

ФАНО РОССИИ
«Всероссийский научно–исследовательский ветеринарный институт
птицеводства» - филиал Федерального государственного бюджетного
научного учреждения Федеральный научный центр Российской академии
наук «Всероссийский научно-исследовательский и технологический
институт птицеводства»
(ВНИВИП)

На правах рукописи

СЕРОВА Наталья Юрьевна

ИНДИКАЦИЯ И ИДЕНТИФИКАЦИЯ ИЗОЛЯТОВ ВИРУСА
ИНФЕКЦИОННОГО БРОНХИТА КУР, ЦИРКУЛИРУЮЩИХ НА
ТЕРРИТОРИИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

06.02.02 – ветеринарная микробиология,
вирусология, эпизоотология, микология с
микотоксикологией и иммунология

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени
кандидата ветеринарных наук

Научный руководитель:
доктор ветеринарных наук,
профессор, академик РАН
Джавадов Эдуард Джавадович

Санкт-Петербург – 2017 г.

Оглавление

1	ВВЕДЕНИЕ	4
2	ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ	10
2.1	ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	10
2.1.1	Краткие исторические данные, распространение инфекционного бронхита кур и ущерб, причиняемый этим заболеванием	10
2.1.2	Характеристика возбудителя ИБК	12
2.1.2.1	Морфология вируса инфекционного бронхита.....	13
2.1.2.2	Физико-химические свойства вируса.....	15
2.1.2.3	Репродукция и культивирование вируса в различных биологических системах	16
2.1.2.4	Антигенная специфичность и вариабельность вируса.....	18
2.1.3	Эпизоотологические особенности инфекционного бронхита кур	21
2.1.4	Патогенез и клинико-патологоанатомические признаки.....	23
2.1.5	Формирование иммунитета кур против ИБК	26
2.1.6	Индикация и идентификация вируса ИБК.....	27
2.1.6.1	Выделение вируса и биопроба	28
2.1.6.2	Идентификация вируса	29
2.1.6.2.1	Молекулярно-генетические методы идентификации ..	30
2.1.7	Профилактика и меры борьбы с инфекционным бронхитом кур	31
2.1.8	Заключение по обзору литературы.....	32
2.2	СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ	34
2.2.1	Материалы и методы.....	34
2.2.2	Выделение изолятов вируса ИБК	44
2.2.3	Изучение чувствительности изолятов вируса к некоторым химическим и физическим факторам	51
2.2.3.1	Чувствительность изолятов вируса ИБК к действию эфира и хлороформа	52

2.2.3.2	Изучение терморезистентности изолятов.....	54
2.2.4	Метод выявления вируса инфекционного бронхита с помощью обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции	57
2.2.4.1	Анализ геномных последовательностей вируса ИБК из международной базы данных GenBank и определение оптимальных олигонуклеотидных последовательностей праймеров	58
2.2.4.2	Полимеразная цепная реакция	60
2.2.4.3	Оценка специфичности и аналитической чувствительности метода	61
2.2.4.4	Оценка возможности использования разработанного метода на основе ОТ-ПЦР для выявления вируса ИБК в полевых пробах	64
2.2.5	Идентификация изолятов методом геномного секвенирования. Филогенетический анализ.....	70
3	ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	75
3.1	ОБСУЖДЕНИЕ МАТЕРИАЛА	75
3.2	ВЫВОДЫ	79
3.3	ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ	81
	СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	82
	СЛОВАРЬ ТЕРМИНОВ	85
	СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	86
	СПИСОК ИЛЛЮСТРАТИВНОГО МАТЕРИАЛА	97
	ПРИЛОЖЕНИЯ	99
	Приложение А	100
	Приложение Б	102
	Приложение В.....	103
	Приложение Г	104
	Приложение Д.....	105
	Приложение Е.....	106

1 ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования. Инфекционный бронхит кур (ИБК) – высококонтагиозная болезнь, которая широко распространена в птицеводческих хозяйствах РФ [1, 5, 8, 24, 45]. Возбудитель ИБК – РНК-содержащий вирус, семейства *Coronaviridae*, чрезвычайно изменчив, поэтому небольшие замены в гене S1 приводят к появлению новых серотипов вируса, что затрудняет правильную постановку диагноза и не позволяет своевременно провести эффективную специфическую профилактику против данной болезни [24, 47, 50, 51, 68, 69, 87].

На территории РФ циркулируют вирусы ИБК разных серогрупп. Большая часть изолятов (около 40%) имеет высокое генетическое родство со штаммами серотипа Массачусетс [5, 24, 25]. Некоторая часть гомологична Европейским (D274, 4/91, В/648), китайским и корейским штаммам [1, 31]. Кроме того, выделяются энзоотичные для России изоляты, имеющие более 20% отличий от всех представленных в Genbank [24, 25]

Хотя инфекционный бронхит в первую очередь респираторное заболевание, он также является одной из важных причин снижения яичной продуктивности. Некоторые штаммы вызывают нефрозную патологию со значительной смертностью молодняка. Основной ущерб птицеводства обусловлен неэффективностью производства [8, 39, 54, 59].

Существующие методы выделения и идентификации вируса ИБК имеют некоторые недостатки. Вирусологические методы выделения вируса требуют большого количества времени, реакция нейтрализации трудоемка и долговременна, антиген-улавливающий и блокирующий варианты непрямого метода ИФА требует использования моноклональных антител [75, 79, 81], что не всегда возможно, реакция диффузионной преципитации малочувствительная [59].

В связи с вышеизложенным, актуальным является усовершенствование существующих методов выделения и идентификации изолятов вируса ИБК, изучение их биологических свойств для разработки эффективных схем вакцинации.

Степень разработанности темы исследования. Первые публикации по инфекционному бронхиту кур появились в 30-40-х гг. в США. В нашей стране первые исследования по изучению вируса ИБК были начаты с 1960-х гг. [17, 18, 27, 28, 30]. Исследования были посвящены вопросам эпизоотологии ИБК [18], изучению биологических свойств изолятов вируса [19], определению патогенности штаммов вируса ИБК [17] и определению типовой принадлежности изолятов посредством реакции нейтрализации.

Вопросам диагностики молекулярно-генетическими методами посвящены ряд зарубежных и отечественных работ [4, 25, 38, 41, 43, 52, 71, 77]. В 1999 году в России был разработан метод ОТ-ПЦР с использованием праймеров, специфичных к S1 гену [4]. В 2010 г, по имеющимся публикациям, были разработаны Методические указания по выявлению вируса ИБК с использованием ОТ-ПЦР в режиме реального времени [25]. В методе предложено использование системы праймеров и зонда, специфичных к нетранслируемому участку генома, предложенных Callison A.A. et al [46].

В работах отечественных авторов описано широкое распространение вариантных изолятов вируса ИБК, описаны молекулярно-генетические свойства рекомбинантных вирусов ИБК циркулирующих на территории РФ [24, 25]. Высокая изменчивость коронавируса птиц, постоянно возникающие новые варианты требует специфичного и чувствительного метода ОТ-ПЦР, позволяющего проводить массовые исследования для контроля циркулирующих вариантов вируса ИБК, с использованием отечественных реактивов и препаратов.

Цели и задачи исследования. Целью настоящей работы явилось усовершенствование метода индикации и идентификации вируса

инфекционного бронхита кур с помощью обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции для последующего изучения изолятов, циркулирующих на территории РФ.

В соответствии с поставленной целью необходимо было решить следующие задачи:

- выделить изоляты вируса инфекционного бронхита кур;
- изучить физико-химические свойства изолятов вируса инфекционного бронхита кур;
- усовершенствовать тест-систему для индикации и идентификации вируса ИБК с помощью ОТ-ПЦР и оценить возможность использования данного метода для лабораторной диагностики ИБК при исследовании патологического материала;
- определить молекулярно-генетические характеристики и провести филогенетический анализ изолятов вируса ИБК, выявленных на территории Российской Федерации.

Научная новизна. Усовершенствован метод индикации и идентификации вируса инфекционного бронхита кур с помощью обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции с использованием отечественных препаратов, и реактивов. Впервые выявлены и идентифицированы вариантные изоляты вируса инфекционного бронхита кур, которые представляют интерес для дальнейшего изучения. Впервые определена нуклеотидная последовательность фрагментов S1 и 3'UTR участков 11 полевых изолятов вируса ИБК. Проведено сравнение полученных последовательностей с опубликованными в GenBank различных изолятов и штаммов вируса ИБК.

Теоретическая и практическая значимость работы. На основании проведенных исследований усовершенствован метод диагностики инфекционного бронхита кур методом обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции по выявлению и идентификации вируса ИБК и коронавируса индеек в патологическом материале.

Разработаны и утверждены методические положения для выявления вируса инфекционного бронхита птиц методом обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции. Выделенные изоляты могут использоваться для разработки живых и инаktivированных вакцин с целью профилактики ИБК, для создания опытных образцов рекомбинаций S1 участков генетически различных серовариантов вируса ИБК.

Методология и методы исследования.

Методологические подходы в решении задач основаны на знании природы и происхождении, структуры, химического состава, морфологических, биологических, физико-химических свойств и проблем экологии вируса инфекционного бронхита кур. При выборе методов исследований и анализе полученных результатов учитывалось распространение вируса ИБК, предпочтительные методы выделения вируса ИБК из патологического материала, генетика вируса ИБК.

Положения, выносимые на защиту:

- результаты выделения и идентификации изолятов вируса ИБК;
- результаты изучения устойчивости изолятов к физико-химическим факторам;
- метод ОТ-ПЦР для обнаружения генома вируса ИБК в пробах патологического материала;
- результаты сравнительного анализа фрагмента гипервариабельной области гена S1 изолятов вируса и филогенетический анализ изолятов вируса ИБК, выявленных в ходе массовых исследований.

Степень достоверности и апробация результатов.

Научные положения, выводы и практические рекомендации, сформулированные в диссертационной работе, научно обоснованы, достоверны и вытекают из результатов собственных исследований. Исследования проведены на большом количестве фактического материала (куриные

эмбрионы и образцы патологического материала n=4123). Для оценки возможности использования усовершенствованного метода индикации и идентификации вируса инфекционного бронхита кур осуществлен и использован комплекс исследований, включающих вирусологические и молекулярно-биологические методы.

Основные результаты проведенных исследований доложены и опубликованы в материалах научных конференций: 45 конференции молодых ученых и аспирантов по птицеводству (ВНИТИП, Сергиев Посад, 2002 г.), Международной юбилейной научно-практической конференции, посвященной 40-летию ВНИВИП (ВНИВИП, Санкт-Петербург-Ломоносов, 14-16 сентября, 2004 г.), «Балтийском форуме ветеринарной медицины и продовольственной безопасности 2016» (Санкт-Петербург, 28-30 сентября 2016 г.), 4-м Международном конгрессе ветеринарных фармакологов и токсикологов «Эффективные и безопасные лекарственные средства» (Санкт-Петербург, 17-19 октября 2016 г.), Международной научно-практической конференции молодых учёных и специалистов (Екатеринбург, 7-9 июня 2017 г.), а также на заседаниях ученого и методического советов отдела вирусологии и ОБП ВНИВИП в 1999-2002 и 2013-2016 гг.

Публикации.

По материалам диссертации опубликовано 8 научных работ, в которых изложены основные положения и выводы по работе, из них 3 статьи – в периодических изданиях, входящих в перечень российских научных рецензируемых журналов для опубликования основных результатов диссертаций, утверждённых ВАК Министерства образования и науки Российской Федерации.

Структура диссертации.

Диссертация изложена на 106 страницах печатного текста и состоит из следующих разделов: введение, основная часть, заключение, список сокращений, список литературы и приложения.

Диссертация иллюстрирована 10 таблицами, 24 рисунками и 1 формулой. Список литературы включает 92 источника, из которых 61 зарубежный.

2 ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

2.1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

2.1.1 Краткие исторические данные, распространение инфекционного бронхита кур и ущерб, причиняемый этим заболеванием

Инфекционный бронхит кур (ИБК) – остро протекающая высококонтагиозная болезнь вирусной этиологии [3, 9, 29, 39]. К ИБК восприимчивы куры всех возрастов. У молодняка болезнь проявляется респираторным и уремическим синдромами, у взрослого поголовья – поражением герминативных органов, что ведет к длительному снижению яйценоскости.

Впервые болезнь была установлена Шалком и Хауном в 1931 году в США (штат Северная Дакота), с тех пор болезнь распространилась повсеместно, где есть промышленное птицеводство [41, 39]. В крупных птицеводческих хозяйствах эта инфекция приобретает стационарный характер. В настоящее время инфекционный бронхит распространен в США, Венгрии [35], Великобритании [34], Австралии [65], Судане [32, 89], Корее [85], Китае [89], Японии [74], Египте, Уганде, Индии, Тайване, Польше, Италии, Германии, Франции, Израиле, Канаде [52]. В нашей стране заболевание было установлено в 1946 году среди цыплят [27], а в 1967 году были выделены штаммы инфекционного бронхита кур [30].

Источником инфекции служат больные и переболевшие цыплята и куры, выделяющие вирус во внешнюю среду, которые остаются вирусоносителями до 39-105 дней после переболевания. Из организма больной птицы вирус выделяется трахеально-бронхиальным экссудатом, истечениями из глаз, со слюной, пометом [41].

Вирус распространяется горизонтально, аэрозольно или алиментарно. Скорость распространения вируса зависит от вирулентности вируса и иммунного статуса стада. Если вирус является высоковирулентным, в естественных условиях респираторные признаки развиваются у контактной птицы в течение 36 часов. На местах распространение заболевания от птичника к птичнику происходит за 1-2 дня, между фермами за 3-4 дня.

Роль вертикальной передачи в эпизоотологии вируса инфекционного бронхита кур до конца не выяснена. Опытным путем выяснили, что экспериментально зараженная птица несет инфицированные яйца в течение 1-6 недель после заражения. Вирус также выделялся от суточных цыплят, полученных от этих кур [41, 66]. Это подтверждает, что вирус может передаваться вертикально. Вирус инфекционного бронхита кур был также выделен из спермы петухов до двух недель после заражения, что указывает на возможность того, что яйцевод у чувствительной несушки, а также яйцо в яйцеводе могут быть инфицированы такой спермой [66, 9].

Контаминированные помет, оборудование, материалы и персонал являются потенциальным источником не прямой передачи инфекции на большие расстояния [41].

Способ ведения хозяйства и штамм вируса играют основную роль при воздействии инфекции вируса инфекционного бронхита. Основной ущерб обусловлен неэффективностью производства. Респираторная болезнь ослабляет организм, приводит к низкой усвояемости кормов молодняка, отсюда слабый прирост массы тела. Выбраковка в период откорма из-за аэросаккулита также влияет на производственные показатели. После вспышки инфекционного бронхита кур 3-8% бройлеров могут быть выбракованы при откорме в сравнении со стадами, где ИБК контролируется, выбраковка может быть ниже – 1%.

У несушек и племенной птицы основные потери обусловлены не реализацией полного потенциала яйценоскости. Это приводит к следующему: 1) задержке созревания; 2) ухудшению продуктивности во время инфекции (от 3 до 50%); 3) снижению продуктивности после выздоровления. Кроме этого ущерб дополняется из-за снижения качества яиц. У племенной птицы уровень продуктивности может снижаться во время и после вспышки. В случаях нефрита при инфекционном бронхите кур кроме убытков от низкого прироста и снижения качества тушек, ущерб от смертности может быть от 10 до 25%

В большинстве случаев болезнь протекает бессимптомно и проявляется только снижением яйценоскости, инфекционный бронхит кур заслуживает внимания как синергист комплекса - "хроническая респираторная болезнь" где находится совместно с микоплазмой, *E. coli* и как болезнь, являющаяся непосредственной причиной снижения яйценоскости у кур-несушек.

На долю инфекционного бронхита кур приходится около 20% всех болезней органов дыхания птицы, и она является одной из опасных болезней. Экономический ущерб велик, и он складывается из потери упитанности птицы, ее гибели, снижения яйценоскости на 20-89% и гибели эмбрионов. При инфекционном бронхите кур происходит большой процент выбраковки яйца вследствие пороков – неправильная форма, сильное загрязнение скорлупы, «красюк», выливка. При хранении происходит частичная потеря ценности яиц – снижение содержания ненасыщенных жирных кислот в желтке куриных яиц [23].

2.1.2 Характеристика возбудителя ИБК

Возбудитель инфекционного бронхита кур - вирус из семейства *Coronaviridae*. Впервые был обнаружен в 1936 году американскими исследователями [41]. В самостоятельную группу коронавирусов был выделен в 1970 г., а в 1997 г семейства коронавирусов и артеривирусов были сгруппированы в общую группу нидовирусов *Nidovirales*. В 2008 году вирус

ИБК, коронавирусы индеек, уток, гусей, фазанов и пингвинов на основании сходства геномов (до 90 %) были объединены в один вид – коронавирус птиц [86].

2.1.2.1 Морфология вируса инфекционного бронхита

Вirus инфекционного бронхита является прототипом семейства Coronaviridae. Геном представлен позитивной одноцепочечной линейной молекулой РНК длиной около 25-30 тыс. нуклеотидов. Геном вируса ИБК кодирует как минимум 10 открытых рамок считывания (ОРС, ORF) и организован следующим образом: 5'UTR-1a-1ab-S-3a-3b-E-M-5a-5b-N-3a-3'UTR (Рисунок 1).

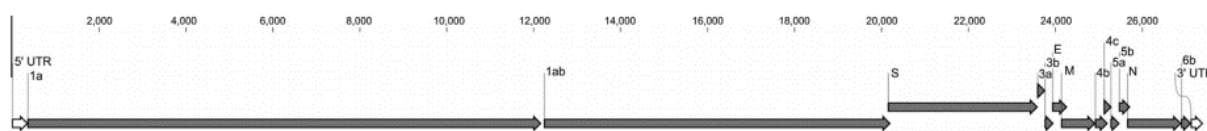


Рисунок 1 – Организация генома вируса ИБК (QX) [33]

Инфекционностью обладает вирионная РНК. Вирионы сферической формы, диаметром 60-220 нм [41, 42] (Рисунок 2). Вирион ИБК состоит из нуклеокапсида спиральной симметрии и липопротеидной оболочки. Имеет четыре структурных протеина. На поверхности вириона имеются характерные редко расположенные хрупкие булавовидные выросты S гликопротеины, образующие подобие солнечной короны (Рисунок 3) [41, 52, 48, 88]. S гликопротеины являются димерами или тримерами. S протеин сформирован двумя нековалентно связанными полипептидами S1 и S2. Основной функцией S шипов является прикрепление вируса к рецепторам клеток-мишеней. Доступное поверхностное расположение S протеинов делает его первой мишенью для атаки вируснейтрализующими антителами, которые вырабатываются вскоре после заражения, обеспечивая иммунитет.

Мембранный "М" гликопротеид частично выявляется на поверхности вириона. Нуклеокапсидный "N" протеин располагается внутри вириона [48, 88].

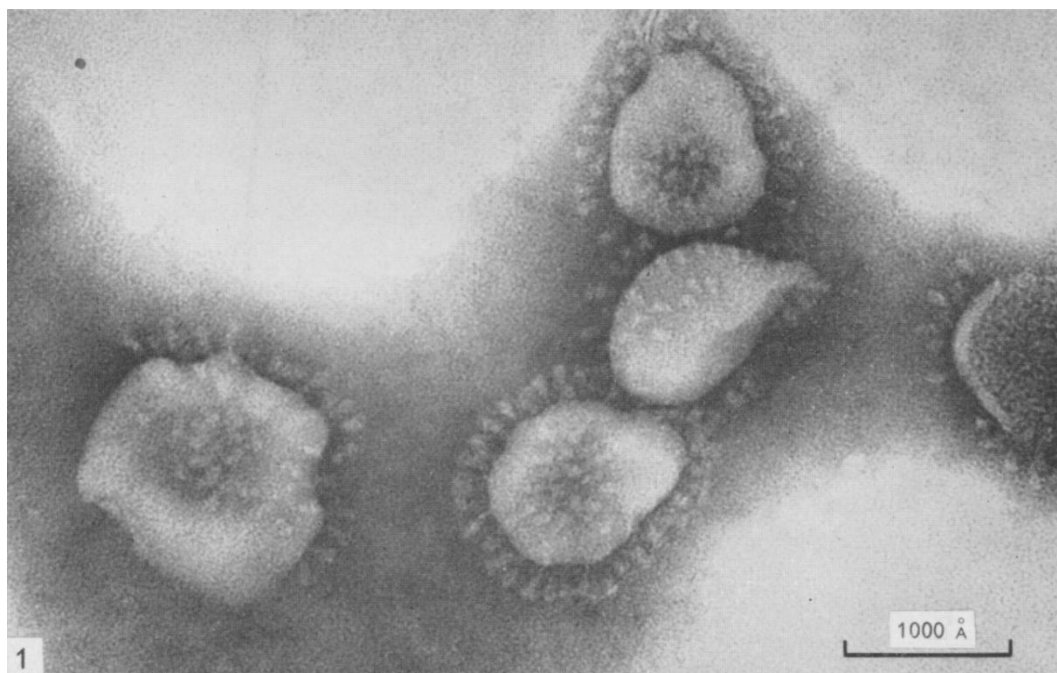


Рисунок 2 – Электронная микроскопия коронавирусов [42]

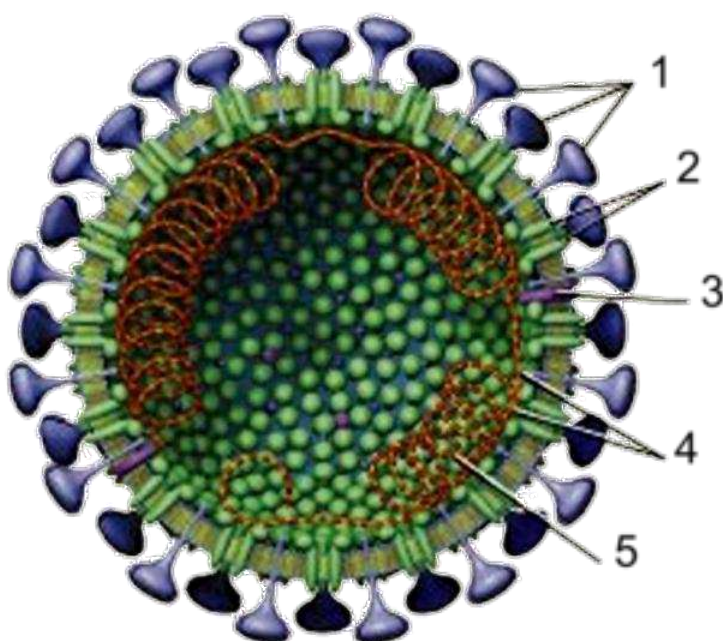


Рисунок 3 – Строение вириона инфекционного бронхита кур. [55] 1 – шиповой "S" протеин; 2 – мембранный "M" гликопротеид; 3 – оболочечный гликопротеин "E"; 4 – нуклеокапсидный "N" гликопротеин; 5 – геномная РНК

2.1.2.2 Физико-химические свойства вируса

Устойчивость вируса к физико-химическим воздействиям слабая. В трупах павшей птицы его активность быстро исчезает. В питьевой воде при комнатной температуре вирус сохраняется в течение 11 час. В условиях птичника при температуре $+2-12^{\circ}\text{C}$ и относительной влажности воздуха 34-58% вирус инфекционного бронхита кур теряет биологические свойства между 6-11 днем; летом, соответственно, при $17-23^{\circ}\text{C}$ и 60-90% - в течение 4-7 суток; осенью, при $12-18^{\circ}\text{C}$ и 50-74% - 12-14 дней; зимой, при $7-13,5^{\circ}\text{C}$ и 39-66% - 13-21 день. Нагревание до 56°C инактивирует большинство штаммов возбудителя в течение 15-45 минут, до 45° - за 90 минут [29, 66, 83]. Вне помещения при плюсовых температурах выживаемость вируса существенно не отличается, в то время как при минусовых температурах вирус сохраняется до 44 дней. В пухе и пере вирус в помещении сохраняет жизнеспособность до 12 суток, а на поверхности яиц - 8-9 дней.

Растворы хлорной извести, содержащие 0,2 и 0,3% активного хлора, 0,3 и 0,6%-ный раствор едкой щелочи инактивируют вирус инфекционного бронхита кур за 10 минут, а 0,1%-ный раствор формалина - за 5 минут. Вирус более стабилен при низких значениях pH, чем при высоких. При pH 3,0 вирус стабилен 14 дней. При применении вакцины жизнеспособность вируса ИБК зависит от качества воды и ее состава [66].

Гемагглютинирующие свойства. Вирioны инфекционного бронхита кур содержат две фракции гемагглютинина: одну - связанную с вирусной частицей, другую - отделимую от нее. Серотип Коннектикут способен агглютинировать эритроциты кур, в то время как другие серотипы обретают эту способность только при обработке вируссодержащей аллантоисной жидкости фосфолипазой с нейраминидазой или 1,5%-ным раствором трипсина [84].

Интерференция. Известно, что при смешанной инфекции, вызванной двумя вирусами возможны: 1) двойная инфекция, когда оба вируса

реплицируются независимо друг от друга; 2) экзальтация (синергизм) – усиление вирулентности возбудителей; и 3) интерференция – подавление размножения одного вируса другим. Вирус ИБК интерферирует с размножающимися вирусом ньюкаслской болезни у цыплят и на РЭК. Вирус птичьего энцефаломиелита интерферирует с вирусом ИБК в куриных эмбрионах [52, 66].

2.1.2.3 Репродукция и культивирование вируса в различных биологических системах

Коронавирусы проникают внутрь клетки посредством виropексиса и путем сплавления оболочки вириона с плазматической мембраной клетки. Полный цикл размножения коронавирусов происходит в цитоплазме инфицированных клеток. Дочерние вирионы появляются через 4-6 часов после заражения. Максимальное накопление инфекционного вируса в клетке происходит через 12-36 часов (Рисунок 4).

Вирионная РНК коронавирусов может функционировать как иРНК и обеспечивать синтез вирусоспецифических белков. Вирионы созревают внутри клеток на эндоплазматической мембране, освобождаются почкованием через эндоплазматический ретикулум [41].

Развитие инфекционного процесса сопровождается виремией с локализацией вирусного антигена в лейкоцитах и эритроцитах до 16 дней после заражения. Вирулентные штаммы вируса инфекционного бронхита кур инфицируют и разрушают реснитчатые эпителиальные клетки, выстилающие трахею. Авирулентный вирус локализуется там же, но инфицирует только часть эпителиальных клеток. Вирус локализуется также в почках, селезенке, яичниках, слизистой клоаки, выделяют его и из фекалий.

Зараженные эмбрионы имеют шарообразную форму, мумифицированы, по сравнению со здоровыми – мельче. На вскрытии измененных эмбрионов отмечается гиперемия и отечность оболочек. Амниотическая оболочка мутная, плотно облегает эмбрион. Конечности деформированы и лежат над головой. Кожа сухая, оперение слабо развито. Желточный мешок сморщенный [35, 41, 66]. При вскрытии отмечается недоразвитие паренхиматозных органов; отек в области затылка и конечностей, застойную гиперемию печени, почек, хорионаллантоисной оболочки (ХАО), головного мозга и кожи [26]. У эмбрионов, которые погибли на 19-21 день инкубации, наблюдается эктопия желтка и кишечника из-за несрастания брюшной стенки.

Наибольшая концентрация вируса, при введении его в аллантоисную полость, наблюдается через 36-48 часов в ХАО, затем в аллантоисной жидкости, амнионе, печени эмбриона [41].

Культивировать вирус в культуре клеток сложно. Среди штаммов вируса ИБК, выявлено большое различие в способности, реплицироваться в культуре клеток [41]. Первичное выделение вируса инфекционного бронхита из патологического материала в монослое культуры клеток претерпевает неудачу [41]. Вирус необходимо адаптировать к РЭК, прежде чем он приобретает способность размножаться в первичной культуре клеток и органных культурах.

Трахеальные органные культуры, приготовленные от 20-дневных СПФ эмбрионов, самые успешные для культивирования как эмбрионально-адаптированных, так и неадаптированных штаммов вируса ИБК [41]. Цилиостаз выражается в уплощении и слущивании эпителия и происходит на 3-4 сутки после заражения.

2.1.2.4 Антигенная специфичность и вариабельность вируса

Классификация штаммов затруднена недостатком стандартизации реакций, используемых во всем мире, использованием различных названий для одного и того же типа вируса, числом различных испытательных систем.

Молекулярные исследования показывают, что новые серотипы и генотипы вируса ИБК появляются в результате небольших нуклеотидных замен гена S1, в то время как другие части генома остаются неизменными [47, 50, 51]. Некоторые исследователи демонстрировали и доказывали очевидность [49, 50, 51, 69, 92], что вирус ИБК может подвергаться рекомбинации в течение смешанных инфекций. В результате, перекрестных реакций не всегда возможно сделать ясную классификацию штаммов вируса ИБК.

Система классификации разделена на две группы: первая группа характеризует биологическую функцию вируса (штаммовая или патотипическая вариабельность); вторая группа рассматривает вирусный геном (антигенная вариабельность) [58].

Штаммовая или патотипическая вариабельность. Штаммы вируса инфекционного бронхита кур различаются по вирулентности или патогенности для респираторного тракта, почек или яйцеводов. Большинство штаммов вируса инфекционного бронхита кур, включая Mass, в котором M41 является прототипом, вызывают сильное респираторное заболевание. Большинство этих штаммов не вызывает смертности в одиночку. Однако различные уровни смертности наблюдаются при экспериментальной или полевой инфекции с E.coli, указывая на различный патогенный потенциал штаммов к развитию у цыплят аэросаккулита, перикардита и перигепатита [30, 35, 41, 52].

Вирулентность штаммов вируса инфекционного бронхита кур для яйцеводов сильно отличается. Многие, но не все штаммы способны реплицироваться в эпителиальных клетках яйцеводов, вызывая патологические изменения. Большинство из тех, что способны реплицироваться вызывают снижение яичной продуктивности, тогда как другие нет. Некоторые респираторные штаммы вызывают только незначительное снижение яйценоскости, но существенно влияют на цвет скорлупы [52, 54].

Нефропатогенные штаммы были доминирующим патотипом вируса инфекционного бронхита кур только в Австралии, со спорадическим выделением в других странах. Однако в течение последних 10 лет нефропатогенные штаммы появились во многих странах, включая Италию, США, Бельгию, Францию, Китай, Японию. В некоторых странах Европы эти штаммы стали доминирующим патотипом [52, 54, 65].

Антигенная вариабельность. Существует множество серотипов вируса инфекционного бронхита кур, и это стало главной проблемой при диагностике и контроле болезни. Для определения серотипа вируса используют реакцию нейтрализации. Штаммы серотипа Mass были доминирующим антигенным типом во многих странах, исключая Австралию и Новую Зеландию [52, 54]. Хотя штаммы этого серотипа продолжают выделяться по всему миру, появилось еще много уникальных и новых серотипов. Сравнение нуклеотидных последовательностей изолятов вируса инфекционного бронхита кур из различных частей света показывает, что штаммы из определенных географических регионов более сходны друг с другом, чем со штаммами из других отдаленных регионов. За исключением штаммов серотипа Mass, штаммы вируса ИБК из Европы отличаются от обнаруженных в США или Австралии и каждая географическая группа может быть дифференцирована по уникальности генетических последовательностей [4, 25, 34, 35, 36, 45, 54, 69, 85].

Перекрестные реакции, которые происходят после заражения вирусом инфекционного бронхита, усложняют серологическую идентификацию серотипов. Такие перекрестные реакции происходят в птице, которая многократно подвергается контакту с вирусом ИБК, особенно разных серотипов [33, 49, 50, 51, 54, 66, 92].

Исследователи из Великобритании [50] выделили у цыплят изолят, который в реакции нейтрализации показал отношение к трем различным

серотипам, он имел чрезвычайно схожие последовательности аминокислот в S1 протеине и, по крайней мере, 5 вируснейтрализующих антигенных детерминант. При множественных перекрестных реакциях в организме взрослой птицы, вакцинированной и вероятно инфицированной неоднократно различными серотипами, интерпретация серологических данных затруднена и порою невозможна. Серотип может быть идентифицирован только, если он включен в набор уже проверенных штаммов вируса ИБК.

Антигенная вариация между штаммами вируса инфекционного бронхита кур связана с относительно небольшими различиями в аминокислотных последовательностях в S1 шиповом протеине. Однако только антигенные исследования штаммов для определения иммунологических взаимоотношений между штаммами были недостаточными и для классификации изолятов инфекционного бронхита кур по "протектошипам" была изучена перекрестная иммунизация. Предполагают, что изменения в S1 протеине могут быть связаны с различиями в тканевом тропизме, показанном разными штаммами. В будущем, возможно, могут появиться новые штаммы вируса ИБК, которые поразят органы и системы, обычно не ассоциируемые с инфекционным бронхитом [60].

2.1.3 Эпизоотологические особенности инфекционного бронхита кур

Популяция вируса ИБК в какой-то одной стране или регионе не является постоянной. В период конца 70-х и начала 80-х гг. серотип D274 был доминирующим в Нидерландах, Франции, Англии и, возможно, в соседних странах [39]. Позднее, этот тип был замещен "новым" серотипом, называвшимся по-разному 793/B (или 4/91) – британский изоляты, и CR88 – французский изолят. В Англии он был впервые обнаружен зимой 1990-1991гг, и ассоциировался с необычной патологией, включающей миопатию грудной мышцы. При сравнении аминокислотных последовательностей участка S1 все

штаммы этого серотипа подразделили на А, В, и С подгруппы. Исследователи считают, что все штаммы серотипа 793/В возникли из общего предшественника, который не выделялся до 1990 г., либо они были занесены извне. Этот серотип обнаруживается во многих европейских странах - Англии, Франции, Германии, Польше, Италии. Его господство будет продолжаться, по-видимому, до тех пор, пока новый серотип вируса ИБК не достигнет такого же распространения [52]. В настоящее время в Англии выделяются 3 типа вируса инфекционного бронхита – 793/В (инфицирующего около 80%бройлеров), и два типа "из прошлого" – D274, D1466 (встречающегося намного меньше) [39].

В середине-конце 1980-х гг. впервые характеризовавшийся в Бельгии, господствовал другой серотип - В1648, который был причиной падежа с заболеванием почек. В Италии выявляются 793/В тип, 624/І и штаммы, которые идентифицировали как варианты серотипа В1648 [39].

В Австралии все штаммы, выделенные с 1961 по 1994 гг., были разделены на две группы. Первая - штаммы, связанные антигенно, имели общие эпитопы, дающие перекрестные реакции на пепломере S, нуклеокапсидном (N) и мембранном (M) белках, были выделены в течение всего указанного периода. Вторая группа - штаммы, выделенные с 1988 по 1994 гг. Они обладали слабой степенью родства со штаммами классической группы, но были антигенно связаны между собой. Эта новая группа не выявлялась до 1988 г. и ее происхождение неизвестно. Один штамм из новой группы - "Appin" сохранялся без антигенных изменений в течение 3 лет. Однако после вакцинаций новыми штаммами был выделен новый серотип [65]. Нужно отметить, что австралийские штаммы вируса инфекционного бронхита кур отличны от прочих штаммов, описанных в других странах мира [52].

Надо заметить, что новые штаммы не заменяют старые, которые продолжают также часто выделяться [65]. А старые штаммы, в свою очередь, не исчезают, а просто перерождаются "мутируются" [52].

В нашей стране инфекционный бронхит кур регистрируется с 1968 г. На территории России циркулируют несколько генетически различных групп изолятов вируса инфекционного бронхита кур. Из публикаций мы знаем, что в 70-80-х гг. выделяли изоляты, имеющие серологическое родство со штаммами серотипа Массачусетс, реже Коннектикут [17, 18, 19]. В конце 90-х гг. методами молекулярно-генетической диагностики выявлено, на территории России циркулировали изоляты вируса инфекционного бронхита кур разных серогрупп. 41% от выделенных имели высокое генетическое родство (94-99%) со штаммами серотипа Массачусетс. Некоторое количество обнаруживали высокий уровень гомологии с европейскими штаммами, отличными друг от друга (D274, 4/91 и B/648). Остальные выделяемые изоляты значительно отличались от всех имеющихся в банке данных российских и зарубежных штаммов (более 25% отличий). Такие изоляты были обозначены как «вариантные» изоляты [5]. Профилактика инфекционного бронхита кур затруднена тем, наличием большого количества серотипов вируса, отличающихся в антигенном отношении. В начале 2000-х годов на территории РФ выявлялись изоляты гомологичные штаммам из разных географических групп – английской, китайской, голландской, и серотипов Массачусетс и Арканзас. Кроме того, выделялись энзоотичные для России изоляты, имеющие более 20% отличий от всех представленных в Genbank [24, 25]. Высокое генетическое разнообразие вирусов ИБК на территории России объясняется высокой мутабельностью генома, постоянным использованием живых вакцин и географической удаленностью разных регионов.

2.1.4 Патогенез и клинико-патологоанатомические признаки

Первичным и основным местом репликации вируса является эпителий трахеи. Из этого места вирус распространяется в другие органы легкие, селезенку, печень, почки, яйцеводы, яичники, семенники, пищеварительный и кишечный тракты [39]. В трахее, почках, фабрициевой сумке вирус

обнаруживается уже через 24 ч. после инфицирования [41]. Вирус продолжительное время может выделяться из миндалин слепой кишки (до 14 недель) и из фекалий (до 20 недель).

При ИБК отмечают три *клинических синдрома*: респираторный, нефрозо-нефритный и репродуктивный.

Инкубационный период при ИБК зависит от инфицирующей дозы и пути заражения и длится от 18 часов (при инфицировании интратрахеально) до 36 часов (интраокулярно) [41].

Проявление клинических признаков также зависит от возраста птицы, вирулентности штамма вируса и существующего уровня иммунитета. Более восприимчивы цыплята до 2-6-недельного возраста. У которых проявляется респираторный синдром, характеризующийся кашлем, затруднением дыхания (с открытым клювом), носовыми истечениями, трахеальными хрипами, иногда конъюнктивитом, ринитом, синуситом. Наблюдается общая слабость, сопровождаемая депрессией. Потребление пищи, и масса тела значительно снижается, перья взъерошены, крылья опущены.

Болезнь цыплят приводит к аномальному развитию репродуктивных органов, и появлению "ложных" несушек – кур, которые не могут нести яйца [66]. Клинические признаки при неосложненных инфекциях могут длиться недолго, обычно менее 7 дней. Часто осложняются вторичной инфекцией *E.coli*, колибактериозом и микоплазмозом, вследствие чего усиливаются респираторные признаки. Развивается хроническое респираторное заболевание, которое может длиться несколько недель со смертностью 5-25%. Микоплазма приводит к более острым клиническим признакам с депрессией роста.

Нефрозо-нефритная форма инфекционного бронхита кур наиболее описана у бройлеров и характеризуется слабыми и кратковременными респираторными признаками с последующим угнетением. Птица взъерошена, скучивается у источников тепла, потребляет чрезмерное количество воды,

быстро теряет вес. Характерным является жидкий помет. Смертность наблюдается на 12 день после заражения. У молодняка, пораженного нефритом, смертность достигает 25% [66]. С этой формой наиболее часто идентифицируют штаммы Gray, Holte, Cal99 [62], австралийские, и китайские (QX) штаммы.

Репродуктивный синдром обычно проявляется у кур старше 6 месяцев. Болезнь у них протекает бессимптомно или с незначительным поражением органов дыхания. Болезнь при этом проявляется в виде длительного снижения яйценоскости. После болезни куры долгое время несут мелкие яйца неправильной формы с тонкой скорлупой [66].

Патологоанатомическая картина при респираторном синдроме в острых случаях выглядит так: отек и гиперемия легких, в бронхах и трахее - обильное количество серозно-слизистого экссудата с примесью хлопьев фибрина. Просветы отдельных бронхов полностью заполнены плотной фибринозной массой. Легкие вокруг первичных бронхов темно-красные и уплотнены. В полости воздухоносных мешков пенистый экссудат с хлопьями фибрина. У маленьких цыплят - катаральный ринит и синусит. При осложнении инфекции *E.coli* наблюдается аэросаккулит, перикардит и перигепатит [41, 54, 66].

При репродуктивном синдроме у взрослых кур – атрофия яйцевых фолликулов, кисты яичников. В яйцеводе – перетяжки, кисты, признаки сальпингита. Зрелые фолликулы имеют дефекты, желток, просачиваясь сквозь теку, скапливается в грудобрюшной полости, вследствие чего может развиваться желточный перитонит. У "ложных" несушек просвет яйцевода зарастает. Овуляция у них происходит в полость тела [41, 54, 66].

При нефрозо-нефритном синдроме почки желто-коричневого цвета, с пёстрым рисунком, вследствие скопления уратов в мочевых канальцах. Дряблой консистенции. Мочеточники растянуты мочекислыми солями.

Отмечают общий цианоз тушки, дегидратацию и неравномерное окрашивание скелетных мышц [41, 54, 66].

2.1.5 Формирование иммунитета кур против ИБК

Иммуногенные протеины вируса инфекционного бронхита кур. S1 гликопротеин вируса ИБК индуцирует вируснейтрализующие антитела и гемагглютинирующие антитела и рассматривается как наиболее вероятный индуктор защиты, S2 и N протеины также могут быть важными, поскольку они несут эпитопы для индукции перекрестно-реактивных антител [64]. S1-, S2- и N-антитела появляются в одно время, в ELISA их определяют через 2 недели после иммунизации живыми вакцинами против ИБК [64]. Это совпадает с появлением вируснейтрализующих антител [57, 76].

Врожденный иммунитет. У цыплят-бройлеров отмечают три критических иммунологических периода. Первый - на 5-7-й день, связанный с повышенным расходом защитных факторов, поступивших из яйца. Второй - к концу 3-й недели, обусловленный дальнейшим расходом материнских антител и незрелостью иммунной системы цыплят. Третий - к концу 2-го месяца жизни [11].

Врожденный иммунитет включает комплекс факторов, препятствующих инвазии. Физические барьерные факторы (кожа, и слизистые оболочки), и растворимые факторы (лизозим, комплемент, гранулоциты, макрофаги, киллерные клетки). Основное свойство врожденного иммунитета - отсутствие специфичности и иммунологической памяти.

Гетерофилы (нейтрофилы) - это "первая линия защиты" против инфекционных агентов, они первыми устремляются к месту инфекции, с последующим началом воспалительной реакции. Исследователями было установлено, что они не влияют на репликацию вируса ИБК и, в сущности, способствуют повреждению трахеального эпителия [60].

Приобретенный иммунитет проявляется в активации АГ-специфических эффекторных механизмов, включающих В-клетки (гуморальные), Т-клетки (клеточные), макрофаги и создание клеток памяти.

Гуморальные антитела. При получении стимула, В-клетки дифференцируются в плазменные клетки, чтобы секретировать антитела. Куры вырабатывают хорошую гуморальную реакцию на вирус инфекционного бронхита кур, измеряемую в ELISA, РЗГА или РН [59, 77, 91].

Иммуноглобулин G (Ig G) - основной циркулирующий Ig является антителом, определяемым с помощью РЗГА и ELISA. Последняя разработана для количественного его определения, и является более чувствительной [76]. IgG может быть определен уже на четвертый день после заражения, достигает пика примерно на 21 день, но может сохраняться в сыворотке в высоком титре в течение многих недель [76]. Это антитела, определяемые в обычных серологических тестах для контроля вируса инфекционного бронхита или применения вакцин.

Иммуноглобулин M (Ig M) присутствует временно, только после заражения, достигает пиковых концентраций примерно к 8 дню после заражения и затем уровень снижается [76].

Материнские антитела могут обеспечить защиту против вируса инфекционного бронхита, но продолжительность их жизни недолгая [57]. Исследования ученых показывают, что материнские антитела снижаются к 11-дневному возрасту и исчезают совсем к 19-20 дням [10, 14, 15].

Зарубежные ученые утверждают, что разные линии кур имеют разную чувствительность к заражению вирусом инфекционного бронхита [40, 80].

2.1.6 Индикация и идентификация вируса ИБК

Предварительный диагноз основан на анализе клинико-эпизоотологических данных и патологоанатомических изменений и лабора-

торных исследований (выделение, идентификация вируса, обнаружение специфических антител у переболевших птиц). Предпочтительный метод выделения – последовательные пассажи пробы на СПФ-РЭК, во время которых осуществляют индикацию вируса ИБК по его эмбриональному инфекционному действию (ЭИД). Идентификацию проводят или с помощью моноклональных антител в ИФА, РН, РЗГА, РДП или ПЦР. Ретроспективная диагностика с помощью серологических тестов имеет силу только при условии, если поголовье предварительно контактировало с вирусом инфекционного бронхита кур. Или серологический статус стада контролировался постоянно, что дает возможность точного выявления специфического роста титров антител.

2.1.6.1 Выделение вируса и биопроба.

Выделение вируса служит золотым стандартом при постановке диагноза [41]. Для исследования от больной птицы берут смывы с трахеи и гортани. От вынужденно убитых и только что павших – кусочки легких, соскобы с трахеи, гортани, бронхов, от взрослой птицы – почки и яйцевод.

Не рекомендуется отбор материала, во избежание выделения вакцинных штаммов в пределах трех недель от момента иммунизации птицы живой вакциной.

Вирус выделяют на СПФ-КЭ, проводя не менее четырех пассажей. Проба считается негативной, если через 6 пассажей не наблюдалось изменений. Для обнаружения характерных изменений несколько куриных эмбрионов оставляют на инкубацию и вскрывают на 7-9-тый день после заражения.

Выделение вируса на культуре клеток при его первичной изоляции не находит практического применения.

Биопробу проводят методом интратрахеального заражения 10-20-дневных цыплят, у которых потом наблюдают развитие клинических признаков инфекционного бронхита кур, а при вскрытии обнаруживают

патологоанатомическую картину, характерную для инфекционного бронхита кур.

2.1.6.2 Идентификация вируса.

Диагностика инфекционного бронхита кур вследствие клинического сходства с некоторыми заболеваниями, протекающими с поражением органов дыхания, бывает нередко затруднена.

Для идентификации вируса инфекционного бронхита в органных культурах трахеи возможно использование *метода иммунофлуоресценции* [38, 43]. Наличие вируса инфекционного бронхита, в материале трахеальных и клоакальных мазков зараженных цыплят, определялось в течение 24 ч. после заражения органных культур. При этом специфическая флуоресценция почти всегда определялась до развития цилиостаза.

Электронная микроскопия позволяет быстро получить ответ и дифференцировать вирус по его морфологическому строению [38, 41]. На рисунке 2 изображены вирионы инфекционного бронхита кур, обнаруженные при помощи электронной микроскопии. Хорошо видна корона из булавовидных шипиков, образованная субъединицами гликопротеина S.

Антиген-улавливающий или "сэндвич" и блокирующий варианты непрямого твердофазного иммуноферментного анализа является наиболее быстрым методом подтверждения наличия вируса инфекционного бронхита кур, как в полевой пробе, так и в аллантоисной жидкости [75, 81, 79]. Этим методом могут выявляться все типы, однако во избежание неспецифического связывания аллантоисной жидкости необходимо использовать моноклональные антитела, а это не всегда возможно.

Реакция диффузионной преципитации (РДП) используется для обнаружения антигена. Реакция дешевая, требует немного времени лабораторных средств. Хотя, реакцию считается мало чувствительной [59].

Реакция нейтрализации (РН) является дорогой и долговременной, так как в ней должно использоваться множество сывороток к разным серотипам вируса инфекционного бронхита кур.

Реакция задержки гемагглютинации (РЗГА) может использоваться для быстрого типирования изолятов вируса ИБ, но после обработки ВСЖ фосфолипазой или трипсином и наличием специфических сывороток [29, 38].

2.1.6.2.1 Молекулярно-генетические методы идентификации

Обратная транскрипция и полимеразная цепная реакция (ОТ-ПЦР) является надежным и чувствительным методом [38], который можно использовать для исследования полевых проб. ОТ-ПЦР в значительной степени вытеснила РН и гемагглютинирующий тесты для идентификации вируса ИБК. В основе ПЦР лежит многократная амплификация специфического участка нуклеотидной последовательности с помощью праймеров и ДНК-полимеразы. Метод позволяет выявить необходимый участок генома в сложной смеси молекул. Даже если этот участок присутствовал в ничтожно малых количествах. ПЦР дает возможность исследовать инфицированные ткани легких, трахей, яичников, почек кур без предварительного пассирования на культуре клеток или куриных эмбрионах [4]. В первых исследованиях тест адаптировали для выявления вируса ИБК с использованием праймеров на фрагменты генов S2, S1 и N [25, 44]. Позднее для повышения чувствительности ПЦР и разработки праймеров стали использовать консервативный нетранслируемый участок генома 3'UTR [25, 41, 53].

Полиморфизм длин рестрикционных фрагментов (ПДРФ) (*Restriction Fragment Length Polymorphism – RFLP*) – это метод генотипирования, который может применяться для дифференциации известных штаммов ИБК [38, 41, 72]. Для чего предварительно амплифицируют весь участок S гена и подвергают рестрикции [72, 78]. Зарубежными учёными было установлено, что этот метод генотипирования сравним с реакцией нейтрализации, однако некоторые

штаммы, такие как Gray и JMK сложно дифференцировать, используя ферменты рестрикции [72].

Нуклеотидное секвенирование гена S1 является единственным точным методом дифференциации всех штаммов вируса инфекционного бронхита.

Продолжительное использование живых вакцин осложняет постановку диагноза, так как нет простых диагностических методов, позволяющих дифференцировать полевой изолят от вакцинного штамма. Присутствие, которых бывает во многих полевых пробах. Некоторые молекулярные зонды в реакции ОТ-ПЦР в реальном времени дают возможность дифференцировать штаммы, одновременно представленные в пробе, однако такие зонды выявляют только те генотипы вируса инфекционного бронхита кур, которые были типированы ранее. Хотя ОТ-ПЦР-РВ более чувствительная, чем стандартная ОТ-ПЦР, но является более дорогостоящей и может выходить за рамки финансовых возможностей многих лабораторий [41].

2.1.7 Профилактика и меры борьбы с инфекционным бронхитом кур

Меры профилактики основываются на охране хозяйства от заноса вируса, строгом выполнении комплекса мероприятий, предусмотренных ветеринарно-санитарными правилами, изолированном выращивании и содержании птиц разновозрастных групп со строгим соблюдением температурно-влажностного режима в птичниках. Не допускается хозяйственная связь с неблагополучными по инфекционному бронхиту кур хозяйствами, хозяйство объявляют благополучным по инфекционному бронхиту кур через 3 месяца после последнего случая выделения больной птицы [38].

Специфическая профилактика – основное средство борьбы с инфекционным бронхитом кур с применением живых и инактивированных вакцин [39].

Живые вирусные вакцины - это, как правило, искусственно ослабленные посредством культивирования или природные авирулентные или слабовирулентные штаммы вируса, которые в серийных пассажах на естественно восприимчивых животных не проявляют повышения вирулентности и потеряли способность к горизонтальной передаче. Живые вакцины создают раннюю неспецифическую защиту, которая развивается через 1-2 дня, благодаря явлению гомологичной интерференции [8].

Основное и неоспоримое преимущество живых вакцин перед инактивированными состоит в том, что их применение обеспечивает создание более напряженного и длительного иммунитета.

Для усиления иммунитета, созданного живыми вакцинами, в ряде случаев, применяют инактивированные вакцины. В мировой практике применяемые схемы вакцинации несколько отличные друг от друга, но основной принцип один. Первая вакцинация проводится с использованием менее вирулентного штамма, живой вакциной, вторая более вирулентным и иммуногенным, тоже живой вакциной и третья - с использованием инактивированной вакцины [8].

Опыты по созданию рекомбинантных вакцин [51, 73, 90], на основе S1 гена вируса ИБК подтверждают, что небольшие различия в S1 гене дают недостаточную перекрестную защиту. Поэтому для создания перекрестного иммунитета гораздо надежнее создание рекомбинаций из S1 участков генетически различных штаммов. Методы генной инженерии дают большой потенциал для развития нового поколения вакцин против ИБК [87].

2.1.8 Заключение по обзору литературы

Инфекционный бронхит кур продолжает наносить большой экономический ущерб промышленному птицеводству во многих странах.

Ущерб складывается из снижения привесов цыплят-бройлеров, снижения яичной продуктивности и снижения качества яиц кур-несушек.

Анализ литературных источников показал широкое распространение вируса ИБК в мире и нашей стране. Вирус ИБК, коронавирусы индеек, фазанов, уток, гусей и пингвинов, вследствие сходства геномов (90%), объединены в вид – Коронавирус птиц. Как и многие РНК-содержащие вирусы коронавирус подвержен мутациям. Способность вируса мутировать в организме птицы затрудняет диагностику и профилактику ИБК.

Детекция вируса с помощью ОТ-ПЦР на основе S1 гена и последующий анализ последовательности нуклеотидов позволяет определить штаммовую принадлежность выявленных изолятов. Но для выявления вариантных вирусов ИБК требуется иногда не одна пара праймеров специфичных к S1 гену, поэтому консервативный нетранслируемый участок генома вируса является оптимальным для конструкции праймеров и массовых ОТ-ПЦР исследований.

2.2 СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Все экспериментальные исследования выполнены в отделе вирусологии Всероссийского научно-исследовательского ветеринарного института птицеводства (ВНИВИП).

2.2.1 Материалы и методы

Патологический материал для выделения эпизоотических штаммов вируса инфекционного бронхита брали от кур и цыплят различного возраста птицефабрик Саратовской, Омской, Пермской, Ленинградской, Свердловской, Челябинской областей.

Вирус. В работе использовали вакцинные штаммы "Н-120", «4/91», патогенный штамм "Чапаевский". Инфекционный титр вируса $10^{7,5}-10^{8,5}$ ЭИД₅₀/см³. Эпизоотические изоляты, выделенные из внутренних органов цыплят и кур.

Инкубационные яйца и цыплята:

- 9-10-суточные СПФ-РЭК и коммерческие РЭК 9-10-суточной инкубации, полученные из птицеводств благополучных по острым инфекционным заболеваниям;
- СПФ-цыплята 1-25-суточного возраста.

Реактивы и ферменты:

- комплект реагентов для выделения РНК/ДНК из клинического материала «РИБО-сорб» (ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора);
- комплект реагентов для получения кДНК на матрице РНК «РЕВЕРТА-Л» (ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора);
- агароза;
- смесь дезоксинуклеозидтрифосфатов (dNTP) и термостабильная Taq ДНК-полимераза (ООО «Бигль»);

- этанол 80 и 96%;
- обратная транскриптаза (MMIv);
- вода деионизированная;
- минеральное масло;
- 0,25% раствор бромфенолового синего;
- маркер длин ДНК (Axygen Scientific, Inc.).

Буферные растворы:

- трисборатный буфер (ТБЕ) концентрированный (x20) с бромидом этидия (ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора);
- 2,5-кратный ПЦР-буфер, крезоловый красный, 5,5 мМ MgCl₂ (ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора);
- 10-кратный ПЦР буфер KCl, 2,5 мМ MgCl₂;
- фосфатно-буферный 0,85%-ный физиологический раствор.

Питательные среды:

- мясопептонный бульон (МПБ);
- мясопептонный агар (МПА);
- мясопептонный печеночный бульон под вазелиновым маслом (МППБ);
- бульон Сабуро;
- агар Сабуро;

Праймеры. В работе применяли несколько систем праймеров (концентрация каждого праймера 2,0 О.Е./см³), синтез праймеров осуществляла компания ООО «Бигль» (Санкт-Петербург). Нуклеотидные последовательности, характеристики и область применения указаны в таблице:

Таблица 1 – Последовательности олигонуклеотидных праймеров

Наименование	Последовательность 5' – 3'	Положение на геноме	Референсный геном	Ген
S1(+)	TGAAAAAY(C/T)TGAACAAAAGACM (A/C)G	20302-20322	FJ904722.1	S1

Наименование	Последовательность 5' – 3'	Положение на геноме	Референсный геном	Ген
S2(+)	CTGAACAAAAGACM(A/C)GACTTAG	20308-20332	FJ904722.1	S1
S3(+)	TD(T/A/G)Y(T/C)TM(G/A)Y(T/C)AGTR(G/A)TTTGTACACA	20714-20695	FJ904722.1	S1
S4(-)	Y(T/C)TR(A/G)W(T/A)AR(G/A)CAATGY(T/C)GTD(A/T/G)ACM(A/C)AA	20681-20662	FJ904722.1	S1
S5(-)	GTD(G/T/A)CCATTD(G/A/T)ACAAAR(A/G)TAR(A/G)GC	20997-20977	FJ904722.1	S1
S1OLIGO5F	TGAAACTGAACAAAAGACA	20249-20267	KP118893.1	S1
XCE3(-)	CAGATTGCTTACAACCACC	21403-21385	KP118893.1	S1
3'UTR-F	CAGCGCCAAAACAACAGCG	26930-26948	NC_001451.1	3'UTR
3'UTR-R	CATTTCCTGGCGATAGAC	27362-27344	NC_001451.1	3'UTR

Расходные материалы и оборудование:

- бокс ламинарный с вертикальным потоком воздуха 2 класса биозащиты;
- система для проведения ПЦР в режиме реального времени CFX-96 Touch (Bio-Rad, США);
- амплификатор Терцик (ДНК-технология, Россия);
- одно- и многоканальные автоматические пипетки с диапазоном дозирования 0,5-1000 мкл;
- микропробирки объемом 0,2, 0,5 и 1,5 см³;
- спектрофотометр Promega QuantiFlour;
- термостат «Гном» (ДНК-технология, Россия);
- микроскоп МБИ-3;
- весы ВЛКТ-М и ВЛР-200 г;
- центрифуги;
- вакуумный насос;
- низкотемпературные (-20°C) и бытовые холодильники;
- источник питания Эльф-4 на 5-400 В;
- камера для горизонтального электрофореза;
- MegaBACE 1000 ДНК анализатор (GE Healthcare, США);
- источник ультрафиолетового излучения (трансиллюминатор);

– штативы, ступки и другое лабораторное оборудование.

Отбор и подготовка патологического материала. Патологический материал брали от больной птицы в период проявления у них клинических признаков. От молодняка брали легкие и трахеи, от взрослой птицы – почки и яичники. Патматериал хранили при минус 20°C до завершения исследований. Патологический материал растирали с кварцевым песком в ступке и готовили 10%-ную суспензию на физиологическом растворе. Суспензию центрифугировали при 3000 об./мин. в течение 10-15 мин. и отбирали надосадочную жидкость. К надосадочной жидкости добавляли антибиотики (пенициллин 1000 ЕД и стрептомицин - 1 мг), оставляли на контакт в течение 1-2 ч в бытовом холодильнике и делали посевы на стерильность.

Контроль материалов на стерильность. Отсутствие посторонних микроорганизмов подтверждали путем посевов в пробирки с МПА, МПБ, МППБ под вазелиновым маслом, среды Сабуро по общепринятой методике [13]. Все среды выдерживали в течение 10 суток при $37\pm 0,5^\circ\text{C}$, а среды Сабуро при 22-24°C.

Выделение изолятов вируса ИБК. Полученной суспензией патологического материала заражали 10-15 развивающихся эмбрионов кур 9-10-дневной инкубации в дозе $0,2\text{ см}^3$ в аллантоисную полость по общепринятой методике [6]. Развивающиеся эмбрионы кур инкубировали в термостате при $37\pm 0,5^\circ\text{C}$ и влажности 60-70%. Гибель развивающихся эмбрионов кур в первые 24 ч после заражения считали неспецифической. Через 72 ч после заражения собирали аллантоисную жидкость, обрабатывали антибиотиками и хранили при -20°C. Часть зараженных эмбрионов оставляли на инкубацию до 8 суток. После чего вскрывали и оценивали. При наличии гибели эмбрионов, отставания в росте, "карликовости", мумификации, шарообразной формы, кисты - эмбрионы считали, как положительные. Для исследуемого материала проводили по 4-6 пассажей на развивающихся эмбрионов кур, используя для заражения аллантоисную жидкость от эмбрионов предыдущего пассажа.

Биопроба на цыплятах. Для заражения использовали 10-20-дневных цыплят из благополучных по респираторным болезням и инфекционному бронхиту кур птицеводств. Вирусосодержащей жидкостью, полученной при пассажировании суспензии патологического материала, заражали 10-15 цыплят интратрахеально по 0,2-0,3 см³. При наличии в исследуемом материале вируса инфекционного бронхита кур у цыплят через 18-36 ч после заражения отмечали хрипы при дыхании, чихание, кашель, носовые истечения, затрудненное дыхание с открытым клювом, угнетение и сонливость.

Для накопления вируса ИБК использовали вирусосодержащий материал с биологической активностью не менее $10^{7,0}$ ЭИД₅₀/0,2см³. С этой целью готовили разведение вируса на стерильном МПБ в соотношении 1:100. Заражали 9-10-суточные развивающиеся эмбрионы кур в аллантоисную полость в объеме 0,2 см³. Зараженные эмбрионы кур инкубировали в вертикальном положении в течение 72 ч при температуре 37,0±0,5°C и относительной влажности 60-70%. В процессе инкубации эмбрионы овоскопировали два раза в сутки. Погибшие эмбрионы, впервые 24 ч, выбраковывали. Эмбрионы, погибшие через 48 ч, собирали и помещали в холодильник при температуре 4-6°C. Через 72 ч инкубации все живые и погибшие эмбрионы охлаждали при 4-6°C в течение 10-12 ч. Охлажденные эмбрионы вскрывали и при помощи вакуума отсасывали вирусосодержащую аллантоисную жидкость. В вирусосодержащий материал вводили по 1000 ЕД пенициллина и 1 мг стрептомицина на 1 см³. Выдерживали 60 мин при температуре 4-6°C и проверяли на стерильность. Вирусосодержащий материал хранили при температуре - 25-30°C.

Биологическую активность вирусосодержащей жидкости проверяли путем титрования его на 9-суточных развивающихся эмбрионах кур. Перед титрованием готовили десятикратные разведения вирусосодержащего материала на физиологическом растворе от 10^{-1} до 10^{-10} . Вирусосодержащую жидкость каждого разведения заражали по 4 развивающихся эмбриона кур в аллантоисную полость, в дозе 0,2 см³. Зараженные эмбрионы кур инкубировали

в течение 8 сут. В первые сутки павшие эмбрионы не учитывали. По истечении 8 сут развивающиеся эмбрионы кур вскрывали. При наличии отставаний в росте, скручивания, мумификации, шарообразной формы, кист - эмбрионы считали пораженными вирусом инфекционного бронхита кур и отмечали как положительные. Эмбрионы, не имеющие изменений, относили к отрицательным. На основании проведенного титрования определяли титр вируса по методу Кербера [6, 22].

Определение терморезистентности. Неразведенную вируссодержащую жидкость (ВСЖ) вносили в пробирки по 1,0 см³. Пробирки помещали в водяную баню с температурой 45°C и 56°C до уровня ВСЖ и выдерживали в течение 30, 60 и 90 минут [16]. По истечении указанных временных интервалов пробирки с материалом охлаждали на льду. Затем проводили титрование прогретого и непрогретого вируса на РЭК 8-9-суточного возраста. Метод титрации описан выше. На основании полученных результатов, определяли снижение титра изолятов вируса после обработки.

Обработка вируса эфиром. Опыты по определению чувствительности изолятов вируса к эфиру проводили следующим образом. Готовили ряд центрифужных пробирок с плотно закрывающимися пробками. В пробирки вносили по 5 см³ ВСЖ, затем добавляли по 1,0 см³ (20%) объема диэтилового эфира. Для контроля, параллельно в пробирки с ВСЖ вносили фосфатно-буферный физиологический раствор в том же объеме 1,0 см³ [16].

Инфекционную активность обработанного и контрольного вируса определяли методом титрования на развивающихся эмбрионах кур.

Определение чувствительности вируса к хлороформу. Для определения чувствительности изолятов вируса к хлороформу в центрифужные пробирки вносили по 5 см³ ВСЖ, затем добавляли по 0,5 см³ хлороформа (10%). Для контроля, параллельно в пробирки с ВСЖ вносили фосфатно-буферный физиологический раствор в том же объеме 1,0 см³. Пробирки помещали в холодильник при температуре 4°C и периодически встряхивали в

течение 1 часа, и оставляли на 18 часов. После контакта, пробирки с пробами центрифугировали в течение 30-45 мин при 2200 g [16]. При этом в пробах образовывалось три слоя: нижний – содержащий хлороформ с растворимыми в нем субстанциями, средний – осажденный белок и верхний – вирусный материал.

Конструкция праймеров. Последовательности олигонуклеотидных праймеров рассчитывались с помощью программы jPCR версия 3.09 (PrimerDigital Ltd) на основе сравнения и анализа нуклеотидных последовательностей известных штаммов, опубликованных в международной базе данных GenBank.

Выделение суммарной РНК. При совместных исследованиях с Бочковым Ю.А., суммарную РНК выделяли из 0,2 см³ вируссодержащей жидкости используя набор реактивов RNeagents Total RNA Isolation System (Promega), по инструкции производителя. Для этого готовили денатурирующий раствор, состоящий из 25 г гуанидина тиоцианата и 33 см³ CSB - буфера (42 мМ цитрат натрия, 0,83% N-лаурил саркозин, 0,2 мМ β-меркаптоэтанол). К 0,2 см³ вируссодержащей суспензии добавляли 0,5 см³ денатурирующего раствора, 0,05 см³ 2М ацетата натрия (pH 4) и 0,5 см³ фенола-хлороформа-изоамилового спирта (соотношение 25:24:1), пробирку помещали на лед на 15 мин в холодильник при +4⁰С. Центрифугировали пробирку 5 мин при 10 000g и отбирали 0,5 см³ верхней водной фазы. Добавляли 1 см³ этанола (96%) и помещали в холодильник при -70⁰С на 10 мин. Осаждали РНК центрифугированием при 10 000g в течение 5 мин., надосажок удаляли, а полученный осадок растворяли в 0,3 см³ денатурирующего раствора и добавляли 0,6 см³ этанола. Пробирку помещали при -70⁰С на 10 мин и переосаждали центрифугированием при 10 000g 10 мин. Полученный осадок РНК отмывали 75% этанолом, центрифугировали 5 мин при 10 000g, удаляли спирт и растворяли в 50-80 мкл воды в зависимости от количества осадка [4].

При самостоятельных исследованиях в лаборатории ПЦР ВНИВИП, для выделения суммарной РНК из суспензии гомогената внутренних органов в физиологическом растворе и вируссодержащей экстраэмбриональной жидкости использовали комплект реагентов для экстракции РНК/ДНК из клинического материала «АмплиПрайм РИБО-сорб» методом сорбции на частицах силикагеля, согласно инструкции производителя. В качестве положительного контроля, при выделении РНК, использовали вакцину против ИБК, в качестве отрицательного контроля – РНК-буфер или деионизированную воду.

С полученной суммарной РНК сразу же ставили реакцию обратной транскрипции.

Обратная транскрипция. Для реакции обратной транскрипции при исследованиях, проведенных совместно с Бочковым Ю.А., к 10 мкл раствора суммарной РНК добавляли реакционную смесь, содержащую 2,5 мкл 10 mM dNTP, 4 мкл 5X ревертазного буфера, 100 пмоль обратного праймера S4, 5ед. MMLV-ревертазы и воду до конечного объема 20 мкл, перемешивали и инкубировали при 42⁰ С 30 мин. После инкубации инактивировали фермент при 95⁰ С 3 минуты и быстро охлаждали на льду [4].

При самостоятельных исследованиях, проведенных в лаборатории ПЦР ВНИВИП, комплементарную ДНК получали, используя комплект реагентов для получения кДНК на матрице РНК «РЕВЕРТА-L», согласно инструкции производителя. Полученный раствор кДНК сразу использовали в ПЦР или хранили при температуре не выше -20°C.

Полимеразная цепная реакция. При совместных исследованиях с Бочковым Ю.А. полимеразную цепную реакцию проводили с использованием амплификатора ДНК Терцик. В 0,5 см³ пробирку вносили 3 мкл раствора кДНК, по 100 пмоль праймеров (S1 и S2), 5 мкл буфера для ПЦР (10X), 6 mM MgCl₂, 1,5 мкл 10 mM dNTP, 2 ед. Taq ДНК-полимеразы и воду до конечного объема 50 мкл, сверху наслаивали 50 мкл минерального масла. Проводили 35 циклов

амплификации при следующих режимах: 93⁰ С - 0,5 мин., 56⁰ С - 0,5 мин., 72⁰ С - 45 сек.

При самостоятельных исследованиях в лаборатории ПЦР ВНИВИП, полимеразную цепную реакцию проводили в амплификаторе CFX96 Touch (Bio-Rad Laboratories, Inc., США) с использованием праймеров фланкирующих нетранслируемый 3'UTR участок и ген S1 (Таблица 1) вируса инфекционного бронхита кур. Температуру плавления подбирали в зависимости от системы праймеров.

Детекция продуктов амплификации. Визуализацию продуктов амплификации проводили методом электрофореза в 1-2%-ном агарозном геле с 0,001% содержанием интеркалирующего красителя бромида этидия в трисборатном буфере (ТБЕ). Электрофорез проводили при напряжении 128 В 30 мин. Детекцию продуктов амплификации проводили на трансиллюминаторе в ультрафиолетовом свете. Так как бромистый этидий - сильный мутаген, то все манипуляции с гелями и растворами, содержащими краситель, проводили в перчатках.

Очистку продуктов ПЦР и концентрирование ДНК проводили методом осаждения этанолом [20, 21]. Вырезанный из геля продукт ПЦР помещали в колонки со стекловатой и оставляли на 12 часов при температуре -20⁰С. Колонки центрифугировали при 4000-5000 об./мин в течение 5-10 мин. Отцентрифугированную жидкость смешивали с 0,25 объема 10М ацетата аммония и 4 объемами 96%-ного этанола и помещали на 30 минут в морозильную камеру при температуре -20⁰С. Центрифугировали пробирки при 10000 об./мин в течение 15-20 минут. Сливали супернатант, промывали осадок 80%-ным этанолом, высушивали и растворяли в 10 мкл дистиллированной воды.

Секвенирование и анализ нуклеотидных последовательностей

При совместных исследованиях с Бочковым Ю.А. нуклеотидную последовательность амплифицированных фрагментов кДНК определяли

методом прямого секвенирования, используя внутренние праймеры S3 и S4 и набор реактивов Promega fmol DNA Sequencing System согласно инструкции изготовителя.

Праймеры радиоактивно метили в реакционной смеси, содержащей 100 пмоль праймера, 10 пмоль [γ - ^{32}P]-dATP (г.Обнинск), 1 мкл. 10X киназного буфера, 5 ед. полинуклеотидкиназы из фага T4 и воды до 10 мкл. Смесь инкубировали при 37⁰ С, затем прогревали при 90⁰ С 3 мин.

Для секвенирования готовили реакционную смесь, содержащую 4-40 рмоль ДНК-матрицы, 4 мкл 5X буфера для секвенирования, 1,5 мкл меченного праймера, доводили водой до 16 мкл и добавляли 5 ед. Taq-ДНК-полимеразы для секвенирования (Promega). По 4 мкл полученной смеси переносили в 4 пробирки, содержащие по 2 мкл d/ddNTP MIXES (G, A, T, C) и наслаивали по 15 мкл минерального масла. Реакцию циклического секвенса проводили при следующих температурных режимах: 94⁰ С – 0,5 мин, 56⁰ С - 0,5 мин, 70⁰ С – 1 мин,

После амплификации для остановки реакции к образцам добавляли 3 мкл стоп-раствора на стенку каждой пробирки и осаждали в микроцентрифуге. Непосредственно перед нанесением на 5% секвенирующий гель реакционную смесь прогревали в течение 2 минут при 70⁰ С. На гель наносили по 2,5-3,0 мкл каждой пробы.

После окончания электрофореза секвенирующий гель отмывали от мочевины, сушили в сухожаровом шкафу и закладывали на автордиографию. После 10-20 часовой экспозиции пленку проявляли и высушивали. Полученные результаты обрабатывали с помощью программы SeqProgs.

При самостоятельных исследованиях в лаборатории ПЦР ВНИВИП, секвенирование амплифицированных фрагментов проводили на ДНК-анализаторе MegaBACE 1000 согласно инструкции производителя. Для

обработки и просмотра результатов секвенирования использовали MegaBACE Sequencing Analysis Software v.4.0.

Анализ нуклеотидных последовательностей, контроль качества и филогенетический анализ. Анализ нуклеотидных последовательностей проводили с помощью программ MEGA 6 [71] и UGENE v.1.22.0 [63, 82]. Контроль качества проводили с помощью программы FASTQ. Выравнивание последовательностей осуществляли с помощью программы ClustalW и алгоритма множественного выравнивания. Построение дендрограмм проводили с помощью алгоритма Neighbor-Joining (в том числе с использованием бутстрэп-анализа) программы MEGA 6.

Статистическая обработка результатов исследований. Использовали общепринятые в биологии методы статистической обработки данных. Вычислительные операции и графические построения выполняли с помощью программного приложения Microsoft Office Excel.

2.2.2 Выделение изолятов вируса ИБК

Нами была поставлена задача выделить изоляты вируса инфекционного бронхита кур и провести их идентификацию.

В одном из птицеводств Омской области наблюдали заболевание яйценоского поголовья кур, протекающее с поражением герминативного тракта, проявление которого и патологоанатомические изменения имели свои особенности.

В хозяйстве в течение ряда лет регистрировали колибактериоз, микоплазмоз, пуллороз, в том числе и инфекционный бронхит кур.

Для профилактики ИБК птицу иммунизировали трехкратно живой вирус-вакциной из штамма "Н-120" и четвертый раз инактивированной эмульсионной вакциной против инфекционного бронхита кур, ньюкаслской болезни и синдрома снижения яйценоскости-76

При эпизоотическом обследовании хозяйства у яйценоского поголовья наблюдался репродуктивный синдром, выражающийся в резком спаде яйценоскости. Респираторная клиника не наблюдалась. На момент обследования наблюдался большой падеж промышленного стада (до 40%). При патологоанатомическом вскрытии, у 70% павших кур наблюдалась деформация яичника (дистрофия, перетяжки, зернистость, кисты и т.п.). У некоторых кур наблюдался перитонит; увеличенные почки с зернистостью, солевыми отложениями; селезенка увеличена; печень дряблая. При этом кишечник и железистый желудок без изменений, трахея, легкие и воздухоносные мешки без изменений, синусит не наблюдался.

Для уточнения этиологии заболевания мы провели вирусологические исследования.

Из хозяйства были доставлены 10 кур восьмимесячного возраста. При клиническом осмотре была установлена задержка развития кур, они были недоразвиты для своего возраста. При патологоанатомическом вскрытии отмечали недоразвитие яичников с наличием кист, перетяжек, дистрофии; почки увеличены с отложением солей.

От этих кур брали для исследования почки и яичники. Приготовление материала и выделение вируса проводили обычным методом (см. "Материалы и методы"). Приготовили отдельно суспензию яичников и отдельно суспензию почек.

При заражении развивающихся эмбрионов кур суспензией яичников кур птицеводства Омской области, в третьем пассаже пал один эмбрион из четырнадцати зараженных (7%). При заражении суспензией почек – в 4-ом пассаже пало 9% зараженных эмбрионов. В дальнейшем проводили пассажи изолята из суспензии яичников. Часть эмбрионов, как обычно, оставляли до восьми суток после заражения, для оценки изменений. В процессе пассажирования количество павших эмбрионов увеличивалось и в пятом

пассаже "положительных" эмбрионов кур (павших и с характерными признаками ИБК: карликовость, скрученность в "шары"), изолятом выделенным из яичников достигла 78%. Активность изолята вируса ИБК в пятом пассаже составила $5,5 \lg \text{ЭИД}_{50}/0,2 \text{ см}^3$.



Рисунок 5 – Куриные эмбрионы с характерными признаками ИБК, зараженные изолятом, выделенным от кур птицеводства Омской области

У эмбрионов, павших в первые дни после заражения, отмечалась гиперемия зародыша, отечность и кровенаполненность почек, застойные явления в печени, а у эмбрионов с более поздними сроками гибели – задержка в росте и развитии, амниотическая оболочка уплотненная и окружает зародыш, имеющий форму шара (Рисунок 5). У таких зародышей желточный мешок сморщен, а желток уплотнен.

Аллантоисную жидкость от павших эмбрионов исследовали на наличие бактериальной флоры путем посева на соответствующие питательные среды. Для исключения гибели эмбрионов от поражения вирусом ньюкаслской болезни мы исследовали аллантоисную жидкость павших эмбрионов четвертого и шестого пассажей в реакции гемагглютинации.

Для дальнейшей идентификации вируса была поставлена реакция нейтрализации выделенного вируса с гипериммунными сыворотками на развивающихся эмбрионах кур. В результате этих исследований было установлено, что специфические сыворотки к антигенному серотипу

Массачусетс вируса инфекционного бронхита кур нейтрализовали выделенный нами вирус.

Выделенный вирус проверяли также путем проведения биопробы на цыплятах. Аллантоисную жидкость от павших эмбрионов вводили цыплятам в трахею в разведении физиологическим раствором 1:10 или мясо-пептонным бульоном по 0,2 см³.

Все зараженные цыплята заболевали с клиническими признаками, характерными для инфекционного бронхита кур.

Исходя из этих исследований считали, что из патологического материала, полученного от восьмимесечных кур птицеводства Омской области, выделен изолят вируса ИБК, которому присвоили название "RF/09/00".

Несколько позже в бройлерном репродукторе Саратовской области наблюдали заболевание цыплят, протекающее с поражением респираторных органов, клиническое проявление которого и патологоанатомические изменения имели свои особенности.

В хозяйстве регистрировался респираторный микоплазмоз и колибактериоз. Необходимо отметить, что вакцинацию против инфекционного бронхита кур не проводили.

Первые признаки заболевания появлялись у цыплят на 15-18 дне жизни. У больных наблюдали учащенное дыхание, конъюнктивиты. У некоторых появлялись отеки подглазничного синуса. Отдельные цыплята становились вялыми, малоподвижными, чихали и у них прослушивались хрипы.

При патологоанатомическом вскрытии обнаруживали скопление в носовых полостях и трахее повышенного количества серозно-слизистого экссудата. Также наблюдалось помутнение грудных воздухоносных мешков, в полостях - пенистый экссудат, иногда с примесью фибрина, у некоторых

цыплят – участки пневмонии вокруг крупных бронхов (уплотнения темно-красного цвета).

Для уточнения этиологии болезни мы провели вирусологические исследования.

Из хозяйства были доставлены 10 цыплят 20-30-суточного возраста. При клиническом осмотре было установлено следующее: цыплята нахохлившиеся, с втянутой в туловище головой, перо грязное, прослушиваются хрипы, ринит, некоторые из них чихают. При патологоанатомическом вскрытии отметили повышенное количество слизистого экссудата в ротовой и носовой полостях и в трахее, у всех цыплят обнаружены участки пневмонии вокруг крупных бронхов и в корнях легкого, у нескольких цыплят – помутнение воздухоносных мешков.

От больных цыплят брали для исследования трахеи и пораженные участки легких. Приготовление материала и выделение вируса проводили по методике, описанной выше (см. "Материалы и методы").

Первые изменения эмбрионов, характерные для инфекционного бронхита кур появились на третьем пассаже. Падеж развивающихся эмбрионов кур при заражении суспензией легких и трахеи цыплят птицефабрики Саратовской области начался с 4-го пассажа (6,3%), количество пораженных эмбрионов кур (с характерными для инфекционного бронхита кур изменениями) к 6-му пассажу достигла 45%. Активность изолята к шестому пассажу составила 4,5lg ЭИД₅₀/0,2 см³.

Мы провели три слепых пассажа, прежде чем появились характерные изменения у зараженных развивающихся эмбрионов кур, вскрытых на восьмой день после заражения. Из восьми оставленных эмбрионов два было с изменениями (25%). Наблюдалась задержка в росте и развитии вплоть до "карликовости", при которой зародыш с прижатыми к голове лапами окружен уплотненной амниотической оболочкой и имеет форму шара. В следующем пассаже из 16 зараженных эмбрионов один пал (6,3%), а из оставленных восьми

три имели характерные изменения (37%). При дальнейших пассажах количество павших и характерно измененных эмбрионов увеличивалось. И к шестому пассажу "положительные" (павшие и с изменениями) эмбрионы кур составили 45%.

У эмбрионов, павших в первые дни после заражения, отмечалась гиперемия зародыша, отечность и кровенаполненность почек, а у павших в более поздние сроки, отмечали задержку в развитии и росте зародышей вплоть до "карликовости" со скрученностью (Рисунок 6).



Рисунок 6 – Куриные эмбрионы с характерными признаками ИБК, зараженные изолятом, выделенным от цыплят-бройлеров птицеводства Саратовской области

При высевах на МПБ, МПА и МППБ из патологического материала, которым заражали эмбрионы кур, было установлено отсутствие бактериальной флоры.

Таким образом, из патологического материала от больных цыплят был выделен инфекционный агент не бактериального происхождения, вызывающий гибель эмбрионов кур и изменения их, аналогичные изменениям при заражении вирусом инфекционного бронхита кур.

На 25-суточных цыплятах была поставлена биопроба. Аллантоисную жидкость от павших эмбрионов вводили цыплятам в трахею в разведении физиологическим раствором 1:10 по 0,2 см³. Через 24-36 часов у цыплят

отмечали клинические признаки, описанные при заражении вирусом инфекционного бронхита.

Аллантоисную жидкость павших эмбрионов кур третьего и пятого пассажей исследовали в реакции гемагглютинации с отрицательными результатами.

При исследовании в реакции нейтрализации на развивающихся эмбрионах кур выделенный вирус нейтрализовался сывороткой против вируса инфекционного бронхита серотипа Массачусетс.

Кроме этого вирусодержащая аллантоисная жидкость куриных эмбрионов, зараженных выделенным вирусом, была исследована обратной транскрипцией и полимеразной цепной реакцией (ОТ-ПЦР). В результате которой был выявлен геном вируса инфекционного бронхита кур. Секвенирование фрагмента кДНК выделенного вируса и последующий сравнительный анализ показали, что он не входит ни в одну генетическую группу и имеет более 25% отличий от всех известных зарубежных и российских штаммов вируса ИБК.

На основании проведенных исследований мы пришли к выводу, что выделенный нами изолят является вирусом инфекционного бронхита кур, и присвоили ему название "RF/12/01".

Результаты выделения изолятов вируса ИБК на развивающихся эмбрионах кур представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Результаты выделения изолятов вируса ИБК на РЭК

Изолят	Возраст птицы	Патологический материал	Пассаж начала падежа	Пораженность РЭК	Биологическая активность Ig ЭИД ₅₀ /0,2 см ³
RF/09/00	8 мес.	Яичники	3/7%*	5/68%**	5/5,5***
		Почки	4/9%*	-	-
RF/12/01	20-30 дн.	Трахея, легкие	4/6,3%*	6/45%**	6/4,5***

Примечание: *- пассаж/количество павших РЭК; ** - пассаж/количество РЭК с характерными изменениями; *** - пассаж/титр биологической активности, ЭИД₅₀/0,2 см³.

В результате последовательных многократных пассажей суспензии патологического материала, отобранного от кур с клиническими признаками инфекционного бронхита кур (трахея, легкие, почки и яичники), на развивающихся эмбрионах кур выделены вирусные агенты характерные для инфекционного бронхита. Они вызывали характерные изменения развивающихся эмбрионов кур (отставание в росте, "карликовость", перекручивание шеи, мумификация, шарообразная форма, кисты), и гибель.

На основании проведенных исследований было подтверждено, что метод заражения развивающихся эмбрионов кур можно с успехом применять для выделения вируса инфекционного бронхита кур из патологического материала от больной птицы, благодаря характерным изменениям, вызываемым вирусом на эмбрионах.

Специфические изменения и гибель эмбрионов при культивировании вируса дают возможность применять указанный метод для идентификации выделенного вируса и диагностики инфекционного бронхита методом реакции нейтрализации в развивающихся эмбрионах кур.

2.2.3 Изучение чувствительности изолятов вируса к некоторым химическим и физическим факторам

При изучении биологических свойств вирусных изолятов инфекционного бронхита кур имеют значение их устойчивость к физико-химическим факторам. Нашей задачей было изучение устойчивости изолятов к физико-химическим факторам.

Использующиеся в вирусологии, некоторые физические и химические агенты оказывают преобладающее воздействие на липидный, белковый или

нуклеиновый компоненты вируса. При изучении устойчивости изолятов вируса к химическим и физическим факторам обращали внимание на определение чувствительности к действию эфира, хлороформа, и действию температуры.

2.2.3.1 Чувствительность изолятов вируса ИБК к действию эфира и хлороформа

Проба на определение чувствительности к эфиру позволяет обнаружить липидную оболочку у вириона. Вирион инфекционного бронхита кур покрыт липопротеидной оболочкой, следовательно, он чувствителен к воздействию эфира и другим жирорастворителям [15, 19, 83].

Применение хлороформа дает еще лучшие результаты. Поэтому нашей задачей было изучить устойчивость изолятов вируса ИБК к воздействию эфиром и хлороформом.

Мы проводили ряд опытов по определению чувствительности изолятов вируса к эфиру следующим образом. Готовили шесть рядов центрифужных пробирок с плотно закрывающимися пробками. В первый, второй и третий ряды пробирок наливали по 5 см³ вирусосодержащей жидкости изолята “RF/09/00”, в четвертый, пятый и шестой – вирусосодержащую жидкость изолята “RF/12/01” в том же объеме.

Затем в первый и четвертый ряды добавляли по 1,0 см³ (20%) объема диэтилового эфира, во второй и пятый ряды – по 0,5 см³ хлороформа (10%), а в третий и шестой – фосфатно-буферный физиологический раствор в том же объеме 0,5 см³. Пробирки помещали в холодильник при температуре 4°C и периодически встряхивали в течение 1 часа, и оставляли на 18 часов.

После контакта, пробирки с пробами центрифугировали в течение 30-45 мин при 2200 g. При этом в пробах, обработанных хлороформом, образовывалось три слоя: нижний – содержащий хлороформ с растворимыми в

нем субстанциями, средний – осажденный белок и верхний – вирусный материал.

Следующим этапом было проведение титрования, исследуемого обработанного и контрольного не обработанного материала. В результате проведенных исследований установлено, что в пробах вирусосодержащего материала обоих изолятов, обработанных эфиром, произошло снижение инфекционного титра больше чем на 1 lg. И полная инаktivация вирусных изолятов при обработке хлороформом. Результаты опыта представлены в таблице (Таблица 3). Это позволяет сделать вывод, что изоляты вируса инфекционного бронхита кур “RF/09/00” и “RF/12/01”, выделенные в птицеводствах чувствительны к органическим растворителям.

Таблица 3 – Определение чувствительности изолятов вируса к действию эфира и хлороформа

Изолят	Инфекционный титр до обработки, lg ЭИД ₅₀ /см ³	Инфекционный титр обработанной пробы, lg ЭИД ₅₀ /см ³		Инфекционный титр контрольной пробы, lg ЭИД ₅₀ /см ³	Снижение титра в результате обработки	
		20% эфиром	10% хлороформом		20% эфиром на lg ЭИД ₅₀ /см ³	10% хлороформом
RF/09/00	6,4	2,8	0	5,2	3,6	100%
RF/12/01	5,1	1,2	0	3,8	3,9	100%

Из проведенных исследований видно, что исследуемые изоляты после обработки эфиром снижают свою инфекционность на 3,6-3,9 lg ЭИД₅₀/см³, и полностью теряют свою жизнеспособность после обработки хлороформом (Рисунок 7), что свидетельствует об их чувствительности к органическим растворителям.

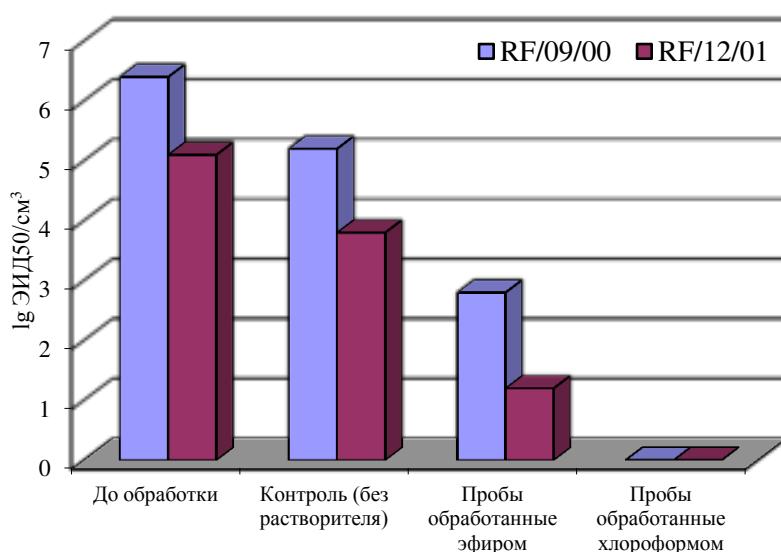


Рисунок 7 – Определение чувствительности изолятов RF/09/00 и RF/12/01 к органическим растворителям

Таким образом, при изучении устойчивости вирусных изолятов ИБК к химическим факторам установлено, что оба изолята чувствительны к органическим жирорастворителям. После обработки диэтиловым эфиром изолят «RF/12/01» снижает свою инфекционную активность на 3,6 lg ЭИД50/см³, изолят «RF/09/00» – на 3,9 lg ЭИД50/см³. После экспозиции с хлороформом оба изолята полностью теряют инфекционность.

2.2.3.2 Изучение терморезистентности изолятов

Вирусы характеризуются разной чувствительностью к действию температуры. Особенно отчетливо эти отличия выявляются в зоне температур от 50°C до 60°C. Мы изучали изменение инфекционной активности вирусных изолятов под воздействием двух температурных режимов.

Пробы вирусосодержащей жидкости инкубировали при 45°C и 56°C и наблюдали динамику инактивации в различные периоды времени – 30, 60 и 90 минут. Каждую пробу после предварительной температурной обработки проверяли на наличие инфекционного титра.

При температуре 56°C инфекционность вируса быстро уменьшалась в течение первых 30 минут. Через 30 минут выдержки инфекционность упала на 5,3 lg ЭИД₅₀/см³ у изолята «RF/12/01» и 4,9 – у «RF/09/00». В течение часового периода инкубации изоляты полностью потеряли инфекционность (Таблица 4).

Таблица 4 – Чувствительность изолятов к температуре 56°C

Исследуемый изолят	Инфекционность перед обработкой, lg ЭИД ₅₀ /см ³	Инфекционность после обработки при 56°C, lg ЭИД ₅₀ /см ³ в течение		
		30 минут	60 минут	90 минут
RF/09/00	6,4	1,1	0	0
RF/12/01	5,2	0,3	0	0

Графически снижение титра изолятов при температуре 56° С представлена на рисунке 8.

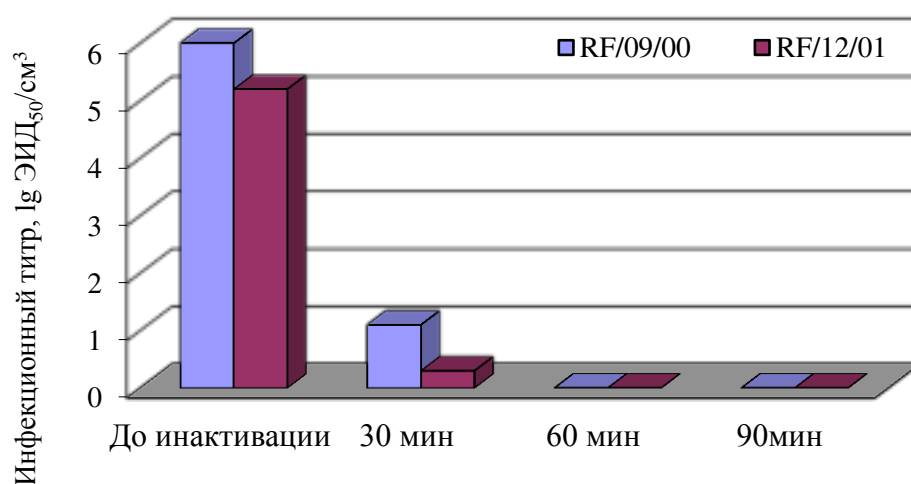


Рисунок 8 – График инактивации изолятов вируса ИБК при 56°C

По горизонтали – время обработки, мин; по вертикали – снижение титра вируса, ЭИД₅₀/см³.

При температуре 45°C через 30 минут инфекционность изолята «RF/12/01» снизилась на 3,2 ЭИД₅₀/см³ и на 3,3 ЭИД₅₀/см³ – у «RF/09/00». Через 60 мин изоляты полностью теряли свою инфекционную активность (Таблица 5).

Таблица 5. Чувствительность изолятов к температуре 45°C

Исследуемый изолят	Инфекционность перед обработкой, lg ЭИД ₅₀ /см ³	Инфекционность после обработки при 45°C, lg ЭИД ₅₀ /см ³ в течение		
		30 минут	60 минут	90 минут
RF/09/00	6,4	3,1	0	0
RF/12/01	5,2	2,0	0	0

Графически снижение титра изолятов при температуре 45°C представлено на рисунке 9.

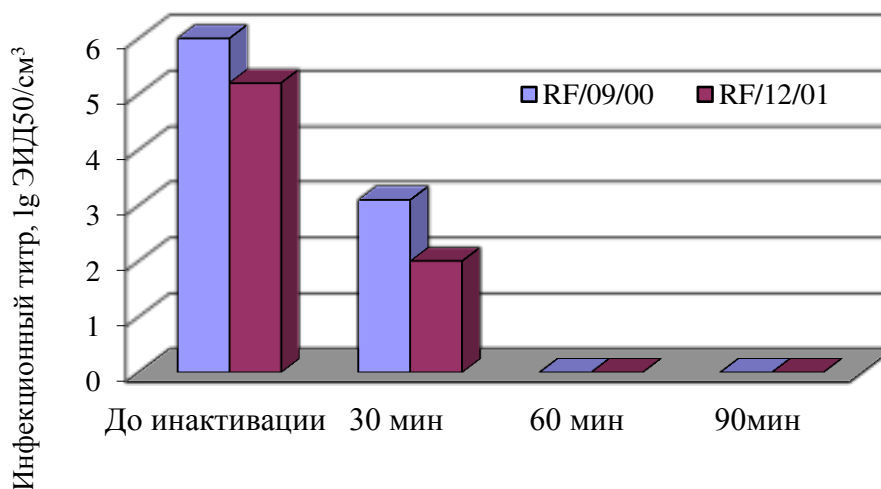


Рисунок 9 – График инактивации изолятов вируса ИБК при 45°C

По горизонтали – время обработки, мин; по вертикали – снижение титра вируса, lg ЭИД₅₀/см³.

Из опытов по чувствительности изолятов к температурному фактору выявили, что изолят «RF/09/00» через 30 минут снижает свою активность при температуре 45°C на 3,3 lg ЭИД₅₀/см³, при 56°C на 4,9 lg ЭИД₅₀/см³. Изолят

«RF/12/01» – на $3,2 \text{ см}^3$ и $5,3 \text{ lg ЭИД}_{50}/\text{см}^3$ соответственно. Через 60 мин оба изолята полностью снижают свою активность при температурах 56°C и 45°C . Таким образом, при изучении терморезистентности изоляты «RF/09/00» и «RF/12/01» показали термолабильность.

2.2.4 Метод выявления вируса инфекционного бронхита с помощью обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции

Известны две основные причины эволюции коронавирусов: мутации в связи с частотой ошибок вирусной РНК-полимеразы и рекомбинации последовательностей S1 гена. И, как следствие, появление в мире новых штаммов и генотипов [49, 51, 68]. Ген S1 вируса ИБК интересен для проведения филогенетического анализа, но его высокая изменчивость значительно усложняет его выявление при массовых исследованиях. Нетранслируемый 3'UTR регион содержит консервативную последовательность нуклеотидов и является оптимальным участком генома коронавируса птиц для подбора праймеров с целью выявления его методом полимеразной цепной реакции (ПЦР).

Исходя из вышесказанного, нами были поставлены задачи: сконструировать олигонуклеотидные последовательности праймеров специфичных к консервативному нетранслируемому участку генома вируса ИБК; усовершенствовать тест-систему для индикации и идентификации вируса ИБК с помощью ОТ-ПЦР и оценить возможность использования данного метода для лабораторной диагностики ИБК при исследовании патологического материала.

Для решения поставленных задач были выполнены следующие этапы работы:

- проведен анализ геномных последовательностей вируса ИБК в банке данных NCBI и определена последовательность олигонуклеотидных праймеров;

- оптимизированы условия проведения ПЦР и определены специфичность и аналитическая чувствительность разработанного метода;
- проведена апробация разработанной ОТ-ПЦР с использованием проб патологического материала, и вирусосодержащего материала с содержанием вируса ИБК, принадлежащего различным генотипам ИБК.

2.2.4.1 Анализ геномных последовательностей вируса ИБК из международной базы данных GenBank и определение оптимальных олигонуклеотидных последовательностей праймеров

Анализ международной базы данных GenBank был проведен с учетом, сходства геномов (до 90%) вируса инфекционного бронхита кур, коронавирусов индеек, уток, гусей, фазанов и пингвинов, которые были объединены в один вид – коронавирус птиц. Для определения последовательностей олигонуклеотидных праймеров были выбраны два референсных генома, выделенных у кур и индеек (NC_001451.1 Avian infectious bronchitis virus, NC_010800.1 Turkey coronavirus).

Были определены последовательности олигонуклеотидных праймеров и проверены на отсутствие комплементарности друг другу с помощью программы jPCR версия 3.09 (PrimerDigital Ltd). Проверка специфичности праймеров с помощью программы Primer-BLAST (NCBI, National Center for Biotechnology Information) показала, что подобранные праймеры отжигаются только на нетранслируемом участке генома вируса ИБК. Синтез праймеров производился в ООО «Бигль» (г. Санкт-Петербург)

Характеристики олигонуклеотидных праймеров и их схематическое расположение на геноме представлены ниже (Таблица 6, Рисунок 10).

Таблица 6 – Последовательность и характеристика праймеров

Праймер	Последовательность	Длина	Температура плавления, °C	GC%
3'UTR-F	GAGCGCCAAAACAACAGCG	19	62,58	63.16
3'UTR-R	CATTTCCCTGGCGATAGAG	19	52,63	52.63

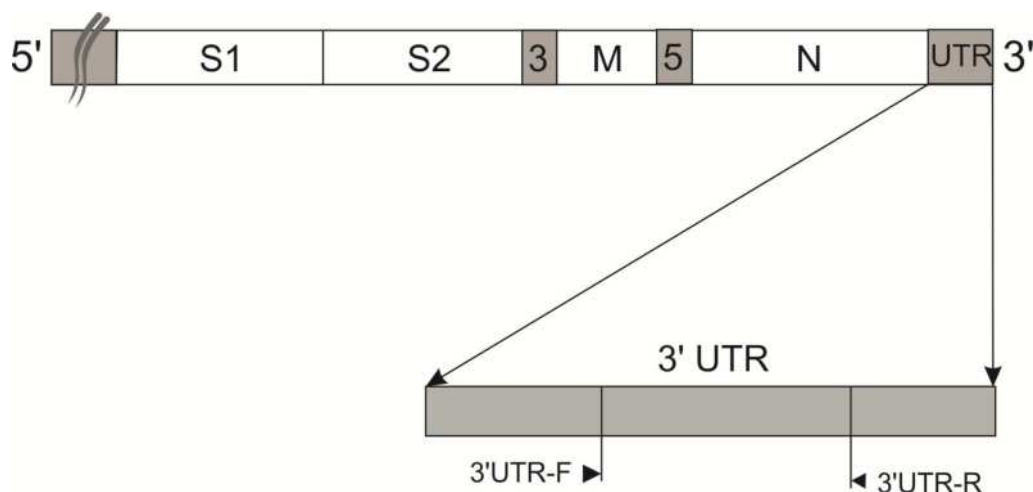


Рисунок 10 – Расположение специфических 3'UTR праймеров на геноме коронавируса птиц

Праймеры фланкируют участок длиной 433 п.н. на 3'UTR участке генома вируса инфекционного бронхита кур, и участок 277 п.н. на 3'UTR участке генома коронавируса индеек (Таблица 7).

Таблица 7 – Расположение и размеры участков, ограниченных праймерами, относительно референсных геномов

Праймер	Ген	Размер (п.н.)	Участки генома	Референсный геном
3'UTR-F	3'UTR	433	26930-26948	NC_001451.1 Avian infectious bronchitis virus
3'UTR-R			27362-27344	
3'UTR-F	3'UTR	277	27111-27129	NC_010800.1 Turkey coronavirus
3'UTR-R			27387-27369	

2.2.4.2 Полимеразная цепная реакция

Был проведен ряд опытов по подбору оптимальных концентраций и соотношений компонентов реакционной смеси и матричной кДНК штаммов «Н-120» и Nobilis «IB 4-91». При сравнении 10х КСІ ПЦР буфера (Mg^{+2} 2.5 мМ) и 2,5-х ПЦР-буфер, наилучшие результаты по чувствительности реакции показал 2,5-кратный ПЦР-буфера (Рисунок 11, Рисунок 12). Были сделаны десятикратные разведения вирусвакцины 4/91с титром $3,6 \lg \text{ЭИД}_{50}/\text{см}^3$. Предел обнаружения кДНК с 2,5-х ПЦР-буфером составил 10^{-5} , тогда как с 10х КСІ ПЦР-буфером только 10^{-2} .

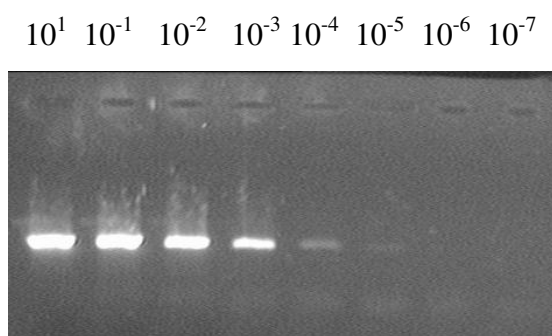


Рисунок 11 – Электрофореграмма ПЦР-продуктов на основе 2,5х ПЦР 2–red буфера

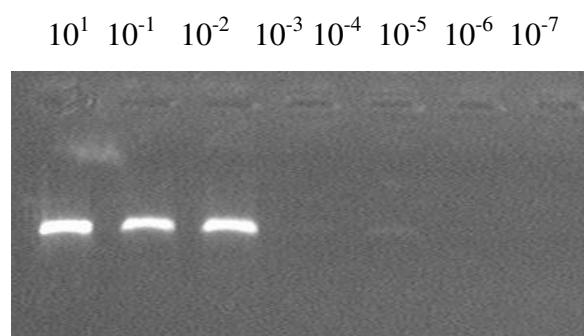


Рисунок 12 – Электрофореграмма ПЦР-продуктов на основе 10х КСІ ПЦР-буфера

В результате испытаний был определен состав ПЦР смеси (Таблица 8). Общий объем реакционной смеси для одной пробы составил 25 мкл, концентрация ионов Mg^{+2} составила 2,2 мМ, дезоксинуклеозидтрифосфатов 0,32 мМ, каждого праймера по 0,2 рМ и 1 ед. Taq-ДНК полимеразы.

Таблица 8 – Состав ПЦР-смеси и концентрация компонентов

Реактив	Концентрация исходная	Количество на 1 реакцию, мкл	Конечная концентрация
Деионизированная вода	-	7,2	-
2,5-кратный ПЦР-буфер	2,5х	10	1х
$MgCl_2$ (в составе буфера)	5,5 мМ	-	2,2 мМ
dNTP	5мМ	1,6	0,32 мМ

Реактив	Концентрация исходная	Количество на 1 реакцию, мкл	Конечная концентрация
Праймер F	10 pM	0,5	0,2 pM
Праймер R	10 pM	0,5	0,2 pM
Taq-ДНК полимеразы	5 ед./мкл	0,2	1 ед.
ДНК матрицы	-	5	-
Конечный объем	-	25	-

Температурно-временной режим амплификации состоял из следующих этапов: первичная денатурация и инаktivация ревертазы 94°C – 3 мин, затем 35 циклов: 94°C – 45 сек., 55°C – 45 сек., 72°C – 45 сек., и финальный цикл 72°C – 5 мин.

2.2.4.3 Оценка специфичности и аналитической чувствительности метода

Специфичность метода была проверена на различных образцах биологического материала, содержащие разные штаммы вируса ИБК и нескольких видах РНК-содержащих вирусов (вирус ньюкаслской болезни, метапневмовирус птиц, вирус инфекционной бурсальной болезни, реовирус). Положительная реакция наблюдалась только с РНК вируса инфекционного бронхита кур, что свидетельствовало о специфичности метода. В таблице 9 показаны результаты испытаний специфичности разработанного метода ОТ-ПЦР.

Таблица 9 – Результаты испытаний специфичности метода

Исследуемый материал	Результат
20% суспензия почек цыплят, инфицированных вирусом ИБК, 10 ⁻³ штамм Massachusetts 41	Положительно
Вирусосодержащая жидкость, штамм CR88121, серотип 4/91 CR88 793B, 10 ⁻²	Положительно
Вирусосодержащая жидкость, штамм D1466, 10 ⁻²	Положительно
Аллантаическая жидкость РЭК, после введения раствора Хэнкса	Отрицательно
20% суспензия почек цыплят, инфицированных вирусом ИБК, штамм CR88121, серотип 4/91 CR88 793B	Положительно

Исследуемый материал	Результат
Вирусосодержащая жидкость, штамм Massachusetts 41	Положительно
20% суспензия почек цыплят, инфицированных вирусом ИБК, штамм D388 (QX)	Положительно
20% суспензия почек СПФ цыплят	Отрицательно
Вирусосодержащая жидкость, штамм «Ла-Сота» вируса НБ	Отрицательно
Вирусосодержащая жидкость, штамм «Крон-1» вируса МПВИ	Отрицательно
Вирусосодержащая жидкость, штамм «ВНИВИП» вируса ИББ	Отрицательно
Вирусосодержащая жидкость, штамм «1133» реовируса	Отрицательно

В результате проведенных исследований установлено, что амплификация специфического фрагмента кДНК (консервативного нетранслируемого участка) наблюдалась только в 6 заведомо положительных образцах, содержащих вирус ИБК.

Чувствительность метода определяли с использованием десятикратных разведений трех образцов кДНК вируса ИБК (штамм 4/91) с известной концентрацией. По данным GenBank длина одной молекулы кДНК штамма 4/91 (GenBank: KF377577.1) составляет 27618 п.н.

Концентрацию полученной кДНК измеряли спектрофотометрически, и определяли число молекул кДНК в 1 мл (N) по формуле (1):

$$N = \frac{\text{концентрация кДНК} \left(\frac{\text{г}}{\text{мкл}} \right) * \text{число Авогадро} \left(\frac{\text{молекул}}{\text{моль}} \right)}{\text{молярная масса кДНК} \left(\frac{\text{г}}{\text{моль}} \right)} \quad (1)$$

Концентрация кДНК первого образца составила 1 нг/мкл или 1×10^{-9} г/мкл. Поскольку молярная масса 1 п.н. составляет 660 г/моль, молярная масса кДНК равна $660 \text{ г/моль} \times 27618 \text{ п.н.} = 18227880 \text{ г/моль}$. Следовательно, концентрация кДНК в первом образце составляет:

$$N = \frac{1 \times 10^{-9} \frac{\text{г}}{\text{мкл}} * 6,022045 \times 10^{23} \frac{\text{молекул}}{\text{моль}}}{18227880 \text{ г/моль}} = 3,30 * 10^7 \frac{\text{молекул}}{\text{мкл}}$$

Из образца готовили серию 10-кратных разведений (от 1 до 7), содержащих от $3,3 \times 10^6$ до 3,3 копий/мкл. Со вторым образцом также делали

серийные разведения и проводили ПЦР. Электрофореграмма реакции представлена на рисунке 13.

Пределом чувствительности считали последнее разведение, при котором регистрировался положительный результат. Предельное разведение первого образца (10^{-5}), в котором был выявлен геном вируса ИБ 4/91, содержало $3,3 \times 10^2$ копий/мкл.

Таблица 10 – Результаты определения чувствительности метода

№ образца	Концентрация кДНК, г/мкл	Число молекул кДНК в 1 мкл	Число выявляемых молекул кДНК на 1 мкл
1	1×10^{-9}	$3,30 \times 10^7$	$3,3 \times 10^2$
2	1×10^{-9}	$3,30 \times 10^7$	$3,3 \times 10^2$

Среднее значение числа выявляемых молекул кДНК составило $3,3 \times 10^2$ копии/мкл или $3,3 \times 10^5$ копий молекул кДНК вируса/мл.

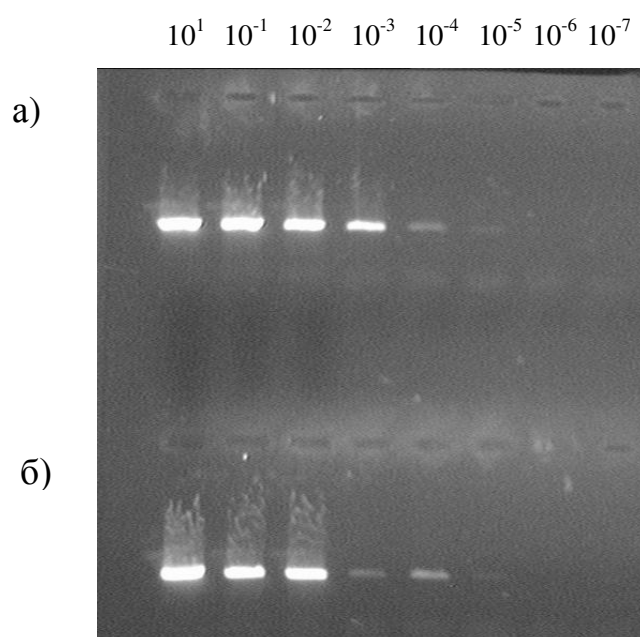
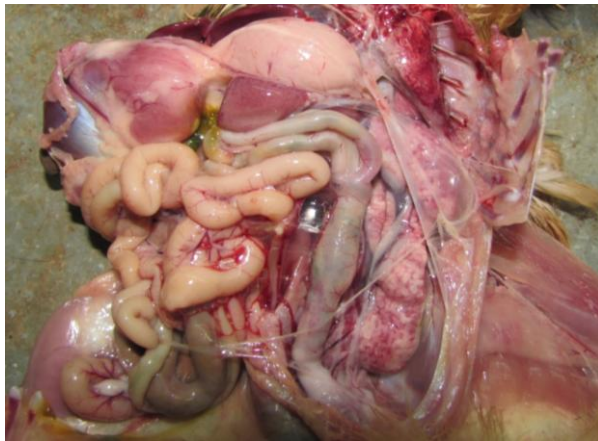


Рисунок 13 – Электрофореграмма результатов амплификации 3'UTR фрагмента генома вируса ИБ, штамм 4/91 при разных концентрациях матрицы: а) образец №1; б) образец №2

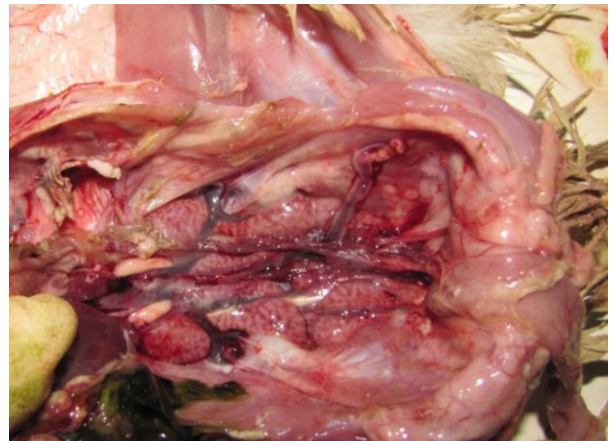
2.2.4.4 Оценка возможности использования разработанного метода на основе ОТ-ПЦР для выявления вируса ИБК в полевых пробах

Следующим этапом исследования явилась оценка значимости разработанного метода для диагностических исследований в лабораторных условиях. Была изучена возможность выявления фрагментов консервативного участка генома вируса ИБК в образцах патологического материала полученных от птиц различных птицевхозов РФ с признаками ИБК.

При вскрытии павших или вынужденно убитых кур для исследований отбирали увеличенные, анемичные, с пестрым рисунком почки, что является характерными признаками инфекционного бронхита (Рисунок 14).



а)



б)



в)



г)

Рисунок 14 – Фотографии почек кур, использованных в исследованиях, с характерными для ИБК макроскопическими изменениями

Отобранные образцы ткани почек гомогенизировали с физраствором. Центрифугировали, из надосадочной жидкости выделяли РНК и проводили ОТ-ПЦР. Параллельно с гомогенатом почек делали серийные пассажи на РЭК по общепринятой методике. Через 3-4 пассажа полученную экстрэмбриональную жидкость исследовали в ПЦР.

При положительных результатах получали ампликоны размером 277-433 п.н. (Рисунок 15).

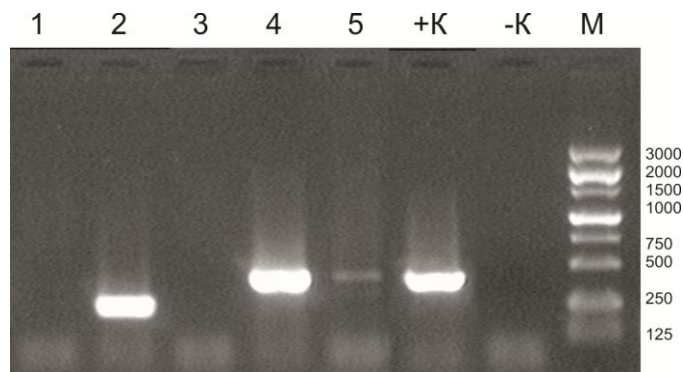


Рисунок 15 – Электрофореграмма продуктов ОТ-ПЦР, с 3'UTR праймерами специфичными к консервативному участку генома вируса ИБК. Цифрами обозначены дорожки: 1 – 5 – полевые пробы; +К – положительный контроль; -К – отрицательный контроль; М – маркер длин ДНК

Для подтверждения генетической принадлежности полученных ампликонов к вирусу ИБК, продукты ПЦР выделяли из геля методом осаждения с 96% этанолом в присутствии 10 М ацетата аммония. Секвенирование выделенных фрагментов с праймером 3'UTR-F подтвердило полученные положительные результаты (Рисунок 16, Рисунок 17, Рисунок 18, Рисунок 19, Рисунок 20, Рисунок 21, Рисунок 22).

European turkey coronavirus 080385d, complete genome

Sequence ID: [KR822424.1](#) Length: 27739 Number of Matches: 1Range 1: 27105 to 27494 [GenBank](#) [Graphics](#)

▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
686 bits(760)	0.0	387/390(99%)	1/390(0%)	Plus/Plus
Query 17	AGCAGGA-GATGATGTAGATAAGGCATTGACCTCAGATGAAGAGAGGAACAATGCACAGC	75		
Sbjct 27105	AGCAGGAAGATGATGTAGATAAGGCATTGACCTCAGATGAAGAGAGGAACAATGCACAGC	27164		
Query 76	TCGAGTTTGTGATGATGAACCAAAGTGATTAATTGGGAGATTTCAGCTCTTGGGAAAAATG	135		
Sbjct 27165	TCGAGTTTGTGATGATGAACCAAAGTGATTAATTGGGAGATTTCAGCTCTTGGGAAAAATG	27224		
Query 136	AATTGTAAGTAACATAATGGACTTGCTGCATTGCTGTACACATTTGTAAATACTATTT	195		
Sbjct 27225	AATTGTAAGTAACATAATGGACTTGCTGCATTGCTGTACACATTTGTAAATACTATTT	27284		
Query 196	TGTTGCTTTCCTATCAATTATTACAGGCATTGATTGTGATTATGTGCAATATTTAAGCTA	255		
Sbjct 27285	TGTTGCTTTCCTATCAATTATTACAGGCATTGATTGTGATTATGTGCAATATTTAAGCTA	27344		
Query 256	CTTTTGGTTGCTTTTGTGTTGTTGTTGCTGTGCTTTTTATTATTGTGATTCTCAT	315		
Sbjct 27345	CTTTTGGTTGCTTTTGTGTTGTTGTTGCTGTGCTTTTTATTATTGTGATTCTCAT	27404		
Query 316	TAGTTTGCTTTATCGCAGAAGTGCAATAGTAAGAGTTAAGGAAGATAGGCATGTAGCTTG	375		
Sbjct 27405	TAGTTTGCTTTATCGTAGAAGTGCAATAGTAAGAGTTAAGGAAGATAGGCATGTAGCTTG	27464		
Query 376	ATTACCTACATGTCTATCGGAGGGAATG 405			
Sbjct 27465	ATTACCTACATGTCTATCGGAGGGAATG 27494			

Рисунок 16 – Сравнительный анализ секвенированного фрагмента 3'UTR пробы №58 в международной базе данных

Infectious bronchitis virus strain CK/SWE/0658946/10, complete genome

Sequence ID: [JQ088078.1](#) Length: 27664 Number of Matches: 1Range 1: 26991 to 27384 [GenBank](#) [Graphics](#)

▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
684 bits(758)	0.0	389/394(99%)	1/394(0%)	Plus/Minus
Query 16	CCTATCTTCCTTA-CTCTACTATTGCACCTCTGCGATAAAGCAAACAAATGAGAATCAC	74		
Sbjct 27384	CCTATCTTCCTTAACCTCTACTATTGCACCTCTACGATAAAGCAAACAAATGAGAATCAC	27325		
Query 75	AATAATAAAAAGCTCAGCAACAATAACAAGCAAAAAGCAACAAAAGTAGCTTAAATA	134		
Sbjct 27324	AATAATAAAAAGCACAGCAACAATAACAAGCAAAAAGCAACAAAAGTAGCTTAAATA	27265		
Query 135	TTGCACATAATCACAATCAATGCCTGTAATAATTGATAGGAAAGCAACAAATAGAAATTT	194		
Sbjct 27264	TTGCACATAATCACAATCAATGCCTGTAATAATTGATAGGAAAGCAACAAATAGTATTT	27205		
Query 195	AACAAAATGTGACAGCAATGCAGCAAGTCCATTATGTTACTTACAATTCATTTTCCCA	254		
Sbjct 27204	AACAAAATGTGACAGCAATGCAGCAAGTCCATTATGTTACTTACAATTCATTTTCCCA	27145		
Query 255	AGAGCTGAATCTCCCAATTAATCACTTTGGGTTTCATCAAACTCGAGCTGTGCATTG	314		
Sbjct 27144	AGAGCTGAATCTCCCAATTAATCACTTTGGGTTTCATCAAACTCGAGCTGTGCATTG	27085		
Query 315	TTCTCTCTTCATCTGAGGTCAATGCCTTATCTACATCATCTTCTGCTCTTTGGCTTT	374		
Sbjct 27084	TTCTCTCTTCATCTGAGGTCAATGCCTTATCTACATCATCTTCTGCTCTTTGGCTTT	27025		
Query 375	TTCTCTCTCTTTTGGCGCTGTTGTTTGGCGCTG 408			
Sbjct 27024	TTCTCTCTCTTTTGGCGCTGTTGTTTGGCGCTG 26991			

Рисунок 17 – Сравнительный анализ секвенированного фрагмента 3'UTR пробы №59 в международной базе данных.

Infectious bronchitis virus strain ck/CH/LLN/130101, complete genome

Sequence ID: [KP118892.1](#) Length: 27594 Number of Matches: 1

Range 1: 26905 to 27299 [GenBank](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
670 bits(742)	0.0	387/395(98%)	3/395(0%)	Plus/Minus
Query 11	ATACCTACCTTCTT--ACTCTTACTATTGCACTTCTGCGATAAAGCAAACATAGAGAAT	68		
Sbjct 27299	ATGCCATCTTCTTAACTCTTACTATTGCACTTCTACGATAAAGCAAACATAGAGAAT	27240		
Query 69	CACAATAATAAAAGCACAG-AACAATACAACAGCAAAAGCAACCAAAAGTAGCTTAA	127		
Sbjct 27239	CACAATAATAAAAGCACAGCAACAATACAACAGCAAAAGCAACCAAAAGTAGCTTAA	27180		
Query 128	ATATTGCACATAATCACAATCAATGCCTGTAATAATTGATAGGAAAGCAACAAATAGTA	187		
Sbjct 27179	ATATTGCACATAATCACAATCAATGCCTGTAATAATTGATAGGAAAGCAACAAATAGTA	27120		
Query 188	TTTAACAAAATGTGACAGCAATGCAGCAAGTCCATTATGTTACTTACAATTCATTTTCC	247		
Sbjct 27119	TTTAACAAAATGTGACAGCAATGCAGCAAGTCCATTATGTTACTTACAATTCATTTTCC	27060		
Query 248	CCAAGAGCTGAATCTCCCAATTAATCACTTTGGGTTTCATCATCAAACTCGAGCTGTGCA	307		
Sbjct 27059	CCAAGAGCTGAATCTCCCAATTAATCACTTTGGGTTTCATCATCAAACTCGAGCTGTGCA	27000		
Query 308	TTGTTCTCTCTTCATCTGAGGTCAATGCCTTATCTACATCATCTTCTGCTTCTTTGGC	367		
Sbjct 26999	TTGTTCTCTCTTCATCTGAGGTCAATGCCTTATCTACATCATCTTCTGCTTCTTTGGC	26940		
Query 368	TTTTTCTCTTCTTTTGGCGCTGTTGTTTGGCGC	402		
Sbjct 26939	TTTTTCTCTTCTTTTGGCGCTGTTGTTTGGCGC	26905		

Рисунок 18 – Сравнительный анализ секвенированного фрагмента 3'UTR пробы №5 в международной базе данных

Infectious bronchitis virus ITA/90254/2005, complete genome

Sequence ID: [FN430414.1](#) Length: 27643 Number of Matches: 1

Range 1: 26969 to 27362 [GenBank](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
639 bits(708)	1e-179	379/394(96%)	5/394(1%)	Plus/Minus
Query 9	TGCCATCTTCTT--ACTCTTACTATTGCACTTCTACGataaagcaaaactaacaataata	66		
Sbjct 27362	TGCCATCTTCTTAACTCTTACTATTGCACTTCTACGATAAAGCAAACATAGAGAATC	27303		
Query 67	acaataa---aaagcacagcaacaacacaacagcaaaaagcaaccaaaagTAGCTTAAA	123		
Sbjct 27302	ACAATAATAAAAGCACAGCAACAATACAACAGCAAAAGCAACCAAAAGTAGCTTAAA	27243		
Query 124	TATTGCACATAATCACAATCAATGCCTGTAATAATTGATAGGAAAACAACAAATAGTAT	183		
Sbjct 27242	TATTGCACATAATCACAATCAATGCCTGTAATAATTGATAGGAAAGCAACAAATAGTAT	27183		
Query 184	TTAACAAAATGTGACAGCAATGCAGCAAGTCCATTATGTTACTTACAATTCATTTTCCC	243		
Sbjct 27182	TTAACAAAATGTGACAGCAATGCAGCAAGTCCATTATGTTACTTACAATTCATTTTCCC	27123		
Query 244	CAAGAGCTGAATCTCCCAATTAATCACTTTGGGTTTCATCATCAAACTCAAGCTGTGCAT	303		
Sbjct 27122	CAAGAGCTGAATCTCCCAATTAATCACTTTGGGTTTCATCATCAAACTCGAGCTGTGCAT	27063		
Query 304	TGTTCTCTCTTCATCTGAGGTCAATGCCTTATCTACATCATCGTCTGCTTCTTTGGCT	363		
Sbjct 27062	TGTTCTCTCTTCATCTGAGGTCAATGCCTTATCTACATCATCTTCTGCTTCTTTGGCT	27003		
Query 364	TTTTCTCTTCTTTTGGCGCTGTTGTTTGGCGC	397		
Sbjct 27002	TTTTCTCTTCTTTTGGCGCTGTTGTTTGGCGC	26969		

Рисунок 19 – Сравнительный анализ секвенированного фрагмента 3'UTR пробы №99 в международной базе данных

Infectious bronchitis virus isolate Vac.4/91-M. nucleocapsid protein gene, partial cds; and 3'
Sequence ID: [KF437358.1](#) Length: 401 Number of Matches: 1

Range 1: 1 to 383 GenBank Graphics					▼ Next Match ▲ Previous Match	
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand		
659 bits(730)	0.0	378/384(98%)	3/384(0%)	Plus/Minus		
Query 4	CTACCTGCCTATCTTCTT--ACTCTTACTATTGAATTTTACGATAAGGCAAACTAATG	61				
Sbjct 383	CTACATGCCTATCTTCCTTAACCTTTACTATTGAATTT--CTACGATAAAGCAAACTAATG	325				
Query 62	AGAATCACAAATAAAAAAGCACAGCAACAATACAACAAGCAAAAAGCAACGAGAAGAAG	121				
Sbjct 324	AGAATCACAAATAAAAAAGCACAGCAACAATACAACAAGCAAAAAGCAACGAGAAGAAG	265				
Query 122	CTTAAGTATTGAACATAATCACAAATCAATACCTGTAAATTTGATAGTAAAAACAAAAA	181				
Sbjct 264	CTTAAGTATTGAACATAATCACAAATCAATACCTGTAAATTTGATAGTAAAAACAAAAA	205				
Query 182	TAATATTTAAACAAAATGTGACAGCAAAATGCAGCAAGTCCATTATGTTAATCAAGTTCAT	241				
Sbjct 204	TAATATTTAAACAAAATGTGACAGCAAAATGCAGCAAGTCCATTATGTTAATCAAGTTCAT	145				
Query 242	TTTCACCTAGTGCAGAGTCCCCCAGTTAATCACCTTGGGTTTCATCATCAATTCAGCT	301				
Sbjct 144	TTTCACCTAGTGCAGAGTCCCCCAGTTAATCACCTTGGGTTTCATCATCAATTCAGCT	85				
Query 302	GTGCATTGTTCTCTCCTCATCTGAGGTCATGCCTTATCTACTTCATCATCTGCTTCT	361				
Sbjct 84	GTGCATTGTTCTCTCCTCATCTGAGGTCATGCCTTATCTACTTCATCATCTGCTTCT	25				
Query 362	TGGGCTTTTTCTCCTCTTTGGGC 385					
Sbjct 24	TGGGCTTTTTCTCCTCTTTGGGC 1					

Рисунок 20 – Сравнительный анализ секвенированного фрагмента 3'UTR
пробы №93 в международной базе данных

Infectious bronchitis virus isolate Ck/CH/Shaanxi/2012/BJ nucleocapsid protein (N) gene, complete cds
Sequence ID: [KC478653.1](#) Length: 1230 Number of Matches: 1

Range 1: 1116 to 1230 GenBank Graphics					▼ Next Match ▲ Previous Match	
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand		
163 bits(180)	1e-36	105/115(91%)	0/115(0%)	Plus/Minus		
Query 127	TTAAAGTTCAATCTCTCCTAGAGCAAAATTTCCCAATTAATCACCTTAGGTTACCATC	186				
Sbjct 1230	TTAAAGTTCAATCTCTCCTAGAGCAAAATTTCCCAATTAATCACCTTAGGTTACCATC	1171				
Query 187	AAACTCTACCTGTGCATTGTTCTCTCCTCATCTGAGGTCAATGCTTTATCTACT	241				
Sbjct 1170	AAATTCTAGCTGTGCATTGTTCTCTCCTCATCTGAGGTCAATGCTTTATCTACT	1116				

Рисунок 21 – Сравнительный анализ секвенированного фрагмента 3'UTR
пробы №12 в международной базе данных

Infectious bronchitis virus isolate Q4/99 nucleocapsid protein gene, partial cds
Sequence ID: [FJ235180.1](#) Length: 425 Number of Matches: 1

Range 1: 1 to 173 GenBank Graphics					▼ Next Match ▲ Previous Match	
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand		
271 bits(300)	5e-69	164/173(95%)	0/173(0%)	Plus/Minus		
Query 125	TTAAAGTTCAATCTCTCCTAAAGCAGAATTTCCCAATTAATCACCTTAGGTTACATC	184				
Sbjct 173	TTAAAGTTCAATGTCCTAAAGCAGAATCCCCCAATTAATTAATTTGGGTTACATC	114				
Query 185	AAATTCTAGCTGTGCATTGTTCTCTCCTCATCTGAGGTCAATGCTTTATCTACTTCATC	244				
Sbjct 113	AAATTCTAGCTGTGCATTGTTCTCTCCTCATCTGAGGTCAATGCTTTATCTACTTCATC	54				
Query 245	ATCCTGCTTCTTCGACTTTTTCTCCTTCTTCGGGCGCTGTTGTTTTGGCGCTG	297				
Sbjct 53	ATCCTGCTTCTTTGGCTTTTTCTCCTTCTTAGGGCGCTGTTGTTTTGGCGCTG	1				

Рисунок 22 – Сравнительный анализ секвенированного фрагмента 3'UTR
пробы №9 в международной базе данных

Сиквенсы в формате *fasta* представлены в приложении А.

На основании проведенной работы были разработаны методические положения по выявлению вируса инфекционного бронхита птиц с помощью обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции. Методические положения были рассмотрены и одобрены Ученым советом и утверждены ВРИО директора ФГБНУ ВНИВИП (Приложение Б).

В результате проведенной работы были рассчитаны праймеры 3'UTR-F и 3'UTR-R, характеризующиеся высокими показателями ПЦР, ограничивающие консервативный нетранслируемый участок 3'UTR вируса инфекционного бронхита кур длиной 277-433 п.н., которые рекомендовано использовать для диагностики инфекционного бронхита кур и коронавирусной инфекции индеек.

Усовершенствован метод выявления РНК коронавируса птиц за счет использования видоспецифичных праймеров к консервативному нетранслируемому участку 3'UTR вируса и оптимизированных параметров реакции, что обеспечивает образование специфичных ампликонов длиной 277-433 п.н. Чувствительность метода показала выявление $3,3 \times 10^5$ копий молекул кДНК на мл.

Секвенирование ампликонов, образованных в результате метода подтвердило их генетическую принадлежность к вирусу ИБК.

Апробация методики на образцах генетического материала гомологичных (4/91 793В, D1466, Massachusetts 41, D388 QX) и гетерологичных (вирус НБ, МПВИ, ИББ, РВТ) вирусов птицы показала высокую специфичность предложенной методики.

При исследовании 105 образцов патологического материала от домашней птицы РНК вируса ИБК была идентифицирована в 25 образцах. В диагностических исследованиях данный метод применяли с 2015 года.

2.2.5 Идентификация изолятов методом геномного секвенирования.

Филогенетический анализ.

Задача данного раздела состояла в идентификации и определении штаммовой принадлежности выявленных изолятов вируса ИБК. Сравнительный анализ опубликованных в международной базе данных известных штаммов и изолятов вируса ИБК позволяет определить принадлежность исследуемых изолятов к тому или иному генотипу. Для анализа использовали гипервариабельный фрагмент гена S1, т.к. транслируемый структурный белок именно этой области содержит антигенные детерминанты, индуцирующие выработку вируснейтрализующих антител.

Работа по секвенированию гипервариабельного участка гена S изолята «RF/12/01» и его анализу была проведена совместно с Бочковым Ю.А. во ВНИИЗЖ. Для сравнительного анализа был использован фрагмент вариабельной области гена S1 длиной 701 п.н. (позиция на геноме 20281-20981 п.н) относительно штамма Mass41 (GenBank: GQ504725.1).

Пробы экстраэмбриональной жидкости РЭК, зараженных выделенным полевым изолятом «RF/12/01» были исследованы методом обратной транскрипции – полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР) с праймерами, ограничивающими вариабельную область гена S1 вируса инфекционного бронхита кур. В результате ОТ-ПЦР был амплифицирован фрагмент вариабельной области генома изолята «RF/12/01», с последующим секвенированием фрагментов кДНК изолятов и сравнительным анализом с известными зарубежными и российскими штаммами вируса инфекционного бронхита кур

Секвенирование фрагмента кДНК изолята «RF/12/01» и последующий сравнительный анализ показали, что он не входит ни в одну генетическую группу и имеет более 25% отличий от всех известных зарубежных и российских штаммов вируса инфекционного бронхита кур, т.е. может быть обозначен как

вариантный изолят. Графически генетические отношения изолята «RF/12/01» и других штаммов вируса инфекционного бронхита кур представлены на рисунке 23 в виде дендрограммы. Нуклеотидная последовательность варибельной области гена S1 данного изолята депонирована в EMBL (Accession number AJ550983).

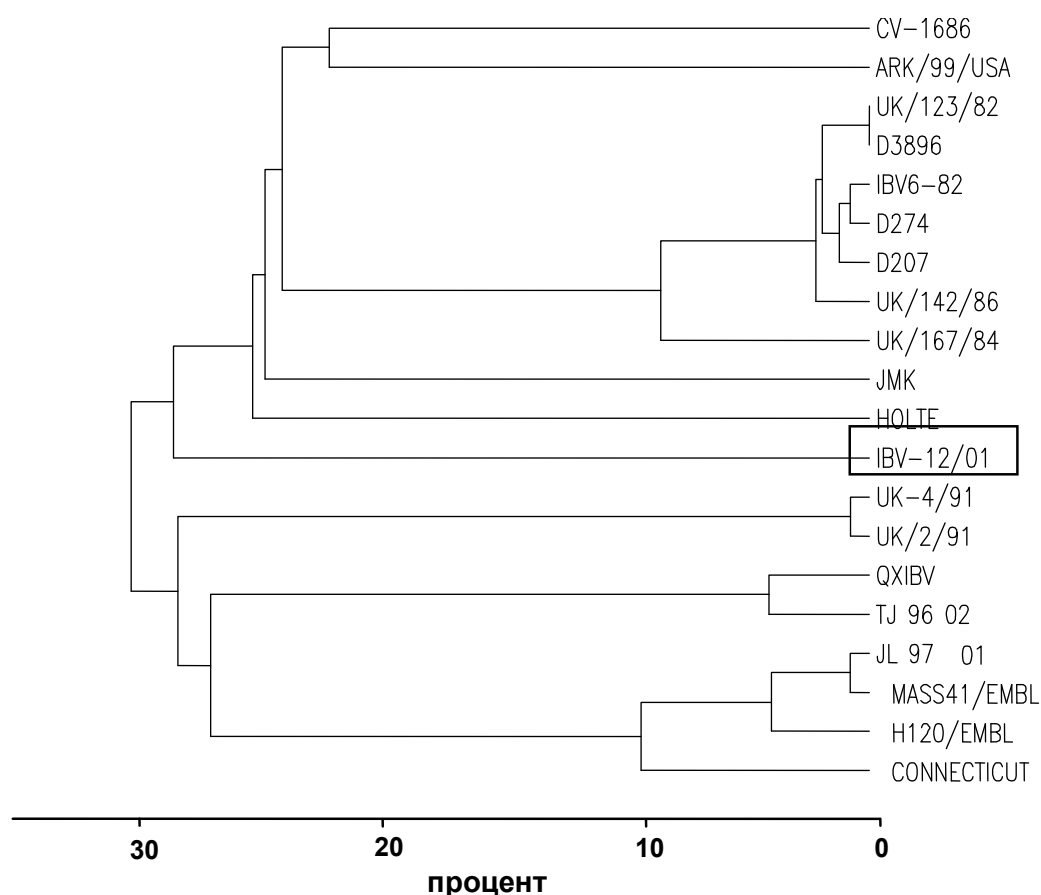


Рисунок 23 – Дендрограмма, построенная на основе сравнения нуклеотидных последовательностей варибельной области гена S1 зарубежных штаммов вируса инфекционного бронхита кур и российского изолята IBV-«RF/12/01», построенная с использованием программы “SeqProgs” [70]

Дальнейшая исследовательская работа по секвенированию и филогенетическому анализу проводилась в ПЦР-лаборатории ВНИВИП. Для сравнительного анализа был использован фрагмент варибельной области гена S1 длиной 1155 п.н. (позиция на геноме 20249- 21403) относительно штаммов и изолятов вируса ИБК (GenBank: KP118893.1, GenBank: KP036504.1 и др.).

Пробы экстраэмбриональной жидкости РЭК, зараженных изолятом «RF/09/00» были исследованы методом обратной транскрипции – полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР) с праймерами S1OLIGO5'F и XCE3(-) (Таблица 1), ограничивающими переменную область гена S1 вируса инфекционного бронхита кур. В результате был амплифицирован фрагмент переменной области генома изолята «RF/09/00», с последующим секвенированием фрагментов кДНК изолятов и сравнительным анализом с известными зарубежными и российскими штаммами вируса инфекционного бронхита кур. Нуклеотидная последовательность переменной области гена S1 данного изолята «RF/09/00» депонирована в NCBI (GenBank KY120169) (Приложение В).

В 2016 г. из птицеводств Челябинской области были выделены изоляты, которым были присвоены названия «RF/466/16» и «RF/467/16». В птицеводствах активно использовали ежемесячную вакцинацию живыми вакцинами взрослого поголовья. Что способствовало мутированию вирусов ИБК в организме птиц. Кроме того, были выделены изоляты вирусов, которым были присвоены названия «RF/432/2016», «ГС-11».

Анализ секвенированных фрагментов переменной области гена S1 изолятов «RF/466/16», «RF/467/16», «RF/432/2016», «ГС-11» и вариантного штамма «РВ-07» проводили в сравнении с последовательностями изолятов и штаммов вируса ИБК, опубликованных в GenBank, EMBL, DDBJ и PDB. Анализировали on-line программой *blastn* на сайте NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) с целью определения наиболее близкородственных штаммов вирусов по амплифицированным фрагментам.

На основании множественного выравнивания и сравнения секвенсов фрагмента гена S изолятов и размещенных в международной базе данных GenBank геномов вируса ИБ, с помощью программы MEGA 6, используя метод ближайшего соседа с бутстрап-поддержкой (Bootstrapped Neighbor-Joining Tree) построена дендрограмма (Рисунок 24).

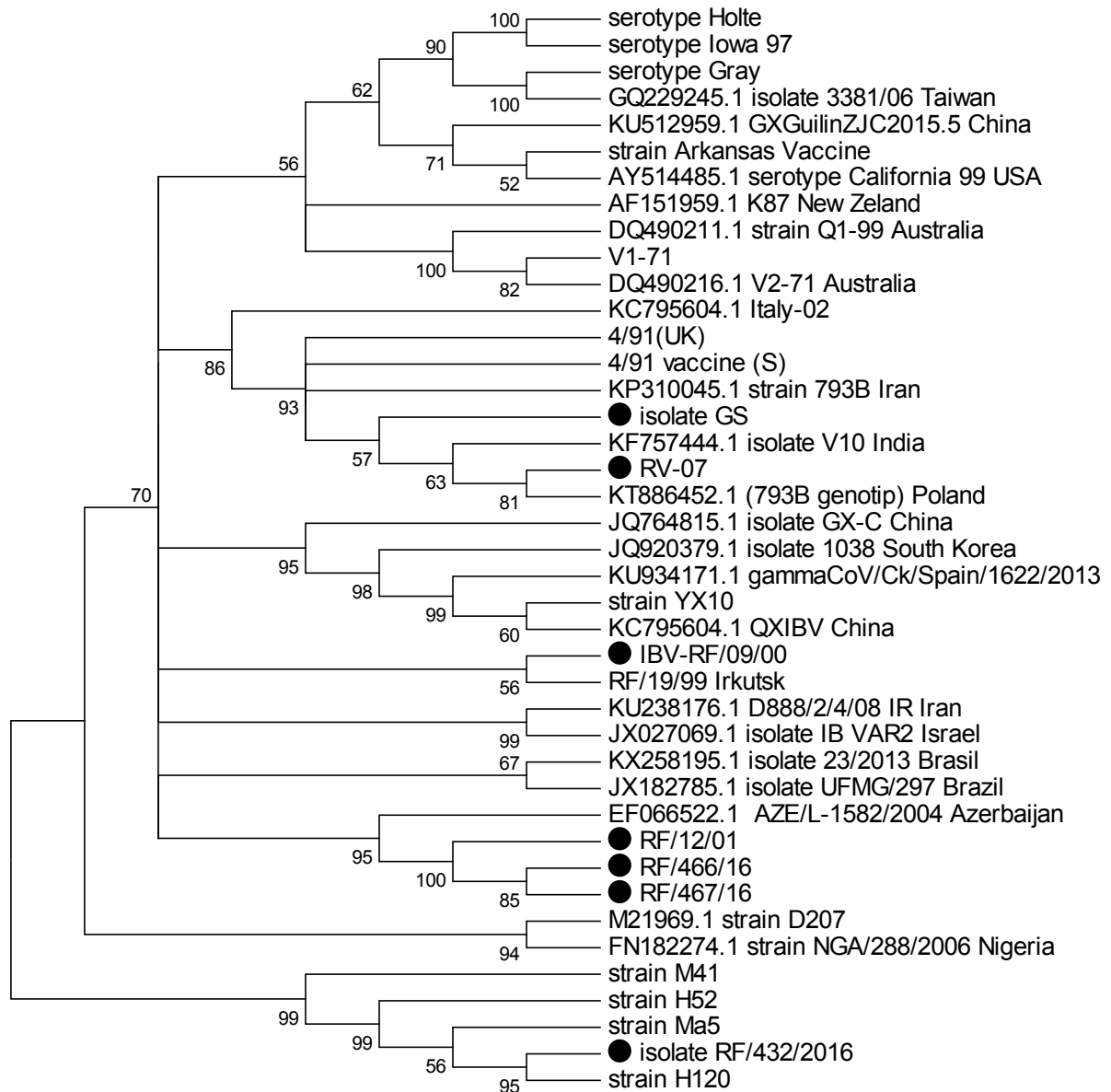


Рисунок 24 – Дендрограмма, построенная на основе сравнения нуклеотидных последовательностей варибельной области гена S1 зарубежных штаммов вируса ИБК и изолятов «RF/12/02», «RF/09/00», «RF/466/16», «RF/467/16», «ГС-11», «штамма РВ-07» построенная с использованием программы “MEGA 6”

Как видно из дендрограммы, изолят «ГС-11» входит в один кластер генотипа 793В, процент гомологии 57%. Штамм «РВ-07» показал 81% гомологии с изолятом выделенным в Польше в 2010 г., принадлежащим генотипу 793В (GenBank: KT886452).

Изоляты выделенные в Челябинской области «RF/467/16» и «RF/466/16» показали гомологию с изолятом из Саратовской области «RF/12/01». Изоляты образуют собственную генетическую группу, отличную от известных зарубежных и российских штаммов вируса ИБК. В эту же группу вошел изолят из Азербайджана взятый из международной базы данных (GenBank: EF066522).

В результате анализа установлено, что изолят «RF/09/00» показал родство на 56% с изолятом «RF/19/99» (GenBank: AJ458942.1), выделенным в Иркутске коллегами из ВНИИЗЖ, образуя генетическую группу отличную от известных штаммов вируса ИБК.

Изолят «RF/432/2016» на 95% показал гомологию со штаммом «Н-120».

3 ЗАКЛЮЧЕНИЕ

3.1 ОБСУЖДЕНИЕ МАТЕРИАЛА

В результате проведенных исследований были сконструированы олигонуклеотидные праймеры характеризующиеся высокими показателями ПЦР, фланкирующие консервативный нетранслируемый участок 3'UTR вируса инфекционного бронхита кур длиной 277-433 п.н., которые рекомендовано использовать для диагностики инфекционного бронхита кур и коронавирусной инфекции индеек.

Усовершенствован метод выявления РНК коронавируса птиц за счет использования видоспецифичных праймеров к консервативному нетранслируемому участку 3'UTR вируса и оптимизированных параметров реакции, что обеспечивает образование специфичных ампликонов длиной 277-433 п.н. Чувствительность метода показала выявление $3,3 \times 10^5$ копий молекул кДНК на мл.

Секвенирование ампликонов, образованных в результате метода подтвердило их генетическую принадлежность к вирусу ИБК.

Апробация методики на образцах генетического материала гомологичных (4/91 793В, D1466, Massachusetts 41, D388 QX) и гетерологичных (вирус НБ, МПВИ, ИББ, РВТ) вирусов птицы показала высокую специфичность предложенной методики.

При исследовании 105 образцов патологического материала от домашней птицы была идентифицирована РНК вируса ИБК в 25 образцах. В диагностических исследованиях данный метод применяли с 2015 года.

В процессе работы выявили, идентифицировали и изучили свойства двух изолятов вируса ИБК от кур несушек птицеводства яичного направления (Омской области) и цыплят-бройлеров птицеводства мясного направления

(Саратовской области). Изолятам были присвоены названия RF/09/00 и RF/12/01 соответственно. Биологическая активность изолята RF/09/00 к 5 пассажу достигла $5,5 \lg \text{ЭИД}_{50}/0,2 \text{ см}^3$, изолята RF/12/01 к 6 пассажу $4,5 \lg \text{ЭИД}_{50}/0,2 \text{ см}^3$.

С данными изолятами провели работу по изучению их физико-химических свойств. При изучении устойчивости вирусных изолятов к химическим и физическим факторам обращали внимание на определение чувствительности к действию органических жирорастворителей и терморезистентность.

Мы проводили пробу на определение чувствительности вирусных изолятов инфекционного бронхита к эфиру. В результате проведенных исследований установили, что обработанные диэтиловым эфиром пробы вируссодержащего материала изолят «RF/12/01» снижает свою инфекционную активность на $3,6 \lg \text{ЭИД}_{50}/\text{см}^3$, изолят «RF/09/00» – на $3,9 \lg \text{ЭИД}_{50}/\text{см}^3$. А после экспозиции с хлороформом оба изолята теряли инфекционность на 100%. Полученные результаты согласуются с результатами других исследователей [83]. Это свидетельствует о чувствительности изолятов к эфиру, и подтверждает наличие липопротеидных оболочек у вирусов.

Вирусы характеризуются разной чувствительностью к действию температуры. При изучении чувствительности изолятов к температурному фактору выявили, что изолят «RF/09/00» через 30 минут снижает свою активность при температуре 45°C на $3,3 \lg \text{ЭИД}_{50}/\text{см}^3$, при 56°C на $4,9 \lg \text{ЭИД}_{50}/\text{см}^3$. Изолят «RF/12/01» – на $3,2 \lg \text{ЭИД}_{50}/\text{см}^3$ и $5,3 \lg \text{ЭИД}_{50}/\text{см}^3$ соответственно. Через 60 мин оба изолята полностью снижают свою активность при температурах 56°C и 45°C . Таким образом, при изучении терморезистентности изоляты «RF/09/00» и «RF/12/01» показали термолабильность. Полученные результаты говорят о термолабильности изолятов, что согласуется с результатами других исследователей [83].

Пробы экстраэмбриональной жидкости КЭ, зараженные выделенными полевыми изолятами были исследованы методом обратной транскрипции – полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР) с праймерами, ограничивающими переменную область гена S1 вируса инфекционного бронхита кур. С последующим секвенированием фрагментов кДНК изолятов и сравнительным анализом с известными зарубежными и российскими штаммами вируса инфекционного бронхита кур. Для сравнительного анализа изолята «RF/12/01» был использован фрагмент переменной области гена S1 длиной 701 п.н. (позиция на геноме 20281-20981 п.н.) относительно штамма Mass41 (GenBank: GQ504725.1).

Секвенирование фрагмента кДНК изолята «RF/12/01» и последующий сравнительный анализ показали, что он не входит ни в одну генетическую группу и имеет более 25% отличий от всех известных зарубежных и российских штаммов вируса инфекционного бронхита кур, т.е. может быть обозначен как вариантный изолят. Нуклеотидная последовательность переменной области гена S1 данного изолята депонирована в EMBL (Accession number AJ550983).

В последующей работе для сравнительного анализа был использован фрагмент переменной области гена S1 длиной 1155 п.н. (позиция на геноме 20249 - 21403) относительно штаммов и изолятов вируса ИБК (GenBank: KP118893.1, GenBank: KP036504.1 и др.). Так был проанализирован изолят «RF/09/00», выделенный в Омской области, изоляты, выделенные из патматериала от кур птицеводств Челябинской области «RF/466/16» и «RF/467/16», изоляты «ГС-11» и «RF/432/2016» (Ленобласть), штамм «PB-07».

Секвенирование и анализ изолятов, выделенных в Челябинской области «RF/467/16» и «RF/467/16» показали гомологию с изолятом из Саратовской области «RF/12/01». Изоляты образуют собственную генетическую группу, отличную от известных зарубежных и российских штаммов вируса ИБК. В эту же группу вошел изолят из Азербайджана, взятый из международной базы

данных (GenBank: EF066522). Изолят «ГС-11» входит в один кластер генотипа 793В, процент гомологии 96%. Штамм «РВ-07» показал 99% гомологии с изолятом выделенным в Польше в 2010 г., принадлежащим генотипу 793В (GenBank: KT886452).

Изолят «RF/09/00» показал родство на 77% с изолятом «RF/19/99» (GenBank: AJ458942.1), выделенным в Иркутске коллегами из ВНИИЗЖ, образуя генетическую группу отличную от известных штаммов вируса ИБК.

Изолят «RF/432/2016» на 98% показал гомологию со штаммом «Н-120», что указывает на его происхождение от вакцинного штамма.

Нуклеотидные последовательности вариабельной области гена S1 изолятов «RF/12/01», «RF/09/00», «RF/467/16», «ГС-11» депонированы в международной базе данных. Изоляту «RF/12/01» присвоен номер AJ550983, изоляту «RF/09/00» - KY120169, изоляту «RF/467/16» - KY120168, изоляту «ГС-11» - KY211873.

Генетическое разнообразие изолятов, циркулирующих на территории Российской Федерации объясняется заносом европейских штаммов вместе с импортируемыми из-за рубежа инкубационным яйцом и племенной птицей. Применением, в последнее время, в птицеводствах на взрослом поголовье живых вакцин один, а порою даже два раза в месяц. Большой удаленностью разных географических регионов Российской Федерации.

Таким образом, было выделено и генотипировано четыре изолята вируса ИБК («RF/12/01», «RF/09/00», «RF/467/16», «ГС-11»), которые представляют интерес для их дальнейшего изучения с целью паспортизации и изготовления на их основе вакцин, в том числе рекомбинантных для профилактики ИБК.

3.2 ВЫВОДЫ

1 Вирусологические исследования с учетом эпизоотических данных, клинических признаков и патологоанатомических изменений, подтвержденные методом ОТ-ПЦР позволили установить на птицефабриках Омской, Саратовской и Челябинской областей неблагополучие, что свидетельствовало о широком распространении ИБК.

2 Изоляты характеризуются патогенностью для куриных эмбрионов и цыплят различного возраста. Биологическая активность изолята «RF/12/01» к 6-му пассажу составила $4,5 \lg \text{ЭИД}_{50}/0,2 \text{ см}^3$. Изолята «RF/09/00» к 5-му пассажу $5,5 \lg \text{ЭИД}_{50}/0,2 \text{ см}^3$.

3 Подтверждена чувствительность изолятов вируса ИБК к органическим жирорастворителям. Изоляты снижают свою инфекционную активность при обработке диэтиловым эфиром, 20% концентрации в течении 18 часов при 4°C в 2,5 раза. После обработки хлороформом (10%) вирус теряет свою инфекционную активность на 100%.

4 Выявлена термолабильность изолятов вируса ИБК. В течение 1 часа, изоляты снижают свою активность на 100% при температурах 56°C и 45°C .

5 Усовершенствован метод выявления РНК коронавируса птиц за счет использования видоспецифичных праймеров к консервативному нетранслируемому участку 3'UTR вируса и оптимизированных параметров реакции, что обеспечивает образование специфичных ампликонов длиной 277-433 п.н. Чувствительность метода показала выявление $3,3 \times 10^5$ копий молекул кДНК на мл. Специфичность доказана секвенированием амплифицированных фрагментов и апробацией на референсных образцах генетического материала штаммов вируса ИБК (4/91 793В, D1466, Massachusetts 41, D388 QX).

6 В результате исследования усовершенствованным методом ОТ-ПЦР 105 образцов патологического материала от домашней птицы была идентифицирована РНК вируса ИБК в 25 образцах.

7 Генотипировано шесть изолятов вируса ИБК. Установлена гомология изолятов «RF/466/16», «RF/467/16» и «RF/12/01», которые образуют собственную генетическую группу. Определено родство изолята «ГС-11» и штамма «РВ-07» с генотипом 793В (4/91). Выявлена гомология изолята «RF/09/00» (Омская область) с изолятом «RF/19/99» (GenBank: AJ458942.1), выделенным в Иркутске. Установлено родство изолята «RF/432/2016» со штаммом «Н-120» (98%).

8 Фрагменты последовательностей четырёх изолятов депонированы в международных базах данных. Нуклеотидная последовательность вариабельной области гена S1 изолята «RF/12/01» депонирована в EMBL (Genbank: AJ550983). Последовательности вариабельной области гена S1 изолятов «RF/09/00», «RF/467/2016» и штамма «ГС-11» депонированы в банке данных NCBI («IBV/RF/467/2016» - Genbank: KY120168, «RF/09/00» - Genbank: KY120169, «ГС-11» – Genbank: KY211873).

3.3 ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ

1 В результате проведенных исследований предложены, одобрены Учёным советом и утверждены директором ВНИВИП нормативные документы: «Выявление вируса инфекционного бронхита птиц с помощью обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции (Методические положения)».

2 Для практического использования предлагаются изоляты вируса инфекционного бронхита кур «RF/12/01», «RF/09/00», «RF/467/2016», «ГС-11»:

- для использования в учебном процессе на курсах повышения квалификации ветеринарных специалистов птицеводов и лабораторий;
- для продолжения изучения изолятов ИБК, с целью паспортизации и изготовления живых и инактивированных вакцин из вариантных штаммов ИБК;
- для продолжения изучения изолятов с целью создания рекомбинаций S1 участков генетически различных вирусов ИБК.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

АГ – антиген;

АЖ – аллантоисная жидкость;

АП – аллантоисная полость;

АТ – антитела;

Б-ИФА – блокирующий вариант непрямого иммуноферментного анализа;

НБ – ньюкаслская болезнь;

ВНИВИП – Всероссийский научно-исследовательский ветеринарный институт птицеводства;

ВНИИЗЖ – Всероссийский научно-исследовательский институт защиты животных;

ВСЖ – вируссодержащая жидкость;

ГВР – гипервариабельный регион (HVR – hypervariable region);

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота;

ИББ – инфекционная бурсальная болезнь;

ИБК – инфекционный бронхит кур;

ИЛТ – инфекционный ларинготрахеит;

иРНК – информационная РНК;

КЭ – куриные эмбрионы;

ИФА – иммуноферментный анализ (ELISA – enzyme-linked immunosorbent assay);

ИЭМ – инфекционный энцефаломиелит;

кДНК – комплементарная ДНК;

МПБ – мясо-пептонный бульон;

МПА – мясо-пептонный агар;

МПВИ – метапневмовирусная инфекция;

ОТ-ПЦР – обратная транскрипция и полимеразная цепная реакция;

ОТ-ПЦР-РВ – обратная транскрипция и полимеразная цепная реакция в реальном времени;

ОРС – открытая рамка считывания (ORFs – open reading frames);

ПЦР – полимеразная цепная реакция;

ПДРФ – полиморфизм длин рестрикционных фрагментов;

РГА – реакция гемагглютинации;

РЕО (РВТ) – реовирусная инфекция (реовирусный теносиновит);

РДП – реакция диффузионной преципитации;

РЗГА (РТГА) – реакция задержки (торможения) гемагглютинации;

РН – реакция нейтрализации;

РНК – рибонуклеиновая кислота;

РСК – реакция связывания комплемента;

РЭК – развивающиеся эмбрионы кур;

СПФ – свободные от патогенной флоры;

ТВБ буфер – трис-боратный электродный буфер;

ФЭК – фибробласты эмбрионов кур;

ФБР – фосфатно-буферный раствор;

ХАО – хорионаллантоисная оболочка;

ЭИД – эмбриональная инфекционная доза

ЭИД₅₀ – доза вируса, вызывающая патологоанатомические изменения у 50% зараженных куриных эмбрионов;

IgG – иммуноглобулин G;

IgM – иммуноглобулин M.

СЛОВАРЬ ТЕРМИНОВ

открытая рамка считывания (Open reading frame):

Последовательность нуклеотидов, не содержащая терминирующих кодонов; кодирует полипептид или белок.

полиморфизм длин рестрикционных фрагментов, ПДРФ (restriction fragment length polymorphism, RFLP): Вариабельность длин фрагментов ДНК разных организмов одного вида, образующихся при расщеплении ДНК рестриктазами. П.д.р.ф. обусловлен мутационными изменениями сайтов рестрикции или появлением новых сайтов; обнаруживается при разделении фрагментов с помощью гель-электрофореза и последующей гибридизации с определенными зондами.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1 Абдуллоев, Х.С. Иммунобиологические свойства вируса инфекционного бронхита кур генотипа QX: автореф. дис. ... канд. вет. наук: 06.02.02 / Абдуллоев Хушбахт Сатторович. – Владимир, 2015. – 24 с.
- 2 Батченко, Г. В. Выделение, идентификация и характеристика изолятов вирусов инфекционного бронхита кур и инфекционного ларинготрахеита птиц: автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.06.00 / Батченко Галина Владимировна. – Владимир, 2004. – 25 с.
- 3 Болезни домашних и сельскохозяйственных птиц: в 3 ч. Ч. 2. (Под ред. Кэлнека и др.) / пер. с англ. И.Григорьевой, С.Дорош, Н.Хрущевой, И.Суровцева. – М.: «Аквариум принт», 2011. – 424 с.
- 4 Бочков, Ю.А. Метод штаммовой дифференциации вируса инфекционного бронхита кур и анализ изолятов вируса выделенных на территории России: дис. ... канд. биол. наук: 03.00.06 / Бочков Александр Владимирович. – Владимир, 1999. – 180 с.
- 5 Бочков, Ю.А. Филогенетический анализ изолятов вируса инфекционного бронхита кур, выявленных в России / Ю.А.Бочков, А.В.Борисов, Л.О.Щербакова, В.В. Дрыгин // Аграрная Россия – 2002. – N 2. – С. 11-16.
- 6 Белоусова, Р.В. Практикум по ветеринарной вирусологии / Р.В.Белоусова, Н.И.Троценко, Э.А.Преображенская. – 3-е изд., перераб. и доп. – М.: КолосС, 2006. – 248 с.
- 7 Глик, Б. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение / Б.Глик, Дж.Пастернак. – Пер. с англ. – М.: Мир, 2002. – 589 с.
- 8 Джавадов, Э. Д. Диагностика и профилактика новых инфекционных болезней птиц / Э. Д. Джавадов // Farm Animals. – 2013. – № 2. – С. 69–75.
- 9 Закстельская, Л.Я. Коронавирусы человека и животных / Л.Я.Закстельская, А.В.Шеболдов. – М.: Медицина, 1977. – 244 с.

10 Казанцев, И.В. Различия в материнском и поствакцинальном иммунитете у цыплят-бройлеров, полученных от кур-несушек разного возраста / Казанцев И.В., Осовских Н.Т., Борисов А.В. // Достижения молодых ученых – в ветеринарную практику: материалы конф. молодых ученых. – Владимир: ОКНИИиМС, ВНИИЗЖ, 2000. – С. 110-116.

11 Карапуть, И.М. Формирование иммунного статуса цыплят-бройлеров / И.М.Карапуть, М.П.Бабина // Ветеринария. – 1996. – № 6. – С. 28-30.

12 Коничев, А.С. Молекулярная биология: Учеб. для суд. пед. вузов / А.С.Коничев, Г.А.Севостянова. – 2-е изд., испр. – М.: Издательский центр «Академия», 2005. – 400 с.

13 Лабинская, А.С. Микробиология с техникой микробиологических исследований. Изд. 4-е, перераб. и доп. / А.С.Лабинская. – М: Медицина, 1978, 394 с.

14 Луговская, Н.Н. Набор для определения антител к вирусу инфекционного бронхита кур: специфичность, чувствительность, воспроизводимость результатов, стабильность антигена при хранении / Н.Н.Луговская, Н.С.Мудрак, В.В.Дрыгин [и др.] // Достижения молодых ученых – в ветеринарную практику: Материалы конф. молодых ученых. - Владимир: ОКНИИиМС, ВНИИЗЖ, 2000. – С. 145-150.

15 Луговская, Н.Н. Применение набора по определению антител к вирусу инфекционного бронхита кур иммуноферментным методом при тестировании сыворотки в одном разведении для контроля материнского иммунитета и поствакцинального иммунитета / Н.Н.Луговская, Н.С.Мудрак, В.В.Дрыгин [и др.] // Достижения молодых ученых – в ветеринарную практику: Материалы конф. молодых ученых. – Владимир: ОКНИИиМС, ВНИИЗЖ, 2000. – С. 150-155.

16. Лярски, З. Диагностика вирусных болезней животных / Пер. с пол. Т.Г.Орловой, Я.С.Ляндесберга; Под ред. и с предисл. В.Н.Сюрина. – М.: Колос, 1980. – 400 с.

17 Мазурина, М.Г. Патогенность отечественных штаммов вируса инфекционного бронхита кур для эмбрионов и цыплят / М.Г.Мазурина, А.Б.Терюханов // Тезисы докладов всесоюзной межвузовской научной конференции по ветеринарной вирусологии (11-13 декабря 1973 г.). – Ч. II. – Москва, 1973. – С. 104-105.

18 Мазурина, М.Г. Эпизоотология инфекционного бронхита кур / М.Г.Мазурина, А.Б.Терюханов // Новое в борьбе с болезнями птиц: Сборник научных трудов. – Ленинград, 1984. – С. 30-33.

19 Мазурина, М.Г. Биологические свойства изолятов вируса инфекционного бронхита кур / М.Г.Мазурина // Современ. средства и методы борьбы с заразными болезнями с.-х. птиц. ч. 1. Л, 1988. – С. 7-14.

20. Матвеева, Т.В. Малый практикум по генной инженерии / Т.В.Матвеева, Д.И.Богомаз, Л.А.Лутова. – СПб: Реноме, 2011. – 52 с.

21 Маниатис, Т. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование: Пер. с англ. / Т.Маниатис, Э.Фрич, Дж.Сэмбрук. – М.: Мир, 1984. – 480 с.

22 Медицинские лабораторные технологии: руководство по клинической лабораторной диагностике: в 2 т. / [В.В.Алексеев и др.]; под ред. А.И.Карпищенко. – 3-е изд. перераб. и доп. – Т. 2. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2013. – 792 с.

23 Мезенцев С.В. Ветеринарно-санитарная экспертиза пищевых куриных яиц при синдроме снижения яйценоскости-76 и инфекционном бронхите: автореф. дис. ... канд. вет. наук: 16.00.08, 16.00.03 / Мезенцев Сергей Витальевич. – М., 2000. - 16 с.

24 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.

25 Овчинникова, Е.В. Молекулярно-биологические свойства изолятов вируса инфекционного бронхита кур, выявленных на территории России в период с 2005 по 2011 гг: дис... канд. биол. наук: 03.02.02 / Овчинникова Евгения Валерьевна. – Владимир, 2012 – 117с.

26 Осман, Мохамед О.С. Патоморфология куриных эмбрионов при заражении вирусом инфекционного бронхита кур: автореф. дис. ... канд. вет. наук: 16.00.03 / Осман Мохамед Осман Соркатти. – М., 1991. - 16 с

27 Сопиков, П.М. Болезни птиц / П.М.Сопиков. – М-Л.: Сельхозгиз, 1953. – 288 с.

28 Сюрин, В.Н. Сравнительная динамика сывороточных антител в крови цыплят при экспериментальном инфекционном бронхите/ В.Н.Сюрин, З.Я.Чистова, М.А.Ромахова // Тезисы докладов всесоюзной межвузовской научной конференции по ветеринарной вирусологии (11-13 декабря 1973 г.). – Ч. 1. – Москва, 1973. – С. 117-118.

29 Сюрин, В.Н. Диагностики вирусных болезней животных: Справочник / В.Н. Сюрин, Р.В.Белоусова, Н.В.Фомина. – М: Агропромиздат, 1991. – 528 с.

30 Чистова, З.Я. Роль вируса инфекционного бронхита в развитии респираторных заболеваний птиц / З.Я.Чистова // Труды Всес. науч.-исслед. ин-та болезней птиц. – Вып. 7(18). – М., 1971. – С. 175-178.

31 Чупина, О.А. Определение генотипа и степени патогенности изолята вируса инфекционного бронхита кур / О.А.Чупина, О.А.Овчинникова, Л.О.Щербакова [и др.] // Ветеринарная патология. – 2007. – №4. – С. 121-126.

32 Abd, B.E.E. Seroepidemiological survey of infectious bronchitis virus in the Sudan / B.E.E.Abd, M.Eisa & S.A.A.Kheir // Bull. Anim. Health and Prod. Afr. – 1996. – Vol. 44. – N2. – P. 87-90.

33 Abolnik, C. Genomic and single nucleotide polymorphism analysis of infectious bronchitis coronavirus / C. Abolnik // Infect Genet Evol. – 2015. – Vol.32. – P. 416-424.

34 Adzhor, A. Molecular analysis of the 793/B serotype of infectious bronchitis virus in Great Britain / A.Adzhor, R.E.Gough, D.Haydon [et al.] // Avian Pathology. – 1997. – Vol. 26. – N3. – P. 625-640.

35 Al Tarcha, B. Isolation and characterization of new infectious bronchitis virus variants in Hungary / B.Al Tarcha, J.Kojnok & C.S.Vorro // Acta. Vet. Hung. – 1990. – Vol. 38. – N4. – P. 287-298.

36 Ariyoshi, R. Classification of IBV S1 genotypes by direct reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) and relationship between serotypes and genotypes of strains isolated between 1998 and 2008 in Japan / R.Ariyoshi, T.Kawai, T.Honda [et al.] // J Vet Med Sci. – 2010. – Vol.72. – N6. – P. 687-692.

37 Armesto, M. The replicase gene of avian coronavirus infectious bronchitis virus is a determinant of pathogenicity / M.Armesto, D.Cavanagh, P.Britton // PLoS One. – 2009. – Vol.4. – N 10. – P. e7384. – doi: 10.1371/journal.pone.0007384

38 Avian infectious bronchitis. Version adopted by the World Assembly of Delegates of the OIE in May 2013. OIE Terrestrial Manual 2013 [Электронный ресурс] // The World Organisation for Animal Health (OIE). URL: http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.03.02_AIB.pdf.

39 Awad, F. An overview of infectious bronchitis virus in chickens / F.Awad, R.Chhabra, M.Baylis, K.Ganapathy // World's Poultry Science Journal. – 2014. – Vol.70. – N 2. – P.375-384.

40 Banat, G. R. Association of the chicken MHC B haplotypes with resistance to avian coronavirus / G. R.Banat, S.Tkalcic, J. A.Dzielawa [et al.] // Dev Comp Immunol. – 2013. – Vol.39. – N 4. – P. 430-437.

41 Bande, F. Pathogenesis and Diagnostic Approaches of Avian Infectious Bronchitis / F.Bande, S. S.Arshad, A. R.Omar [et al.] // Adv Virol. – Vol.2016. – 11 p.

42 Berry, D.M. The morphological and biological effects of various antisera on avian infectious bronchitis virus / D.M.Berry, J.D.Almeida // J Gen Virol. – 1968. – Vol.3(1). – P. 97-102.

43 Bhattacharjee, P. S. A simple method for immunofluorescence staining of tracheal organ cultures for the rapid identification of infectious bronchitis virus / P.S.Bhattacharjee, C.J.Naylor & R.C.Jones // Avian Pathol. – 1994. – Vol.23. – N3. – P. 471-480.

44 Brierley, I. An efficient ribosomal frame-shifting signal in the polymerase-encoding region of the coronavirus IBV / I.Brierley, M. E.Bournnell, M. M.Binns [et al] // EMBO J. – 1987. – Vol.6 (12). – P. 3779-3785.

45 Bochkov, Y. A. Molecular epizootiology of avian infectious bronchitis in Russia / Y.A.Bochkov, G.V.Batchenko, L.O.Shcherbakova [et al] // Avian Pathol – 2006. – V. 35(5). – P. 379-393.

46 Callison, S. A. Development and evaluation of a real-time Taqman RT-PCR assay for the detection of infectious bronchitis virus from infected chickens / S.A.Callison, D.A.Hilt, T.O Boynton [et al.] // J Virol Methods. – 2006 – Vol.138. – N1-2. – P.60-65.

47 Cavanagh, D. Evolution of avian coronavirus IBV: sequence of the matrix glycoprotein gene and intergenic region of several serotypes / D.Cavanagh & P.J.Davis // Journal of General Viriology. – 1988. – Vol. 69. – P. 621-629.

48 Cavanagh, D. Coronavirus IBV: structural characterization of the spike protein / D.Cavanagh // J Gen Virol. – 1983. – Vol.64 (12). – P. 2577-2583.

49 Cavanagh, D. Infectious bronchitis virus: evidence for recombination within the Massachusetts serotype/ D.Cavanagh, P.J.Davis & J.K.A.Cook // Avian Pathology. – 1992. –Vol. 21. – P. 401-408.

50 Cavanagh, D. 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. – Vol. 21. – N1. – P. 33-43.

51 Cavanagh, D. Relationship between sequence variation in the S1 spike protein of infectious bronchitis virus and the extent of cross-protection in vivo / D.Cavanagh, M. M.Elus, J. K.Cook // Avian Pathology. – 1997. – Vol. 26 – N1. – P. 63-74.

52 Cavanagh, D. Infections bronchitis virus: a moving target / D.Cavanagh // Poultry International. – 1999. – Vol.38. – N3. – P. 58-61.

53 Cavanagh, D. Coronaviruses from pheasants (*Phasianus colchicus*) are genetically closely related to coronaviruses of domestic fowl (infectious bronchitis virus) and turkeys. / D.Cavanagh, K. Mawditt, D. de B. Welchman [et al.] // Avian Pathol. – 2002. – Vol. 31 – P. 81–93.

54 Cavanagh, D. Coronavirus avian infectious bronchitis virus / D.Cavanagh // Vet Res. – 2007. – P. 281-297.

55 Coronavirus. SARS Coronavirus [Электронный ресурс] URL: <https://mikrobia.files.wordpress.com/2008/05/dita-maria-virginia-078114116.pdf> (дата обращения: 15.06.2016)

56 Coronaviruses [Электронный ресурс] Last Updated: Wednesday, May 21, 19103. URL: http://bioinformatica.uab.es/biocomputacio/treballs02-03/Rudilla_Obradors/Coronaviruses.htm (дата обращения: 08.07.2015)

57 Darbyshire, J. H. Sequential development of humoral immunity and assessment of protection in chickens following vaccination and challenge with avian infectious bronchitis virus / J. H.Darbyshire, R. W.Peters // Res Vet Sci. – 1984. – Vol.37. – N1. – P.77-86.

58 De Wit, J.J. Detection of infectious bronchitis virus / J.J.De Wit // Avian Pathology. – 2000. – Vol.29. – N2. – P.71-93.

59 De Wit, J.J. Comparison of the enzyme linked immunosorbent assay, the haemagglutination inhibition test and the agar gel precipitation test for the detection of antibodies against infectious bronchitis and Newcastle disease in commercial broilers / J.J.De Wit, F.J.Daveloar, W.W.Breunius // Avian Pathology. - 1992. - Vol. 21. – N4. - P. 651-658.

60 Dhinakar, I. Raj. Infectious bronchitis virus: immunopathogenesis of infectious in chicken / I.Raj Dhinakar & R.C.Jones // *Avian Pathol.* – 1997. – Vol.26. – N4. – P. 677-706.

61 El-Houadfi, M. The isolation and characterisation of six avian infectious bronchitis viruses isolated in Morocco / M.El-Houadfi, R. C.Jones, J.K.Cook, [et al.] // *Avian Pathol.* – 1986. – Vol.15. – N1. – P.93-105.

62 França, M. Nephritis Associated with Infectious Bronchitis Virus Cal99 Variant in Game Chickens / M.França, P.R.Woolcock, M.Yu. [et al.] // *Avian Diseases.* – 2011. Vol.55(3). – P.422-428.

63 Golosova, O. Unipro UGENE NGS pipelines and components for variant calling, RNA-seq and ChIP-seq data analyses. / O.Golosova, R.Henderson, Y.Vaskin [et al.] // *PeerJ.* – 2014. – Vol.2. – e644. doi:10.7717/peerj.644

64 Ignjatovic, J. Immune responses to structural proteins of avian infectious bronchitis virus / J.Ignjatovic, U.Galli // *Avian Pathol.* – 1995. – Vol.24. – N2. – P. 313-332.

65 Ignjatovic, J. A long-term study of Australian infectious bronchitis viruses indicates a major antigenic change in recently isolated strains / J.Ignjatovic, S.I.Sapats & F.Ashton // *Avian Pathology.* – 1997. – Vol. 26. – N3. – P. 535-552.

66 Ignjatovic, J. Avian infectious bronchitis virus. / J.Ignjatovic and S.Sapats. // *Rev Sci Tech.* – 2000. – N19 (2). – P. 493-508.

67 Jackwood, M. W. Review of infectious bronchitis virus around the world. / M. W.Jackwood // *Avian Dis.* – 2012. – 56(4). – P. 634-641.

68 Jackwood, M.W. Molecular evolution and emergence of avian gammacoronaviruses. / M.W.Jackwood, D.Hall, A.Handel, // *Infect Genet Evol.* – 2012. – 12(6). – P. 1305-1311.

69 Kamble, N.M. Evolutionary and bioinformatic analysis of the spike glycoprotein gene of H120 vaccine strain protectotype of infectious bronchitis virus from India / N.M.Kamble, A.S.Pillai, S.S.Gaikwad, // *Biotechnol Appl Biochem.* – 2016. – Vol.63 (1). – P. 106-112.

70 Knowles, N.J. // SeqProgs, 1.0. 1991–1992. IAH, Pirbright, UK

71 Kumar, S. MEGA: a biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences / S.Kumar, M.Nei, J.Dudley [et al.] // Brief Bioinform. – 2008. – Vol.9. – N4. – P.299-306.

72 Kwon, H.M. Differentiation of infectious bronchitis virus serotypes using polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism analysis / H. M.Kwon, M.W.Jackwood, J.Gelb, Jr. // Avian Dis. – 1993. – Vol.37. – N1. – P.194-202.

73 Leghari, R. A. Construction and expression of recombinant plasmids containing nephropathogenic IBV S1 gene and li-key segment of chicken major histocompatibility complex II gene / R.A.Leghari, B.Fan, J.Bai [et al.] // The Journal of Animal & Plant Sciences. – 2015. – Vol.25. – N4. – P.1121-1128.

74 Lin, Z. Typing of recent Infectious bronchitis virus isolates causing nephritis in chicken / Z.Lin, A.Kato, Y.Kudou, K.Umeda & S.Ueda // Arch. Virol. – 1991. – Vol. 120. – N1-2. – P. 145-149.

75 Lougovskaia, N.N. Detection and estimation of avian infectious bronchitis virus antigen by a novel indirect liquid-phase blocking enzyme-linked immunosorbent assay using chicken and rabbit affinity purified immunoglobulins / N.N.Lougovskaia, A.A.Lougovskoi, Bochkov Y.A. [et al.] // Avian Pathology. – 2002. – Vol.31(6). – P. 549-557.

76 Mockett, A. P. Comparative studies with an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for antibodies to avian infectious bronchitis virus / A.P.Mockett, J.H.Darbyshire // Avian Pathology. – 1981. – Vol. 10. – N1. – P. 1-10.

77 Monreal, G. Comparison of the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), haemagglutination inhibition test and agar gel precipitation test for detection of antibodies to avian infectious bronchitis virus / G.Monreal, H.J.Bauer & J.Wiegmann // Avian Pathology. – 1985. – Vol. 14. – N3. – P. 421-424.

78 Montassier, M. D. F. S. Genetic grouping of avian infectious bronchitis virus isolated in Brazil based on RT-PCR/RFLP analysis of the S1 gene / M. D. F. S.

Montassier, L. Brentano, H. J. Montassier [et al.] // Pesquisa Veterinaria Brasileira. – 2008. – Vol.28. – N3. – P. 190–194.

79 Nagano, H. Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of infectious bronchitis virus (IBV) antigen with monoclonal antibody / H.Nagano, M.Tsuchimoto, T.Hohdatsu [et al] // Jap. J. Vet. Sci. – 1990. – V. 52. – P. 657-659.

80 Nakamura, K. Comparative study of respiratory lesions in two chicken lines of different susceptibility infected with infectious bronchitis virus: histology, ultrastructure and immunohistochemistry / K.Nakamura, J. K.Cook, K.Otsuki, M. B.Huggins, J. A.Frazier // Avian Pathol. – Vol. 20. – N 2. – P.242-257.

81 Naqi, S.A. A monoclonal antybody-based antigen capture enzyme-linked immunosorbent assay for identifcaition of infectious bronchitis virus serotypes / S.A.Naqi, K.Karaca, B.Bauman // Avian Pathology. – 1993. – V. 16. – P. 555-564.

82 Okonechnikov, K. Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit. / K.Okonechnikov, O.Goloseva, M.Fursov, the UGENE team. // Bioinformatics. – 2012. – Vol.28. – P.1166-1167. doi:10.1093/bioinformatics/bts091

83 Otsuki, K. Studies on avian infectious bronchitis virus (IBV). I. Resistance of IBV to chemical and physical treatments / K.Otsuki, H.Yamamoto, M.Tsubokura, // Arch Virol. – 1979. – Vol.60 (1). – P. 25-32.

84 Ruano, M. A rapid-plate hemagglutination assay for the detection of infectious bronchitis virus / M.Ruano, J.El-Attrache, P.Villegas // Avian Dis. – 2000. – Vol.44 (1). – P.99-104.

85 Song, C.-S. Epidemiological clasification of infectious bronchitis virus isolated in Korea between 1986 and 1997 / C.-S.Song, Y.-H.Lee, H.-W.Sung [et al.] // Avian Pathology. – 1998. – Vol. 27. – N4. – P, 409-416.

86 Taxonomic proposal to the ICTV Executive Committee, 2008.085-126V [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://ictvonline.org/proposals/2008.085-122V.v4.Coronaviridae.pdf> (дата обращения: 01.09.2013).

87 Umar, S. Infectious bronchitis virus: evolution and vaccination / S.Umar, M. A. A.Shah, M. T.Munir, U.Ahsan, K.Kaboudi // World's Poultry Science Journal. – 2016. – Vol.72. – N. 1. – P. 49-60.

88 Wadey, C. N. Structural proteins and glycoproteins of infectious bronchitis virus particles labeled during growth in chick embryo cells / C.N.Wadey, E.G.Westaway // Intervirology. – 1981. – Vol.15 (1). – P. 19-27.

89 Wang, H. N. Isolation and identification of infectious bronchitis virus from chickens in Sichuan, China / H. N.Wang, Q. Z.Wu, Y.Liu P.Huang, // Avian Dis. – 1997. – Vol.41 (2). – P. 279-282.

90 Wang, W. Genome-wide association study of antibody level response to NDV and IBV in Jinghai yellow chicken based on SLAF-seq technology / W.Wang, T.Zhang, G.Zhang [et al.] // J Appl Genet. – Jan 15. – doi: 10.1007/s13353-014-0269-y

91 Wilcox, G.E. Comparison of a microneutralisation test with ELISA and precipitin tests for detection of antibodies to infectious bronchitis virus in chickens / G.E.Wilcox, N.Nandapalan, R. L.Flower [et al.] // Aust Vet J . – 1983. – Vol.60. – N4. – P.119-122.

92 Zhang, T. Serotype shift of a 793/B genotype infectious bronchitis coronavirus by natural recombination / T.Zhang, Z.Han, Q.Xu // Infect Genet Evol. – 2015. – Vol.32. – P. 377-387.

СПИСОК ИЛЛЮСТРАТИВНОГО МАТЕРИАЛА

Рисунок 1 – Организация генома вируса ИБК (QX) [33]	13
Рисунок 2 – Электронная микроскопия коронавирусов [42].....	14
Рисунок 3 – Строение вириона инфекционного бронхита кур. [55] 1 – шиповой "S" протеин; 2 – мембранный "М" гликопротеид; 3 – оболочечный гликопротеин "Е"; 4 – нуклеокапсидный "N" гликопротеин; 5 – геномная РНК	14
Рисунок 4 – Репродукция коронавируса [56]	17
Рисунок 5 – Куриные эмбрионы с характерными признаками ИБК, зараженные изолятом, выделенным от кур Омской области.....	46
Рисунок 6 – Куриные эмбрионы с характерными признаками ИБК, зараженные изолятом, выделенным от цыплят-бройлеров Саратовской области	49
Рисунок 7 – Определение чувствительности изолятов RF/09/00 и RF/12/01 к органическим растворителям.....	54
Рисунок 8 – График инаktivации изолятов вируса ИБК при 56°С.....	55
Рисунок 9 – График инаktivации изолятов вируса ИБК при 45°С.....	56
Рисунок 10 – Расположение специфических 3'UTR праймеров на геноме коронавируса птиц	59
Рисунок 11 – Электрофореграмма ПЦР-продуктов на основе 2,5х ПЦР 2-red буфера.....	60
Рисунок 12 – Электрофореграмма ПЦР-продуктов на основе 10х KCl ПЦР-буфера.....	60
Рисунок 13 – Электрофореграмма результатов амплификации 3'UTR фрагмента генома вируса ИБ, штамм 4/91 при разных концентрациях матрицы: а) образец №1; б) образец №2	63
Рисунок 14 – Фотографии почек кур, использованных в исследованиях, с характерными для ИБК макроскопическими изменениями	64
Рисунок 15 – Электрофореграмма продуктов ОТ-ПЦР, с 3'UTR праймерами специфичными к консервативному участку генома вируса ИБК. Цифрами	

обозначены дорожки: 1 – 5 – полевые пробы; +К – положительный контроль; -К – отрицательный контроль; М – маркер длин ДНК.....	65
Рисунок 16 – Сравнительный анализ секвенированного фрагмента 3'UTR пробы №58 в международной базе данных.....	66
Рисунок 17 – Сравнительный анализ секвенированного фрагмента 3'UTR пробы №59 в международной базе данных.....	66
Рисунок 18 – Сравнительный анализ секвенированного фрагмента 3'UTR пробы №5 в международной базе данных.....	67
Рисунок 19 – Сравнительный анализ секвенированного фрагмента 3'UTR пробы №99 в международной базе данных.....	67
Рисунок 20 – Сравнительный анализ секвенированного фрагмента 3'UTR пробы №93 в международной базе данных.....	68
Рисунок 21 – Сравнительный анализ секвенированного фрагмента 3'UTR пробы №12 в международной базе данных.....	68
Рисунок 22 – Сравнительный анализ секвенированного фрагмента 3'UTR пробы №9 в международной базе данных.....	68
Рисунок 23 – Дендрограмма, построенная на основе сравнения нуклеотидных последовательностей вариабельной области гена S1 зарубежных штаммов вируса инфекционного бронхита кур и российского изолята IBV- «RF/12/01», построенная с использованием программы “SeqProgs” [70].....	71
Рисунок 24 – Дендрограмма, построенная на основе сравнения нуклеотидных последовательностей вариабельной области гена S1 зарубежных штаммов вируса ИБК и изолятов «RF/12/02», «RF/09/00», «RF/466/16», «RF/467/16», «ГС-11», «штамма РВ-07» построенная с использованием программы “MEGA 6” ..	73

ПРИЛОЖЕНИЯ

Приложение А

Нуклеотидные последовательности вируса ИБК

>58-3'UTR-R

GGACATTGGTGCAGAGCAGGAGATGATGTAGATAAGGCATTGACCTCAGATGAAGAGAGG
AACAAATGCACAGCTCGAGTTTGATGATGAACCCAAAGTGATTAATTGGGGAGATTGAGCTCTTG
GGGAAAATGAATTGTAAGTAACATAATGGACTTGCTGCATTTGCTGTCACATTTTGTAAATAC
TATTTTGTGCTTTCCCTATCAATTATTACAGGCATTGATTGTGATTATGTGCAATATTTAAGCTA
CTTTTGGTTGCTTTTGTGTTGATTGTTGCTGTGCTTTTTATTATTGTGATTCTCATTAGTTTG
CTTTATCGCAGAAAGTGCAATAGTAAGAGTTAAGGAAGATAGGCATGTAGCTTGATTACCTACAT
GTCTATCGGCAGGGAAATGA

>59-3'UTR-F

CGAAAGGGTCCGGGACCTATCTTCCTTACTCTTACTATTGCACTTCTGCGATAAAGCAAACCTAA
TGAGAATCACATAATAAAAAAGCTCAGCAACAATACAACAAGCAAAAAGCAACCAAAAAGTAG
CTTAAATATTGCACATAATCACAATCAATGCCTGTAATAATTGATAGGAAAGCAACAAAATAG
AATTTAACAAAATGTGACAGCAATGCAGCAAGTCCATTATGTTACTTACAATTCATTTTCCCC
AAGAGCTGAATCTCCCCAATTAATCACTTTGGGTTTCATCATCAAACCTCGAGCTGTGCATTGTTCC
TCTCTTCATCTGAGGTCAATGCCTTATCTACATCATCTTCCTGCTTCTTTGGCTTTTTCTCCTTCTT
TTGGCGCTGTTGTTTTGGCGCTGA

>5-177g-3'UTR-F

GAACCAGGGGATACCTACCTTCTTACTCTTACTATTGCACTTCTGCGATAAAGCAAACCTAATGA
GAATCACATAATAAAAAAGCACAGACAATACAACAAGCAAAAAGCAACCAAAAAGTAGCTTA
AATATTGCACATAATCACAATCAATGCCTGTAATAATTGATAGGAAAGCAACAAAATAGTATTT
AACAAAATGTGACAGCAAAATGCAGCAAGTCCATTATGTTACTTACAATTCATTTTCCCCAAGAG
CTGAATCTCCCCAATTAATCACTTTGGGTTTCATCATCAAACCTCGAGCTGTGCATTGTTCTCTCT
TCATCTGAGGTCAATGCCTTATCTACATCATCTTCCTGCTTCTTTGGCTTTTTCTCCTTCTTTTG
CGCTGTTGTTTTGGCGCTGACGA

>99-3'UTR-F

GTCTGCTCTGCCTATCTTCTTACTCTTACTATTGCACTTCTACGATAAAGCAAACCTAACATAAT
AACATAAAAAAGCACAGCAACAACAACAAGCAAAAAGCAACCAAAAAGTAGCTTAAATATT
GCACATAATCACAATCAATGCCTGTAATAATTGATAGGAAACAACAAAATAGTATTTAACAA
AATGTGACAGCAAAATGCAGCAAGTCCATTATGTTACTTACAATTCATTTTCCCCAAGAGCTGAA
TCTCCCCAATTAATCACTTTGGGTTTCATCATCAAACCTCAAGCTGTGCATTGTTCTCTCTCTCT
GAGGTCAATGCCTTATCTACATCATCGTCTGCTTCTTTGGCTTTTTCTCCTTCTTTTGGCGCTGT
TGTTTTGGCGCTG

>93-3'UTR-F

GGCCTACCTGCCTATCTTCTTACTCTTACTATTGAATTTACTACGATAAAGCAAACCTAATGAGAA
TCACAATAATAAAAAAGCACAGCAACAACAACAAGCAAAAAGCAACCAAGAGAGCTTAAG
TATTGAACATAATCACAATCAATACCTGTAATAATTGATAGTAAACACAAAATAATATTTAA
CAAAATGTGACAGCAAAATGCAGCAAGTCCATTATGTTAATCAAAGTTTCATTTTACCTAGTGCA
GAGTCCCCCAGTTAATCACCTTGGGTTTCATCATCAAATTCAGCTGTGCATTGTTCTCTCTCTC
ATCTGAGGTCAATGCCTTATCTACTTCATCATCTGCTTCTTTGGGCTTTTTCTCCTTCTTTGGGCG
CTGTTGTTTTGGCGCTG

>12-3'UTR-F

GGCTCCACATGCTACCTTCCTTACTTTTACTATTGAACCTAAGAATCACACAATAAAAAAGCAC
AGCAATAAAAAACCCAAGTCCATATTTGTGCTTTAAAGTTTCATTCTCTCCTAGAGCAGGATTTTAA
AAGTTCATTCTCTCCTAGAGCAAAATTTCCCCAATTAATCACCTTAGGTTACCATCAAACCTCTA
CCTGTGCATTGTTCTCTCTCATCTGAGGTCAATGCTTTATCTACT

>9-3'UTR-F

GAATCTCATGCCTACTTCTTACTTTTACTATTGAACCTAAGAATCACACAATAAAAAAGCACAG
CAATAAACAGTCAAGTCCATATTTGTGCTTTAAAGTTTCATTCTCTCCTAGAGCAGGATTTTAA
GTTTCATTCTCTCCTAAAGCAGAATTTCCCCAATTAATCACCTTAGGTTTCATCATCAAATCTAGC
TGTCATTGTTCTCTCTCATCTGAGGTCAATGCTTTATCTACTTCATCATCTGCTTCTTCGAC
TTTTCTCCTTCTTCGGGCGCTGTTGTTTTGGCGCTGAA

> RF/12/01

ATGGTGGTAACCCCTCTTTAATAGTGACTCTTTTGTGTGCACTATGTAGTGCTAGTCTGTATGG
TAATAGTAACAAGGTTTACTATTACCAAAGTGGCTTTCGACCATCTACAGGTGGCATCTTCAT
GGTGGTGCTTATGCAGTGGTTAATACGCTGTGTTGATGTAGGTGGAGCCACTTGTAGAGCAGGGG
CTATTTGTTGGAGTAAGAATTTCACTGCTGCTTCTGTAGCTATGACCACACCACATCAAGGTAT
GGCTTGGTCAACGTCACAGTTTTTTACAGCTCACTGTAATTTCACTGATTTTACAGTGTTTGCA
CACATTGTTTCAAAGCGGCAGCTCTGAGTGCCCTTTAACAGGTTTAATTCCTAAAGGTTTATT
CGTATTGCTATGAAATCATCAGGCAGTGGGCCTAGTGATTTATTTTACAAATTAACAGTTTCTGT
GACTAAATACTCTAAATTTATGTCGCTGCAATGTGTTAATAATTTTACATCTGTATATCTAAATG
GTGATCTTGTGTTTTACTTCAAATGAGACTAAAGACGTTAACGGTGCAGGTGTTAATTTTGTACGT
GGTGGGCCTATAACTTAT

>379-2-S1 - 355 nucleotides

CAGTATAATACTGGTAATTTTTCAGATGGATTCTATCCTTTTACTAACAGTACTCCAGTTAAAGA
AAGGTTTATTGTTTATCGTGAAAATAGTGTTAATACTATTTTGGAAATTAACATAATTTTACTTTTC
ATAACGAGAGTGCTGCCCCGCCCTAATAATGGGGGTGTTGAAACTTTTACATTATATCAAACCTAC
AACAGCTCAGAGTGGATATTATAATTTTAATTTCTCATTCTGAGTAGTTTTAGGTATCTCGAAT
CTAATTTTATGTATGGGTCTTACCATCCAAATGTAAATTTAGACCCGAGAACATTAATAATGGT
CTGTGGTTAATCACTTCCATTCACTGTTTTCG

>380-9-S1 - 199 nucleotides

GGGGTGTGAACTTTTACATTATATCAAACCTACAACAGCTCAGAGTGGATATTATAATTTTAA
TTTCTCATTCTGAGTAGTTTTAGGTATCTCGAATCTAATTTTATGTATGGGTCTTACCATCCAA
ATTGTAATTTTAGACCCGAGAACATTAATAATGGTCTGTGGTTTAATTCATTCCATTCACTTGA
AAAGA

>466-5-S1 - 267 nucleotides

GGTACTACATACTTTAGAGTTAAATAATTTCACTTTTAATAATGTAAGTAATGCTTCTCCTAACT
CAGGTGGCGTTGATACTTTCCAATTATATCAAACACATACTGCTCAGGATGGTTATTATAATTTT
AATTTATCATTCTGAGTAGTTTTGTGTATAAACCATCTGATTTTATGTATGGGTCATACCACCC
AAATTGTAATTTTAGACCAGAGAATATTAATAATGGCTTATGGTTAATTCATTATCTGTTTCTTA
ATATAGC

>467-9-S1 - 360 nucleotides

GTATAACACTGGTAGTTTTTTTCAGATGGATTCTACCCTTTTACTAATTCTTCTTTAGTTAAAGAT
AGGTTTATTGTATATCGAGAAAGTAGTACTAACACTACTTTAGAGTTAACTAATTTCACTTTTAC
TAATGTAAGTAATGCTTCTCCTAACTCAGGTGGCGTTGATACTTTCCAATTATATCAAACACATA
CTGCTCAGGATGGTTATTATAATTTTAATTTATCATTCTGAGTAGTTTTGTGTATAAACCATCT
GATTTTATGTATGGGTCATACCACCCAAATTGTAATTTTAGACCAGAGAATATTAATAATGGCT
TATGGTTAATTCATTATCTGGTTCACTACCTAAGGC

Приложение Б

ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНСТВО НАУЧНЫХ ОРГАНИЗАЦИЙ РОССИИ
(ФАНО РОССИИ)

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ «ВСЕРОССИЙСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ВЕТЕРИНАРНЫЙ ИНСТИТУТ ПТИЦЕВОДСТВА»
(ФГБНУ ВНИВИП)

УТВЕРЖДАЮ:

Врио директора ФГБНУ ВНИВИП
доктор ветеринарных наук, член-
корреспондент



Э.Д.Джавадов

« 14 » января 2016 г.

ВЫЯВЛЕНИЕ ВИРУСА ИНФЕКЦИОННОГО БРОНХИТА ПТИЦ С
ПОМОЩЬЮ ОБРАТНОЙ ТРАНСКРИПЦИИ И ПОЛИМЕРАЗНОЙ
ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ
(Методические положения)

Приложение В

Isolate-IBV-RF/09/00 (GenBank: KY120169)

```

LOCUS      KY120169                1050 bp    RNA        linear    VRL 08-DEC-2016
DEFINITION Infectious bronchitis virus isolate IBV/RF/09/00 spike glycoprotein
            (S1) gene, partial cds.
ACCESSION  KY120169
VERSION    KY120169
KEYWORDS   .
SOURCE     Infectious bronchitis virus
  ORGANISM Infectious bronchitis virus
            Viruses; ssRNA viruses; ssRNA positive-strand viruses, no DNA
            stage; Nidovirales; Coronaviridae; Coronavirinae; Gammacoronavirus.
REFERENCE  1 (bases 1 to 1050)
  AUTHORS  Serova,N.Y. and Gogoladze,D.T.
  TITLE    Direct Submission
  JOURNAL   Submitted (12-NOV-2016) PCR Laboratory, All-Russian Research
            Veterinary Institute of Poultry Science, Chernikova, 48,
            Saint-Petersburg 198412, Russia
COMMENT    ##Assembly-Data-START##
            Sequencing Technology :: Sanger dideoxy sequencing
            ##Assembly-Data-END##
FEATURES             Location/Qualifiers
     source            1..1050
                        /organism="Infectious bronchitis virus"
                        /mol_type="genomic RNA"
                        /isolate="IBV/RF/09/00"
                        /host="chicken"
                        /db_xref="taxon:11120"
                        /country="Russia: Omsk"
                        /collection_date="2016"
     gene              1..>1050
                        /gene="S1"
     CDS               1..>1050
                        /gene="S1"
                        /codon_start=1
                        /product="spike glycoprotein"
                        /protein_id="API69974"
                        /translation="MLVQPILLVLTLLCALCSASLYGNSNKYVYYYQSGFRPSTGWHHLH
                        GGAYAVVNTSVDVGGATCRAGAICWSKNFTAASVAMTTPHQGMAWSTSEFFTAHCNFT
                        DFTVFVTHCFKSGSSECPLTGLIPKGFIRIAAMKSSGSGPSDLFYNLTVSVTKHSKFM
                        SLQCVNFTSVYLNGLDVFVTSNETKDVSGAGVNFVRGGPITYKIMKEFKVLAYFVNGT
                        AQDVILCDNSPRRGYYHVSIIILVNFQDGFYPFTNSTPVKRGKLLVYRENSVNTILELT
                        NFTFHNESAAPNNGGVETFTLYQTTTAQSGYYNFNFSFLSSFRYLESNFMYSYHPN
                        CNFRPENINNGLLWLIT"
ORIGIN
      1 atgttggtac aaccactttt gctagtgtg cttttgtgtg cactatgtag tgctagtctg
      61 tatggtaata gtaacaagta tgtttactat taccaaagtg gctttcgacc atctacaggt
     121 tggcatcttc atggtggtgc ttatgcagtg gttaatacgt ctggtgatgt aggtggagcc
     181 acttgtagag caggggctat ttgttgagt aagaatttca ctgctgcttc tgtagctatg
     241 accacaccac atcaaggatg ggcttggtca acgtcagagt tttttacagc tcactgtaat
     301 ttactgatt ttacagtgtt tgtcacacat tgtttcaaaa gcggcagctc tgagtgcctc
     361 ttaacagggt taattcctaa gggttttatt cgtattgctg ctatgaaatc atcaggcagt
     421 gggcctagtg atttatttta caatttaaca gtttctgtga ctaaactc taaatttatg
     481 tcgctgcaat gtgttaataa ttttacatct gtatatctaa atggtgatct tgtttttact
     541 tcaaagtaga ctaaagacgt tagcgtgca ggtgttaatt ttgtacgtgg tgggcctata
     601 acttataaaa ttatgaaaga atttaaagtt ttggcctatt ttgttaattg taccgcacag
     661 gatgtcattc tgtgcgataa ctcacctagg aggggctact atcatgtcag tataatactg
     721 gtaaattttc aggatggatt ctatcctttt actaacagta ctccagttaa aggaaagggt
     781 ttattgggtt atcgtgaaaa tagtgtaaat actattttgg aattaactaa ttttactttt
     841 cataacgaga gtgctgcccg ccctaataat ggggggtgtg aaacttttac attatatcaa
     901 actacaacag ctcagagtgg atattataat ttttaattct catttctgag tagttttagg
     961 tatctcgaat ctaattttat gtatgggtct taccatccaa attgtaattt tagaccgcag
    1021 aacattaata atggtctgtg gttaatcact
  
```

//

Приложение Г

Isolate_IBV/RF/467/2016 (GenBank: KY120168)

```

LOCUS      KY120168                332 bp    RNA        linear    VRL 08-DEC-2016
DEFINITION Infectious bronchitis virus isolate IBV/RF/467/2016 spike
            glycoprotein (S1) gene, partial cds.
ACCESSION  KY120168
VERSION    KY120168
KEYWORDS
SOURCE     Infectious bronchitis virus
            ORGANISM Infectious bronchitis virus
            Viruses; ssRNA viruses; ssRNA positive-strand viruses, no DNA
            stage; Nidovirales; Coronaviridae; Coronavirinae; Gammacoronavirus.
REFERENCE  1 (bases 1 to 332)
AUTHORS    Serova,N.Y., Samuseva,G.N., Dzhavadov,E.D. and Gogoladze,D.T.
TITLE      Direct Submission
JOURNAL    Submitted (04-NOV-2016) PCR Laboratory, All-Russian Research
            Veterinary Institute of Poultry Science, Chernikova, 48,
            Saint-Petersburg 198412, Russia
COMMENT    ##Assembly-Data-START##
            Sequencing Technology :: Sanger dideoxy sequencing
            ##Assembly-Data-END##
FEATURES   Location/Qualifiers
            source                1..332
                                   /organism="Infectious bronchitis virus"
                                   /mol_type="genomic RNA"
                                   /isolate="IBV/RF/467/2016"
                                   /host="chicken"
                                   /db_xref="taxon:11120"
                                   /country="Russia: Chelyabinskaya oblast"
            gene                  <1..>332
                                   /gene="S1"
            CDS                   <1..>332
                                   /gene="S1"
                                   /codon_start=1
                                   /product="spike glycoprotein"
                                   /protein_id="API69973"
                                   /translation="NTGNFSDGFYPFTNSSLVKDRFIVYRESSTNTTLELTNFTFTNV
            SNASPNSSGGVDTFQLYQTHTAQDGYYNFNLSFLSSFVYKPSDFMYGSYHPNCNFRPEN
            INNGLWFNS"
ORIGIN
1 aacactggta atttttcaga tggattctac ctttttacta attcttcttt agttaaggat
61 aggttttattg tatatcgaga aagtagcact aacactactt tagagttaac taatttcact
121 ttactaatg taagtaatgc ttctccta atcaggtggcg ttgatacttt ccaattatat
181 caaacacata ctgctcagga tggttattat aattttaatt tatcatttct gagtagtttt
241 gtgtataaac catctgattt tatgtatggg tcataccacc caaattgtaa ttttagacca
301 gagaatatta ataatggctt atggtttaat tc
//

```


Приложение Д

Strain_GS-11 (GenBank: KY211873)

```

LOCUS      KY211873                799 bp    RNA        linear    VRL 08-DEC-2016
DEFINITION Infectious bronchitis virus strain GS-11 spike glycoprotein (S1)
            gene, partial cds.
ACCESSION  KY211873
VERSION    KY211873
KEYWORDS   .
SOURCE     Infectious bronchitis virus
            ORGANISM Infectious bronchitis virus
            Viruses; ssRNA viruses; ssRNA positive-strand viruses, no DNA
            stage; Nidovirales; Coronaviridae; Coronavirinae; Gammacoronavirus.
REFERENCE  1 (bases 1 to 799)
AUTHORS    Serova,N.Y., Samuseva,G.N., Dubovoj,A.S. and Gogoladze,D.T.
TITLE      Direct Submission
JOURNAL    Submitted (18-NOV-2016) PCR Laboratory, All-Russian Research
            Veterinary Institute of Poultry Science, Chernikova, 48,
            Saint-Petersburg 198412, Russia
COMMENT    ##Assembly-Data-START##
            Sequencing Technology :: Sanger dideoxy sequencing
            ##Assembly-Data-END##
FEATURES   Location/Qualifiers
            source          1..799
                               /organism="Infectious bronchitis virus"
                               /mol_type="genomic RNA"
                               /strain="GS-11"
                               /host="Gallus gallus"
                               /db_xref="taxon:11120"
                               /country="Russia"
                               /collection_date="2011"
                               /note="genotype: 793B"
            gene            <1..>799
                               /gene="S1"
            CDS              <1..>799
                               /gene="S1"
                               /codon_start=1
                               /product="spike glycoprotein"
                               /protein_id="API69972"
                               /translation="FYESHNISASSVAMTVPHNGMSWSASQFCTAHCNFSDFTVFVTH
                               CFKNQLGSCPLTGMIPQNHIRISAMRDGVLFYNLTVSVSKYPRFKSLQCVSNSTSVYV
                               NGDLVFTSNETSYVTGAGVYFKSGGPVTVKVMKEVKALAYFINGTAQEVILCDNSPRG
                               LLACQYNTGNFSDGFPFTNHSVLKDRFIVYRESSTNTTLKLTNFSFTNVSNASPNSG
                               GVDTFQLYQTSTAQDGYYNFNLSFLSSFVYKPSDFMYGSYHPHCKFRP"
ORIGIN
1  ttttatgaaa gccataatat ttctgcttct tctgtagcca tgacagtacc acataatggt
61 atgtcttggt cagcttcaca attttgtaca gctcattgta acttctcaga ctttacagtg
121 ttcgttacgc attgttttaa aaatcaactc ggtagttgtc ccttgacagg tatgattcct
181 cagaatcata ttcgtatttc tgctatgaga gatggagttt tgttttataa cttaacagtt
241 agcgtatcta aataccctag attttaatcg cttcaatgtg ttagcaattc tacatctgtc
301 tatgtaaatg gtgaccttgt tttcacttct aatgaaactt cttacgttac ggggtgcaggc
361 gtttatttta aaagtgggtg gcctgtaact tataaagtta tgaaaagaag taaagcccta
421 gcctacttta ttaatgttac cgcacaagag gttattttat gtgataactc acctagaggt
481 ttgcttgcat gtcagtataa cactggtaat ttttcagatg gattctaacc ttttactaat
541 cattcttag ttaaggatag gtttattgta tatcgagaaa gtagcactaa cactacttta
601 aagttaacta atttcagttt tactaatgta agtaatgctt ctcctaattc aggtggcggt
661 gatactttcc aattatatca aacaagtact gctcaggatg gttattataa ttttaattta
721 tcatttctga gtagttttgt gtataaacca tctgatttta tgtatgggtc ataccacca
781 cattgtaagt ttagaccag

```

//

Приложение Е

«УТВЕРЖДАЮ»:

Заместитель директора ВНИВИП по
научной работе


 Дмитриева М.Е.
« 12 » декабря 2016 г.
М.П. 

Справка о внедрении результатов диссертационной работы в учебный процесс

Результаты научно-исследовательской работы старшего научного сотрудника Всероссийского научно-исследовательского ветеринарного института птицеводства – филиала Федерального научного центра Федерального государственного бюджетного научного учреждения Всероссийский научно-исследовательский технологический институт птицеводства Российской академии наук Серовой Натальи Юрьевны на тему «Индикация и идентификация изолятов вируса инфекционного бронхита кур, циркулирующих на территории Российской Федерации» по специальности 06.02.02 – ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология, микология с микотоксикологией и иммунология внедрены в учебный процесс.

Материалы научных исследований используются в научно-исследовательских учреждениях ветеринарного и биологического профиля на курсах повышения квалификации ветеринарных специалистов, работающих в области промышленного птицеводства.

Заведующий отделом вирусологии
и опухолевых болезней птиц,
доктор ветеринарных наук, профессор

 Трефилов Б.Б.