Разработка инактивированной вакцины из вариантного вируса инфекционного бронхита кур

Дубовой А.С.,
с.н.с. отдела вирусологии
Самусева Г.Н.,
с.н.с. отдела вирусологии

ВНИВИП филиал ФНЦ «ВНИТИП» РАН
E-mail: alexsd07@mail.ru

ВВЕДЕНИЕ

Инфекционный бронхит кур (ИБК) — высококонтагиозная болезнь, проявляющаяся поражением респираторного тракта, а также мочеполовой системы птиц [3,6]. Возбудитель ИБК — РНК-содержащий вирус, принадлежащий к роду Gammacoronavirus семейства Coronaviridae. Заболевание широко распространено практически во всех странах с развитым птицеводством [6,8]. Вирус ИБК свойственна высокая генетическая изменчивость в результате накопления точечных мутаций, инсерций и делеций и рекомбинации [7,9]. Возникающие вариантные штаммы вируса ИБК зачастую становятся причиной поражения птицепоголовья, вакцинированного «классическими» вакцинными штаммами, принадлежащими к серотипу Массачусетс [1,7,9] Исследования показали, что во многих странах циркулируют различные вариантные штаммы вируса ИБК [8]. Вакцинация птиц одним серотипом не гарантирует полной защиты от гетерологичных штаммов вируса ИБК, однако было показано, что использование живых вакцин из комбинаций классического и вариантного штаммов дает возможность обеспечить высокую защиту [4,10,12].

Проведенный на территории РФ мониторинг с помощью ОТ-ПЦР и секвенирования указывает, что в 2005-2011 гг. по сравнению с данными за период 1998-2004 гг. сократилось количество изолятов вируса ИБК генотипа Массачусетс и возросло количество изолятов вируса ИБК генотипа 793 B и QX [2,5,11]. Следовательно, для успешной профилактики ИБК необходимо осуществлять типирование и изучение биологических свойств изолятов вируса ИБК как потенциальных продуцентов живых и инактивированных вакцин.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе были использованы СПФ-эмбрионы кур 9 суточного срока инкубации, выделенный ранее нами изолят вариантного вируса ИБК, по анализу последовательности фрагмента гена S1 имеющий 98% гомологии со щтаммами и изолятами серотипа 793/B, штамм «4/91» вариантного вируса ИБК, также принадлежащий к серотипу 793/B, штамм «Чапаевский» вируса ИБК, принадлежащий к серотипу Массачусетс, цыплята 20-дневного возраста, набор фирмы BioChek для выявления антител к вирусу ИБК иммуноферментным методом (ИФА).

Эмбрионы заражали инокуляцией вирусного материала в аллантоисную полость объемом 0,2 $см^3$. Биологическую активность вирусного материала определяли титрованием на развивающихся СПФ-эмбрионах кур. Титр вируса расчитывали методом Кербера в модификации Ашмарина.

Инактивацию вируссодержащего материала проводили теотропином в конечной концентрации 0,15% при $(37,0\pm0,5)^0$C в течение 36 часов. Полноту инактивации контролировали методом трех последовательных пассажей на развивающихся эмбрионах кур. Образцы инактивированных вакцин получали эмульгированием инактивированных штаммов с масляным адъювантом, формирующим

обратную эмульсию, в соотношении 30:70 с помощью гомогенизатора Ultraturrax T-25.

Иммунизацию цыплят осуществляли подкожным введением препаратов объемом 0,5 $см^3$ в среднюю треть шеи. Антигенную активность оценивали по титрам поствакцинальных антител в ИФА (ИБК) в соответствии с инструкцией набора.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Для сравнительных исследований был отобран вируссодержащий материал изолята, шт. «4/91» и шт. «Чапаевский» с одинаковой биологической активностью равной $10^{7,5}$ $ЭИД_{50/см}{}^3$. После инактивации и контроля на полноту инактивации из этих антигенов были изготовлены три образца инактивированных вакцин. Цыплята в количестве 60 голов были разделены на 3 группы по 20 голов в каждой. Цыплят каждой группы иммунизировали соответствующим образцом инактивированной вакцины. Дополнительно 10 голов цыплят оставили в качестве чистого контроля. Через 28 дней после вакцинации от всех цыплят брали кровь, получали сыворотки и исследовали их в ИФА на наличие антител к вирусу ИБК.

Вакцину считали антигенно активной, если титры поствакцинальных антител в ИФА к вирусу ИБК не менее, чем в 2 раза превышали минимальный положительный титр, указанный в инструкции набора BioChek (1:834) при отрицательном иммунном фоне (уровень титров антител к вирусу ИБК у цыплят контрольной группы) или не менее, чем в 2 раза превышали уровень иммунного фона. Результаты исследований образцов вакцин на антигенную активность представлены на рис.1.

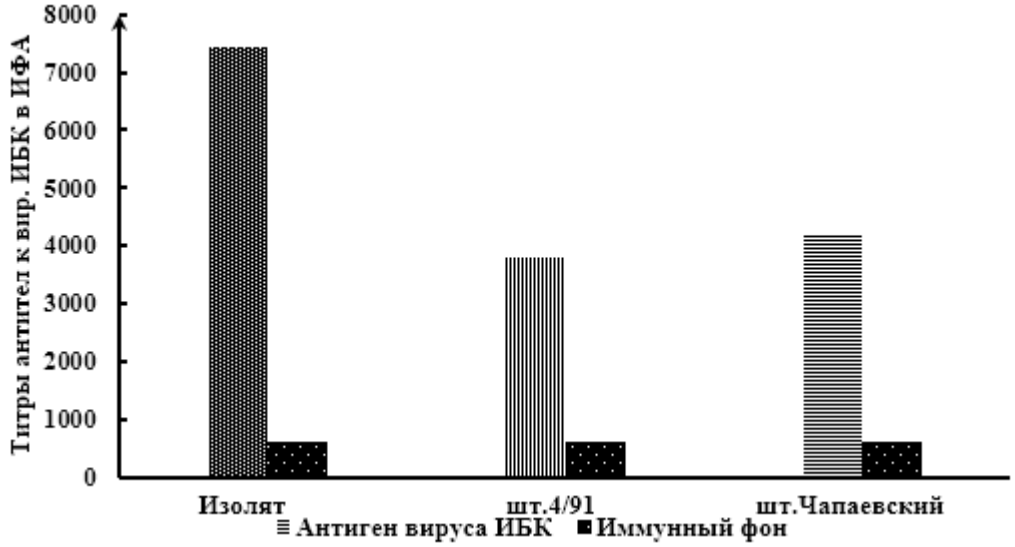

Рис. 1 Антигенная активность трех образцов вакцин, содержащих в своем составе антигены вируса ИБК, изготовленные из изолята, шт.«4/91» и шт. «Чапаевский» соответственно.

Как видно из представленного графика, все три препарата показали достаточно высокую антигенную активность. Однако, уровень титров антител к вирусу ИБК после иммунизации препаратом, изготовленным на основе изолята вариантного вируса ИБК, был в 2 раза выше.

Далее цыплят контрольной группы и цыплят, иммунизированных образцом вакцины, изготовленным на основе изолята вариантного вируса ИБК, после повторной иммунизации, использовали для изучения продолжительности иммунного ответа. От цыплят этих групп один раз в месяц брали кровь, получали сыворотку и проводили соответствующие серологические исследования. Срок наблюдения составил 12 месяцев.

Результаты данного исследования представлены на рис. 2.

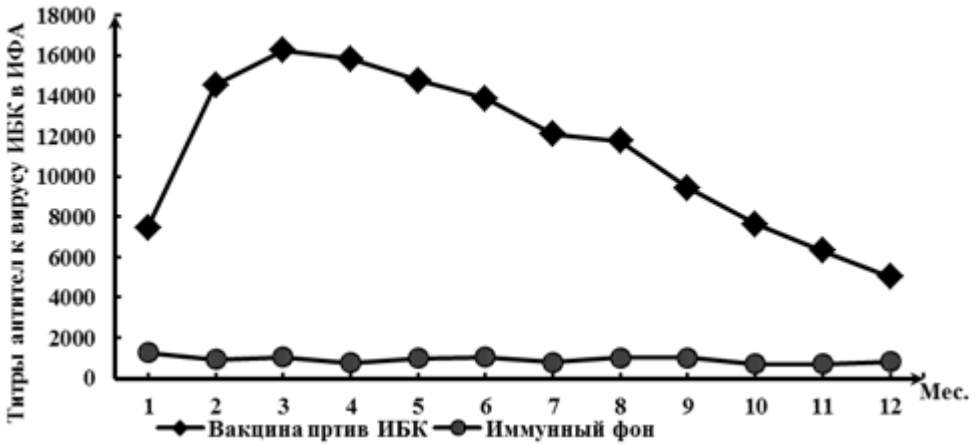

Рис. 2 Динамика выработки антител к вирусу ИБК после двукратной иммунизации цыплят образцом вакцины, изготовленным на основе изолята вариантного вируса ИБК

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Препарат, изготовленный на основе изучаемого изолята вариантного вируса ИБК, индуцирует у привитой птицы высокий и продолжительный уровень иммунного ответа, что позволяет рекомендовать его в качестве продуцента вируссодержащего материала для изготовления инактивированной вакцины.

Литература

1. Бочков, Ю.А. Диагностика инфекционного бронхита кур / Ю. А. Бочков, А. В. Борисов, С.В. Фролов и др. // Ветеринария. — 2003. — № 4. — С. 21-24.
2. Овчинникова, Е.В. Генетическая характеристика полевых изолятов вируса инфекционного бронхита кур, выявленных в России в 2004-2005 гг. / Е.В. Овчинникова, Г.В. Батченко, О.А. Чупина и др. // Тр. Федерального центра охраны здоровья животных. — Владимир, 2006. — Т. 4. — С. 362-369.
3. Сюрин, В.Н. Вирусные болезни животных / В.Н. Сюрин, А.Я. Самуйленко, Б.В., Соловьев, Н.В. Фомина. — М.: ВНИТИБП, 1998. — С. 183-198.
4. Alvarado I. R. Evaluation of the protection conferred by commercial vaccines against the California 99 isolate of infectious bronchitis virus / I. R. Alvarado, P. Villegas, J. El-Attrache et al. // Avian Diseases. — 2003. -Vol. 47, No. 4. -P. 1298–1304
5. Bochkov, Y.A. Molecular epizootiology of avian infectious bronchitis in Russia / Y.A. Bochkov, G.V. Batchenko, L.O. Shcherbakova et al. // Avian Pathology. — 2006.-Vol. 3 5 . — P . 379-393.
6. Calnek B.W. Infectious bronchitis / B.W. Calnek, H.J. Barnes, C.W. Beard et al. // Diseases of Poultry,Tenth Edn. Iowa State University Press Ames, Iowa, USA –1997. — P . 510-526.
7. Cavanagh, D., Naqi S. Infectious bronchitis // Diseases of Poultry. — 11th ed. — Ames, Iowa, 2003. -P. 101-119.
8. de Wit J. J. Infectious bronchitis virus variants: a review of the history, current situation and control measures./ J. J. de Wit, J. K. A. Cook, H. M. J. F. Van Der Heijden //Avian Pathology. — 2011. -Vol. 40, No. 3. — P. 223–235.
9. Ignjatovic, J. Isolation of a variant infectious bronchitis virus in Australia that further illustrates diversity among emerging strain / J. Ignjatovic, G. Gould, S. Sapats et al. // Arc. Virol. — 2006. -Vol. 151, -P. 1567-1585.
10. Martin M. P. Evaluation of the effectiveness of two infectious bronchitis virus vaccine programs for preventing disease caused by a California IBV field isolate./ M. P. Martin, P. S. Wakenell, P. Woolcock et al. // Avian Diseases. — 2007. -Vol. 51, No. 2. — P. 584–589.

11. Ovchlnnikova, E. Molecular characterization of infectious bronchitis virus isolates from Russia and neighbouring countries: identification of intertypic recombination in the SI gene / E. Ovchlnnikova, Y. Bochkov, L. Shcherbakova, Z. Nikonova et al. // Avian Pathology. — 2011. — Vol. 40, No. 5. — P. 507-514.
12. Terregino C. 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. Toffan, M. Serena Beato et al. //Avian Pathology. — 2008. — Vol. 37, No.5 — P. 487–493.