

Ключевые слова: Campylobacter, морфологические признаки, тинкториальные, культуральные, биохимические свойства.

CULTURAL AND BIOCHEMICAL PROPERTIES OF ISOLATES OF CAMPYLOBACTER SPP.

O. Lapa, O. Iakubchak, P. Boyko

National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine, Kyiv

Institute of Veterinary Medicine NAAS, Kyiv, llu706@mail.ru

Summary. The analysis of the scientific literature showed that Campylobacter pathogen in major cases causes acute intestinal infections of bacterial origin spread in developed countries, in some areas even exceeding cases of Salmonellosis and Escherichiosis incidence. Therefore it is necessary to examine general characterization of Campylobacter genus microorganisms and their properties to improve the diagnostics and identification of these pathogens from other food-borne agents.

The goal of the work was research the morphological characteristics, cultural, tinctorial, biochemical properties and sensitivity to antimicrobial substances of the reference strain Campylobacter jejuni and two isolates of Campylobacter, identify their genus. Isolation of strains was performed according to the current DSTU ISO 10272-1: 2007. The differential diagnosis was performed by [Bergey's manual of determinative bacteriology](#). The material for the isolation of Campylobacter was: the cloacal contents of broilers and of the blind gut of cattle and pigs.

We studied strains and identified the types of Campylobacter isolates according to the abovementioned methods.

Tinctorial, cultural properties and morphological characteristics revealed that the studied isolates belonged to the genus Campylobacter – were gram-negative rods moving, looked like a thin, spirally curved around the axis of microorganisms, capsules and spores do not form. During cultivation in liquid nutrient media noted the typical uniform turbidity and sediment in vitro, in dense environments was significantly grayish-white or gray-bluish colonies, resembling drops of condensation. The results of the temperature test were found properties of isolated cultures grown in 25 °C; at 37 °C was observed somewhat slow growth, especially in isolated cultures from pigs and optimal for the growth of all studied microorganisms temperature was  $41 \pm 0,5$  °C. According to the results of these studies, it can be argued that the emphasis of culture related to the genus Campylobacter.

Campylobacter crops not produced indole, not restored nitrate to nitrite, hydrogen sulfide is not formed during cultivation on agar. These biochemical properties showed all three species studied cultures – the allocation of microorganisms from cattle and pigs and standard C. jejuni. As a result of biochemical research, namely the reaction of sodium hipurat, we can say that 1-st isolate, as well as the reference strain was the C. jejuni species (formation a violet color), and 2-nd isolate – was C. coli.

Key words: Campylobacter, morphological features tinctorial, cultural, biochemical properties.

УДК 619:578:616.98

**КУЛЬТИВУВАННЯ ВІРУСУ РИНОТРАХЕЇТУ ІНДИКІВ В КУЛЬТУРІ КЛІТИН VERO**

Мазуркевич В.І. аспірант, dmandred91@gmail.com

Недосеков В.В. д. вет. н., професор, nedosekov1@rambler.ru

Національний університет біоресурсів і природокористування України, м. Київ

**Анотація.** В даній статті описано перевірку двох розроблених методів культивування вірусу Ринотрахеїту Індиків в культурі клітин VERO. За результатами перевірки цитопатогенної дії та кінцевого титру вірусу, показана перевага методу культивування вірусу в матрацах та можливість його подальшого застосування для напрацювання біомаси вірусу.

**Ключові слова:** культура клітин, вірус, цитопатогенна дія, титр, культивування.

**Актуальність проблеми.** Метапневмовірусна інфекція птиці (МПВІП) – високо контагіозне респіраторне захворювання індиків, курей та інших видів домашньої та дикої птиці, яке характеризується запальними процесами верхніх дихальних шляхів [17].

Вірус викликає інфекцію верхніх дихальних шляхів у курей та індиків різного віку. Реєструється в країнах світу де розвинуте птахівництво. Є дані про виділення метапневмовірусу птиці у Росії, США, Південній Африці, Німеччині, Франції, Італії, Іспанії,

Угорщині, Великобританії, Нідерландах, Бразилії, Марокко, Ізраїлі та Тайвані [1, 2, 3, 7]. У 1985 р. в Англії (Уельсі) було зафіксовано випадок гострого високо контагіозного захворювання верхніх дихальних шляхів у індиків, причиною якого виявився пневмовірус. У 1990–1992 рр. хвороба була виявлена у курей в ряді країн Азіатсько-Тихоокеанського регіону. У США (штат Мінесота) у 1996 р. було зафіксовано спалах інфекційного ринотрахеїту індиків, який фіксується тут і по сьогоднішній день. У Росії захворювання фіксується протягом останніх років, починаючи з 2005 р. [15, 17].

Методи для первинної ізоляції МПВІП включають або використання ембріонів яєць [9, 12] або культуру клітин курячої трахеї [7]. Після того як вірус був виділений в одній з цих двох систем, його можна адаптувати до вирощування на культурі клітин [6, 15]. Первинне виділення підтипу С МПВІП було досягнуто за рахунок семи сліпих пасажів польового зразка в фібробластах курячих ембріонів (ФЕК) [5], з наступною адаптацією ізоляту в клітинах VERO. Щоб отримати велику кількість штамів МПВІП для визначення характеристик і створення вакцини, необхідно, щоби вірус виростав до високих титрів *in vitro* в клітинній культурі.

**Завдання дослідження:** підібрати ефективний метод культивування вірусу Ринотрахеїту Індиків в культурі клітин VERO для отримання матеріалу з високою інфекційною активністю.

**Матеріали та методи дослідження.** Культуру клітин VERO, надану ТОВ «Біотестлаб», яка зберігалась в рідкому азоті за температури  $-196^{\circ}\text{C}$ , розморожують при температурі  $37-40^{\circ}\text{C}$ . Суспензію клітин переносять у флакони, в яких розводили у 5–10 разів ростовим середовищем ( $10\text{ см}^3$  4 рази з інтервалом 4 хв.).

Після розморожування суспензію з концентрацією  $150-200\text{ тис./см}^3$  життєздатних клітин вносять у матраци. Клітини вирощують  $48-72$  год. за температури  $37\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ . Через 24 год. змінюють живильне середовище. Для подальшого пересівання з матраців зливають ростове середовище, моношар клітин дворазово обполіскують сумішшю розчинів трипсину і Версену у співвідношенні 1:3. Потім матраци кладуть пластом клітин до гори і витримують  $10-15$  хв. Відшаровані від скла клітини ресуспендують у  $50\text{ см}^3$  поживного середовища. Суспензію клітин ділять з одного матраца на два.

Клітини, що отримані зняттям моношару із матрасів, вносять до поживного середовища (рівні об'єми середовища Ігла і 199 з додаванням 10% сироватки крові великої рогатої худоби) з розрахунку  $100\text{ тис. клітин/см}^3$  і висівають у роллерні бутлі в об'ємі  $450\text{ см}^3$ . Вирощують клітини впродовж  $48-72$  год. за одноразового обертут бутля впродовж  $4-5$  хв.

Для проведення дослідження було взято штам «TRT» вірусу Інфекційного Ринотрахеїту індиків, який зберігався в банку штамів мікроорганізмів ТОВ «Біотестлаб».

Для зараження культури клітин VERO було розроблено дві системи культивування вірусу – на матрацах (1) і в роллерних бутлях (2).

1) Для зараження готують моношар культури клітин VERO, висіваючи клітини в концентрації  $600-800\text{ тис. клітин/см}^3$  в матраци, заражали штамом «TRT», після чого культивують при температурі  $37-38^{\circ}\text{C}$  протягом 7 днів, після чого культуру заморожують. Культуральну суспензію після розморожування і визначення в ній рівня ураження моношару пересівали.

2) Перещеплювану культуру клітин VERO культивували в роллерних бутлях об'ємом  $450\text{ см}^3$ , як ростове середовище використовували поживні середовища ПСС, ПСП з 10% сироваткою крові ВРХ.

В культуру клітин вносили вірус. Інфіковані культури вміщували в роллерний апарат і для контакту вірусу з клітинами витримували 1 год. при температурі  $37,5-38,0^{\circ}\text{C}$ . Потім вносили підтримуюче середовище з 2% інактивованою сироваткою крові ВРХ і культивували 3 дні.

Кожним методом проводили 5 пасажів культивування, перевіряючи рівень ЦПД вірусу на кожному пасажі методом світлової мікроскопії.

Активність вірусу перевіряли за допомогою світлової мікроскопії, визначаючи площу цитопатогенної дії вірусу та утворення характерних синцитій. Також, на останньому пасажі визначали титр вірусу в культурі клітин методом Ріда та Менча [12] і виражали в Ід тканинній цитопатичній дозі на  $\text{см}^3$  (ТЦД<sub>50</sub>/см<sup>3</sup>).

**Результати дослідження.** Метою даної роботи було підбирання найбільш ефективного методу *in vitro* культивування штаму вірусу Ринотрахеїту Індиків на культурі клітин Vero. Результати культивування перевіряли методом мікроскопії кожного пасажу і визначенням рівня ЦПД вірусу, градуючи його від 25% (+) до 100% (+++++) (табл.1).

Таблиця 1

## Цитопатогенна дія вірусу Ринотрахеїту індиків

Пасаж	Метод культивування	
	№ 1	№ 2
1	+	–
2	+	–
3	++	+
4	+++	+
5	++++	++

Послідовна мікроскопія кожного пасажу показала швидшу адаптацію вірусу до культури клітин при культивації вірусу на матрацах. Вірус почав проявляти ЦПД вже на першому пасажі ( $\approx 25\%$ ) і до 5-го пасажу ЦПД досягало 90%. На останньому пасажі титр вірусу склав  $7,3 \lg \text{TCID}_{50}/\text{cm}^3$ .

Вірус в культурі клітин, яку культивували в роллерних бутлях перші два пасажи не проявляв ЦПД. На третьому пасажі цитопатогенна дія вірусу досягла 25% поверхні моношару, а до закінчення досліду досягла не більше 40%. На останньому пасажі титр вірусу склав  $3,6 \lg \text{TCID}_{50}/\text{cm}^3$ .

**Висновки**

Після порівняння результатів проведених робіт, які наведені в табл. 1, а також кінцевого титру вірусу в культурі клітин можна сказати, що використання методу вирощування на матрацах для адаптації і вирощування штаму вірусу «TRT» Ринотрахеїту Індиків на культурі клітин VERO найкраще підходить для подальшого отримання матеріалу з високою інфекційною активністю та напрацювання біомаси вірусу.

**Література**

- Bennett R.S. Detection of avian pneumovirus in wild Canada geese (*Branta Canadensis*) and blue-winged teal (*Anas discors*) / R.S.Bennett // *Avian Dis.* – 2002. – V. 46, №4. – P. 1025–1029.
- D'Arce R.C.F. Subtyping of new Brazilian avian metapneumovirus isolates from chickens and turkeys by reverse transcriptase-nested-polymerase chain reaction / R.C.F.D'Arce // *Avian Pathol.* – 2005. – V.34. – P. 133–136.
- Dani M.A. Molecular characterization of Brazilian avian pneumovirus isolates: comparison between immunochemiluminescent Southern blot and nested PCR / M.A.Dani // *J. Virol. Methods.* – 1999. – V.79. – P. 237–241.
- Gough R.E. Isolation of an avian pneumovirus from broiler chickens / R.E.Gough // *Vet. Rec.* – 1994. – V.134. – P. 353–354.
- Goyal S.M. Isolation of avian pneumovirus from an outbreak of respiratory illness in Minnesota turkeys / S.M.Goyal, S.-J.Chiang, A.M.Dar, et al. // *J. Vet. Diagn. Invest.* – 2000. – V.12 (2). – P.166–168.
- Grant M.B.-J.C. An enzyme-linked immunosorbent assay for the serodiagnosis of turkey rhinotracheitis infection / M.B.-J.C.Grant, G.P.Wilding // *Vet. Rec.* – 1987. – V.120 (12). – P. 279–280.
- McDougall J.S. Turkey rhinotracheitis: preliminary investigations / J.S.McDougall, J.K.Cook // *Vet. Rec.* – 1986. – V.118 (8). – P. 206–207.
- Naylor C.J. Demonstration of a virulent subpopulation in a prototype live attenuated turkey rhinotracheitis vaccine / C.J.Naylor, R.C.Jones // *Vaccine.* – 1994. – V.12 (13). – P. 1225–1230.
- Nedosekov V. Infectious animal pathology: problems and prospects / V.Nedosekov // *International scientific electronic journal "Earth Bioresources and Quality of Life"*. – НУБіП України. – 2012. – № 1.
- Nedosekov V. Biological properties of salmonella isolated from chickens in Ukraine farms / V.Nedosekov, O.Gomzykov // *International scientific electronic journal "Earth Bioresources and Life Quality"*. – НУБіП України. – 2013. – №3.
- Panigrahy B. Experimental and serologic observations on avian pneumovirus (APV/turkey/Colorado/97) infection in turkeys / B.Panigrahy, D.A.Senne, J.C.Pedersen, et al. // *Avian Dis.* – 2000. – V.44 (1). – P. 17–22.

12. Reed, L.J.; Muench, H. "A simple method of estimating fifty percent endpoints" / L.J.Reed, H.Muench // The American Journal of Hygiene. (1938). 27: 493–497.
13. Shin H.J. Susceptibility of broiler chicks to infection by avian pneumovirus of turkey origin. / H.J.Shin, B.McComb, A.Back, et al. // Avian Dis. – 2000. – V.44 (4). – P. 797–802.
14. Song M.-S. Genetic characterization of avian metapneumovirus subtype C isolated from pheasants in a live bird market / M.-S.Song, J.-Y.Shin // Virus res. – 2007. – V. 128. – P. 18–25.
15. Williams R.A. Development of a live attenuated vaccine against turkey rinotracheitis / R.A.Williams, C.E.Savage, R.C.Jones // Avian Pathol. – 1991. – V.20. – P. 45–55.
16. Борисова О.А. Метапневмовирусная инфекция птиц / О.А.Борисова. – Владимир: ФГУ «ВНИИЗЖ». – 2007. – С. 5–10, 26–31.
17. Корнієнко Л.Є. Інфекційні хвороби птиці (Друге видання доповнене) / Л.Є.Корнієнко, Л.І.Наливайко, В.В.Недосєков та ін. // Херсон: Олді-Плюс, 2013. – 528 с.
18. Лазуткина, Е.А. эпизоотологические особенности и эффективность специфической профилактики пневмовирусной инфекции (синдром опухшей головы) у цыплят-бройлеров: автореф. дис. ... канд. вет. наук: спец. 16.00.03 – ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология, микология с микотоксинологией и иммунология. – М.: 2009. – 14 с.

#### КУЛЬТИВИРОВАНИЕ ВИРУСА РИНОТРАХЕИТА ИНДЮКОВ В КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК VERO

Мазуркевич В.И., аспирант, [dmandred91@gmail.com](mailto:dmandred91@gmail.com), Недосєков В.В. д. вет. н., профессор [nedosekov1@rambler.ru](mailto:nedosekov1@rambler.ru)

Национальный университет биоресурсов и природопользования Украины, г. Киев

Аннотация. В данной статье описано проверку двух разработанных методов культивирования вируса Ринотрахеита Индюков в культуре клеток VERO. По результатам проверки цитопатогенного действия и конечного титра вируса, показана преимущество метода культивирования вируса в матрасах и возможность его дальнейшего применения для наработки биомассы вируса.

Ключевые слова: культура клеток, вирус, цитопатогенное действие, титр, культивирование.

#### CULTIVATION OF TURKEY RHINOTRACHEITIS VIRUS IN VERO CELL CULTURE

Mazurkevych V.I. postgraduate student

[dmandred91@gmail.com](mailto:dmandred91@gmail.com)

Nedosekov V.V., Doctor of Veterinary Science, Professor, [nedosekov1@rambler.ru](mailto:nedosekov1@rambler.ru)

National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine, Kyiv

Summary. The aim of this work was to choose an effective method for cultivation of field isolate of turkey rhinotracheitis virus «TRT» for further development of virus biomass and development of the vaccine. Methods for the primary isolation of aMPV virus include the use of eggs embryos or cell culture of chicken trachea. Once the virus was isolated in one of the two systems, it can be adapted to growing in cell culture. For cultivation of field isolate was selected cell culture VERO (African green monkeys kidney cells), as the most suitable cell culture for the virus growth. For the study were developed two methods of the virus cultivation in the VERO cell culture - on mattresses and roller bottles. VERO cell culture, provided by Biotestlab Ltd., which was stored in liquid nitrogen at a temperature of minus 196 °C, thawed at 37–40 °C. After revitalization of cells and the development of their required volume, monolayers were infected with field isolate of turkey rhinotracheitis virus. The method of cultivation of the virus on mattresses included seeding of cells monolayer, which was infected with a virus and then cultivated at 37–38° C for 7 days, followed by freezing of the culture. The culture suspension after thawing and determination of the virus cytopathogenic action was passed.

The second method of the virus cultivation using roller bottles consisted of production of VERO cells monolayer and their subsequent infection with studied strain of the virus. Than infected cultures were placed in roller apparatus and for the contact of the virus with cells were kept for 1 hour at a temperature of 37,5–38,0 °C. Then added a supportive medium with 2 % inactivated bovine serum and cultivated for 3 days.

Conducted five passages of the virus by both methods controlling the cytopathogenic action (CPA) of the virus, and after the 5th passage checked final titer of the virus using the method of Reed and Mench. Sequential microscopy of each passage showed faster adaptation of the virus to the cell culture in the cultivation of the virus on mattresses. Cytopathogenic action of the virus began to show at the first

passage ( $\approx 25\%$ ) and up to the 5th passage cytopathogenic action of the virus has reached 90%. On the last passages measured virus titer, which was  $7,3 \lg \text{TCID}_{50} / \text{cm}^3$ .

The virus in cell culture which were cultured in roller bottles at the first two passages showed no cytopathogenic action. On the third passage cytopathogenic action of the virus has reached 25 % of the monolayer, and by the end of the experiment has reached up to 40 %. On the last passage measured virus titer, which was  $3,6 \lg \text{TCID}_{50} / \text{cm}^3$ .

After comparing of the cytopathogenic actions and final titer of virus in cell cultures it was found that using the method of cultivation on mattresses for adaptation and growing of the strain «TRT» of turkey rhinotracheitis virus in cell culture VERO was best suited to receive further material with high infectious activity and the development of virus biomass.

Key word: cell culture, virus, cytopathogenic action, titer, cultivation.

УДК 636.085.3:619

## ЕПІЗООТОЛОГІЧНІ ОСОБЛИВОСТІ, КЛІНІЧНІ ОЗНАКИ ТА ПАТОЛОГО-АНАТОМІЧНІ ЗМІНИ ЗА ПАСТЕРЕЛЬОЗУ БРОЙЛЕРІВ

Передера О.О., Лаврінченко І.В., Жерносік І.А.  
Полтавська державна аграрна академія, м. Полтава

**Анотація.** У статті наведено результати дослідження спалаху пастерельозу бройлерів в приватному господарстві. В умовах приватного господарства вивчали епізоотичну ситуацію в осередку, клінічні ознаки і патолого-анатомічні зміни за пастерельозу бройлерів.

В приватному господарстві захворювання було зареєстроване на початку жовтня 2015 року, тоді раптово почали гинути бройлери 3-х тижневого віку. Хвороба впродовж тижня швидко поширювалася по стаду, кількість загинувших збільшувалася.

Встановлено, що спалах пастерельозу курей в досліджуваному приватному господарстві виник спонтанно, без занесення збудника ззовні. У даному приватному господарстві в приміщенні, де утримувалися кури знаходилися кролі. Також, у це приміщення мали вільний доступ кіт та собака. Тому збудник міг бути занесений цими тваринами. Не виключено, що спалах пастерельозу курей спричинили кролі, оскільки цей вид тварин надзвичайно сприйнятливий до пастерельозу і частина з них могла бути носіями збудника.

Швидкому поширенню та важкому прояву пастерельозу сприяла велика кількість сприйнятливого молодняка – тритижневих курчат на обмеженій території. Клінічні ознаки не були характерними: у птиці реєстрували лише анемію слизових оболонок, гребеня, сережок та шкіри, що було характерним для надгострого та гострого перебігу. Трупі птиці не були виснажені, шкіра курчат була анемічною або мала синюшний відтінок. Після розтину трупів загинувших курчат з порожнини витікала жовта желеподібна рідина. Патолого-анатомічні зміни внутрішніх органів що були виявлені при розтині загинувшої птиці були типовими для моноінфекції, спричиненої збудником пастерельозу. Відмічали типову картину пастерельозного сепсису: множинні крапчасті геморагії на серозних та слизових оболонках внутрішніх органів, на внутрішній поверхні грудних м'язів та кілі, в грудочеревній порожнині — накопичення драглистого ексудату жовтого кольору, що пов'язано з порушенням білкового обміну. Серце – збільшене, м'яке, з крововиливами на епікарді. При патолого-анатомічному дослідженні встановлено, що стінки порожнини серця розтягнуті, а сам орган мав округлу форму. Поверхневі судини були кровонаповнені.

Найбільш яскраві зміни стосувалися печінки. Даний орган характеризувався збільшенням об'єму, неоднорідним темно-фіолетовим забарвленням та підкапсульними крововиливами. Жовчний міхур – збільшений, наповнений жовцю темно-зеленого кольору. Тонкий відділ кишківника був гіперемійований, стінка потовщена та набрякла. На поверхні органу відзначали переповнення судин та значну кількість крапкових геморагій. На слизовій оболонці цього органу виявляли ознаки геморагічного запалення та численні крововиливи.

**Ключові слова:** пастерельоз, бройлери, клінічні ознаки, патолого-анатомічні зміни.

**Актуальність проблеми.** За останні роки в Полтавській області кількість приватних господарств, що вирощує бройлерів суттєво збільшилася. Це пов'язано з доступністю кормів,