

идных тканей (трехклеточная система иммуногенеза) // Успехи современ. биологии. — Т. 69. — Вып. 2. — С. 261–271

13. Пол У.Е. (Paul W.E.). Иммунная система // Иммунология: пер. с англ. / Под ред. У.Е. Пола. — Т. 1. — М., 1987. — С. 14–45.

14. Ройт А. (Roit I. M.). Основы иммунологии: пер. с англ. — М.: Мир, 1991. — 328 с.

15. Сидорова Е.В. Молекулярные механизмы биосинтеза и клеточная дифференцировка. // М.: Наука, 1978. — С. 67–101.

16. Смородинцев А.А., Лузянина Т.Я., Смородинцев Ал.А. Основы противовирусного иммунитета. — Л.: Медицина, 1975. — 312 с.

17. Федосеева В.П., Порядин Г.В., Ковальчук Л.В. и др. Руководство по иммунологическим и аллергологическим методам в гигиенических исследованиях. — М.: Промедэк, 1993. — С.13–93.

18. Хаитов Р.М., Игнатъева Г.А., Сидорович И.Г. Иммунология. — М.: Медицина, 2000. — 432 с.

19. Хаитов Р.М., Пинегин Б.В. Современные подходы к оценке основных этапов фа-

гоцитарного процесса // Иммунология. — 1995. — № 4. — С. 3–8.

20. Шевырев Н.С. Введение в ветеринарную иммунологию. Учебное пособие. Курск: КГСХФ, 1999. — 249 с.

21. Ярилин А.А. Основы иммунологии. М.: Медицина, 1999, 608с.

22. Beutler E. Glucose-6-phosphat dehydrogenase deficiency and red cell glutathione piroxidase // Blood. — 1977. — V. 49, № 3. — P. 467–469.

23. Glick B. The avian immune system// Avian Dis., 1979, Vol. 23, № 2, P. 282–289.

24. Gorman N. T.: Immunology. In: Textbook of veterinary internal medicine. Eds. S.J.Ettinger and E.C.Feldman. — W.B. Saunders Co., Philadelphia, London, Toronto, Montreal, Sydney, Tokyo, 1995, vol. 2, pp 1978.

25. Hafter K., Seveian M. In vitro studies on the macrophages of resistant and auctoptibility chickens with Marek's disease // Poultry sci. — 1979. — Vol. 58. — P. 295–297.

26. Hearst I. E. et al Characterization of murine lung and peritoneal macrophages // Beticuloendo the J. Sol. — 1980. — Vol. 27. — № 5. — P. 443–454.

27. Mogensen S. C. Role of macrophages in natural resistance to virus infections // Microbiol.Rev. — 1979. — Vol. 43. — № 1. — P. 1–26.

28. Weiss J, Victor M. Role of charge and hydrophobic interactions in the action on the bactericidal permeability-increasing protein of neutrophils on gram-negative bacteria.// J. Clin Invest. — 1983. — Vol. 71. — № 3. — P. 540–549. □

Для контактов с авторами:
Джавадов Эдуард Джавадович
Вихрева Ирина Николаевна
e-mail: kronvet@mail.ru
Прокофьева Наталья Ивановна
Джавадов Михаил Эдуардович
Тарлавин
Николай Владимирович

УДК 619:616.23:636.5

ОЦЕНКА ПРОТЕКТИВНЫХ СВОЙСТВ АТТЕНУИРОВАННОГО ШТАММА V1-1/96 ВИРУСА ИНФЕКЦИОННОГО БРОНХИТА ПРОТИВ ПОЛЕВОГО ШТАММА ИБК 793В У ПРОМЫШЛЕННЫХ ЦЫПЛЯТ

Penzes Z., Global Biological R&D Director

Soos B. P., Scientist, Ceva-Phylaxia

Zolnai A., Scientist, Ceva-Phylaxia

Nogrody N., Senior Scientist

Palya V., Scientif Support Director, SSIU

Компания Ceva Phylaxia, Будапешт, Венгрия

Chacon J., Technical Manager

Компания Ceva Saude Animal Ltda, Паулина, Бразилия

Glavits R., Histopathologist, Head of Histopathology Department

Институт MgSzH Veterinary Diagnostic Institute, Будапешт Венгрия

Аннотация: В статье приведены результаты исследования протективных свойств аттенуированного штамма вируса ИБКV1-1/96 против заражения гомологичным полевым вирусом. Исследование показало, что аттенуированный штамм вируса ИБК V1-1/96 может применяться для создания защиты цыплят от группы вирусов ИБК серотипа 793В.

Abstract: The results of the research have been given in the paper on the protective properties of the attenuated IBKV1-1/96 virus strain against chicken infection with the homologous field virus. The research has shown that the attenuated IBK V1-1/96 virus strain can be used for chicken protection against virus group IBK serotype 793B.

Ключевые слова: инфекционный бронхит кур, аттенуированный штамм вируса ИБК V1-1/96, цилиарная активность.

Key Words: chicken infectious bronchitis, attenuated IBK V1-1/96 virus strain, ciliar activity.

Введение

Инфекционный бронхит кур (ИБК) приносит убытки птицеводческим предприятиям во всем мире и может являться

причиной респираторных заболеваний, нефрита, энтерита, снижения оплодотворения яиц, ухудшения яйценоскости и качества яиц [2]. Вирус ИБК содержит

четыре структурных белка. Гликопротеин S содержит эпитопы и детерминанты вируснейтрализующих антител защитного иммунитета, адгезии клеток

и специфичности серотипа [5]. Профилактика ИБК — трудная задача, поскольку для возбудителя характерно высокое генетическое разнообразие, малый срок генерации и высокая частота мутаций. Во всем мире были идентифицированы многочисленные серотипы вируса ИБК, между которыми практически отсутствует перекрестный иммунитет. Штамм 793В ИБК наиболее распространен в Европе [6], кроме того, он был обнаружен и на других континентах [3]. В Венгрии от стада бройлеров был выделен полевой штамм вируса ИБК, родственного штамму 793В ИБК. После молекулярного исследования вирус, названный штаммом V1-1/96, аттенуировали и исследовали на безопасность для SPF и промышленных цыплят.

Цель исследования

Целью исследования являлась оценка протективных свойств аттенуированного штамма вируса ИБК V1-1/96, обеспечивающих защиту промышленных цыплят против заражения гомологичным полевым вирусом.

Материалы и методы исследования

Вирусы. Аттенуированный штамм вируса ИБК V1-1/96 использовали для вакцинации цыплят, а гомологичный полевой вирус 793В — для заражения. Для сравнения в настоящем исследовании использовали также коммерческую вакцину против ИБК, серотип 793В.

Схема исследования. Шестидесят промышленных цыплят в суточном возрасте разделили на три группы. Птиц из первой группы вакцинировали штаммом V1-1/96 спрей-методом в дозе $2,8 \log_{10} \text{EID}_{50}/\text{гол}$. Птиц из второй группы вакцинировали коммерческой вакциной спрей-методом в дозе $3,7 \log_{10} \text{EID}_{50}/\text{гол}$. Цыплят третьей группы не вакцинировали. Через 3 нед. после вакцинации каждой птице из трех групп внутритрахеально ввели вирус ИБК по $4,2 \log_{10} \text{EID}_{50}$.

Клиническое наблюдение. После введения вакцины и заражения цыплят ежедневно исследовали на наличие клинических симптомов. Оценивали клиническое состояние птиц (тип симптомов, число птиц с симптомами и пр.).

На 5-й и 6-й дн. после заражения цыплят обследовали на наличие клинических симптомов, их состояние оценивали по шкале от нуля до трех баллов: один балл — нормальное дыхание; два балла — легкие/редкие трахейные хрипы, возникающие при движении, или умеренные/частые трахейные хрипы в неподвижном состоянии, но не постоянно; три балла — выраженные постоянные трахейные хрипы.

МТ тела и среднесуточный привес (прирост МТ). Цыплят взвешивали на 21-й, 26-й и 27-й дн. после вакцинации. МТ и среднесуточный привес определяли у птиц каждой группы [1].

Цилиарная активность. Срезы тканей из верхней, средней и нижней частей трахеи, третье, четвертое и пятое кольца трахеи поместили в культуральную среду MEM-H, на 96-луночный планшет. Кольца трахеи исследовали под микроскопом при слабом увеличении и оценивали по шкале цилиостаза от 0 (100%-я цилиарная активность) до 4 (отсутствие активности). Для каждой группы птиц рассчитали средний показатель цилиостаза. Максимальный показатель для каждой трахеи составил 40 (10 колец/трахея). Цилиарную активность оценивали в течение 2 ч.

Оценку цилиарной активности выполняли в соответствии с положением 04/2008:0442 пункта 2.4.3.1 Европейской фармакопеи. Для данного участка трахеи цилиарную активность считали нормальной, если не менее чем у 50% колец имелось активное цилиарное движение (соответствует 0, 1 или 2 баллам — цилиарная активность 100, 75 или 50%, соответственно). Птицу считали здоровой, если не менее чем в 9 из 10 колец наблюдали нормальную цилиарную активность [Z. Penzes, J. Chacon, B.P. Soos, R. Glavits, A. Zolnai, N. Nagy, V. Palya].

Восстановление вируса. На шестой день после заражения после полного удаления трахеи отделяли фрагмент ткани из средней части трахеи размером 2,5 см, в трахею осторожно вводили стерильный тампон и брали мазок одним движением по вертикали. Мазки со слизистой оболочки трахеи каждой птицы переносили в 1,5 мл фосфатно-солевого буфера,

который охлаждали с помощью натурального льда. Затем 0,2 мл этой суспензии инокулировали в аллантоисную полость пяти яиц с зародышем 10-дневного возраста, которые инкубировали в течение шести дней. Яйца, в которых не было живого эмбриона через один день инкубации, отбраковывали как случаи неспецифической гибели эмбрионов. Особенности гибели эмбрионов, типичных для вируса ИБК, и поражений остальных яиц исследовали в конце инкубационного периода. Была исследована аллантоисная жидкость каждого образца (пять яиц) методом иммуносорбентного ферментного анализа.

Количественный анализ вирусного вируса. Для количественного анализа РНК вируса методом ПЦР в реальном времени использовали суспензию из слизистой оболочки трахеи, приготовленную для выделения вирусов [1]. Вирусную РНК выделяли с использованием набора лабораторных реагентов *QIAamp® Viral RNA Mini (Qiagen)*. Производили обратную транскрипцию вирусной РНК в кДНК с использованием *pd(N)6* гексамер 5-фосфата (*Fermentas*) в соответствии с инструкцией производителя, кДНК подвергли количественной ПЦР для определения количественного содержания вируса ИБК в образце. Для амплификации 143-bp фрагмента 5'-UTR использовали праймеры IBV5_GU391 и IBV5J3L533 для ПЦР, а также двояко-меченный зонд *Taqman IBV5_G*.

Гистология. Взяли по одному образцу тканей с верхней и нижней частей трахеи и поместили в пробирки с 10%-ным буферным раствором формальдегида. После фиксации препарировали фрагменты размером 3–5 мм и окрасили их гематоксилином и эозином. Исследовали фрагменты трахеи на предмет стирания ресничек эпителия, эпителиальной метаплазии и дегенерации, лимфоцитарной инфильтрации в основу слизистой оболочки, оценили поражение по следующей шкале: 0 — норма, 1 — незначительное поражение, 2 — умеренное поражение, 3 — тяжелое поражение.

Статистический анализ. Был проведен анализ следующих данных: МТ, среднесуточный привес, титр вируса

egg inject[®]

IN OVO SYSTEM

СОЗДАН БЫТЬ БЕЗОПАСНЫМ



Разработано **Ecat-ID**

Egginject[®]

Egginject[®] позволяет проводить безопасную in ovo вакцинацию в современных инкубаториях благодаря

«Технологии двухэтапного введения иглы разным давлением»

www.egginject.com

ООО «Сева Санте Анималь»
109428, Россия, г. Москва, Рязанский пр-т, 16
Телефон: 8 (495) 729-59-90. Факс: 8 (495) 729-59-93
www.ceva-russia.ru



(количество вируса), а также их статистическое сравнение с результатами однофакторного дисперсионного анализа (Statgraphics) при уровне значимости 5%.

Результаты

Среднесуточный привес (прирост МТ). У птиц контрольной группы на 5-й и 6-й дн. после введения вирулентного вируса ИБК наблюдали статистически более низкий ежедневный привес, чем у птиц из вакцинированных групп. На пятый день после введения вирулентного вируса ИБ между птицами из двух вакцинированных групп не наблюдали статистически значимых различий, однако на пятый день после введения вирулентного вируса ИБК у птиц из группы, вакцинированной штаммом V1-1/96, наблюдали статистически более высокий ежедневный привес, чем у птиц из группы, обработанной коммерческой вакциной.

Клиническая система оценки. Клинических симптомов, которые можно связать с вакцинацией вирусом ИБК, не наблюдали. Только у одной птицы из вакцинированной группы после заражения отмечали незначительные респираторные симптомы. В этом случае число баллов равнялось единице (незначительное поражение), а у нескольких птиц в контрольной группе отмечали симптомы умеренного поражения.

Цилиарная активность. Высокий количественный показатель цилиостаза отмечен спустя 5–6 дн. после заражения у невакцинированных птиц, что указывает на правильную модель заражения. У птиц из групп, обработанных вакциной, этот показатель был ниже, чем у птиц из контрольной группы, и явного расхождения между ними по соответствующему показателю не выявлено. Согласно критерию Европейской фармакопеи, у цыплят нормальная цилиарная активность, если 9 из 10 исследуемых трахейных колец имеют цилиарную активность более 50%. В группе, обработанной V1-1/96, у 80 % птиц была нормальная цилиарная активность спустя 5–6 дн. после заражения, тогда как в группе, обработанной коммерческой вакциной, у 70 и 80% птиц была

нормальная цилиарная активность спустя 5 и 6 дн. после заражения соответственно.

Выделение вируса. Индуцирующий вирус может быть выделен из клеток цыплят из групп, обработанных вакциной, но его процентное содержание будет ниже по сравнению с контрольной группой. Индуцирующий вирус был выделен повторно из клеток всех невакцинированных птиц, которых заражали. Процентное содержание выделенного индуцирующего вируса в группе, обработанной вакциной V1-1/96 (30%), было таким же, как в группе, обработанной коммерческой вакциной.

Содержание вируса в тканях трахеи. Спустя 6 дн. после заражения методом количественной ПЦР было определено явное расхождение между РНК титра индуцирующего вируса в группах птиц вакцинированных и невакцинированных. Титр вируса в клетках контрольной группы был значительно выше (2,7 log₁₀ EID₅₀), чем у вакцинированных птиц (1,7–1,8 log₁₀ EID₅₀). Статистически значимого расхождения по соответствующему показателю между вакцинированными птицами из двух групп не выявлено.

Микроскопическое исследование. Микроскопически выявляемые поражения, вызванные введением индуцирующего вируса (потеря ресничек и дегенерация эпителия), наблюдали у всех цыплят невакцинированной группы и у одной птицы из группы, обработанной коммерческой вакциной. В целом у вакцинированных птиц отмечены незначительные поражения. Средний гистологический показатель трахеи был выше в контрольной группе (2,5 балла), тогда как в группе вакцинированных птиц этот показатель был ниже (1,1–1,2 балла). У птиц из вакцинированных групп расхождений по данному показателю не выявлено.

Выводы

При вакцинации цыплят штаммом V1-1/96 ИБК отмечено проявление сильных протективных свойств, обеспечивающих защиту против инфицирования гомологичным вирусом 793В ИБК.

Литература

1. Callison S. A., Hilt D. A., Boyton T. O., Sample B. F., Robison R., and Swayne D. E. 2006. Development and evaluation of a real-time TaqMan RT-PCR assay for the detection of infectious bronchitis virus from infected chickens. *Journal of Virological Methods* (Оценка результатов ПЦР в режиме реального времени по технологии TaqMan вируса инфекционного бронхита, полученного от инфицированных цыплят). 138: 60-65.
2. Cavanagh D., and Gelb J. 2008. Infectious bronchitis. (Инфекционный бронхит) In Y. M. Saif, H. J. Barnes, J. R. Glisson, A. M. Fadly, L. R. McDougaid & D. E. Swayne (Eds.), *Diseases of Poultry* (Заболевания домашней птицы), 12th ed (pp. 117–135). Ames: Iowa State Press.
3. Cook J. K., Orbelí S. J., Woods M. A., and Huggins M. B. A survey of the presence of a new infectious bronchitis virus designed 4/91 (793В) (Обследование для выявления нового вируса инфекционного бронхита 4/91 (793В)). 1996. *Veterinarian Record*. 138: 178–180.
4. European Pharmacopoeia 6.1 04/2008:0442 Avian Infectious Bronchitis Vaccine (live) monograph, 2-4-3. Immunogenicity, 2-4-3-1. Ciliary activity of tracheal explants; 2-4-3-2. Virus recovery from tracheal swabs. (Монография о (живой) вакцине инфекционного бронхита птиц. Иммуногенность. Цилиарная активность клеток из тканей трахеи. Восстановление вируса из мазков трахеи).
5. Ignjatovic J., and Galli L. 1994. The S1 glycoprotein but not N or M proteins of avian infectious bronchitis virus induces protection in vaccinated chickens (Иммунитет в организме вакцинированных цыплят создается благодаря гликопротеину S1, но не благодаря протеину N или M). *Archives of virology*, 138, 117–134.
6. Worthington K. J., Currie R. J. W., and Jones R. C. 2008. A reverse transcriptase-polymerase chain reaction survey of infectious bronchitis virus genotypes in Western Europe from 2002 to 2006 (Исследование генотипов инфекционного бронхита с использованием полимеразной цепной реакции с обратной транскриптазой, Западная Европа, 2002–2006 гг.). *Avian Pathology*, 37, 247–257. □

Для контактов с авторами:

Penzes Zoltan

e-mail: zoitan.penzes@ceva.com

Soos Pal

Zolnai Anna

Nogrady Noemi

Palya Vilmos

Chacon Jorge

Glavits Robert