

УДК 636.09:616.233-002:578.834:636.5

Г. А. ПОПОВА

А. П. КУБАЄВ

А. Ю. НЕМАШКАЛО, аспірант

Інститут ветеринарної медицини НААН, м. Київ.

ПОРІВНЯЛЬНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ АНТИГЕННИХ ТА ПАТОГЕННИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ ПОЛЬОВИХ ІЗОЛЯТІВ QX-ПОДІБНОГО ТИПУ І ШТАМІВ СЕРОТИПУ MASSACHUSETTS ВІРУСУ ІНФЕКЦІЙНОГО БРОНХІТУ КУРЕЙ

Вивчено антигенну спорідненість польових ізолятів ВІБ QX-подібного типу B2 (виділений від курчат бройлерів) і КН4 (виділений від курей несучок) між собою, а також з вакцинним штамом H120 серотипу Massachusetts. Ступінь антигенної спорідненості між ізолятами склав 92 % , а з вакцинним штамом 10,2 % і 11 % відповідно. Польові ізоляти, крім респіраторного захворювання у 3-тижневих курчат, при окулярному зараженні, викликають ураження нирок і сечоводів з відкладенням уратів. Референтний вірулентний штам M41 серотипу Massachusetts викликає тільки респіраторне захворювання, а нефропатогенністю не володіє.

Ключові слова: Інфекційний бронхіт (ІБ), вірус інфекційного бронхіту (ВІБ), польові ізоляти, QX, вакцинний штам H120, вірулентний штам M41, Massachusetts, антигенна спорідненість, патогенність

Інфекційний бронхіт (ІБ) – гостре контагіозне вірусне захворювання курей різного віку, що проявляється у курчат респіраторним і/або нефрозо-нефритним синдромом, у курей – враженням гермінативних органів та органів сечовивідної системи [1].

Захворювання викликає велику загибель серед курчат до 30-60 денного віку та спричиняє величезні втрати в уражених ІБ стадах, як м'ясного, так і яєчного напрямків [1].

Вірус інфекційного бронхіту (ВІБ) – пташиний коронавірус родини Coronaviridae, який має одно ланцюгову РНК «+», геном укладений в глікопротеїнову оболонку. ВІБ характеризується високою частотою виникнення серотипів та антигенних варіантів за рахунок змін геному шляхом мутацій та рекомбінацій, які регулярно виникають в польових умовах. На даний час нараховують більше 80 різних серотипів і варіантів ВІБ. Причому перехресний захист між різними серотипами частіше за все є відсутнім [2, 3].

Контроль ІБ базується на щепленні птахопоголів'я з використанням живих та інактивованих вакцин різних серотипів. Найчастіше використовують вакцинний штам H120 ВІБ серотипу Massachusetts. Це обумовлено здатністю цього штаму забезпечувати гетерологічний перехресний захист проти різних серотипів ВІБ, особливо в комбінації з вакцинними штамми інших серотипів [4, 5].

Можливість одночасної циркуляції в господарствах декількох серотипів ВІБ, поява нових штамів і варіантів збудника, які суттєво відрізняються від

відомих серотипів та вакцинних штамів ВІБ, призводить до виникнення захворювання серед поголів'я птахів щеплених проти ІБ.

Протягом 2011-2013 років, окремо в двох господарствах при спалахах ІБ-подібного захворювання серед щепленого проти ІБ птахопоголів'я, було виділено 2 ізоляти ВІБ, які отримали назву Б2 та КН4. Ізолят Б2 був виділений від хворих курчат-бройлерів, а ізолят КН4 – від курей-несучок. За допомогою ЗТ-ПЛР з серотипспецифічними праймерами ВІБ вони були ідентифіковані як QX-подібний тип. Окрім типу QX в ЗТ-ПЛР в обох господарствах виявили також тип Massachusetts, що свідчить про те, що під час спалаху захворювання в господарствах циркулювали не менше двох типів ВІБ: QX та Massachusetts.

Оскільки відомо, що захворювання, яке викликає ВІБ, відрізняються різноманітністю клінічних ознак було доцільним провести порівняльне визначення патогенності польових ізолятів ВІБ Б2 і КН4 QX-подібного типу з референтним вірулентним штамом М41 серотипу Massachusetts.

Метою роботи було визначення антигенної спорідненості польових ізолятів ВІБ Б2 та КН4 між собою та з вакцинним штамом ВІБ Н120 серотипу Massachusetts та порівняльна оцінка патогенних властивостей цих ізолятів з референтним вірулентним штамом ВІБ М41 (Massachusetts).

Матеріали і методи

Використовували ВІБ:

Б2 – польовий ізолят QX-подібного типу 7 пасажу у вільних від патогенної флори курячих ембріонах (ВСП-КЕ) з титром інфекційної активності $10^{7.0}$ ЕІД₅₀/см³;

КН4 – польовий ізолят QX-подібного типу 7 пасажу у ВСП-КЕ з титром інфекційної активності $10^{7.5}$ ЕІД₅₀/см³;

Н120 – вакцинний штам 5 пасажу у ВСП-КЕ з титром інфекційної активності $10^{7.0}$ ЕІД₅₀/см³;

М41 – референтний вірулентний штам 2 пасажу у ВСП-КЕ з титром інфекційної активності $10^{7.5}$ ЕІД₅₀/см³ отримано ІВМ з Veterinary Laboratory Agency (Weybridge, United Kingdom) у 2000 році.

ВІБ розмножували у ВСП-КЕ 10-денної інкубації, які одержували з VALO SPF курячих інкубаційних яєць фірми Lohmann (Німеччина).

Курчат отримували з ВСП-КЕ. До необхідного віку їх вирощували у віварії ІВМ в умовах ізоляції.

Антигенну спорідненість ізолятів ВІБ Б2 та КН4 QX-подібного типу між собою та з вакцинним штамом Н120 серотипу Massachusetts визначали шляхом постановки перехресної реакції нейтралізації (РН) у варіанті з одним розведенням гіперімунної антисироватки (1:10) та з послідовними 10-разовими розведеннями вірусу. Розведення всіх матеріалів, що використувувались у реакції, проводили на фосфатному буфері. У РН використовували антисироватки на досліджувані віруси, отримані шляхом гіперімунізації курчат. У якості контролю використовували нормальну сироватку. Реакцію нейтралізації проводили на 8-денних КЕ. Дію ВІБ на КЕ оцінювали за загибеллю ембріонів та появою ембріонів-карликів (зменшення маси власне ембріона на $\geq 25\%$). Загибель КЕ в перші 24 години після зараження вважали неспецифічною. Титр інфекційної активності розраховували по Керберу в модифікації Ашмаріна [6].

Індекс нейтралізації (ІН) підраховували шляхом ділення титру ЕІД₅₀ ефективної дози суміші вірусу з позитивною сироваткою на титр ЕІД₅₀ суміші вірусу з нормальною сироваткою [6].

Розрахунок ступеню антигенної спорідненості штамів проводили за формулою Арчетті [7]. Якщо рівень антигенної спорідненості був вище 50 %, то варіанти вірусу відносяться до одного серотипу; якщо на рівні 25-50 % – засвідчують про низьку антигенну спорідненість; нижче 25 % – досліджувані об'єкти відносяться до різного серотипу [7].

Патогенність досліджували на курчатах 3-тижневого віку. Було сформовано 4 групи курчат по 15 голів. Курчат 1-ої та 2-ої груп заражали польовими ізолятами ВІБ Б2 та КН4, відповідно. Курчат 3-ої групи заражали вірулентним ВІБ М41. 4-та група курчат залишалась не зараженою та слугувала контролем. Курчат дослідних груп заражали окулярно, шляхом індивідуального закапування в очі дози вірусу $10^{5.5}$ ЕІД₅₀/см³ в об'ємі 0,1 см³.

Патогенність ВІБ оцінювали за критеріями: клінічні прояви захворювання, наявність та ступінь ціліостазу ворсинок війчастого епітелію трахеї та наявності патологічних змін органів сечовивідної системи. Клінічні прояви захворювання визначали за термінами появи, тяжкістю та тривалістю клінічних ознак. Ціліостаз (ЦС) – втрата ціліарної активності війчастого епітелію трахеї – визначали шляхом дослідження ціліарної активності (ЦА) ворсинчастого зараження [2].

Результати та обговорення

Антигенну спорідненість польових ізолятів ВІБ Б2 та КН4 QX-подібного типу між собою та з вакцинним штамом Н120 серотипу *Massachusetts* досліджували в перехресній реакції нейтралізації. Результати реакції по індексу нейтралізації досліджуваних штамів антисироватками наведені в таблиці 1.

Таблиця 1

Індекси нейтралізації польових ізолятів ВІБ Б2 і КН4 QX-подібного типу та вакцинного штаму ВІБ Н120 серотипу *Massachusetts* в перехресній реакції епітелію трахеї. Ціліостаз визначали на 4-6 добу після нейтралізації.

ВІБ	Тип	Титр інфекційної активності, ЕІД ₅₀ /см ³	Індекси нейтралізації з антисироваткою до ВІБ, Іг:		
			Б2	КН4	Н120
Б2	QX-подібний	$10^{6.5}$	6,5	5,5	1
КН4	QX-подібний	$10^{6.0}$	6,0	6,0	1
Н120	<i>Massachusetts</i>	$10^{6.5}$	0,5	≤0,5	6,5

Ізоляти ВІБ Б2, ВІБ КН4 та штам Н120 нейтралізувались гомологічними сироватками. Ізолят ВІБ КН4 повністю нейтралізувався антисироваткою отриманої на ізолят ВІБ Б2, а при нейтралізації ізоляту Б2 антисироваткою на

ізолят ВІБ КН4 залишкова інфекційна активність вірусу складала 1 Іг. Антигенна спорідненість між цими ізолятами складала 92 %.

Напроти, антисироватки, отримані на ізоляти ВІБ Б2 та КН4, практично не нейтралізували штам Н120, як і сироватка на штам Н120 не нейтралізувала ізоляти. Ступінь антигенної спорідненості польових ізолятів ВІБ Б2 та КН4 з вакцинним штамом Н120 складала 10,2 % та 11 % відповідно.

Патогенність виділених польових ізолятів ВІБ Б2 та КН4 QX-подібного типу і референтного вірулентного штаму М41 серотипу *Massachusetts* досліджували на курчатах 3-тижневого віку, яких заражали окулярно дозою вірусу $10^{5.5}$ ЕІД₅₀. В таблиці 2 наведені дані розвитку захворювання у курчат, заражених ізолятами ВІБ Б2 і КН4 та вірулентним штамом М41.

Таблиця 2

Динаміка розвитку захворювання у курчат 3-тижневого віку заражених ізолятами ВІБ Б2 і КН4 QX-подібного типу та референтним штамом М41 серотипу *Massachusetts*

ВІБ	Доза зараження ЕІД ₅₀ /см ³	Динаміка розвитку захворювання		
		Інкубаційний період	Період розвитку захворювання	Період одужання
Б2	10 ⁵	2 доби	3-7 діб	8-9 доба
КН4	10 ⁵	2 доби	3-8 діб	9 доба
М41	10 ^{5.5}	3-5 діб	6-9 діб	10-11 доба

Польові ізоляти ВІБ Б2 і КН4 QX-подібного типу та вірулентний штам М41 серотипу *Massachusetts*, при окулярному зараженні курчат 3-тижневого віку, викликали у них респіраторне захворювання. Інкубаційний період при зараженні курчат польовими ізолятами ВІБ Б2 та КН4 був на 2-3 доби коротший ніж у групі курчат інфікованих вірулентним штамом М41. Клінічні ознаки захворювання реєстрували не у всіх курчат заражених польовими ізолятами. У групі курчат інфікованих вірулентним штамом на 6-у добу хворіли усі курчата. Тривалість захворювання та терміни одужання були приблизно однаковими серед усіх дослідних груп. В групі курчат інфікованих цим ізолятом на 8-у добу після зараження загинуло одне курча, що свідчить про його більшу патогенність.

При дослідженні (на 4-6 добу) ЦА в'їчастого епітелію трахеї ціліостаз спостерігали у всіх інфікованих птахів, в тому числі і у птахів без клінічних ознак захворювання. Після клінічного одужання (на 10-11 добу) ЦА відновлювалось.

Патолого-анатомічний розтин курчат інфікованих ізолятами ВІБ Б2 та КН4 (на 4-6 добу після зараження) показав зміни в органах сечовивідної системи: нирки набрякли, темно-бурого кольору; в окремих курчат – відкладення уратів у сечоводах. У курчати, яке загинуло на 8 добу після зараження ВІБ КН4, при розтині відмічали нефрит з відкладанням уратів в сечоводах. Вражень нирок та відкладання уратів в сечовивідних шляхах у курчат заражених ВІБ М41 не зареєстрували.

Таким чином, польові ізоляти ВІБ Б2 і КН4 типу QX, виділені під час спалахів ІБ серед щепленого поголів'я від птахів різного напрямку продуктивності і віку по антигенній спорідненості та патогенності для курчат 3-тижневого віку мають ряд суттєвих відмінностей від штамів ВІБ (Н120, М41) серотипу *Massachusetts*. Ізоляти

(Б2, КН4) мають високу антигенну гомологію (92 %) між собою і відносяться до одного серотипу, та низьку антигенну гомологію (10,2 % і 11 % відповідно) с вакцинним штамом Н120 серотипу *Massachusetts*, що вказує на їх належність до різних серотипів. Ці результати підтверджують дані, одержані при попередніх дослідженнях цих вірусів в ЗТ-ПЛР з серотипспецифічними праймерами.

Польові ізоляти ВІБ Б2 і КН4 типу QX, як і референтний вірулентний штаму М41 (*Massachusetts*) виявились патогенними для курчат 3-х тижневого віку і викликали в них схоже ІБ-подібне захворювання з враженням в'ячого епітелію трахеї. Проте, на відміну від вірулентного ВІБ штаму М41 (*Massachusetts*) ізоляти володіють вираженою нефропатогенністю, викликають ураження нирок та відкладання уратів в сечоводах. Крім того, ізолят КН4 викликав загибель одного курчати.

Оскільки ВІБ типу QX є новим для нашої країни, необхідне подальше вивчення молекулярно-генетичних та імунобіологічних властивостей виділених ізолятів з метою удосконалення засобів профілактики цього захворювання.

Висновки:

1. Польові ізоляти Б2 (виділений від курчат-бройлерів) та КН4 (виділений від курей-несучок) є антигенно спорідненими між собою (92 %) і відносяться до одного серотипу. Навпаки, рівень антигенної спорідненості цих ізолятів з вакцинним штамом Н120 *Massachusetts* низький (10,2 % та 11 % відповідно). Це означає, що вони відносяться до різних серотипів.

2. При окулярному зараженні 3-тижневих курчат польові ізоляти Б2 і КН4 та референтний вірулентний штам М41 викликають однотипне респіраторне захворювання з повною зупинкою роботи циліарного епітелію трахеї.

3. На відміну від референтного вірулентного штаму М41 серотипу *Massachusetts*, польові ізоляти Б2 та КН4 викликають нефрити та відкладання уратів в сечоводах, тобто володіють нефропатогенністю. Польовий ізолят КН4 викликає загибель курчат.

4. У наступних дослідженнях доцільним є вивчення молекулярно-генетичних та імунобіологічних властивостей виділених ізолятів з метою удосконалення засобів профілактики цього захворювання в Україні.

Список використаної літератури

1. Сюрин В. Н. Вирусные болезни животных / В. Н. Сюрин, А. Я. Самуйленко, Б.В. Соловьев, Н.В. Фомина. // ВНИТИБП. – М.: 1998. – С. 183-198

2. Краснобаев Є. О. Виділення та ідентифікація польових ізолятів вірусу інфекційного бронхіту курей QX-подібного типу. Вивчення їх патогенності для курчат. / Є. О. Краснобаев, О. М. Дерябін, Г. А. Попова, А. П. Кубаєв, І. О. Собко, В. В. Кирименко, В. П. Лук'янець. // Ветеринарна біотехнологія, бюлетень №22. – Ніжин, 2013. – С. 270-283

3. Овчинникова Е. В. Генетическая характеристика полевых изолятов вируса инфекционного бронхита кур, выявленных в России. / Е.В.Овчинникова, Ю.А.Бочков, Г.В.Батченко, Л.О.Щербакова, А.В.Борисов, В.В.Дрыгин. // – Труды федерального центра охраны здоровья животных. – Владимир, 2007. – Т.V. – С.303-315

4. Bijlenga Gosse. Development and use of the H strain of avian infectious bronchitis virus from the Netherlands as a vaccine: a review. / Gosse Bijlenga, Jane K. A. Cook, Jack Gelb Jr, J. J. de Wit. // Avian Pathology. – 2004. – Vol. 33, Issue 6. – P. 550 – 557

5. Краснобаев Е. А. Бронхит кур – современная ситуация, лабораторная диагностика, специфическая профилактика. / Е. А. Краснобаев, И. А. Собко, В. В. Клименко, А. П. Кубаев. // Сучасна ветеринарна медицина. – №1. – 2011. – С.23-28.

6. Сюрин В. Н. Справочник вирусных болезней животных/ В. Н. Сюрин, Р. В. Белоусова, Н. В. Фомина. // Агропромиздат. – М.: 1991. – С.351

7. Методические указания по выделению, титрованию и оценке антигенного родства вариантов вируса инфекционного бронхита кур в трахеальной органной культуре. / О.А. Чупина, С.В. Фролов, В.И. Диев, А.В.Борисов. // ФГУ «ВНИИЗЖ». – Владимир, 2006.

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ АНТИГЕННЫХ И ПАТОГЕННЫХ СВОЙСТВ ПОЛЕВЫХ ИЗОЛЯТОВ QX-ПОДОБНОГО ТИПА И ШТАММОВ СЕРОТИПА MASSACHUSETTS ВИРУСА ИНФЕКЦИОННОГО БРОНХИТА КУР // Г.А. Попова, А.П. Кубаев, А.Ю. Немашкало

Изучено антигенное родство полевых изолятов ВИБ QX-подобного типа B2 (выделен от цыплят бройлеров) и KN4 (выделен от кур несушек) между собой, а также с вакцинным штаммом H120 серотипа Massachusetts. Степень антигенного родства между изолятами составил 92 %, а с вакцинным штаммом 10,2 % и 11 % соответственно. Полевые изоляты, помимо респираторного заболевания у 3-недельных цыплят, при окулярном заражении, вызывают поражение почек и мочеточников с отложением уратов. Референтный вирулентный штамм M41 серотипа Massachusetts вызывает только респираторное заболевание, а нефропатогенностью не обладает.

Ключевые слова: Инфекционный бронхит (ИБ), вирус инфекционного бронхита (ВИБ), полевые изоляты, QX, вакцинный штамм H120, вирулентный штамм M41, Massachusetts, антигенное родство, патогенность

COMPARATIVE STUDIES OF THE ANTIGENIC AND PATHOGENIC PROPERTIES OF FIELD ISOLATES QX-TYPE AND SEROTYPE MASSACHUSETTS STRAINS OF INFECTIOUS BRONCHITIS VIRUS // G. A. Popova, A. P. Kubaeв, A. Y.Nemashkalo

Antigenic relationship of field isolates IBV QX-like type B2 (isolated from broilers) and KN4 (isolated from laying hens) were studied with each other and with vaccine strain H120 serotype Massachusetts. Degree of antigenic relationship between isolates was 92%, and with vaccine strain was 10.2% and 11%, respectively. Field isolates, in addition to respiratory disease in a 3-week-old chickens after ocular infection, cause damage to the kidneys and ureter, with deposition of urates. Reference virulent strain M41 serotype Massachusetts causes only respiratory disease and has no kidney pathogenicity.

Keywords: Infectious bronchitis (IB), infectious bronchitis virus (IBV), field isolates, QX, vaccine strain H120, virulent strain M41, Massachusetts, antigen affinity, pathogenicity

Рецензент – кандидат ветеринарных наук У. М. Яненко