

Є. О. КРАСНОБАЄВ, кандидат ветеринарних наук

О. М. ДЕРЯБІН, Г. А. ПОПОВА,

А. П. КУБАЄВ

Інститут ветеринарної медицини, м. Київ

І. О. СОБКО, директор Центру сучасної діагностики

В. В. КИЛИМЕНКО

НВП «Біо-Тест Лабораторія», м. Київ

В. П. ЛУК'ЯНЕЦЬ, директор Державної Київської спеціалізованої лабораторії ветеринарної медицини по хворобам птиці, м.Бровари

ВИДІЛЕННЯ ТА ІДЕНТИФІКАЦІЯ ПОЛЬОВИХ ІЗОЛЯТІВ ВІРУСУ ІНФЕКЦІЙНОГО БРОНХІТУ КУРЕЙ QX-ПОДІБНОГО ТИПУ. ВИВЧЕННЯ ЇХ ПАТОГЕННОСТІ ДЛЯ КУРЧАТ

Статтю присвячено виділенню польових ізолятів вірусу інфекційного бронхіту курей при спалахах ІБ-подібного захворювання серед щепленого птахопоголів'я в Україні, їх ідентифікації як вірусу інфекційного бронхіту QX-подібного типу за допомогою ЗТ-ПЛР, вивченню патогенності для курчат різного віку.

Ключові слова: інфекційний бронхіт (ІБ); вірус інфекційного бронхіту (ВІБ); зворотньо-транскриптазна полімеразна ланцюгова реакція (ЗТ-ПЛР); вільні від специфічних патогенів курячі ембріони (ВСП-КЕ)

Інфекційний бронхіт являється висококонтагіозним вірусним захворюванням курей, що спричиняє величезні економічні збитки у світовому промисловому птахівництві [1-3]. Захворюваність може складати 100%. Смертність зазвичай невисока, проте може перевищувати 50% при появі нефропатогенних штамів ВІБ або при ускладненні захворювання вторинними бактеріальними інфекціями [4].

ВІБ є убіквітарним у більшості частин світу. Він має властивість до швидкого розповсюдження серед незахищеного птахопоголів'я [5]. Лише вакцинація птиці проти ІБ є по суті єдиним і ефективним заходом в системі контролю та боротьби з цією хворобою.

Однією з важливих особливостей ВІБ – РНК-ового вірусу сімейства *Coronaviridae* є його величезна мінливість за рахунок змін геному шляхом мутацій і рекомбінацій, що може викликати емерджентну появу нових антигенних варіантів вірусу. Антигенні варіанти ВІБ регулярно з'являються в польових умовах. Періодично повідомляється про виявлення в різних регіонах світу ВІБ нових серотипів, варіантів і генотипів, загальна кількість яких перевищує вісімдесят [6-9].

Наявність чисельних відомих серотипів збудника, постійна емерджентність нових варіантів та генотипів ВІБ робить ІБ однією з найбільш складних для контролювання вірусних інфекцій птиці, призводить до виникнення спалахів хвороби серед щепленого поголів'я. Це створює велику загрозу для промислового птахівництва тому, що вакцинація існуючими вакцинами зі штамів ВІБ відомих серотипів є недостатньо ефективною проти хвороби, обумовленої ВІБ нових серотипів і варіантів. Показана можливість одночасної циркуляції в окремих

регіонах або господарствах ВІБ декількох серотипів, які також можуть викликати захворювання на ІБ серед щепленого птахопоголов'я [9-10].

ІБ клінічно може перебігати у вигляді трьох основних синдромів – респіраторного (бронхіт), нефрозо-нефритного (ураження нирок) та порушення продуктивних органів у курей [1-3]. Респіраторний синдром з'являється у молодих курчат і характеризується кашлем, трахеальними хрипами, носовими виділеннями, ускладненим диханням, іноді кон'юнктивітом, ринітом і синуситом. Враження захисних механізмів дихальної системи схиляє курей до вторинних бактеріальних інфекцій, що може призводити до підвищеної смертності.

Багато варіантів ВІБ, що зветься нефротропними, мають високу афінність до нирок і сечоводів [7, 10]. Такі нефротропні штами ВІБ можуть викликати ураження нирок та сечоводів з відкладенням уратів. Частіше зустрічається серед бройлерів.

Репродуктивний синдром звичайно реєструють серед курей старше 6-місячного віку. Захворювання перебігає безсимптомно, або з незначним ураженням органів дихання. Єдиний прояв хвороби – довготривале зниження несучості на 30-80%, яке залежить від віку птиці. У подальшому має місце відновлення несучості, проте вона залишається зниженою. До того ж хворі кури несуть малі яйця, неправильної форми, з тонкою шкаралупою або вадами шкаралупи [2, 8]. У багатьох несучок можуть розвиватися вторинні бактеріальні інфекції, які викликають сальпінгіт і жовточний перитоніт. Враження стад репродукторів та несучок може призводити не тільки до зменшення кількості інкубаційних яєць, але зниження виводимості курчат та їх якості [8].

В Україні ІБ розповсюджений в птахогосподарствах м'ясного та яєчного напрямків у всіх регіонах. Усі промислові господарства регулярно проводять щеплення птахопоголов'я проти ІБ. Незважаючи на це, у ряді господарств з'являються спалахи ІБ-подібного захворювання серед щепленого проти ІБ поголів'я курей.

Серологічний моніторинг в ІФА та серотипування антитіл за допомогою РЗГА з серотипспецифічними антигенами ВІБ, проведені в 2007-2011 рр., вказують на домінування на теренах країни штамів ВІБ серотипів Massachusetts, 4/91 (793/B), D274 та на появу і розповсюдження в останні роки штамів ВІБ нових для України серотипів QX-подібного та Italy-02 [11].

Штам QX ВІБ був вперше виявлений у Китаї в 1995 і 2004 рр [12] і пов'язаний з нефритом, смертністю і проблемами виробництва яєць в вакцинованих проти ІБ стадах а також з провентрикулітом спершу ідентифікованим у 25-70 добових курчат в 1996 році [13]. QX-подібні віруси були потім виявлені на Дальньому сході і в Європейських областях Росії в 2001 і 2002 рр., відповідно, в ході моніторинга різних стад курей в період з 1998 по 2002 рр. [14].

При надзорі ІБ в ряді Європейських держав було ідентифіковано емерджентну ВІБ QX-подібних вірусів з кінця 2001 року. В ході досліджень проведених в 2002-2006 рр. показано, що QX-подібні віруси займають четверте місце за поширенням в Європі. В окремих країнах його поширеність складає 22-23% від усіх виділених польових ізолятів ВІБ [15-18].

Метою роботи було виділення і ідентифікація польових ізолятів ВІБ QX-типу від курей при спалахах ІБ-подібного захворювання серед щепленого поголів'я та вивчення патогенних властивостей виділених ізолятів ВІБ цього типу нового для України.

Матеріали і методи: Детально матеріали і методи було описано у попередньому повідомленні [19]. Коротко:

Відбір патматеріалу для індикації, ідентифікації та для виділення збудника ІБ проводили в 3х господарств несучок і 2-х бройлерних господарств з наявністю серопротипу з відхиленням від нормального поствакцинального. Окрім того в ряді випадків відбирали патматеріал від хворих курей які утримувались в приватному секторі та не вакцинувались проти ІБ.

У господарствах м'ясного напрямку, в основному, мали місце респіраторні проблеми. Симптоми захворювання, як правило, відмічали у бройлерів з 4-го тижня життя. Спостерігали кашель, трахеальні хрипи, ускладнене дихання з відкритим дзьобом, інколи були набряки в ділянці синусів, риніти, синусити. Птиця ставала кволою, відставала в рості. За період від 28-30-денного віку до забою у 44-48-денному віці смертність досягала 5-6%. При розтині спостерігали серозний, катаральний або фібринозний риніт, трахеїт/ або бронхіт.

У деяких бройлерних господарствах поряд з проблемами захворювань респіраторного тракту мала місце поява нефротичного синдрому з ураження нирок, вираженого у різній мірі – від гострих нефритів (нирки набрякли, гіперемовані) до хронічної течії (нирки бліді, у сечоводах – відкладення солей).

У стадах комерційної несучки частіше за все мало місце зниження яєчної продукції на 7-10% протягом 1-2 тижнів, яка потім повільно поновлювалась до звичайного рівня, а також погіршення якості шкарлупи (велика кількість насічок та бою). В окремих стадах визначали появу синдрому «псевдонесучки». Під час розтину в таких випадках знаходили ураження яйцепроводів з накопиченням в них великої кількості прозорої рідини – «кісти яйцепроводів» або частково атрофовані яйцепроводи з великими кістоподібними розширеннями, а також оваріїти, сальпінгіти, іноді жовткові перитоніти, а також яйця з деформованою шкарлупою.

Виділення РНК і проведення ЗТ-ПЛР. Виділення РНК із зразків патматеріалів виконували за допомогою набору „Рибозоль-А” („Амплиценс”, Росія). Реакцію зворотної транскрипції проводили за допомогою набору „РЕВЕРТА-Л” („Амплиценс”, Росія); для проведення полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) використали набір „Амплиценс 200-1” („Амплиценс”, Росія).

Реактиви, ферменти. Використовували 2-МЕ, ЕДТА, борну кислоту, Tween-20, Тритон X-100, MgCl₂, NaCl, Tris-HCl; агароза “NA” – Pharmacia; ДНК маркер „100 bp DNA ladder”, етідіума бромід, бромфеноловий синій, DiaTaq-полімераза, суміш дезоксинуклеотидтрифосфатів (дНТФ), віск – Амплісенс, „GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit”, „Flexi Prep Kit” – Amersham; БСА (fr.V) – Boehringer Mannheim; вода дистильована згідно з ГОСТ 6709-72.

Олігонуклеотидні праймери, які були використані в дослідженнях тільки для виявлення вірусу бронхіту без визначення серотипу та праймери до ВІБ серотипів QX- і Массачусетс для ідентифікації серотипової належності представлені в таблиці 1. Продукти ампліфікації аналізували методом електрофорезу в 1,5% гелі агарози „NA”.

ЗТ-ПЛР використовували для визначення наявності РНК ВІБ у зразках патологічних матеріалів від хворої птиці та в зразках алантоїсної рідини заражених КЕ різних пасажів матеріалів при виділенні та адаптації вірусу до ВСП-КЕ.

Олігонуклеотидні праймери, використані в дослідженнях для виявлення та ідентифікації ВІВ та визначення серотипів QX та Массачусетс

Послідовність праймеру (5'→3')	Призначення (специфічність)
UTR1 (GCTCTAACTCTATACTAGCCTAT)	Для ідентифікації ВІВ („гніздовий” варіант ПЛР)
UTR2 (AAGGAAGATAGGCATGTAGCTT)	
UTR3 (GTCCTAGTGCTGTACCCTCG)	
UTR(+) (GTCTATCGCCAGGGAAATGTCT)	
MQxF (TCAGGGTATGGCTTGGTCTA)	Для ідентифікації ВІВ типу QX
MQxR (ACACCTTTACATGCCCTTGG)	
mH41F (TATGTAGTGCTGCTTTGTATG)	Для ідентифікації ВІВ серотипу Massachusetts
mH41R (GCTGTTTGTGTTTGGTAAG)	

Підготовка матеріалів для вірусологічних досліджень. Зі зразків патологічного матеріалу готували 10% суспензію на стерильному ФСБ (рН 7,0) з антибіотиками (ампіцилін 200 ОД, стрептоміцин 200 ОД та гентаміцин 400 мкг/см³). Отриману суспензію центрифугували при 2 тис.об/хв протягом 20 хвилин. Надосадову рідину відбирали та тримали впродовж 1 год. при температурі +4⁰С, після чого фільтрували через бактеріальний фільтр з діаметром пор 0,2 мк.

Для виділення вірусу використовували вільні від специфічних патогенів курячі ембріони (ВСП-КЕ) 9-10-денного віку, одержані з інкубаційних VALO SPF курячих яєць фірми «Lohmann Tierzucht GmbH» (Сухавен, Німеччина).

Зараження ВСП-КЕ проводили шляхом інокуляції ембріонів в алантоїсну порожнину по 0,2 см³/КЕ отриманої фільтрованої рідини. Кожним зразком заражали по 5 ВСП-КЕ. Заражені ембріони інкубували в інкубаторі при 37⁰С протягом 7 діб. Овоскопію КЕ проводили щоденно. Загибель ембріонів у перші 24 години інкубування вважали неспецифічною. Ембріони, які завмерли в пізніші терміни інкубації, враховували як загиблі від дії вірусу. Через 72 години інкубації незалежно від наявності чи відсутності загибелі алантоїсну рідину з 2 КЕ відбирали, об'єднували, додавали антибіотики та використовували для наступного пасажу. Три ембріони, що залишилися, інкубували до 7-го дня, після зараження, після чого охолоджували, розтинали і досліджували наявність змін (карликовість та скуйовдженість КЕ).

Інфекційну активність отриманого вірусомісного матеріалу визначали шляхом титрування його у 9-10-денних ВСП-КЕ серійними 10-разовими розведеннями. Оцінювали дію ВІВ на КЕ за загибеллю ембріонів після 24 годин після зараження (ГПЗ) та за появою КЕ-карликів. Титр інфекційної активності визначали за методом Кербера в модифікації Ашмаріна [19].

Біопроба на курчатах. Біопробу проводили на курчатах різного віку (від 1-5-денного до 3-6-тижневого), отриманих з ВСП-КЕ.

Для перевірки патогенності ізолятів в кожному випадку формували по дві групи курчат дослідну та контрольну.

Курчат заражали індивідуально, інтраназально-окулярним, назальним та окулярним методами зараження, шляхом закапування робочого розведення вірусу (1:10) у об'ємі 0,1 см³/курча. Контрольних (незаражених) курчат утримували в окремому приміщенні з окремим обслуговуючим персоналом. Курчат дослідної та контрольної групи оглядали щоденно.

Для визначення патогенності використовували клінічні симптоми захворювання (фиркання, трахеальні хрипи, сопіння (диспное), носові виділення, кон'юнктивіт) та циліарну активність (ЦА) епітеліальних клітин, що вистеляють трахею (поява циліостазу).

Клінічні симптоми захворювання визначали за термінами появи, тяжкістю і тривалістю прояву [20].

Дослідження циліарної активності епітелію трахеї проводили на 4-у та 6-у добу після зараження (ДПЗ) [21]. У кожен термін для дослідження циліарної активності забивали по 2 дослідних та по 1 контрольному курчаті.

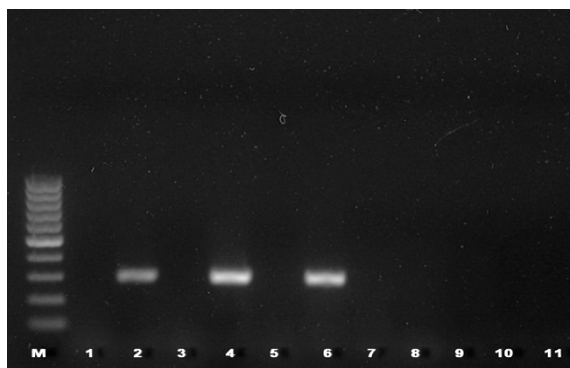
Циліарну активність ворсинкового епітелію трахеї визначали безпосередньо після забою курчат гуманним способом за методикою [22].

Результати досліджень

Виділення та ідентифікація польових ізолятів ВІБ

Для виділення польових ізолятів ВІБ використовували зразки патологічних матеріалів від хворої птиці, отримані з господарств. Зразки попередньо перевірялись в ЗТ-ПЛР з ВІБ-специфічними праймерами на наявність геному ВІБ. Для виділення вірусу використовували тільки зразки позитивні на наявність РНК ВІБ.

На рисунку 1 наведено результати дослідження в ЗТ-ПЛР з праймерами #IBV UTR1/UTR2 11 зразків патологічних матеріалів від курей-несучок з господарств із щепленим проти ІБ поголів'ям та з окремих приватних господарств з не щепленим птахопоголів'ям. Позитивний результат одержано з трьома зразками (КН-2, КН-4, КН-6).



ВАРІАНТИ:

М – маркер “100bp” (Fermentas)

1-11 – номери зразків

Праймери #IBV UTR1/UTR2

Рис. 1. Виявлення наявності генетичного матеріалу ВІБ у зразках патологічних матеріалів КН-1-11 від курей-несучок з ІБ-подібним захворюванням

Аналогічні дослідження були проведені в ЗТ-ПЛР з праймерами #UTR1/#UTR2 5 зразків патологічних матеріалів, отриманих від хворих бройлерів. Позитивний результат отримано з двома зразками – Б-1 та Б-2 (дані не приведені).

Виділення вірусів проводили на ВСП-КЕ. 10% суспензію патматеріалу вводили в алантоїсну порожнину 5 ВСП-КЕ 10-денного віку по 0,2 см³/КЕ; заражені ВСП-КЕ інкубували при 37⁰С протягом 7 діб. Алантоїсну рідину від 2 заражених ембріонів відбирали через 72 години після зараження (ГПЗ) відбирали для проведення наступного пасажу. З кожним матеріалом проводили не менше 3-5 псажів.

У таблиці 2 наведено зведені дані відносно загальних відомостей щодо виділення польових ізолятів вірусу, їх походження (виділені від бройлерів або курей- несучок), рівня пасажів, на якому проявилася їх дія на ембріони, її характер, а також титри інфекційної активності для ембріонів.

Таблиця 2

Зведені дані щодо виділення та властивостей польових ізолятів вірусу інфекційного бронхіту

№ п/п	Птиця, від якої одержано патматеріал	Номер зразка	Рівень пасажу, на якому вперше проявилась дія вірусу	Дія вірусу на ембріон	Титр інфекційної активності, ЕІД ₅₀ /см ³
1	бройлер	Б-1	3-4	загибель ембріонів 96 ГПЗ	10 ^{-6,5} ЕІД ₅₀ /см ³
2	бройлер	Б-2	3-4	загибель ембріонів 72-96 ГПЗ, поява карликів	10 ^{-6,5} ЕІД ₅₀ /см ³
3	курка-несучка	КН-2	3-4	загибель ембріонів 72-96 ГПЗ	10 ^{-6,0} ЕІД ₅₀ /см ³
4	курка-несучка	КН-4	2-3	загибель ембріонів 72-96 ГПЗ, поява карликів	10 ^{-6,2} ЕІД ₅₀ /см ³
5	несучка	КН-6	5	загибель ембріонів 72-96 ГПЗ, поява карликів	10 ^{-5,0} ЕІД ₅₀ /см ³

У ході виділення та адаптації польових ізолятів спостерігали різний характер прояву дії вірусу на ембріони на різних рівнях пасажів. Ізоляти Б-1, КН-2 та КН-4, в основному, викликали загибель ембріонів у різні терміни культивування (72-96 ГПЗ). Ізоляти Б-2 та КН-6 окрім загибелі ембріонів викликали появу ембріонів-карликів (зміни, типові для дії ВІВ). Проявлялась також загальна тенденція щодо збільшення кількості загиблених від дії вірусу ембріонів та появи ембріонів-карликів зі збільшенням кількості адаптаційних пасажів. При розтині заражених ембріонів, що залишилися живими після 7-денної інкубації, спостерігали карликовість, закручування шиї ембріона, щільне прилягання лапок до голови та прилипання амніотичної оболонки до тіла ембріона.

На рисунку 2. надано фотографії заражених різними виділеними польовими ізолятами вірусу ембріонів-карликів та контрольних, незаражених, ембріонів.



А



Б

Рис.2. А, Б Фотографії заражених різними виділеними польовими ізолятами ВІВ : ембріони-карлики (ліворуч), контрольні неінкульовані ембріони (праворуч)

Отримані польові ізоляти ВІБ були перевірені на наявність/відсутність гемаглютинуючої активності з курячими еритроцитами. Це необхідно було зробити, оскільки у господарствах досить широко застосовують вакцинацію птиці проти ньюкаслської хвороби. Тому важливим було виключення можливої наявності вірусу ньюкаслської хвороби (ВНХ) серед виділених польових ізолятів вірусу. Для цього усі виділені польові ізоляти були досліджені в РГА; у випадках отримання позитивного результату РГА відповідні зразки перевіряли в РЗГА з ВНХ-специфічними сироватками. РГА і РЗГА ставили мікрометодом з 1% зависю еритроцитів курей за загально прийнятими методиками. Зведені результати цих досліджень представлені в таблиці 3.

Таблиця 3

**Зведені результати досліджень в РГА та РЗГА
виділених польових ізолятів ВІБ**

Польовий ізолят	Результати:	
	РГА	РЗГА з ВНХ-специфічною сироваткою
Б-1	+	+
Б-2	–	нд*
КН-2	+	+
КН-4	–	нд
КН-6	–	нд

нд* – не досліджували

З наведених в таблиці 3 даних видно, що з п'ятьох виділених польових ізолятів вірусу два ізоляти (Б-1 та КН-2) володіють гемаглютинуючою активністю. Позитивні результати, отримані при дослідженні ізолятів Б-1 та КН-2 в РЗГА з ВНХ-специфічною сироваткою, вказують на те, що вони є ВНХ (скоріш за все це вакцинні штами) або ВНХ-контанінантами цих виділених польових ізолятів ВІБ. Подальших досліджень з цими ізолятами не проводили. З рештою трьома польовими ізолятами (Б-2, КН-4 та КН-6), які не володіли гемаглютинуючою активністю, проводили подальші роботи по їх ідентифікації.

Результати ідентифікації виділених польових ізолятів ВІБ в ЗТ-ПЛР з використанням ВІБ-специфічних праймерів представлено на малюнках 3 та 4.

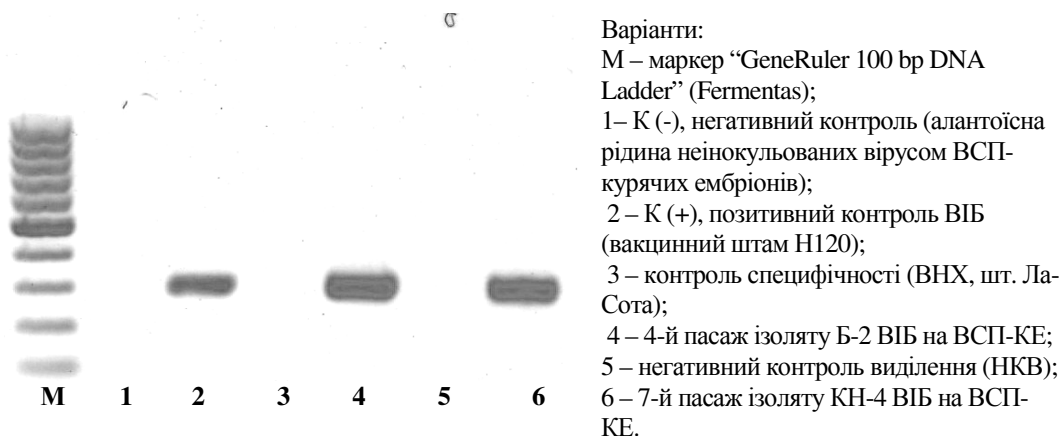
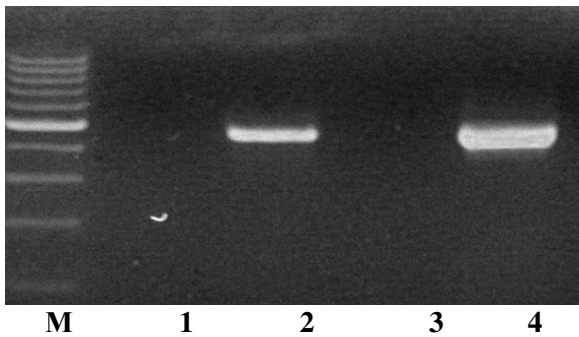


Рис. 3. Результати дослідження в ЗТ-ПЛР з праймерами #UTR1/#UTR2 ізоляту Б-2 ВІБ 4-го пасажу та ізоляту КН-4 ВІБ 7-го пасажів на ВСП-КЕ (розмір фрагменту ДНК – 300 п.н.).



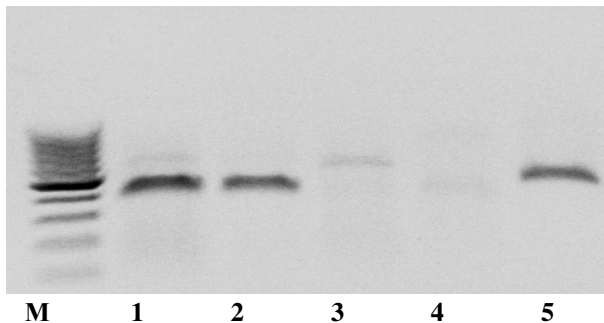
Варіанти: М – маркер “GeneRuler 100 bp DNA Ladder” (Fermentas),
 1 – К (-) – негативний контроль (алантоїсна рідина неінокульованих ВСП-курських ембріонів);
 2 – К (+) – позитивний контроль ВІВ (вакцинний штам Н120);
 3 – негативний контроль виділення (НКВ);
 4 – 5-й пасаж ізоляту КН-6 ВІВ на ПГ-КЕ.

Рис. 4. Результати дослідження в ЗТ-ПЛР з праймерами #IBVN(+)/# IBVN(-) ізоляту КН-6 ВІВ 5 пасажу на ПГ-КЕ (розмір фрагменту ДНК – 453 п.н.)

Дані, представлені на рисунках 3 і 4 свідчать, що виділені у ВСП-КЕ польові ізоляти Б-2, КН-4 та КН-6 ВІВ дійсно є ізолятами вірусу інфекційного бронхіту.

Для визначення серотипової належності трьох виділених польових ізолятів ВІВ були перевірені в перехресній ЗТ-ПЛР з праймерами до серотипу QX та з праймерами до серотипу Масачусетс.

На рисунку 5 представлені результати досліджень виділених польових ізолятів ВІВ у ЗТ-ПЛР з праймерами mQxF та mQxR до ВІВ серотипу QX. Поряд з польовими ізолятами ВІВ досліджували також ВІВ Н120 серотипу Масачусетс (контроль специфічності) та вихідний патологічний матеріал, з якого польовий ізолят ВІВ КН4 було виділено.



Варіанти: М – маркер “GeneRuler 100 bp DNA Ladder” (Fermentas),
 1 – польовий ізолят ВІВ Б-2
 2 – польовий ізолят ВІВ КН-4
 3 – польовий ізолят ВІВ КН-6
 4 – ВІВ Н120 серотипу Масачусетс
 5 – Вихідний матеріал, з якого було виділено польовий ізолят ВІВ КН-4
 Праймери mQxF/mQxR

Рис.5. Результати електрофоретичного аналізу продуктів ЗТ-ПЛР з праймерами mQxF/mQxR з виділеними польовими ізолятами ВІВ

З п'ятих досліджених матеріалів позитивний результат ЗТ-ПЛР з праймерами mQxF та mQxR було отримано лише з ізолятами ВІВ Б-2 та ВІВ КН-4, а також з вихідним патологічним матеріалом, з якого ізолят ВІВ КН-4 було виділено. Ізолят ВІВ КН6 та ВІВ Н120 серотипу Масачусетс дали негативний результат у ЗТ-ПЛР з праймерами mQxF та mQxR.

При дослідженні польових ізолятів Б-2 та КН-6 в ЗТ-ПЛР з праймерами mH41F/mH41R до серотипу Масачусетс позитивний результат було отримано лише з польовим ізолятом ВІВ КН-6 та з позитивним контролем (ВІВ Н120 та ВІВ

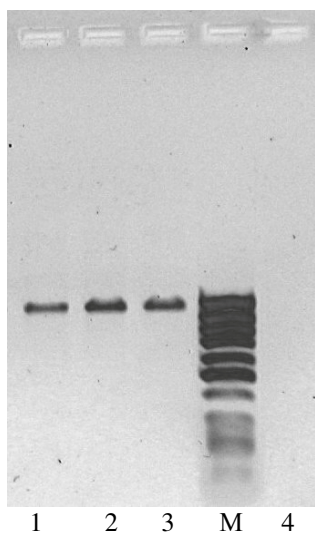


Рис. 6 Результати електрофоретичного аналізу продуктів ЗТ-ПЛР з праймерами mH41F/ mH41R з польовими ізолятами Б2 та КН6 ВІБ. Варіанти: М – маркер “GeneRuler 100 bp DNA Ladder” (Fermentas); 1– вакцинний штаб ВІБ Н120; 2 – ВІБ М41; 3 – ізолят КН6 ВІБ; 4 – ізолят Б2 серотипу QX ВІБ.

М41 серотипу Масачусетс), тоді як польовий ізолят ВІБ Б-2 в ЗТ-ПЛР з праймерами mH41F/mH41R дав негативний результат (рисунок 6). При перевірці в ЗТ-ПЛР польового ізоляту КН-4 та його вихідного патматеріалу з цими праймерами було також отримано негативний результат (дані не приведені).

Отже, дослідження виділених польових ізолятів ВІБ у перехресній ЗТ-ПЛР з праймерами mQxF та mQxR до ВІБ серотипу QX та з праймерами mH41F/mH41R до ВІБ серотипу Масачусетс показує, що ізоляти ВІБ Б-2 та ВІБ КН-4 дають позитивний результат лише в ЗТ-ПЛР з праймерами до ВІБ серотипу QX; з праймерами до ВІБ серотипу Масачусетс вони дають негативний результат.

Все це дозволяє вважати, що польові ізоляти ВІБ Б-2 та ВІБ БК-4 є ізолятами ВІБ серотипу QX, а польовий ізолят ВІБ КН-6 є ізолятом ВІБ серотипу Масачусетс

Патогенність усіх виділених польових ізолятів ВІБ вивчали у окремих дослідах на курчатах від 1-5-денного до 3-6-тижневого віку, отриманих з ВСП-КЕ при використанні комбінованого (інтраназально-окулярного), назального та очулярного методів зараження. В таблиці 4 надано зведені дані вивчення патогенності для курчат ізолятів Б2 та КН4 ВІБ.

Таблиця 4

Зведені дані динаміки розвитку захворювання у курчат різного віку, заражених польовими ізолятами ВІБ Б2 та ВІБ КН4 QX-подібного типу інтраназально-окулярно

Польовий ізолят	Вік курчат при зараженні	Динаміка розвитку захворювання, днів:			Ціліостаз війок трахеї курчат забитих на:	
		Інкубаційний період	Період розвитку захворювання	Період одужання	4 ДПЗ	6 ДПЗ
ВІБ Б2	1-доба	3 дні	4-8 діб	9-10 доба	+/*	+/+
	3-тижн.	2 дні	3-7 діб	8 доба	+/+	+/+
	6-тижн.	2 дні	3-7 діб	8 доба	+/+	+/+
ВІБ КН4	2-доби	1 доба	2-9 діб	10 доба	+/+	+/+
	1-тижн.	≤ 1 доба	2-8 діб	9 доба	+/+	+/+
	2-тижн.	2 доби	3-9 діб	10 доба	+/+	+/+
	3-тижн.	2 доби	3-8 діб	9 доба	+/+	+/+

* «+» – ціліостаз на рівні 21-40 балів; «-» – ціліостаз на рівні 0-20 балів

Обидва ізоляти патогені для курчат всіх вікових груп, викликають у них ознаки респіраторного захворювання (чхання, фиркання, хрипи), котре з'являється на 2^у-3^у добу після зараження і тривають від 2-3 до 7-9 діб. Звертає на себе увагу, що при зараженні ВІВ КН4 інкубаційний період трохи коротший. Клінічно хворіють не всі птахи. Період одужання – 8^а-9^а доба. Дослідження ціліостазу війок трахеї курчат, забитих на 4^у-6^у добу свідчить про наявність вираженого ціліостазу у цих птахів, в тому числі й у птахів з відсутністю клінічних ознак захворювання.

У курчат, забитих для дослідження ціліостазу трахеї на 4^и-6^и день після зараження проводили також патологоанатомічні дослідження. При розтині відмічали набряклі нирки, темно бурого кольору. В окремих курчат спостерігали відкладення уратів у вигляді білих тяжів.

В групі курчат, заражених польовим ізолятом ВІВ КН4 у 3-тижневому віці, одне курча на 7му добу після зараження було кволе та пригнічене та загинуло на наступний день. При розтині відмічали нефрит з відкладенням уратів в сечогінниках.

Враховуючи те, що в цьому досліді ізолят КН4 ВІВ проявив більш високу вірулентність, ніж ізолят Б2 ВІВ того ж типу, виникла необхідність більш детального дослідження характеристики патогенності ізоляту КН4 ВІВ при різних методах зараження. Тому, з цим вірусом був проведений дослід на курчатах 5-денного віку по вивченню його патогенності при інтраназальному та окулярному зараженні. Зведені результати цього досліді представлені в таблиці 5.

Таблиця 5

Динаміка розвитку захворювання і результати тесту на ціліостаз у курчат, заражених польовим ізолятом ВІВ КН4 окулярним і назальним методом

Метод зараження	Динаміка розвитку захворювання (дні)			Ціліостаз ворсинчастого епітелію трахеї курчат, забитих на:	
	Інкубаційний період	Період розвитку захворювання	Одужання	7 ДПЗ	10 ДПЗ
Окулярний	1 день	2-9 день	10-11 день	+/*	+/-
Назальний	1 день	2-9 день	10-11 день	+/+	-/+

* «+» – ціліостаз на рівні 21-40 балів; «-» – ціліостаз на рівні 0-20 балів

Аналіз приведених в ній даних показує, що при кожному з використаних методів зараження хвороба у курчат розвивалась однаково. При обох методах зараження інкубаційний період складає 24 години. Далі захворювання розвивалось однаково (2-9^а доба). На 7^{му} добу після зараження при дослідженні ціліостазу війчастого епітелію трахеї відмічали повну зупинку роботи цилиарного епітелію; на 10^у добу мало місце клінічне одужання і відновлення роботи цилиарного епітелію у окремих курчат.

При розтині курчат, забитих для дослідження ціліостазу трахеї на 7^{му} добу після зараження, відмічали набряклість нирок, які були темно червоного кольору. У одного курчати, зараженого окулярно, окрім враження нирок мало місце також враження яйцеводу (киста яйцеводу) (рис 7).

У курчат, забитих для оцінки циліостазу на 10 добу після зараження, відмічали блідо-рожевий колір нирок, хоча окремі долі їх у деяких курчат залишалися незначно набряклими. Це свідчить про одужання курчат.

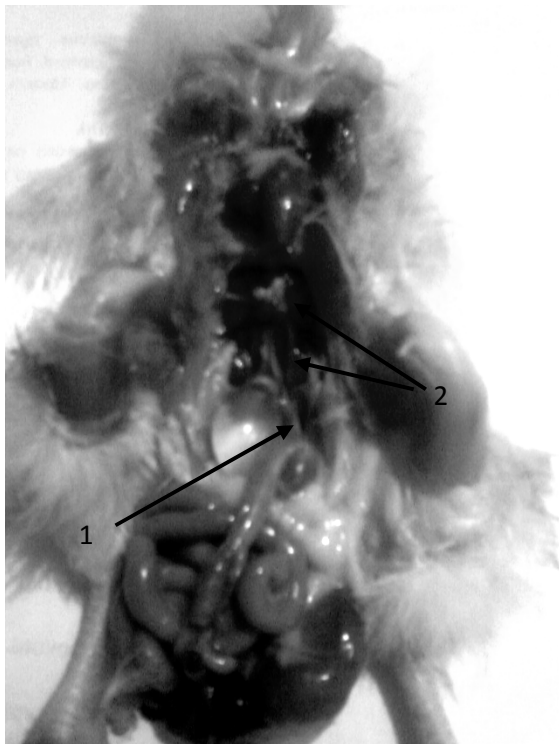


Рис 7. Ураження нирок та яйцеводу курчати, зараженого польовим ізолятом ВІБ КН4 окулярним методом (1 – киста яйцеводу; 2 – нефрит)

При перевірці патогенності польового ізоляту КН6 на курчатах 1-добового віку (інтраназально-окулярний метод зараження) курчата залишались клінічно здоровими на протязі всього періоду спостереження. Дослідження циліостазу, проведені на 4^у і 6^у добу після зараження, показали відсутність циліостазу. Все це свідчило що курчата залишались здоровими, тобто вірус був апатогенним для курчат 1-денного віку. Тому дослідження патогенності цього ізоляту на курчатах більш старшого віку не проводились.

Отже польові ізоляти ВІБ Б-2 та ВІБ КН-4 типу QX є патогенними для курчат різного віку та викликають у них респіраторне захворювання, патологічні зміни характерні для ІБ (нефрит, киста яйцеводу) та циліостаз війок миготливого епітелію трахеї.

Обговорення результатів.

У ході проведених робіт по виділенню і ідентифікації польових ізолятів ВІБ при спалахах ІБ-подібного захворювання серед вакцинованих проти ІБ птахів було виділено два ізоляти (Б-2 та КН4), ідентифіковані як ВІБ QX-подібного типу, та один ізолят (КН6) як ВІБ типу Массачусетс за допомогою молекулярних методів (ЗТ-ПЛР з ВІБ-специфічними праймерами та в ЗТ-ПЛР з ВІБ QX- та ВІБ Массачусетс-специфічними праймерами). Попереднє тестування зразків патологічних матеріалів від хворої птиці на наявність геному ВІБ в ЗТ-ПЛР з ВІБ-специфічними праймерами підвищило ефективність цих робіт.

При вивченні патогенності виділених ізолятів ВІБ на курчатах різного віку виявилось, що ізоляти Б2 та КН-4 ВІБ QX-типу патогенні, викликають у них ознаки респіраторного захворювання, нефрит та ураження яйцеводу (киста яйцеводу). Наскільки нам відомо це перший випадок виділення патогенного ВІБ нового для України QX-типу. Підтвердженням циркуляції в Україні ВІБ QX-типу є дані серологічного моніторингу за 2007-2010 рр [11], що свідчать про виявлення появи антитіл до ВІБ цього типу в господарствах України наприкінці 2009- початку 2010 рр, а також розповсюдження інфекції в 2011-2012 рр в господарствах різних регіонів країни (не опубліковані дані). Про це також свідчать повідомлення з Англії [18] та Росії [23] про визначення наявності ВІБ QX-типу в матеріалах, отриманих з України. Російські дослідники вказують, що ідентифікований ними польовий ізолят ВІБ QX-типу є рекомбінантом ВІБ QX і вакцинного вірусу Н120 ВІБ.

Таким чином, в ході проведених досліджень виконані попередні етапи робіт, суттєві для здійснення обґрунтованої стратегії контролю ІБ [4], а саме: (1) виділення та (2) ідентифікація польових ізолятів ВІБ QX-типу, нового для країни та актуального в світі варіанту ВІБ, пов'язаного з захворюванням серед вакцинованої птиці; (3) охарактеризовано патогенність виділених ізолятів для курчат різного віку. Це створює суттєве підґрунтя для проведення робіт по дослідженню ефективності існуючих вакцин та схем вакцинацій проти виділених ізолятів ВІБ типу QX.

Висновки

1. З патологічних матеріалів від хворих бройлерів та курей-несучок при спалахах ІБ-подібного захворювання серед щепленого проти ІБ поголів'я та від нещеплених курей з приватного сектору виділено шляхом пасажування у ВСП-КЕ три польові ізоляти (Б2, КН-4 та КН-6), ідентифіковані як ВІБ за допомогою ЗТ-ПЛР з ВІБ-специфічними праймерами.

2. Ізоляти ВІБ Б2 та ВІБ КН-4 ідентифіковані як ВІБ QX-типу; ізолят ВІБ КН-6 як ВІБ типу Массачусетс в перехресній ЗТ-ПЛР з ВІБ QX- та ВІБ Массачусетс-специфічними праймерами

3. Ізоляти ВІБ Б2 та ВІБ КН4 QX-типу патогенні для курчат від 1-5-денного до 3-6-тижневого віку при інтраназально-окулярному, інтраназальному та окулярному зараженні. Хвороба проявлялась у вигляді респіраторного захворювання (чхання, фіркання, хрипи, дипресія) з повною зупинкою роботи цилиарного епітелію трахеї та ураженням нирок (нефрит та відкладання уратів) яйцеводу (киста яйцеводу).

4. Ізолят КН-6 ВІБ серотипу Массачусетс не патогенний для курчат 1-денного віку при інтраназально-окулярному зараженні і вірогідно є вакцинним штамом ВІБ.

Список використаної літератури

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

2. *Cavanagh D., Naqi S.A.* Disease of Poultry / Calneck B.W., Barnes H.J., Beard C.W., Reid W.V., Yolder H.W.// Infectious bronchitis, 10th ed., 1997. – P. 511-526

3. *Cavanagh, D., and J. Gelb Jr.* Infectious bronchitis. In: Diseases of poultry, 12th ed. Y. M. Saif, A. M. Fadly, J. R. Glisson, L. R. McDougald, L. K. Nolan, and D. E. Swayne, eds. Blackwell Publishing, Ames, IA. 2008. pp. 117–135.

4. Review of Infectious Bronchitis Virus Around the World / Mark W. Jackwood / AVIAN DISEASES 56:634–641, 2012
5. Infectious bronchitis virus variants: a review of the history, current situation and control measures / J.J. (Sjaak) de Wit¹, Jane K.A. Cook and Harold M.J.F. van der Heijden / Avian Pathology 2011. 40(3), p223-235
6. Lee C. W. Origin and evolution of Georgia 98 (GA98), a new serotype of avian infectious bronchitis virus / C. W.Lee, M. W.Jackwood // Virus Rec., 2001. – V. 71. – P. 33-39
7. Bing G. X. Different genotypes of nephropathogenic infectious bronchitis virus co-circulating in chicken population in China / G.X.Bing et al. // Virus Genes, 2007. – V. 35. – P. 333-337
8. Gelb J. Jr. Variant serotypes of infectious bronchitis virus isolated from commercial layers and broiler chickens / J.Jr.Gelb, J.B.Wolf, C.A.Moran // Avian Dis., 1991. – V. 35. – P. 82-87
9. Liu S. Molecular characterization and pathogenicity infectious bronchitis coronavirus: complicated evolution and epidemiology in China caused by cocirculation of multiple types of infectious bronchitis coronaviruses / S.Liu et al. // Intervirology, 2009. – V. 52. – P. 223-234
10. Liu S. A new genotype of nephropathogenic infectious bronchitis virus circulating in vaccinated and non-vaccinated flocks in China / S.Liu, X.Kong // Avian Pathol., 2004. – V.33. – P.321-327
11. Инфекционный бронхит кур – современная ситуация, лабораторная диагностика, специфическая профилактика. – Краснобаев Е. А., Собко И. А., Килимченко В. В., Кубаев А. П., – Сучасна ветеринарна медицина. – №1. – 2011. – С.23-28.
12. Wang J.D., Wang Y.L.,Zhang Z. et al / Isolation and identification of glandular stomach type IBV (QX IBV) in chickens – Chinese Journal Animal Quarantine., 1998, 15, 1-3
13. Liu S. W., Zhang Q.X., Chen J.D. et al /Genetic diversity of avian infectious bronchitis coronavirus strains isolated in China between 1995 and 2004 / Archive Virology 2006, 151, 1133-1148
14. Bochkov Y. A. Molecular epizootiology of avian infectious bronchitis in Russia / Y. A. Bochkov et al. // Avian Pathol., 2006. – V. 35. – P. 379-393
15. Beato M. S. Evidence of circulation of a Chinese strain of infectious bronchitis virus (QX IBV) in Italy / M.S. Beato et al. // Vet. Rec., 2005. – V. 156. – P. 720
16. Cough R. E., Cox W. J., Welchman D. de B. et al / Chinese QX strain of infectious bronchitis virus isolated in the UK / Veterinary Record 2005, 156:720
17. Worthington K.J. A reverse transcriptase-polymerase chain reaction survey of infectious bronchitis virus genotypes in Western Europe from 2002 to 2006 / K.J. Worthington, R.W.Currie, R.C. Jones // Avian Pathol., 2008. – V. 37. – P 247-257
18. Isabella Monne, Giovanni Cattoli, Richard Jones / QX genotypes of infectious bronchitis virus circulating in Europe // The Veterinary Record, 2008, p606-607
19. Краснобаев С. О. Виділення та ідентифікація польового ізоляту вірусу інфекційного бронхіту від бройлерів при захворюванні серед щепленого поголів'я / С. О.Краснобаев, О. М. Дерябін, Г. А.Попова та ін. / Ветеринарна біотехнологія, бюллетень №18, 2011, с.125-134

20. Picault J.P. The pathogenicity and prophylaxy of infectious bronchitis serotype CR88 in chickens. / J.P.Picault //World Poultry. – 2003. – V.19. – №4. – P.34-36

21. Avian infectious bronchitis. Manual Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals [электронный ресурс] : 6th ed. – 2008. – Vol. 2. Ch.2.3.2. – Paris: OIE, 2008 / Режим доступа: http://www.oie.int/eng/normes/MANUAL/A_00107.htm

22. The ciliostasis test – measuring protection against Infectious Bronchitis. [электронный ресурс]: Intervet // Режим доступа: <http://www.infectious-bronchitis.com/ciliostasis-test.asp>

23. Ovchinnikova E.V., Bochkov Y. A., Shcherbakova L. O. / Molecular characterization of infectious bronchitis virus isolated from Russia and neighbouring countries: identification of intertypic recombination in the S1 gene / Avian Pathology Volume 40, Issue 5, 2011 p.507-514

ВЫДЕЛЕНИЕ И ИДЕНТИФИКАЦИЯ ПОЛЕВЫХ ИЗОЛЯТОВ ВИРУСА ИНФЕКЦИОННОГО БРОНХИТА КУР QX-ПОДОБНОГО ТИПА. ИЗУЧЕНИЕ ИХ ПАТОГЕННОСТИ ДЛЯ ЦЫПЛЯТ/ *Е. А. Краснобаев, О. Н. Дерябин, Г. А. Попова, А. П. Кубаев, И. А. Собко, В. В.Килименко, В. П. Лукьянец*

Работа посвящена выделению полевых изолятов вируса инфекционного бронхита при вспышках ИБ-подобного заболевания среди вакцинированного поголовья птиц в Украине, их идентификации как вируса инфекционного бронхита QX-подобного типа при помощи ОТ-ПЦР, изучению их патогенности для цыплят разного возраста.

Ключевые слова: инфекционный бронхит (ИБ); вирус инфекционного бронхита (ИВБ); обратнo-транскриптазна полимеразная цепная реакция (ОТ-ПЦР); свободные от специфических патогенов куриные эмбрионы (ССП-КЭ).

ISOLATION AND IDENTIFICATION OF A FIELD INFECTIOUS BRONCHITIS VIRUS QX-LIKE TYPE AND STUDYING OF THEIR PATHOGENICITY FOR CHICKENS // Ye.A.Krasnobayev, O.N.Deriabin, G.A.Popova, A.P.Kubayev, I.A.Sobko, V.V.Kylymenko, V.P.Lukjanec

Article is dedicated to isolation of field strains virus infectious bronchitis at outbreaks of IB-like disease among the vaccinated poultry flock in Ukraine, their identification as QX-like type IBV by RT-PCR and studying their pathogenicity for chickens of different age.

Key words: infectious bronchitis (IB); infectious bronchitis virus (IBV); reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) specific pathogen free chicken embryos (SPF-CE).

Рецензент – кандидат ветеринарных наук **И. М. Полупан**