

ВПЛИВ ВІКУ КУРЯЧИХ ЕМБРІОНІВ НА РЕПРОДУКЦІЮ ВІРУСУ ІНФЕКЦІЙНОГО БРОНХІТУ ВАКЦИННОГО ШТАМУ «Н120»

А. П. Кубасєв, ветлікар

Інститут ветеринарної медицини НААН

О. Г. Мартинюк, кандидат ветеринарних наук

Національний університет біоресурсів і природокористування

Досліджено вплив умов культивування (віку курячих ембріонів при зараженні) на накопичення клонованого вакцинного штаму вірусу інфекційного бронхіту Н120 у вільних від патогенної флори курячих ембріонах. Виявлено, що незалежно від віку курячих ембріонів при зараженні ВІБ Н120 К311 накопичується в межах ($7,7 \pm 0,17$) – ($8,0 \pm 0,27$) lg ЕІД₅₀/см³. При цьому відзначено, що при використанні ВСП-КЕ 8-9-добового віку вірусомісної сировини накопичується найменше, тоді як при зараженні ВСП-КЕ 11- та 12-добового віку – найбільше.

Ключові слова: *Інфекційний бронхіт (ІБ), вірус інфекційного бронхіту (ВІБ), вакцинний штам Н120 (ВІБ Н120), клон, серотип Massachusetts, вільні від специфічних патогенів (ВСП) курячі ембріони (КЕ), вплив умов культивування, вік ВСП-КЕ.*

Інфекційний бронхіт (ІБ) курей – гостра, високо контагіозна вірусна респіраторна хвороба, яка проявляється у вигляді трьох синдромів: респіраторного, гермінативного та нефрозо-нефритного [16].

Починаючи з першого повідомлення в 1930 році та не зважаючи на масове використання вакцин, ІБ продовжує залишатись серйозною проблемою для птахопромисловості більшості країн, у тому числі і для

України, який впливає на економічну ефективність та розвиток цієї галузі [8; 17].

Вірус інфекційного бронхіту (ВІБ) поширений глобально. Так, згідно з інформацією МЕБ за 2005-2010 рр. спалахи захворювання на інфекційний бронхіт курей зареєстрували у 136 країнах на всіх континентах світу [4]. За даними вітчизняних дослідників в Україні ІБ розповсюджений у всіх областях [4; 5].

Причиною широкого розповсюдження ВІБ є його фено- та генотипне різноманіття (існує у вигляді численних типів, варіантів та атипичних штамів) завдяки природній схильності збудника до змін геному шляхом мутацій та рекомбінації в процесі свого розмноження [14; 15].

Єдиним засобом профілактики та контролю захворювання є вакцинація живими та інактивованими вакцинами. При цьому головну роль відіграють живі вакцини.

У процесі розробки першої вітчизняної живої вакцини проти ІБ курей з використанням вільних від специфічної флори (ВСП) курячих ембріонів (КЕ), так званої ВСП-біотехнології, одним із етапів її розробки було дослідження впливу умов та оптимізація режиму культивування клонованого вакцинного штаму ВІБ Н120 у ВСП-КЕ для одержання вірусомісної сировини високої якості. Якість одержаного вірусу залежить від багатьох факторів, таких як штам вірусу, вік курячих ембріонів, доза зараження, час і температура культивування. Міжнародними стандартами рекомендується визначати оптимальні умови культивування відносно конкретного вакцинного штаму та системи культивування [7; 9; 12; 16].

Вважають, що вік КЕ мало ймовірно впливає на концентрацію ВІБ [13], проте Хітчнер з колегами в процесі дослідження впливу віку КЕ на репродукцію ВІБ дійшли протилежного висновку. Було виявлено, що оптимальним віком для розмноження вірусу є 10- та 11-добові КЕ. При цьому значення титру інфекційної активності ВІБ було приблизно на 0,5 lg вищим, ніж при культивуванні вірусу в КЕ 9- та 12-добового віку [10]. А у випадку

використання штаму ВІБ серотипу Massachusetts різниця становила навіть 0,65-0,8 lg (фактично в 4,4-6,3 рази) [11].

Метою роботи було вивчити вплив віку курячих ембріонів на репродукцію ВІБ Н120 Клон 311 в ВСП-КЕ.

Матеріали і методи дослідження. У роботі використали: клонований вакцинний штам вірусу інфекційного бронхіту Н120 Клон 311 серотипу Massachusetts з титром інфекційної активності 107,8 ЕІД₅₀/см³; ВСП-КЕ 8-12-добового віку, які одержували шляхом інкубації SPF (specific pathogen free) курячих яєць фірми VALO BioMedia GmbH (Куксхавен, Німеччина) відповідно до методичних рекомендацій щодо інкубації яєць сільськогосподарської птиці [6]; фосфатно-сольовий буфер (ФСБ) або 0,9%-ний розчин хлориду натрію та антибіотики гентаміцин сульфат 10%-ний та енрофлоксацин 5%-ний розчин.

Визначення інфекційної активності вірусного матеріалу здійснювали методом титрування його на ВСП-КЕ граничними 10-разовими розведеннями. Курячі ембріони заражали в алантоїсну порожнину в об'ємі 0,1 см³ і інкубували за температури (37±0,1) ° С протягом семи діб після зараження. Курячі ембріони, що загинули в перші 24 години культивування вибраковували. Загибель КЕ після 24 годин з моменту зараження вважали специфічною. Після закінчення терміну інкубації курячі ембріони, що залишались живими, розтинали та оцінювали репродукцію ВІБ за наявністю недорозвинених ембріонів (ембріонів-карликів) за методикою описаною [8].

Титри інфекційної активності розраховували за формулою Кербера в модифікації Ашмаріна [1].

Достовірність різниці значень середніх величин оцінювали за критерієм Стюдента шляхом статистичної обробки цифрового матеріалу з обчисленням середнього арифметичного значення (M) і його похибки (m) та з використанням математико-статистичних таблиць значення t при цьому числі степеней свободи (n) та рівня значимості (p) 0,05 [3].

Результати дослідження. Вплив віку курячих ембріонів на накопичення ВІБ Н120 К311 досліджували використовуючи КЕ п'яти різних строків інкубації: 8-, 9-, 10-, 11- та 12-добового віку. Ембріони курей заражали дозою вірусу 10^3 ЕІД₅₀ та культивували за температури 37°C 30 годин. Результати визначення інфекційної активності матеріалів показані в таблиці.

**Динаміка репродукції ВІБ Н120 Клон 311 у ВСП-КЕ різного віку,
M±m, n=3**

Вік КЕ при зараженні, діб	Титр інфекційної активності вірусу (lg ЕІД ₅₀ /см ³)
8	7,7±0,17*
9	7,97±0,21*
10	7,83±0,21*
11	8,0±0,27
12	7,8±0,17*

* $p \geq 0,05$ порівняно з титром інфекційності, отриманим на КЕ 11-добового віку

При визначенні інфекційної активності отриманих у ВСП-КЕ 8-9-10-11-12-добової інкубації матеріалів ВІБ Н120 К311 виявлено, що накопичення вірусу становить $(7,7 \pm 0,17) - (8,0 \pm 0,27)$ lg ЕІД₅₀/см³. При статистичній обробці отриманих даних з'ясовано, що достовірної різниці між максимальними значеннями титрів інфекційності отриманих матеріалів немає ($p \geq 0,05$), що вказує на те, що вік ВСП-КЕ при зараженні не впливає на рівень максимального накопичення ВІБ Н120 К311.

З іншого боку, слід відзначити, що об'єм зібраного вірусомісного матеріалу від ВСП-КЕ, заражених у 8-добовому віці був найменшим (близько 5-7 см³ з одного КЕ), а від ВСП-КЕ, заражених у 11- та 12-добовому віці – найбільшим (по 10-14 см³). При промисловому виробництві вакцин різниця в об'ємі отриманого вірусомісного матеріалу (за умови однакового значення титру активності вірусу) набуває суттєвого значення, що необхідно брати до

уваги. Тобто, з погляду практики, для накопичення вірусовмісної сировини доцільніше використовувати ВСП-КЕ 11- і навіть, 12-добового віку.

Отже, вік курячих ембріонів при зараженні не впливає на максимальне накопичення інфекційного ВІВ Н120 Клон 311. При цьому при зараженні він володіє опосередкованим впливом, оскільки з практичного погляду, при використанні ВСП-КЕ 11- та 12-добового віку можна отримати найбільшу кількість екстраембріональної вірусовмісної рідини за умови однакового значення титру активності вірусу. Одержані дані підтверджені в серійних дослідах з напрацювання вірусовмісної сировини.

Висновки

Отже, вік курячих ембріонів при зараженні не впливає на рівень максимального накопичення інфекційного ВІВ Н120 Клон 311, хоча, з практичного погляду, для отримання найбільшої кількості вірусовмісної сировини (за умови однакового значення титру активності вірусу) доцільно використовувати ВСП-КЕ 11-, і навіть, 12-добового віку.

Список літератури

1. Ашмарин И. П. Статистические методы в микробиологических исследованиях / И. П. Ашмарин, А. П. Воробьев. – Л. : Медгиз, 1962. – 180 с.
2. Вирус инфекционного бронхита / [В. Н. Сюрин, А. Я. Самуйленко, Б. В. Соловьёв, Н. В. Фомина] // Вирусные болезни животных. – М. : ВНИТИБП, 1998. – С. 183–198.
3. Гланц С. Медико-биологическая статистика / С. Гланц ; пер. с англ. Ю. А. Данилова. – М. : Практика, 1998. – 459 с.
4. Головка А. М. Аналіз епізоотичної ситуації щодо захворювання на інфекційний бронхіт курей в Україні та світі / А. М. Головка, К. В. Даценко // 2011.
5. Инфекционный бронхит кур – современная ситуация, лабораторная диагностика, специфическая профилактика / [Е. А. Краснобаев,

И. А. Собко, В. В. Килименко, А. П. Кубаев] // Сучасна вет. медицина. – 2011. – № 1 (26). – С. 23–28.

6. Третьяков Н. П. Инкубация с основами эмбриологии / Н. П. Третьяков, Г. С. Крок. – 2-е изд., перераб. и доп. – М. : Колос, 1978. – 304 с.

7. Avian infectious bronchitis [Electronic resource] // Manual Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals : 7th ed. – 2012. – Chapter 2.3.2. – Mode of access : <http://www.oie.int/international-standard-setting/terrestrial-manual/access-online/>. – Title from the screen.

8. Egg: embryo weight ratio as an indicator of dwarfism induced by infectious bronchitis virus / [R. G. Dhinakar, K. Suresh Kumar, A. M. Nainar, K. Nachimuthu] // Avian Pathology. – 2004. – 33 (3). – P. 307–309.

9. European Avian viral vaccines: tests for extraneous agents in seed lots // European Pharmacopoeia : [chap.] 2.6.24. – 7-th ed. – Strasbourg : European Directorate for the Quality of Medicines. – 2010. – Vol. 1. – P. 185–191.

10. Hitchner S. B. Growth-Curve studies of chick embryo-propagated infectious bronchitis virus / S. B. Hitchner, P. G. White // Poultry Science. – 1955. – 34 (3). – P. 590–594.

11. Hitchner S. B. Evaluation of the immunity response to infectious bronchitis virus / S. B. Hitchner, G. S. Appleton and R. W. Winterfield // Avian Diseases. – 1964. – Vol. 8, № 1. – P. 153–162.

12. Intervet Poultry Products. – Nobilis Vaccines [Electronic resource]. – Mode of access : <http://www.thepoultrysite.com/focus/intervet/1883/intervet-poultry-products-nobilis-vac>. – Title from the screen.

13. Jordan F. T. The combined influence of age of embryo and temperature and duration of incubation on the replication and yield of avian infectious bronchitis (IB) virus in the developing chick embryo / F. T. Jordan, T. J. Nassar // Avian Pathology. – 1973. – 2 (4). – P. 279–294.

14. Location of the amino acid differences in the S1 spike glycoprotein subunit of closely related serotypes of infectious bronchitis virus / [D. Cavanagh, P. J. Davis, J. K. A. Cook et al.] // Avian Pathology. – 1992. – 21. – P. 33–43.

15. Pathogenicity of a QX strain of infectious bronchitis virus in specific pathogen free and commercial broiler chickens, and evaluation of protection induced by a vaccination programme based on the Ma5 and 4/91 serotypes / [C. Terregino, A. Toffana, M. S. Beato et al.] // Avian Pathology. – 2008. – 37 (5). – P. 487–493.

16. Specific requirements for the production and control of avian live and inactivated viral and bacterial vaccines : Directive 81/852/EEC / European Medicines Agency. – Date of First Adoption November 1992 ; Date of Entry into Force May 1993. – 15 p. // Production and Control of Avian Vaccines III/3363/92.

17. Vegad J. L. Why Is Infectious Bronchitis a Continuous Challenge to Poultry Industry? / J. L. Vegad // Varsha vahini. – 2009. – Vol. 2 (1). – P. 1–4.

Влияние возраста куриных эмбрионов на репродукцию вируса инфекционного бронхита вакцинного штамма «H120»

Кубаев А. П., Мартынюк А. Г.

Изучено влияние условий культивирования (возраста куриных эмбрионов при заражении) на накопление клонированного вакцинного штамма вируса инфекционного бронхита H120 в свободных от специфических патогенов куриных эмбрионах. Обнаружено, что независимо от возраста куриных эмбрионов при заражении ВИБ H120 K311 накапливается в границах $(7,7 \pm 0,17) - (8,0 \pm 0,27) \lg \text{ ЭИД}_{50}/\text{см}^3$. При этом отмечается, что при использовании ССП-КЕ 8-9-суточного возраста вирусодержащей жидкости накапливается меньше, тогда как при заражении ССП-КЭ 11- и 12-суточного возраста – больше.

Ключевые слова: *Инфекционных бронхит (ИБ), вирус инфекционного бронхита (ВИБ), вакцинный штамм H120 (ВИБ H120), клон, серотип Massachusetts, свободные от специфических патогенов (ССП) куриные эмбрионы (КЭ), влияние условий культивирования, возраст ССП-КЕ.*

The influence of age chick embryos on the reproduction of the infectious bronchitis virus vaccine strain "H120"

Kubaev A. P., Martyniuk A. G.

It was studied the influence of culture conditions (age of chick embryos at infection) on the reproduction of cloned vaccine strain of infectious bronchitis virus H120 in specific pathogen free chick embryos. It has been found that IBV H120 C311 accumulates at range $7,7 \pm 0,17 - 8,0 \pm 0,27 \lg \text{EID}_{50}/\text{cm}^3$ regardless of age chicken embryos during infection. It is noted that at the use of the SPF-CE 8-9-day-old virus-containing fluid accumulates less, whereas the infection of SPF-CE 11-and 12-day-old - the greatest.

Keywords: *Infectious bronchitis (IB), infectious bronchitis virus (IBV), the vaccine strain H120 (IBV H120), clone, serotype Massachusetts, specified pathogen free (SPF) chick embryos (CE), the influence of culture conditions, age of the SPF-CE.*