

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
УНИВЕРСИТЕТ ВЕТЕРИНАРНОЙ МЕДИЦИНЫ»

На правах рукописи

Веретенников Владислав Валерьевич

**РАЗРАБОТКА РЕКОМБИНАНТНОЙ ВАКЦИНЫ ПРОТИВ
ИНФЕКЦИОННОЙ БУРСАЛЬНОЙ БОЛЕЗНИ**

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 Э.Д.

Санкт-Петербург, 2022 г.

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ.....	13
1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	13
1.1. Характеристика возбудителя инфекционной бурсальной болезни.....	13
1.2. Эпизоотология болезни	17
1.3. Особенности патогенеза, клинические признаки и патологоанатомические изменения	22
1.4. Иммунитет.....	28
1.4.1. Активный иммунитет	29
1.4.2. Пассивный иммунитет.....	30
1.5. Методы диагностики	31
1.6. Методы специфической профилактики.....	33
1.6.1. Живые и инактивированные вакцины против ИББ.	33
1.6.2. Субъединичные вакцины.	35
1.6.3. Живые векторные вакцины	36
1.7. Производство рекомбинантного белка в дрожжах	37
1.7.1. Неметилотрофные дрожжи	37
1.7.2. Метилотрофные дрожжи.....	39
1.7.3. Трансформация дрожжей	40
2. СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	42
2.1. Материалы и методы исследования.....	42
2.1.1. Дизайн исследования.....	42
2.1.2. Вирус инфекционной бурсальной болезни	44
2.1.3. Штаммы бактерий и дрожжей	44
2.1.4. Плазмиды	44
2.1.5. Филогенетический анализ	47
2.1.6. Среды и условия культивирования.....	47
2.1.7. Выделение РНК.....	48
2.1.8. Амплификация и клонирование гена VP2 в бактериях <i>E.coli</i>	49
2.1.9. Приготовление бактериальных компетентных клеток	50
2.1.10. Трансформация бактерий лигазной смесью	51

2.1.11. Электрофорез фрагментов ДНК.....	51
2.1.12. Методы работы с рекомбинантной ДНК.....	52
2.1.13. Электропорация дрожжей	52
2.1.14. Белковый электрофорез.....	53
2.1.15. Вестерн блот гибридизация.....	54
2.1.16. Концентрация и очистка рекомбинантного белка	55
2.1.18. Адьюванты.....	55
2.1.19. Определение стерильности	56
2.1.20. Определение безвредности	56
2.1.21. Эксперимент на цыплятах кросса Ломан Уайт и Ломан Браун.	57
2.1.22. Серологические исследования	59
2.2. Результаты собственных исследований.....	61
2.2.1. Конструирование плазмид, содержащих ген VP2	61
2.2.2. Получение штамма дрожжей <i>P. pastoris</i> , синтезирующего белок VP2	69
2.2.3. Синтеза белка VP2 в дрожжах <i>P. pastoris</i>	71
2.2.4. Изучение антигенных свойств рекомбинантной вакцины.	73
2.2.5. Определение стерильности вакцины	76
2.2.6. Определение бурсального индекса и безвредности.....	77
3. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	79
4. ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	87
ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ.....	89
ПРЕСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ	90
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	92
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	94
ПРИЛОЖЕНИЕ.....	111

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность работы.

В связи с интенсивным и стремительным развитием современного птицеводства возрастает спрос потребителя на высококачественную продукцию, что в свою очередь достигается благодаря повышению интенсификации и концентрации производства. Все это приводит к значительной нагрузке на организм птицы, которая имеет определенный генетический потенциал. Стремление производителей к достижению большей прибыли и высокой эффективности повышает риски возникновения инфекционных болезней. Одной из таких является инфекционная бурсальная болезнь (ИББ) [40].

ИББ приводит к невысоким прямым экономическим потерям, связанным со специфической смертности в 30 %, однако косвенные потери намного выше [7]. В основном они связаны с иммуносупрессивным состоянием птиц после контакта с вирусом ИББ, который поражает бурсу Фабрициуса и приводит к разрушению лимфоцитов.

Иммуносупрессивное состояние птиц приводит к вторичным бактериальным инфекциям, повышенной смертности, задержке роста и выбраковке. Наиболее ярко это наблюдается, когда болеет молодняк, который даже после выздоровления продолжает отставать в росте и продуктивности, поскольку функции иммунной системы полностью не восстанавливаются. Это часто является основной причиной респираторных болезней у цыплят, а также низких титров антител после вакцинаций [18].

Вакцинация является наиболее важной мерой борьбы с ИББ. В промышленном птицеводстве применяются в основном живые и инактивированные вакцины, но интенсивное использование живых аттенуированных вакцин против ИББ может привести к увеличению вирулентности этого патогена из-за мутации. К тому же живые вакцины все равно вызывают иммуносупрессию у молодняка кур, а высокие денежные затраты на использование инактивированных вакцин не позволяет просто перейти на них

[15]. В связи с этим возрастает актуальность разработки рекомбинантных вакцин, которые экономически эффективны и не вызывают иммуносупрессию. Капсидный белок VP2 уже давно остается в центре внимания разработки рекомбинантных вакцин, поскольку отвечает за образование защитного иммунного ответа против ИББ. Вакцинированные куры, у которых происходит синтез вируснейтрализующих антител к капсидному белку VP2, устойчивы к инфекционной бурсальной болезни [15,101].

Внедрение рекомбинантной вакцины для профилактики ИББ позволяет полностью или частично заменить живые вакцины против данной болезни, предотвращает развитие иммунодепрессивных состояний, значительно снижает уровень проявления вторичных инфекций и, как следствие, резко снижает или исключает применение антибиотиков в схеме лечебно-профилактических мероприятий. Это способствует получению экологически чистой безопасной продукции, не содержащей антибиотиков. Поэтому исследования данной темы являются актуальными.

За рубежом и на территории Российской Федерации для специфической профилактики инфекционной бурсальной болезни применяется несколько рекомбинантных субъединичных вакцин: Quadractin VP2 и Gumbin VP2 (Abic Biological Laboratories Ltd, подразделение Phibro Animal Health), но эти вакцины разработаны и производятся в Израиле. На данный момент нет отечественных аналогов этих вакцин, поэтому разработка рекомбинантной вакцины является актуальной и обеспечивает пищевую и биологическую безопасность нашей страны [34].

Степень разработанности темы.

За последние три десятилетия было опубликовано множество исследований по синтезу рекомбинантного вирусного структурного белка VP2 (rVP2), основного защитного антигена вируса ИББ.

Изначально Fahey K.J. и Orpling V. [78,140] в 1989 году пытались синтезировать белок VP2 и создать на его основе рекомбинантную вакцину, но

столкнулись с некоторыми сложностями, например, с тем, что денатурированный белок VP2 не индуцировал выработку нейтрализующих антител у цыплят.

Также уже основываясь на этом опыте, были использованы различные системы экспрессии, такие как *Escherichia coli* [101,147], дрожжи [79,141], вирус оспы птиц [92], бакуловирус [159], и даже системы экспрессии растений [169].

Слитый белок, состоящий из VP2 и куриного интерлейкина-2 который, как считается, повышает иммуногенность, был разработан в 2005 году Y. Liu и испытан в качестве потенциальной вакцины [119,152]. Также в 2007 году была разработана вакцина на основе мультимимотопного белка r5EPIS [165].

В экспериментальных исследованиях по вакцинации с использованием rVP2 были получены положительные результаты (от частичных до 100%) по защите птиц от ИББ.

В Российской Федерации также многие авторы занимались изучением рекомбинантных белков вируса ИББ. Луговская Н.Н. и Щербакова Л.О. разрабатывали иммуноферментный анализ на ИББ с использованием рекомбинантного белка VP3 [31]. Овчинникова Е.В. занималась сравнением первичной структуры фрагмента гена VP2 вакцинных штаммов и полевых изолятов вируса инфекционной бурсальной болезни кур [32]. Также стоит отдельно отметить большой вклад Джавадова Эдуарда Джавадовича как в развитии прогрессивных методов вакцинопрофилактики при ИББ, так и в развитии современной вакцинологии [20,19,18,22,23,21,27].

Тем не менее, несмотря на множество публикаций, и разработок, данная тематика все еще остается малоизученной и требует дальнейшего теоретического и практического углубления.

Цель и задачи исследований.

Целью настоящей работы является разработка рекомбинантной вакцины против инфекционной бурсальной болезни.

Для достижения этой цели были поставлены следующие задачи:

1. Изучить нуклеотидную последовательность гена VP2 вируса инфекционной бурсальной болезни.
2. Разработать алгоритм синтеза рекомбинантного белка VP2 вируса инфекционной бурсальной болезни на дрожжевой системе экспрессии (*P. pastoris*).
3. Изучить безвредность, стерильность и антигенную активность экспериментальных серий рекомбинантной вакцины против ИББ.
4. Определить концентрацию рекомбинантного белка VP2 вируса инфекционной бурсальной болезни в вакцине для получения иммунитета к ИББ у иммунизированных кур.

Научная новизна

Впервые была разработана рекомбинантная вакцина нового поколения на основе белка VP2 вируса инфекционной бурсальной болезни эпизоотического штамма, выделенного на территории Российской Федерации.

В ходе работы с эпизоотическим штаммом «Синявинский» вируса ИББ, последовательность гена белка VP2 которого была использована для создания рекомбинантной вакцины, подобраны праймеры. При филогенетическом анализе данного штамма в сравнении с эталонными и высоковирулентными штаммами было установлено, что эпизоотический штамм вируса ИББ «Синявинский» более близкородственен к высоковирулентным штаммам, выделенным на территории Российской Федерации и к классическому штамму «52/70» вируса ИББ, чем к другим классическим штаммам Cu-1, Ga-1, D78, STC и 23/82.

Экспериментальным путем, в условиях вивария, доказана безвредность и антигенная активность экспериментальных серий рекомбинантной вакцины против ИББ. Кроме того, определена стерильность данной вакцины. Действие данной вакцины на организм птицы было исследовано с применением комплекса серологических, вирусологических, микробиологических и молекулярно-генетических методов.

Предложено внедрить рекомбинантную вакцину для профилактики ИББ, что позволило бы частично заменить живые и инактивированные вакцины против данной болезни и полностью импортные рекомбинантные вакцины.

Теоретическая и практическая значимость работы

Впервые на территории Российской Федерации синтезирован рекомбинантный белок VP2 вируса ИББ на дрожжах *Pichia pastoris*. Разработан алгоритм получения рекомбинантного белка, так как в отечественной ветеринарной науке практически отсутствует понимание работы экспрессионных систем на основе *P. pastoris* и производства рекомбинантных белков вируса ИББ. Кроме того, вызывает большой интерес и выбор нуклеотидной последовательности белка, на основе которого будет основана рекомбинантная вакцина, так филогенетический анализ штаммов из разных регионов показывает существенные различия при их сравнении. Поэтому доказано, что для производства и применения рекомбинантных вакцин против инфекционной бурсальной болезни, на основе белка VP2, лучше использовать штаммы, выделенные на территории Российской Федерации

Кроме теоретической значимости разработка рекомбинантной вакцины против ИББ несет в себе и большую практическую значимость. Так как существует множество проблем при выращивании промышленных птиц, с которыми сталкиваются производители при использовании живых и инактивированных вакцин. Доказано, что применение рекомбинантной вакцины является безвредным и не ведет к иммунодепрессивному состоянию птиц, однако при использовании живых вакцин на птицефабриках этого нельзя избежать.

Сегодня российское животноводство зависит от импортных ветпрепаратов и вакцин: 85% иммунобиологических лекарств, которые используются в российском животноводстве, – импортные. Поэтому разработка и производство отечественных вакцин на территории Российской Федерации обеспечивает пищевую и биологическую безопасность нашей страны.

Разработана безвредная и эффективная рекомбинантная вакцина против инфекционной бурсальной болезни. Научно обоснованы принципы изготовления и биологического контроля рекомбинантной вакцины против инфекционной бурсальной болезни. Экспериментально установлена иммунизирующая доза препарата, показана возможность оценки антигенной активности на естественно-восприимчивых животных.

Проведенные исследования были поддержаны грантом, предоставляемым ФГБОУ ВО СПбГУ на тему: «Создание нового поколения вакцинных препаратов для птиц на основе рекомбинантных антигенов и адъювантов – иммуностимуляторов».

Методология и методы исследований.

В работе использовали методологические принципы, учитывающие молекулярно-биологические особенности вируса ИББ и дрожжей *P. pastoris*, а также условия содержания птицы на птицефабриках, режим кормления и поения, факторы передачи возбудителя, схемы вакцинации на птицефабриках.

В работе использованы следующие методы исследований: клинический, патологоанатомический, вирусологический, серологический, бактериологический, молекулярно-генетический и биоинформационные методы исследования, включающие использование современного программного обеспечения (выравнивание нуклеотидных последовательностей было выполнено с помощью программы ClustalW, а филогенетические деревья были сгенерированы с использованием программы MEGA 11)

Объектом исследования служил вирус ИББ. Для выделения гена последовательности VP2 вируса инфекционной бурсальной болезни и для разработки рекомбинантной вакцины был использован эпизоотический штамм «Синявинский» (антигенно родственен эталонному штамму «52/70»).

Реализованный личный вклад.

Диссертация является результатом исследования автора в период с 2018 по 2021 гг. Результаты исследований получены автором лично или при его определяющем участии. Вклад соискателя заключается в участии в выборе направления научных исследований, разработке цели и задач исследования, проведении экспериментов, обработке и анализе полученных данных, формулировании выводов и практических предложений. В статьях, опубликованных совместно с соавторами, большая часть работы выполнена диссертантом. Соавторы не возражают против использования данных результатов.

Положения, выносимые на защиту.

1. Изученная нуклеотидная последовательность рекомбинантного оболочечного гликопротеина вируса ИББ (VP2) из штамма «Синявинский», филогенетически близка к высоковирулентным штаммам, выделенным на территории Российской Федерации и к классическому штамму «52/70».
2. Введение цыплятам кур несушек рекомбинантной вакцины против инфекционной бурсальной болезни вызывает формирование титра антител, способного защитить цыпленка при попадании в организм патогенного вируса.
3. Рекомбинантная вакцина против инфекционной бурсальной болезни стерильна, безвредна, антигенна активна и состоит из оболочечного гликопротеина VP2, дрожжевой среды, вируса инфекционной бурсальной болезни, и адьюванта.

Апробация и степень достоверности

Достоверность работы подтверждается использованием различных методов исследований на сертифицированном оборудовании, а также статистической обработкой полученных данных.

Материалы исследований научной работы были представлены:

- на 73-й международной научной конференции молодых ученых и студентов СПбГАВМ, Санкт-Петербург, 2019;

- на XX Международной конференции Российского отделения Всемирной научной ассоциации по птицеводству, НП "Научный центр по птицеводству", Сергиев Посад, 2020;

- на национальной научной конференции профессорско-преподавательского состава, научных сотрудников и аспирантов СПбГУВМ, Санкт-Петербург, 2021;

- на X юбилейной международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Знания молодых для развития ветеринарной медицины и АПК страны», Санкт-Петербург, 2021.

Публикации результатов исследования.

Основные положения диссертации изложены в 8 научных работах, из них 2 – в периодических изданиях, входящих в перечень российских научных рецензируемых журналов для опубликования основных результатов диссертаций, утвержденных ВАК Министерства образования и науки РФ.

Структура и объём диссертации.

Диссертационная работа изложена на 114 страницах компьютерного текста и включает следующие разделы: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты собственных исследований, обсуждение полученных результатов, заключение, практические предложения, перспективы дальнейшей разработки, список использованных сокращений, список использованной литературы, приложение.

Иллюстрационный материал диссертации включает 18 рисунков и 3 таблицы. Список использованной литературы включает 174 наименований, в том числе 130 иностранных источника.

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Характеристика возбудителя инфекционной бурсальной болезни

Вирус инфекционной бурсальной болезни входит в семейство *Birnaviridae* [55,72,132], которое названо так из-за двуsegmentированной, двухцепочечной РНК [122,72,153]. В данном семействе 4 рода: *Aqua birnavirus*, типовым видом которого является вирус инфекционного некроза поджелудочной железы (IPNV) рыб, моллюсков и ракообразных; *Blosnavirus*, типовой вид которого является пятнистый вирус змееголова (BSNV), *Avibirnavirus*, чей типовой вид – вирус инфекционной бурсальной болезни, поражающий птиц; а также *Entomobirnavirus*, вирус, поражающий насекомых [71].

Двухцепочечная РНК генома вируса ИББ состоит из двух сегментов, обозначаемых как А и В [51,102]. Нуклеотидная последовательность всего генома как серотипа 1, так и серотипа 2 вируса инфекционной бурсальной болезни была полностью определена [135]. Вирус ИББ является одним из редких полиплоидных РНК-вирусов: каждая вирусная частица может включать в себя до четырех сегментов двухцепочечной РНК [135]. В состав вириона входит пять вирусных белков, обозначенных как VP1, VP2, VP3, VP4 и VP5 [73,133,137] приблизительной молекулярной массой 97 кДа, 41 кДа, 32кДа, 28кДа и 21кДа, соответственно. Также отмечают и дополнительные белки, такие как VPX или pVP2 [108].

VP2, VP3 и VP1 являются структурными белками вируса инфекционной бурсальной болезни. В вирусах серотипа 1 они составляют 51%, 40% и 3% от белков вируса, соответственно [72]. Ранее считалось, что они составляют до 6% структурных белков вируса инфекционной бурсальной болезни [72], VP4 теперь признан неструктурным белком, который может связываться с вирусными частицами в градиентах хлорида цезия [88]. В дополнение к структурным вирусным белкам, зрелые вирусные частицы также содержат на своей поверхности четыре небольших пептида, которые образуются, когда VP2

постепенно созревает [67]. VP1 представляет собой вирусную РНК-зависимую РНК-полимеразу (RdRp) и демонстрирует оригинальную организацию по сравнению с другими вирусными RdRp [86,164]. Она присутствует в вирусных капсидах как в виде связанного с геномом, так и в виде свободного белка [131].

VP2 является капсидным белком. Он образует 260 тримеров, которые являются основными единицами оболочки вируса, образуя кристаллическую структуру [83,115]. VP3, другой основной структурный белок, взаимодействует со всеми другими компонентами вирусных частиц и играет важную роль как в вирионе, так и в морфогенезе, инкапсидации и репликации [60,82,121,155]. VP3 не открыт на поверхности вириона, но плотно связан с РНК в нитевидных структурах и поддерживает активность вирусной полимеразы [124]. Наконец, взаимодействия с участием С-концевых аминокислот VP3 - аминокислоты являются критическими для правильной сборки VP2 в капсиды с правильной симметрией [124].

VP4 является вирусной протеазой [95,136] и играет важную роль в созревании капсидного белка VP2 путем постепенного обрезания нескольких пептидов на карбокси-концевой части VP2 во время сборки вируса [116,52]. Однако полная обработка VP2 в зрелый и правильный собранный VP2 также включает аутопротеолитическую активность остатка в VP2 [96]. Кристаллическая структура протеазы бирнавируса была определена в вирусе змееголова [80]. VP5 выполняет регуляторную функцию в высвобождении и распространении вируса, а также антиапоптотическую функцию на ранних стадиях инфекции [118,120,134,166]. Два пептида, образующиеся в процессе созревания VP2, являются важнейшими детерминантами, которые контролируют геометрию процесса сборки вириона [59]. Один из этих пептидов, рер46, также оказывает дестабилизирующее действие на клеточные мембраны [59].

Малый сегмент генома вируса инфекционной бурсальной болезни (В, приблизительно 2,9 тыс. п.н.) кодирует VP1, тогда как большой сегмент (А, приблизительно 3,3 тыс. п.н) кодирует белок VP5, в другой и частично

перекрывающейся рамке считывания, полипротеин 110 кДа, который дает VP2, VP4 и VP3 при ко-трансляционном расщеплении VP4 [48,129]. В обоих сегментах генома кодирующие области фланкированы короткими 5' и 3' нетранслируемыми областями (от 79 до 111 нуклеотидов) [133]. Вторичная структура 3' нетранслируемой области представляется критически важной для эффективной репликации [50]. VP2 является протективным иммуногеном вируса инфекционной бурсальной болезни [78].

В VP2 были идентифицированы два антигенных домена [47]. Один домен является конформационно-независимым, расположен на карбокситерминальном конце VP2/VPX и вызывает появление нейтрализующих антител [47,79]. Некоторые из них являются группоспецифичными, другие - штаммоспецифичны [163].

Второй основной антигенный домен VP2 является конформационно-зависимым и кодируется средней трети гена VP2 [47]. Из-за более высокой частоты аминокислотных изменений в этой области, она известна под названием как "вариабельный домен VP2" [49]. Он группирует серотипические или штаммоспецифические эпитопы, которые вызывают нейтрализующие и пассивно защитные антитела [151]. Самые большие панели нейтрализующих моноклональных антител (МАТ) [171,77,162] выявляют до 6 нейтрализующих эпитопов, расположенных на VP2, которые располагаются, по меньшей мере в трех перекрывающихся антигенных участках. Дальнейший анализ штаммов вируса инфекционной бурсальной болезни с различной реактивностью МАТ выявил "горячие точки" для антигенно значимых аминокислотных изменений [92,112,149]. Они расположены в пределах участков гидрофильных аминокислот в последовательности VP2: 212-224 аминокислотный остаток (а.о.) и 314-324 аа известны как "основные гидрофильные пики VP2" или "гидрофильные пики А и В", соответственно, в то время как а.о. 248-252 и 279-290 обозначаются как "VP2 минорные гидрофильные пики 1 и 2", соответственно [162]. Структурные исследования показали, что эти "пики" соответствуют петлям, расположенным в

наиболее открытой части проекционного домена VP2, и аминокислотам, отображаемым на внешней поверхности вирусной частицы [65,117].

VP3 вызывает появление нейтрализующих и защищающих антител [79]. Выявлено до четырех антигенных доменов, расположенных на VP3 [105,172]. Все содержат эпитопы, общие для обоих серотипов (групповые специфические эпитопы), в то время как два из этих доменов также содержат серотип-специфические эпитопы. Хотя был достигнут определенный прогресс, но молекулярная основа патогенности вируса до сих пор не определена. Развитие систем обратной генетики [142] позволило манипулировать геномом вируса. Используя этот подход, было продемонстрировано, что сегмент А формирует генетическую основу бурсального тропизма в вирусе инфекционной бурсальной болезни серотипа 1 [174]. Замена гена VP2 между высоковирулентным вирусом ИББ и аттенуированными штаммами вируса ИББ и проведение *in vivo* полученных рекомбинантных вирусов показали, что VP2 не является единственной детерминантой вирулентности [53]. Однако введение в VP2 патогенного вируса аминокислотных изменений, необходимых для адаптации к культуре клеток, привело к ослаблению вирулентности [54,160].

Экспериментальные данные свидетельствуют о том, что оба сегмента генома могут быть необходимы для экспрессии высоковирулентных вирусов ИББ или патогенных фенотипов [94,97,114]. Было высказано предположение, что явления реассортации могут быть вовлечены в возникновение высоковирулентных вирусов ИББ. Реассортированные штаммы вируса ИББ с сегментом А и сегментом В, полученным от другого вируса серотипа 1 или серотипа 2 были также описаны. Они обладают пониженной патогенностью по сравнению с типичными высоковирулентными вирусами ИББ. Некоторые филогенетические исследования предположили, что внутрисегментные гомологичные рекомбинации между различными штаммами вируса ИББ также могут происходить [93].

1.2. Эпизоотология болезни

К вирусу восприимчивы цыплята различного возраста, но чаще болезнь наблюдается у 4-10-недельных птиц, как яичных, так и мясных кроссов [7].

Известны два серотипа вируса ИББ. Серотип 1 в основном выделяют от кур, а серотип 2 – от индюшек, уток и гусей [8]. Перекрестный иммунитет между двумя серотипами вируса ИББ минимальный, т.к. их антигенное родство не превышает 30%. Все выделенные и изученные на данный период изоляты серотипа 2 по своей природе являются апатогенными для кур.

Вирус серотипа 1 также был выделен от 2-8 недельных цыплят страусов, у которых наблюдалось истощение лимфоцитов в бурсе Фабрициуса, селезенке и тимусе [168]. Изоляты серотипа 1 были получены от здоровых [127] и павших [106] водоплавающих птиц. Последние вирусы были генетически связаны с высоковирулентным вирусом ИББ и патогенны для кур [106]. Другие высоковирулентные вирусы ИББ были выделены от павшей сороки в Корее. Вирусы, генетически родственные с высоковирулентными вирусами ИББ были обнаружены методом RT-PCR от внешне здоровых голубей и гвинейских птиц в Восточной Африке [107].

Вирус ИББ серотипа 2 был выделен от пингвинов в неволе, которые пали без специфических клинических признаков [87]. Исследования по заражению фазанов, куропаток, перепелов и гвинейских птиц вирусом ИББ не выявили никаких клинических признаков или поражений у этих видов, однако перепела реплицировали вирус в своей бурсе и выделяли его в течение пяти дней в фекалиях и вырабатывали нейтрализующие антитела [161]. Это контрастирует с предыдущим исследованием, в котором не удалось заразить перепелов котурниксов вирусом ИББ куриного происхождения, а у привитых против ИББ гвинейских птиц не развивались поражения.

Несколько видов, свободно живущих и содержащихся в неволе хищных птиц, были исследованы на наличие антител к вирусу ИББ, и положительные

результаты были получены от птиц-акципитрид [158]. Антитела также были обнаружены у грачей, диких фазанов, и нескольких редких видов птиц [31]; у антарктических пингвинов; у уток, чаек и стрижей; ворон, чаек и соколов [139]

В течение многих лет промышленная птица считалась единственной, в которой реплицировался вирус. Все породы были чувствительны к этой болезни, и многие исследователи отмечали, что у белых леггорнов наблюдались самые тяжелые поражения и клинические признаки, и самый высокий уровень смертности. Установлены генетические различия среди яйценосных кроссов в восприимчивости к заражению вирусом ИББ [101].

Утки и гуси, как и индейки, устойчивы к заражению вирусом ИББ серотипа 1, но у них происходит выработка вируснейтрализующих и преципитирующих антител и также в крови находят и самого возбудителя. При заражении индеек штаммом ВД/6 I серотипа снижается интенсивность образования антител на различные антигены, в том числе на эритроциты барана, уменьшается уровень IgG в сыворотке крови, задерживается реакция бласттрансформации под влиянием фитогемагглютинаина, а также встречается повреждение тканей бурсы Фабрициуса. Белые мыши в 1-11-дневном возрасте восприимчивы к интраперитонеальному, а 12-дневные к интрацеребральному заражению вирусом ИББ, с последующими признаками поражения нервной системы и гибелью на 5-13 сутки после инфицирования. Взрослые мыши после внутривенного, а крысы после контактного заражения не проявляют каких-либо признаков болезни, однако в сыворотке их крови отмечаются вируснейтрализующие и вируспреципитирующие антитела. У человека отмечена индивидуальная восприимчивость к вирусу ИББ, обычно отмечающаяся при профессиональном контакте с высоковирулентными полевыми или с «горячими» вакцинными штаммами вируса. Патология проявляется в виде аллергической реакции. У лиц, контактирующих с вирусом ИББ, в сыворотке крови выявляются преципитирующие антитела [6].

Серотип 1 вируса инфекционной бурсальной болезни распространен во всем мире, во всех основных районах птицеводства. Частота инфицирования в этих областях высока; по сути, все стада подвержены заражению вирусом на раннем этапе жизни в результате либо естественного заражения, либо вакцинации. Из-за программ вакцинации, проводимых большинством производителей, все цыплята в конечном итоге становятся серопозитивными к вирусу болезни Гамборо. Случаи вспышек этой болезни на территории Российской Федерации достаточно редки. В Европе, Африке, Азии и на юге Америки преобладают высоковирулентные штаммы ИББ [7]. В США было показано, что антитела к ИББ серотипа 2 были широко распространены у кур, хотя вирус ИББ серотипа 2 авирулентен для них, и в стадах индейки [109], что указывает на общую распространенность инфекции.

Несмотря на это, вирус ИББ 2 серотипа, выделенный от индеек и считающийся апатогенным для кур [7] при заражении 1-дневных СПФ цыплят может вызвать субклиническое течение болезни с гистологическими изменениями средней интенсивности в бурсе Фабрициуса, селезенке. Характер изменений в лимфоидных органах бывает такой же, как при заражении вирусом ИББ 1 серотипа [6]. У СПФ цыплят, зараженных вирусом 2 серотипа в 4-недельном возрасте, изменения в лимфоидных органах также очень незначительны, в виде умеренного обеднения лимфоцитами фолликулов бursы Фабрициуса и уменьшения плазматических клеток в гардеровой железе. В то же время заражение индеек вирусом ИББ 1 серотипа, выделенным от цыплят, не сопровождается клиническим проявлением болезни. Однако у 3-6-недельных индюшат через 5 суток после заражения методом флуоресцирующих антител в бурсе Фабрициуса выявляется антиген вируса ИББ, а также незначительная дегенерация лимфоцитов. В последующем у птиц наблюдается интенсивная сероконверсия. [7]

Также были описаны и вирулентные вирусы серотипа 1 [109]. Вакцинные штаммы, доступные в то время, не вызывали полной защиты от вариантов,

которые антигенно отличаются от полевых изолятов серотипа 1 (в настоящее время, обозначаемых как классические вирусы). Было выделено шесть подтипов по перекрестной нейтрализации среди 13 вакцинных и полевых штаммов серотипа 1. Один из подтипов включал в себя все варианты изолятов. С помощью материнских антител было показано, что основной антигенный сдвиг в вирусах серотипа 1 мог произойти в полевых условиях. Исследования по секвенированию выявили несколько аминокислотных изменений в "гидрофильных пиках VP2", которые коррелировали с антигенными изменениями, наблюдаемыми в вариантах вирусов [115].

Австралийские и европейские штаммы также были идентифицированы, но они отличаются генетически и антигенно от североамериканских вариантных вирусов. Влияние антигенной вариаций на перекрестную защиту было менее документировано для этих австралийских и европейских вирусов. Штаммы высоковирулентных вирусов ИББ, которые были впервые описаны в Европе, были антигенно схожи с классическими вирусами серотипа 1 [45].

Источником возбудителя инфекции служит больная и переболевшая птица. Естественным хозяином вируса ИББ являются только куры, другие виды птиц могут заражаться, но заболевание у них протекает со слабовыраженными клиническими признаками или бессимптомно. Возбудитель передается с инфицированными кормами, водой, через предметы ухода и одежду обслуживающего персонала, оборудование и т.д. [8].

По мнению Бакулина В.А., который также отмечает, что источником инфекции может быть зараженная птица, а оборудование, инвентарь, корма, вода, спецодежда обслуживающего персонала является фактором передачи возбудителя.

Ранее предполагался трансвариальный путь передачи вируса [7]. Однако экспериментальные данные, подтверждающие подобный способ распространения инфекции, отсутствуют. Возможен перенос вируса ИББ мушкетерами и дождевыми червями, комарами, клещами и возбудителями протозойных заболеваний. Не

исключено, что при заражении птиц первоначально репликация вируса происходит в цекальных миндалинах и лимфоидной ткани желудочно-кишечного тракта, а затем он распространяется в другие органы, содержащие лимфоидную ткань, в том числе в бурсе Фабрициуса. Но вероятней, что бурса Фабрициуса является и первичным и основным органом для вируса ИББ. В организме цыплят после заражения вирус локализуется в бурсе в течение 12 дней, в селезенке — 10 дней, в почках и тимусе — 8 дней, в печени — 7 дней, в легких 6 дней и в крови — 4 дня. При этом максимальный срок выделения вируса 14 дней [7].

Эпизоотологический анализ острых вспышек ИББ показал, что первоначально инфекцию регистрировали в промышленных хозяйствах, причем начало болезни не было связано с завозом племенной продукции. Анализируя случаи проявления болезни в 30 птицеводческих хозяйствах, авторы [2] пришли к выводу, что роль племенных птицеводств в распространении ИББ несколько преувеличена. Кроме того, до настоящего времени научных фактов вертикальной передачи возбудителя инфекции не имеется. Биология возбудителя такова, что он не может передаваться через яйцо, так как репликация вируса идет строго в клетках иммунной системы, а сроки его нахождения в организме больной птицы ограничены 10-15 сутками. Учитывая, что болеют в основном 3-6 недельные цыплята, то к началу яйцекладки организм переболевшей особи полностью освобождается от вируса ИББ [1].

Вирус очень стабилен и устойчив к обработке эфиром и хлороформом, инактивируется при pH 12, но стабилен при pH 2. На вирус не влияло воздействие в течение 1 часа при температуре 30°C 0,5% фенола и 0,125% тимеросала. Было отмечено заметное снижение патогенности вируса при воздействии 0,5% формалина в течение 6 часов. Вирус также был обработан с различными концентрациями трех дезинфицирующих средств (комплекс йода, фенольное производное и четвертичное аммониевое соединение) в течение 2 минут при температуре 23°C. Только комплекс йода оказал какое-либо пагубное действие на вирус ИББ. Хлорамин 0,5% убил вирус через 10 минут [84]. Высокие

концентрации соединения, выделяющего метилизотиоцианат в качестве фумиганта, были способны инактивировать вирус инфекционной бурсальной болезни в зараженном помете после одного часа контакта [84]. Инвертное мыло с 0,05% гидроксидом натрия либо инактивировали, либо сильно ингибировали вирус. В бурсальных гомогенатах, нагретых при 70°, 75° и 80 °С происходило быстрое первоначальное падение титра вируса с последующим постепенным снижением [104].

Вирус ИББ был полностью инактивирован в инфицированных тканях после 14 дней компостирования, причем 8 дней при температуре выше 55°C [89]. Гамма-облучение при 3,0 килоГрей, максимальный уровень, одобренный FDA, не привело к значительному снижению титра вакцины или патогенных штаммов вируса ИББ [104]. Устойчивая природа этого вируса является одной из причин его выживания в птичниках даже при соблюдении процедур тщательной очистки и дезинфекции.

1.3. Особенности патогенеза, клинические признаки и патологоанатомические изменения

Птицы, инфицированные вирусом инфекционной бурсальной болезни, как правило, обезвожены, с потемнением грудных мышц. Часто кровоизлияния присутствуют в бедре и грудных мышцах. Увеличивается количество слизи в кишечнике, а почечные изменения могут быть заметны у птиц, которые погибают или находятся на поздних стадиях болезни [61]. Такие поражения, скорее всего, являются следствием сильного обезвоживания. У птиц, убитых и обследованных во время болезни почки выглядят нормальными.

На 3-й день после заражения (ПЗ) бурса Фабрициуса начинает увеличиваться в размерах и весе из-за отека и гиперемии. К четвертому дню ПЗ она обычно увеличивается вдвое, а затем размер начинает уменьшаться.

К 5-му дню ПЗ бурса возвращается к нормальному весу, но продолжает атрофироваться, и с 8-го дня ПЗ ее вес составляет примерно одну треть от первоначального, или даже меньше. На 2-3-й день после переболевания бурса

Фабрициуса становится студенистой, образуется желтоватый транссудат, покрывающий серозную поверхность. Продольные полосы на поверхности становятся заметными, а нормальный белый цвет превращается в кремовый. Транссудат исчезает, когда бурса возвращается к своим нормальным размерам.

Иммуносупрессия при ИББ влияет на последующие вакцинации и снижает устойчивость к другим заболеваниям.

Подавление реакции антител против вируса болезни Ньюкасла было наибольшим у цыплят, зараженных в суточном возрасте вирусом ИББ. Умеренное подавление наблюдалось, когда цыплята были инфицированы в 7-дневном возрасте, и незначительный эффект при инфицировании в 14 или 21 день. Не только подавлялся ответ на вакцины, но и цыплята, инфицированные вирусом ИББ в раннем возрасте, были более восприимчивы к аденовирусному гепатиту с тельцами включениями, кокцидиозу, болезни Марека, геморрагическо-апластической анемии и гангренозному дерматиту, инфекционному ларинготрахеиту, инфекционному бронхиту, возбудителю куриной анемии, сальмонеллезу и колибактериозу [62,103]. Парадокс, связанный с ИББ-инфекциями цыплят, заключается в том, что несмотря на иммуносупрессию против многих антигенов, ответ против самого ИББ является нормальным, даже у восприимчивых цыплят в возрасте 1 дня. Влияние ИББ на клеточно-опосредованный иммунитет (КОИ) является преходящим и менее очевидным, чем на гуморальные реакции. Подавление реактивности КОИ, с использованием теста трансформации лимфобластов, было обнаружено с максимальным угнетением клеточного иммунитета на 6 неделе.

Лимфоидный орган, поражаемый инфекцией, а именно Гардерова железа, связана с местной иммунной системой. Инфицирование ИББ цыплят в возрасте от 1 до 5 дней привело к резкому снижению содержания плазматических клеток в Гардеровой железе, которое сохранялось в течение семи недель [74]. Цыплята, инфицированные ИББ в суточном возрасте, были полностью с дефицитом сывороточного иммуноглобулина G и вырабатывали только мономерный

иммуноглобулин М (IgM) [99,100]. Количество В-клеток в периферической крови уменьшилось после заражения ИББ, но Т-клетки заметно не пострадали [138]. Вирус, по-видимому, реплицируется преимущественно в В-лимфоцитах цыплят. Вирус ИББ имеет пристрастие к активно пролиферирующим клеткам, и было высказано предположение, что вирус поражает "незрелые" клетки [125].

Помимо лизиса лимфоцитов, апоптоз является еще одним механизмом иммуносупрессии. Апоптоз также является механизмом развития поражения и может происходить в различных тканях и органах. Существуют доказательства роли Т-клеток в иммунопатогенезе в результате разрушения тканей усиление, опосредованное цитокинами

В инфицированной бурсе часто наблюдаются некротические очаги, а иногда петехиальные или экхимозные кровоизлияния на поверхности слизистой оболочки. Иногда наблюдаются обширные кровоизлияния по всей бурсе. В этих случаях у птиц могут отмечать кровь в помете. Селезенка может быть слегка увеличена и часто имеет небольшие серые очаги, равномерно рассеянные по поверхности [156]. Иногда наблюдаются кровоизлияния в слизистой оболочке на стыке провентрикулуса и желудочка (желудок) и у птиц наблюдается содержимое кишечника, окрашенное в черный цвет переваренной кровью. По сравнению с умеренновирulentными штаммами вируса, высоковирulentные штаммы вызывали большее снижение тимического индекса массы тела и более серьезные поражения в цекальных миндалинах, тимусе, селезенке и костном мозге, но бурсальные поражения были сходными. Также было показано, что патогенность коррелировала с продукцией поражений в небурсальных лимфоидных органах, предполагая, что патогенность может быть связана с распределением антигена в небурсальных лимфоидных органах [145].

Микроскопические поражения при ИББ возникают преимущественно в лимфоидных тканях (т.е. бурсе Фабрициуса, селезенке, тимусе, гардериевой железе и миндалине кишки). Изменения были наиболее серьезными в бурсе Фабрициуса. Уже через один день после заражения птиц вирусом ИББ

наблюдалась дегенерация и некроз лимфоцитов в медуллярной области фолликулов бурсы. Лимфоциты вскоре были заменены на гетерофилы и гиперпластические ретикулоэндотелиальные клетки.

Все лимфоидные фолликулы были поражены к трем или четырем дням ПЗ. Увеличение веса бурсы, наблюдаемое в это время, было вызвано сильным отеком, гиперемией и выраженным скоплением гетерофилов. По мере того, как воспалительная реакция уменьшалась, кистозные полости развивались в медуллярных областях фолликулов; происходил некроз и фагоцитоз гетерофилов и плазматических клеток; и наблюдалась фиброплазия в межфолликулярной соединительной ткани.

Пролиферация бурсального эпителиального слоя привела к образованию железистой структуры из столбчатых эпителиальных клеток, содержащих глобулы муцина. Во время гнойной стадии появились рассеянные очаги лимфоцитов, но они не сформировали здоровые фолликулы в течение периода наблюдения (18 дней ПЗ) [61].

Последовательное исследование восстановления бурсы Фабрициуса после неонатального заражения классическим штаммом ИББ показало, что первоначальное истощение В-лимфоцитов было максимальным в течение первой недели [167].

С 1 по 8 неделю ПЗ в двух различных типах бурсальных фолликулов происходили разные процессы: большие функциональные фолликулы, скорее всего, восстанавливались из эндогенных бурсальных стволовых клеток, переживших заражение вирусом ИББ, и мелкие, плохо развитые фолликулы, лишенные заметной коры и медуллы не восстанавливались. Структура этих маленьких фолликулов позволила предположить, что они не способны производить функциональные периферические В-клетки, и эта гипотеза подтверждается отсутствием активного ответа на антигена у птиц, не имеющих крупных восстановленных фолликулов.

В селезенке наблюдалась гиперплазия ретикулоэндотелиальных клеток вокруг артерий аденоидной оболочки на ранних стадиях инфекции. К третьему дню наблюдался лимфоидный некроз в герминативных фолликулах и периартериолярной лимфоидной оболочке. Селезенка восстановилась после инфекции довольно быстро, без устойчивых повреждений герминативных фолликулов. В тимусе наблюдалась некоторая клеточная реакция в лимфоидных тканях на ранних стадиях инфекции, но, как и в селезенке, повреждения были менее обширными, чем в бурсе, и восстановление происходило быстрее.

По данным Бакулина В.А. на 7 сутки после заражения фолликулы фабрициевой сумки уменьшены в размере в 2—3 раза, часто имеют структуру в виде «пчелиных сот». Корковый слой фолликулов выражен крайне слабо, а в некоторых случаях дифференцировать его как таковой невозможно. В мозговом слое фолликулов отмечается активизация ретикулярных клеток, имеющих набухшую, слабоэозинофильную, иногда как бы сетчатую цитоплазму. Соседние ретикулярные клетки по 2, 3 или 4 соединяются своими отростками, придавая мозговому слою вид «пчелиных сот». В пространствах, ограниченных отростками ретикулярных клеток, в микрокистах выявляется слабоэозинофильный материал, иногда глыбки хроматина или клетки лимфоидного ряда на различной стадии гибели. Некроз отдельных ретикулярных клеток приводит к слиянию соседних микрокист в более крупные полости. Происходит активизация, пролиферация и дифференцировка кортикомедуллярного эпителия в призматический, которая завершается формированием на месте атрофированных фолликулов железистых структур. Иногда образование на месте мозгового слоя фолликула крупной кистозной полости не сочетается с дифференциацией кортикомедуллярного эпителия в железистый-призматический и он остается, как в обычных фолликулах, в низкодифференцированном состоянии. При этом на месте фолликула формируется киста, равная или в 2—3 раза превышающая его по размерам, содержащая в отдельных случаях слабоэозинофильное, гомогенное или сетчатое

вещество. Выявляются также «псевдофолликулы», которые состоят в основном из ретикулярных клеток, лимфоциты в них отсутствуют, а дифференциация на корковый и мозговой слой затруднена. Часто в фолликулах, расположенных близко к поверхности складки слизистой оболочки, базальная мембрана которых отчетливо переходит в базальную мембрану эпителия слизистой оболочки, распад клеток мозгового слоя распространяется на базальную мембрану, что приводит к ее разрушению и десквамации эпителия слизистой. Полость кисты, сформировавшейся на месте фолликула, открывается в просвет органа, куда в дальнейшем происходит отторжение некротических масс, а на месте фолликула развивается криптообразно впячивание слизистой оболочки, выстланное призматическим эпителием [6].

На 12 сутки после заражения складки слизистой оболочки бурсы Фабрициуса истончены, имеют много бухтообразных впячиваний, крипт, которые придают им ветвистый вид. В складках преобладает строма, представленная бурно развивающейся соединительной тканью. Соединительнотканые перегородки утолщены в 10-30 раз по сравнению с нормой. Чаше встречаются железы, развившиеся на месте фолликулов, несколько реже кисты. Отмечаются также фолликулы, а точнее «псевдофолликулы», поскольку формируют их в основном ретикулярные клетки, среди которых единично обнаруживаются лимфоциты. Размеры таких фолликулов в 2-3 раза меньше, чем в норме [7].

Тяжесть болезни и клинические признаки зависят от возраста и чувствительности зараженных птиц, вирулентности штамма, а также от уровня пассивного иммунитета, передаваемого от родителей.

Инкубационный период ИББ составляет от 2 до 4 дней [17]. Начало заражения восприимчивого стада бройлеров или несушек характеризуется острой депрессией. Птицы почти не двигаются, перья в области клоаки окрашены уратами. Потребление корма снижено, но потребление воды может быть увеличено. У птицы наблюдается тремор мышц и боковое лежачее положение. Короткая продолжительность клинических признаков имеет диагностическое

значение для ИББ [30]. У пораженных птиц наблюдается депрессия в течение 5-7 дней, в течение которых смертность быстро растет, а затем резко снижается по мере клинических проявлений. У выживших цыплят клинические признаки проходят через 5–7 дней. В случае высоковирулентного штамма, инкубационный период сокращается (60 часов вместо 72), что согласуется с более быстрой репликацией вируса у пораженных животных. Болезнь протекает в клинической и субклинической формах.

Клиническая форма проявляется среди восприимчивых птиц внезапно и протекает остро, в виде энзоотии. Заболевают цыплята 2-10-недельного возраста. Максимальная восприимчивость наблюдается в возрасте 3-6 недель, в период полного развития бursы Фабрициуса. Заболеваемость и смертность быстро нарастают, достигая максимума на 3-4-е сут. Продолжительность болезни не превышает 7-10 дней, в случае осложнения или ассоциации ИББ с другими инфекциями продолжительность болезни увеличивается до 15-20 суток [2,7,30].

Субклиническая форма характеризуется отсутствием выраженных признаков ИББ и незначительным падежом птицы (0,5-5%). Наблюдается у цыплят до 3-недельного возраста.

1.4.Иммунитет

Вирусы обоих серотипов вируса ИББ имеют общие групповые антигены, которые могут быть обнаружены с помощью флуоресцентного теста на антитела и ИФА. Следовательно, невозможно различить серотипы или их антитела с помощью этих тестов [24].

Общие (групповые) антигены для обоих серотипов находятся на VP2 (40 кДа) и VP3 (32 кДа). VP2 также имеет серотип-специфические групповые антигены, которые индуцируют вируснейтрализующие антитела [48,50]. Антитела против VP3 не оказывают никакого защитного эффекта. Исследования *in vivo* [98] подтвердили это наблюдение, поскольку цыплята, имеющие антитела к вирусам серотипа 2, не были защищены от вирусов серотипа 1.

В настоящее время считается, что вирусный белок VP2 имеет основные антигены, которые вызывают выработку нейтрализующих антител [48]. Традиционно вирусы серотипа 1 использовались для изучения иммунного ответа на вирус ИББ. Все известные изоляты серотипа 2 были признаны непатогенными для кур [98] или с низкой патогенностью [98]. Обнаружение вариантных штаммов серотипа 1 повысило интерес к углублению знаний об иммунном ответе на вирус ИББ. Было интересно, что варианты были первоначально выделены от цыплят, которые имели антитела к серотипу 1. Инактивированные вакцины и живая вакцина, изготовленная из вариантных штаммов, защищали цыплят от болезни, вызванной как вариантными, так и классическими штаммами, в то время как инактивированные вакцины, изготовленные из классических штаммов, не защищали или только частично защищали от заражения вариантными штаммами [98].

Пять различных подтипов серотипа 1 вируса ИББ были испытаны в качестве инактивированных вакцин против вариантного штамма другого подтипа [98]. Но особых результатов это не дало. На основании этих результатов было выдвинуто предположение, что все подтипы серотипа 1 имеют общий минорный антиген (антигены), который вызывает образование защитных антител. Гуморальный иммунитет имеет большое значение в предотвращении болезни, о чем свидетельствует защита, обеспечиваемая пассивной передачей антител у цыплят. В настоящее время накапливаются доказательства аддитивного эффекта клеточно-опосредованного иммунитета в защите от заболевания [143,150].

1.4.1. Активный иммунитет

Полевой контакт с вирусом или вакцинация с помощью живой или убитой вакциной, стимулирует активный иммунитет. Реакция антител может быть измерена несколькими методами. Уровень антител обычно высокий после полевого воздействия или вакцинации, а титры РН превышают 1 :1000. являются обычным явлением. Взрослые птицы устойчивы к пероральному воздействию вируса, но вырабатывают антитела после внутримышечной или подкожной

прививки ИББ. Тем не менее, частичная защита от ИББ была достигнута у цыплят при отсутствии обнаруживаемых нейтрализующих антител, в результате экспериментальной иммунизации рекомбинантным вирусом натуральной оспы, экспрессирующим белок VP2 [49], что является указанием на то, что гуморальный иммунитет играет большую роль в защите от ИББ.

1.4.2. Пассивный иммунитет

Антитела, передаваемые от курицы через желток яйца, могут защитить цыплят от ранних инфекций вируса ИББ, в результате чего обеспечивается защита от иммуносупрессивного эффекта вируса. Период полураспада материнских антител к ИББ составляет от трех до пяти дней. Поэтому, если титр нейтрализующих антител у потомства известен, то известно и время, когда цыплята станут восприимчивыми. После того, как титр антител упал ниже 1:100, цыплята были на 100% восприимчивы к инфекции, а титры от 1:100 до 1:600 обеспечивали приблизительно 40% защиту от заражения [72]. Титры должны упасть ниже 1:64, прежде чем цыплят можно будет эффективно вакцинировать аттенуированным штаммом ИББ. Использование инактивированных вакцин в масляных эмульсиях (включая варианты штаммы) для стимулирования высокого уровня материнского иммунитета широко практикуется на птицефабриках.

Масляные эмульсионные вакцины против ИББ могут стимулировать адекватный материнский иммунитет для защиты цыплят в течение 4-5 недель, а потомство от заводчиков, вакцинированных живыми вакцинами, защищено только в течение 1-3 недель. Как и в случае со многими болезнями, пассивно приобретенный иммунитет к ИББ может препятствовать стимуляции активного иммунного ответа.

1.5. Методы диагностики

Диагностика ИББ основана на анализе эпизоотологических данных, клинических признаков и выявлении антител в сыворотке крови в ИФА, РН, РДП, встречного иммуноэлектрофореза, на результатах гистологических исследований бурс Фабрициуса, выделения вируса в культуре клеток, на развивающихся эмбрионах кур или восприимчивых цыплятах (что одновременно является биопробой), идентификации выделенного вируса в РДП, РН, МФА, ИФА, ПЦР и электронномикроскопическим методом негативного контрастирования [3,16, 26, 24,27].

ИФА в настоящее время является наиболее часто используемым серологическим тестом для оценки антител к вирусу ИББ. Непрямой ИФА для измерения антител используется чаще, чем реакция нейтрализации (РН), поскольку это более быстрый тест, результаты которого легко выводятся в компьютерные программы [25]. С помощью этих программ, можно создать профиль антител в племенном стаде, который покажет уровень иммунитета стада и предоставит информацию для разработки надлежащих программ иммунизации как для племенных стад, так и для их потомства.

Для того, чтоб провести такой анализ антител в стаде для оценки эффективности программ вакцинации, необходимо исследовать не менее 30 образцов сыворотки крови; многие производители предоставляют до 50-100 образцов. Профили антител строятся с использованием сыворотки, собранной либо от производителей, либо от суточного потомства. Следует признать, что непрямой ИФА не различает антитела к серотипам 1 и 2 и что коммерческие наборы могут выявлять антитела к обоим серотипам [3]. Следует также иметь в виду что наборы ИФА могут различаться по чувствительности и специфичности [70], и что, будучи чувствительным методом, ИФА может иметь как внутрилабораторные, так и межлабораторные различия.

Усовершенствованные реагенты для ИФА могут оказаться полезными для мониторинга серологического ответа на векторные или субъединичные вакцины,

например, на основе белка VP2 вируса ИББ, поскольку реакция антител у вакцинированных птиц будет более специфичная для этого белка [113], чем при использовании аттенуированных вакцин. Кроме того, использование субъединичных антигенов ИФА, специфичных для некоторых белков вируса ИББ, которые не присутствуют в векторных или рекомбинантных вакцинах (например, использование антигена VP3 ELISA), позволило бы реализовать стратегию DIVA [130].

До использования ИФА наиболее распространенной процедурой для выявления антител была реакция нейтрализации. Тест РН является единственным серологическим тестом, который позволяет дифференцировать различные серотипы вируса ИББ, и он до сих пор является методом выбора для выявления антигенных вариаций между изолятами этого вируса. Индикаторный вирус, используемый для РН, может существенно повлиять на результаты теста из-за наличия нескольких антигенных подтипов в рамках одного серотипа. Значительные расхождения в определении титров нейтрализации вируса в разных лабораториях также не редкость [128]. Большинство сывороток цыплят в полевых условиях имеют высокий уровень нейтрализующих антител к широкому спектру антигенно разнообразных вирусов.

Другим методом, используемым для выявления антител к вирусу ИББ, является реакция диффузионной преципитации (РДП) [66]. Этот тест не выявляет серотипических различий; он измеряет в основном антитела к группоспецифическим растворимым антигенам [70].

В настоящее время полимеразная цепная реакция (PCR) является молекулярным инструментом, часто применяемым в диагностике вируса ИББ. PCR в сочетании с рестрикционным ферментным анализом позволяет быстро идентифицировать высоковирулентные штаммы вируса ИББ [174].

Секвенирование продуктов PCR широко используется в науке для дальнейшей характеристики штаммов вируса ИББ [97]. Большинство протоколов PCR основаны на последовательностях VP2. Только недавно появились

протоколы, основанные на гене VP1, а также протоколы RT-PCR были опубликованы [130].

1.6. Методы специфической профилактики

1.6.1. Живые и инактивированные вакцины против ИББ.

Наиболее коммерчески доступными вакцинами против ИББ считаются живые вакцины, основанные на классических штаммах. В свою очередь они классифицируются на, так называемые, «мягкие» вакцины, которые демонстрируют низкую эффективность и способны работать только при невысоком уровне материнских антител, на «промежуточные» и вакцины типа «промежуточный плюс» или «горячие», которые обладают гораздо лучшей эффективностью и могут преодолевать более высокие уровни материнских антител, но они могут вызывать поражения бursы Фабрициуса и, таким образом, вызывают иммуносупрессию в организме птиц [12,29]. Вакцины из «мягких» штаммов не могут полностью защитить цыплят против инфекции полевыми штаммами вирусов ИББ и их антигенными вариантами, а безопасность и эффективность вакцины из «горячих» штаммов вируса ИББ по-прежнему вызывают серьезную озабоченность [28,39].

В Российской Федерации применяют вакцины только из «промежуточных» и «горячих» штаммов [11,12]. Так как производители не указывают в инструкции к каким типам штамма относятся их вакцины, то по мнению авторов к «промежуточным» штаммам можно отнести: АВИВАК-ИББ, штамм «Винтерфилд 2512», производитель НПП АВИВАК; Вакцина против инфекционной бурсальной болезни из штамма ВНИВИП, производитель ФГБНУ ВНИВИП; Вакцина против инфекционной бурсальной болезни из штамма "Винтерфилд 2512", производитель ОАО "Покровский завод биопрепаратов"; Вирусвакцина против инфекционной бурсальной болезни из штамма "Винтерфилд 2512", производитель ФГБУ "ВНИИЗЖ"; Галливак IBD, штамм "S706", производитель Merial; Галливак IBD H 2512, штамм "Винтерфилд 2512", производитель Merial; Вакцина Вольвак® IBD MLV, штамм "Lukert", "D78" и др, производитель «Boehringer Ingelheim Vetmedica

GmbH»; СЕВАК® IBD L, штамм Winterfield 2512, G-61, производитель "Ceva-Phylaxia Veterinary Biologicals Company", Нобилис Гамборо 228Е, штамм «228Е», производитель MSD Animal Health.

Также применяются и вакцины из «горячих» штаммов: «АВИВАК ИББ», штамм «БГ», производитель НПП АВИВАК; Вирусвакцина против инфекционной бурсальной болезни из штамма "БГ", производитель ФГБУ "ВНИИЗЖ".

Также стоит отдельно выделить иммунокомплексные вакцины, поскольку там присутствует живой вирус, окруженный специфическими иммуноглобулинами. Эту вакцину можно вводить как парентерально в первые сутки, так и *in-ovo*, что говорит о том, что вирус защищен от действия материнских антител [20,41]. Разработкой такой вакцины занимаются уже значительно давно и на коммерческом рынке появилось несколько вакцин разных производителей: Живая иммунокомплексная вакцина против болезни Гамборо СЕВАК® TRANSMUNE, Бурсаплекс ZOETIS, Inc., GUMBOHATCH® HIPRA. Также на базе ФГБОУ ВО СПбГУВМ Научно-исследовательского консультационно-диагностического центра по птицеводству (НКДЦ) была разработана и применена иммунокомплексная вакцина [20].

Живые вакцины против ИББ имеют ряд недостатков, поэтому разработаны и применяются инактивированные вакцины [42]. Они, в основном, выпускаются как эмульсии и обычно сочетают несколько антигенов. Было замечено, что инактивированные вакцины против ИББ также были способны индуцировать вирус-специфические Т-клетки и воспалительные реакции у кур [2]. Сообщалось, что инактивированные вакцины против ИББ должны производиться из высокопатогенных штаммов, чтобы вызвать иммунитет, который помогает защитить потомство от инфекции вариантными штаммами вируса ИББ. Эти вакцины имеют ряд преимуществ, например, их можно применять в первые сутки жизни цыплят, и они способны вызывать иммунный ответ при любых уровнях материнских антител, но в тоже время имеют много недостатков, которые выражаются в высоких экономических затратах [15].

В Российской Федерации применяются несколько инактивированных вакцин: Вакцина против инфекционной бурсальной болезни инактивированная сорбированная, разработчик ФГБУ "ВНИИЗЖ"; АВИКРОН, производитель ФГБНУ ВНИВИП; ВИРСИН 563, штамм FS, разработчик BIOVAC.

Растет опасение, что интенсивное использование живых аттенуированных вакцин против ИББ может привести к увеличению вирулентности этого патогена из-за потенциальной мутации, а высокие денежные затраты на использование инактивированных вакцин не позволяет просто перейти на них [13]. Поэтому эти проблемы вызывают растущий интерес к разработке субъединичных и векторных вакцин, в которых один или несколько генов, кодирующих специфические антигены патогенов, экспрессируются рекомбинантной ДНК.

1.6.2. Субъединичные вакцины.

Капсидный белок VP2 уже давно остается в центре внимания разработки субъединичных вакцин, поскольку является основным антигеном вируса ИББ, на который вырабатываются вируснейтрализующие антитела.

Экспрессия VP2 была достигнута с использованием как эукариотической, так и прокариотической систем [46]. Субъединицы VP2, продуцируемые эукариотическими системами, по-видимому, обеспечивают лучшую иммуногенную активность, чем прокариотические системы. Для экспрессии VP2 использовали разные системы, такие как *Escherichia coli*, дрожжи, и даже системы экспрессии растений [101]. Также наблюдалась повышенная иммуногенность субъединиц VP2, когда этот белок вводили вместе с куриным интерлейкином-2 или куриным интерлейкин-18 [152]. Использование иммуномодуляторов и улучшенных адъювантов может повышать иммуногенность субъединичных вакцин.

Также была разработана вакцина на основе мимитопа, где мультимимотопный белок r5EPIS, в котором связаны вирусные пептиды, обладал высокой иммуногенностью [165]. При экспериментальной вакцинации с

использованием этого белка, была продемонстрирована частичная защита цыплят от вирусной инфекции, достигающая до 100%.

На сегодняшний день существует лишь несколько субъединичных вакцин, в основе которых лежит рекомбинантный VP2. К таким вакцинам можно отнести Quadractin VP2 и Gumbin VP2 (Abic Biological Laboratories Ltd, подразделение Phibro Animal Health). Также на базе ФГБОУ ВО СПбГУВМ Научно-исследовательского консультационно-диагностического центра по птицеводству (НКДЦ) была разработана и применена рекомбинантная вакцина на основе белка VP2 вируса ИББ [13,14,15]

Как и в случае инактивированных вакцин, потребности парентерального введения и ревакцинации прививки являются ограничивающими факторами для использования таких вакцин. Это может быть одной из причин, по которой вакцины из субъединиц VP2 не получили широкого распространения.

1.6.3. Живые векторные вакцины

Живые векторные вакцины сочетают в себе положительные качества живых и инактивированных вакцин. Суть их заключается в репликации рекомбинантного вируса в организме птицы с встроенным чужеродным геном, кодирующим синтез полипротеина VP2, который может индуцировать развитие как гуморального, так и клеточного иммунного ответа. Среди таких рекомбинантных вирусов, которых использовали в качестве векторных вирусов для экспрессии VP2: вирус оспы птиц, вирус болезни Ньюкасла, вирус герпеса индейки (HVT), птичий аденовирус и бактериофаг T4 [101]. Эти вакцины вводились птице парентеральным путем и имели определенные недостатки, а именно проблему с материнскими антителами и только векторная вакцина на основе вируса герпеса индеек преодолевала эту проблему, поскольку вирус малочувствителен к влиянию материнских антител. Эти исследования были усовершенствованы Vublott et al. [56] и Le Gros et al. [113], которые предложили вакцинацию *in-ovo*. В исследованиях Le Gros et al. было доказано, что материнский иммунитет, препятствующий действию живой вакцины против бурсальной болезни в контрольной группе, совершенно не влиял

на эффективность векторной вакцины в опытной группе. Подтверждением этих данных являются свежие статьи на смежную тематику [101,130].

Среди вакцин, представленных на рынке, против инфекционной бурсальной болезни на основе вируса герпеса индеек известна вакцина Вакситек HVT + IBD (Boehringer Ingelheim) и др.

1.7. Производство рекомбинантного белка в дрожжах

1.7.1. Неметилотрофные дрожжи

Многие из дрожжей дикого типа, лишенных как эндотоксинов и литических вирусов, известны благодаря своему широкому применению для производства этанола, напитков, ферментов, витаминов, органических и одноклеточных белков (биомассы). Это особенно верно для *Saccharomyces cerevisiae* и, в меньшей степени, для *Kluyveromyces lactis* и *Yarrowia lipolytica*, для которых полностью секвенирован весь геном.

Kluyveromyces marxianus является близким термотолерантным видом *K. lactis*, который в основном использовался для производства эндогенных (пектинолитических) или экзогенных ферментов [146], и демонстрирует строго аэробный рост при избытке глюкозы, что приводит к высоким концентрациям биомассы. Для многих из этих дрожжей современные исследования молекулярной генетики позволили создать широкий спектр векторов, селекционных маркеров, промоторов, терминаторов и сигналов секреции, которые позволили ученым понять и решить многие проблемы, возникающие при экспрессии гетерологичных генов. Успех, достигнутый при использовании этих дрожжей, подтверждается высоким уровнем экспрессии, полученный в культурах.

Передовые методы ферментации (непрерывные и периодические процессы) и технологии (ферментация с компьютерным контролем) также стали доступны.

Интересным элементом также является широкий спектр источников углерода и источников энергии, которые могут быть использованы в ходе промышленных процессов этими дрожжами (среди них: глюкоза, лактоза, мальтоза, крахмал, алканы и жирные кислоты). Несмотря на это, в настоящее

время большинство процессов производства гетерологичных белков с помощью этих дрожжей все еще находятся на стадии разработки. Фактически, крупномасштабные процессы накладывают множество ограничений, и зачастую эти системы экспрессии не могут быть реализованы.

Количество генетической, биохимической, физиологической информации и технологий, доступных для рода *Zygosaccharomyces*, в последнее время увеличилось, но до сих пор является очень бедным. Тем не менее, эти дрожжи кажутся очень перспективными.

Шесть видов, которые, по-видимому, эволюционно довольно близки к *S. cerevisiae* и не так далеки от *K. lactis*, были классифицированы к настоящему времени. Исключительная устойчивость к ряду стрессов делает некоторые из видов *Zygosaccharomyces* потенциально интересными для промышленных целей. Например, *Zygosaccharomyces. rouxii* известен как солеустойчивый (осмофильный), а *Zygosaccharomyces. bailii* может переносить высокие концентрации сахара (осмотолерантность), кислую среду, а также относительно высокие температуры. Несмотря на то, что они классифицируются как Крэбтри, производство этанола в аэробных условиях довольно низкое по сравнению с тем, что наблюдается в клетках *S. cerevisiae*;

Действительно, эти дрожжи могут расти до высокой плотности клеток даже без сложных стратегий ферментации. Развитие этих дрожжей в качестве хозяев для производства гетерологичных белков весьма перспективно, поскольку все эти свойства могут позволить разработать более простые и дешевые стратегии производства.

1.7.2. Метилотрофные дрожжи

Метилотрофные виды дрожжей имеют общий путь метаболизации одноуглеродных соединений, например, метанола в качестве источника углерода и энергии. Первоначально эта группа дрожжей использовалась для производства кормового белка, но вскоре они привлекли интерес как системы производства рекомбинантных белков из-за двух основных особенностей: во-первых, они способны расти до высокой плотности клеток, во-вторых, их высокая потребность в окисляющих метанол ферментов (таких как алкогольоксидаза) наделяет их очень сильными и строго регулируемыми промоторами.

Для синтеза белков в основном используются два вида: *P. pastoris* (син. *Komagataella pastoris*) и *Hansenula polymorpha* (также известная как *Pichia angusta*). Кроме того, *Pichia methanolica* и *Candida boidinii* описаны в литературе как экспрессионные системы [173]. Совсем недавно другие метилотрофные дрожжи, *Ogataea (Pichia) minuta* были разработаны в качестве подходящего хозяина для производства гликопротеинов [111]. Хотя эти дрожжи имеют общий путь метаболизма метанола, они существенно различаются по своей генетике [91]. *P. pastoris* производит две различные алкогольоксидазы (АОХ1 и АОХ2), тогда как *H. polymorpha* экспрессирует только одну метанолоксидазу (МОХ).

Регуляция МОХ несколько отличается, так как депрессия МОХ происходит даже в отсутствие метанола при отсутствии глюкозы. Кроме того, *H. polymorpha* способна расти при повышенной температуре (42°C) и усваивать нитрат.

Первое поколение экспрессионных систем основывалось на промоторе АОХ1 (более сильный из двух) или промоторе МОХ, соответственно. Что касается утилизации метанола, существует три возможных фенотипа для *P. pastoris* по сравнению с двумя для *H. polymorpha*, а именно Mut + (утилизация метанола дикого типа; оба АОХ1 и АОХ2 интактны), Mut s (медленная утилизация метанола; АОХ1 прервана, АОХ2 интактна) и Mut - (удаленная утилизация метанола, АОХ1 и АОХ2 прерваны) [144]. Поскольку метанол

используется как индуктор этих систем экспрессии, утилизация его играет важную роль в производственном процессе.

В конце концов, были выделены и использованы новые промоторы для экспрессии генов, а именно формальдегиддегидрогеназа (FLD) промотор [73, 84] и промотор глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназы (GAP) из *P. pastoris* и формиат дегидрогеназы (FMD) промотора *H. polymorpha* [69,126]. Эти промоторы являются либо регулируемыми, как промотор FLD (регулируемый азотом и метанола), либо конститутивными, как промотор GAP.

Тип регуляции снова играет важную роль в проектировании процесса ферментации.

1.7.3. Трансформация дрожжей

K. lactis и *Y. lipolytica* являются гетероталлическими, в то время как *P. pastoris*, *P. methanolica* и *H. polymorpha* - гомоталлическими. Большинство видов *Zygosaccharomyces* кажется гомоталлическим, но есть некоторые особенности. Для гетероталлических штаммов *K. lactis* и *Y. lipolytica*, генетические манипуляции, описанные для *S. cerevisiae*, могут быть проведены, в то время как для гомоталлических штаммов комплементация и тетрадные анализы представляют различные проблемы.

Экспрессия чужеродного белка в дрожжах состоит, во-первых, из клонирования последовательности ДНК, кодирующей чужеродный белок, внутри экспрессионной кассеты, содержащей дрожжевой промотор. А, во-вторых, трансформация и стабильное поддержание этого слияния ДНК в хозяине. Клонирование гетерологичного гена в приведенные дрожжи-хозяева может быть осуществлено с помощью трех различных подходов: подготовка сферопластов [57], метод ацетата лития и электропорация [148]. Метод ацетата лития и электропорация являются на сегодняшний день наиболее предпочтительными методами. Эффективность трансформации явно зависит от штамма, и подробные исследования следует проводить, когда требуется высокая эффективность трансформации.

Трансформанты могут быть отобраны путем (а) комплементации ауксотрофных маркеров (например, URA3, LEU2, TRP1, HIS3, HIS4, ADE1 - наиболее часто используемые), (b) доминантных маркеров (гены, придающие устойчивость к присутствию антибиотиков, таких как G418, флеомицин, гигромицин, цеоцин или другие в культуральной среде), или (c) доминантные маркеры (гены, придающие устойчивость к присутствию в культуральной среде антибиотиков), или так называемые системы автоселекции.

Для промышленного процесса система экспрессии должна быть генетически стабильной без давления отбора. Настоятельно не рекомендуется использовать антибиотики в процессе производства, а ауксотрофные маркерные системы потребуют химически очищенной минимальной среды (что не является необычным для крупномасштабного процесса), а при высокой плотности клеток также будет наблюдаться тенденция к перекрестному питанию между маркерсодержащими и ауксотрофными клетками, утратившими маркер. Для *S. cerevisiae* ген LEU2 и ген устойчивости к G418 являются двумя наиболее популярными используемыми маркерами, в то время как для *P. pastoris*, HIS4 и устойчивость к зеоцину.

2. СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Материалы и методы исследования

2.1.1. Дизайн исследования

Исследование проводили в период с 2018 по 2021 годы на базе кафедры эпизоотологии им. В.П. Урбана федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет ветеринарной медицины» (ФГБОУ ВО СПбГУВМ) Министерства сельского хозяйства Российской Федерации. Тема диссертационной работы являлась составной частью научно-исследовательской работы по гранту, предоставляемым ФГБОУ ВО СПбГУ на тему: «Создание нового поколения вакцинных препаратов для птиц на основе рекомбинантных антигенов и адъювантов – иммуностимуляторов».

Опыт по синтезу рекомбинантного белка в дрожжах *P. pastoris* выполняли в несколько этапов.

Первым этапом был подбор праймеров к последовательности гена-интереса для амплификации её методом ПЦР.

Второй этап это градиентная ПЦР нуклеотидной последовательности гена-интереса и электрофорез этой последовательности в агарозном геле, с последующей очисткой при помощи набора «Evrogen Cleanup standart kit» (Евроген, Россия).

Следующий этап - это лигирование ПЦР-продукта в промежуточный вектор pAL2-T и трансформация бактериальных клеток *Escherichia coli* (штамм DH5 α), с последующей селекцией трансформантов на среде с ампициллином.

Четвертый этап - это выделение плазмидной ДНК с вставкой из бактериальных клеток после их наращивания и анализ структуры плазмид с помощью рестрикционного анализа. Параллельно с этим проводилась трансформация бактериальных клеток *Escherichia coli* плазмидой pPICZ α A, которая используется при синтезе рекомбинантных белков в дрожжевых клетках,

с последующим культивированием на среде с зеоцином. Также в этот этап входило выделение плазмидной ДНК из бактериальных клеток и препаративная рестрикция рестриктазами EcoRI и XbaI полученных плазмид, с последующим дефосфорилированием и очисткой в агарозном геле.

Пятый этап - это лигирование полученных фрагментов и трансформация лигазной смесью бактерий *E. coli*, с последующим отбором трансформантов на среде LB с зеоцином и проверкой, выделенной плазмиды в рестрикционном анализе. Также в этот этап входила трансформация полученной плазмидой дрожжей *P. pastoris* (штамм GS115) методом электропорации и отбором трансформантов на среде YEPDS с зеоцином, с последующей проверкой рестрикционным анализом.

Шестой этап - это синтез белка VP2 с использованием сред BMGY и BMMY, с последующей концентрацией и очисткой дрожжевой среды с использованием колонок Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter Unit.

Также был поставлен опыт *in vivo* на цыплятах кросса Ломан Браун и Ломан Уайт (Lohmann Brown и Lohman White) с использованием рекомбинантной вакцины. Эксперимент на цыплятах кросса Ломан Браун и Ломан Уайт проводили на базе вивариев Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет ветеринарной медицины». В работе использованы следующие методы исследований: клинический, патологоанатомический, серологический, вирусологический, молекулярно-генетический и статистический.

Материалом для лабораторных исследований служили образцы сыворотки крови птиц, а также ткани бурсы Фабрициуса. Лабораторные исследования содержания антител в сыворотке крови проводили в Научно-исследовательском консультационно-диагностическом центре по птицеводству ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет ветеринарной медицины». Схемы и результаты исследований приведены в соответствующих разделах диссертации.

2.1.2. Вирус инфекционной бурсальной болезни

В качестве источника гена оболочечного гликопротеина VP2 использовали эпизоотический штамм инфекционной бурсальной болезни «Синявинский» (антигенно родственен эталонному штамму «52/70»), полученный в компании ООО «Кронвет».

Вирусный материал получен после расплеков на развивающихся СПФ эмбрионах кур (Specific Pathogen Free) и приготовлен в виде осветленного гомогената (20 %) инфицированных эмбриональных тканей на изотоническом фосфатном буфере (pH 7,2-7,6).

2.1.3. Штаммы бактерий и дрожжей

Для наработки плазмид в работе использовали штамм бактерий *Escherichia coli* DH5 α (*fhuA2 lac(del)U169 phoA glnV44 Φ 80' lacZ(del)M15 gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17*).

В работе использовали штаммы дрожжей *P. pastoris* X-33 (дикий тип) (из коллекции ФГБОУ ВО СПбГУ).

2.1.4. Плазмиды

Для клонирования последовательности гена оболочечного гликопротеина VP2 был использован вектор pAL2-T от фирмы Евроген (рис. 1).

Вектор представляет собой линейризованную плазмиду с выступающими фосфорилированными 3'-концевыми тимидинами. Эффективное лигирование ПЦР-продукта в pAL2-T вектора основано на способности Taq-полимеразы и ее аналогов нематрично добавлять на 3'-конец синтезированной цепи ДНК дезоксиаденозин. Таким образом, продукт ПЦР и pAL2-T вектор несут выступающие комплементарные 3'-концевые нуклеотиды А:Т. Наличие таких «липких» концов обеспечивает значительно более высокую эффективность лигирования по сравнению с лигированием «вступую».

Также вектор pAL2-T несет ген устойчивости к ампициллину и обеспечивает возможность бело-голубой селекции клонов (по результатам ПЦР-

скрининга не менее 90% белых колоний содержат рекомбинантную плазмидную ДНК);

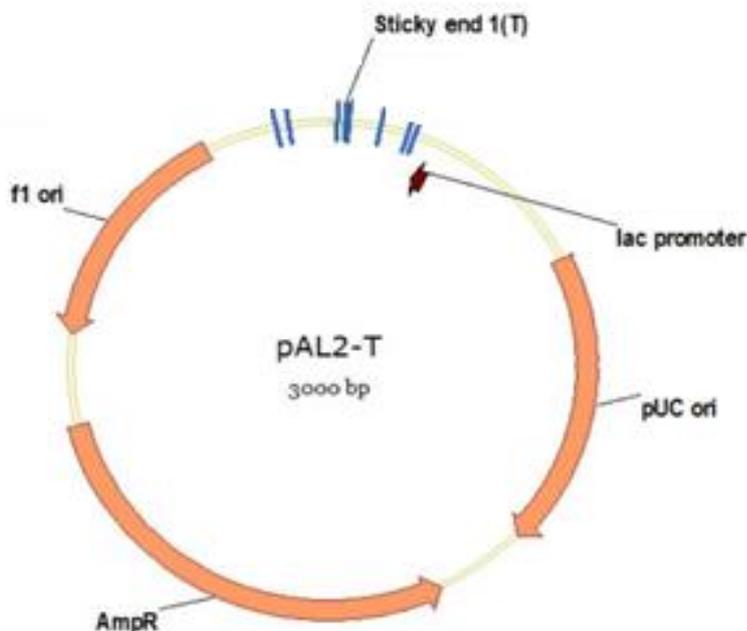


Рисунок 1 - Карта плазмиды pAL2-T (Евроген, Россия), размером 3000 п.о.

Плаزمида содержит ориджины репликации (f1 ori и pUC ori), ген бета-лактамазы, дающий устойчивость к ампициллину (AmpR).

Для экспрессии гена оболочечного гликопротеина VP2 в дрожжах был использован другой вектор pPICZ α A (рис. 2), Thermo Fisher Scientific, США). Этот вектор обеспечивает высокоуровневую, индуцируемую метанолом экспрессию интересующего гена в *Pichia* и может быть использованы в любом штамме *Pichia*, включая X-33, SMD1168H и KM71H. Вектор широко используется при синтезе рекомбинантных белков в дрожжах *P. pastoris*.

Вектор содержит:

- Промотор AOX1 для жестко регулируемой, индуцируемой метанолом экспрессии интересующего гена.

- Сигнал секреции α -фактора для направления секреторной экспрессии рекомбинантного белка
- ген устойчивости к зеоцину для селекции как в *E. coli*, так и в *Pichia*
- С-концевой пептид, содержащий эпитоп с-тус и полигистидиновую метку (6xHis) для обнаружения и очистки рекомбинантного слитого белка

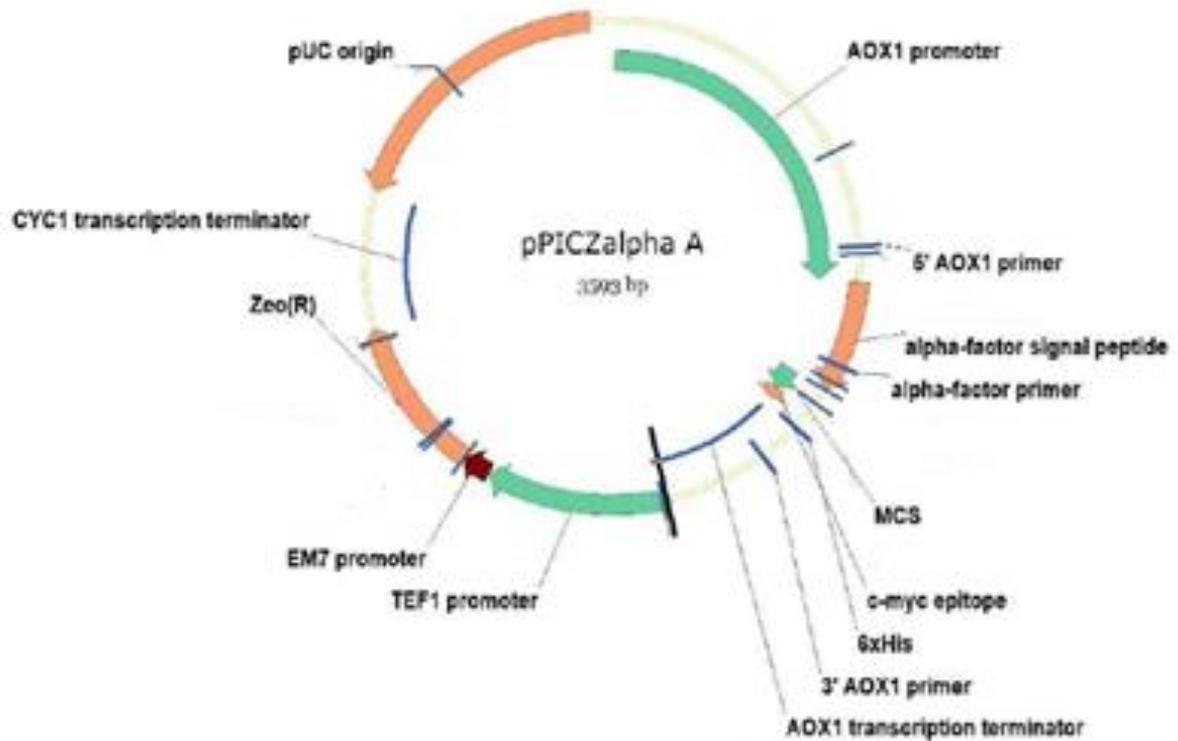


Рисунок 2 - Карта вектора pPICZ α A (Thermo Fisher Scientific, США): pUC origin –бактериальный ориджин репликации, ZeoR - ген устойчивости к антибиотику зеоцину, AOX1 promoter - промотора гена алкогольоксидазы дрожжей *P. pastoris* AOX1.

2.1.5. Филогенетический анализ

Для проведения филогенетического анализа нуклеотидную последовательность гена белка VP2 штамма «Синявинский» инфекционной бурсальной болезни сравнивали с последовательностями эталонных и высоковирулентных штаммов. Для этого из международных баз данных (GenBank) брали последовательности таких штаммов как: F52/70 ((United Kingdom; HG974565), D78 (Netherlands; AF499929), Cu-1 (Germany; X16107), GA-1 (USA; EF418034), 23/82 (Germany; AF362773), STC (D00499), 641_Russia (Russia; MF142556), 716_Russia (Russia; MF142563), 630_Russia (Russia; MF142554), 727_Russia (Russia; MF142565), 713_Russia (Russia; MF142562) .

Дендрограмму строили на основе гомологии нуклеотидных последовательностей гена VP2 эпизоотического штамма, эталонных (классических) и высоковирулентных.

Выравнивание нашей и эталонных последовательностей было выполнено с помощью программы ClustalW, программы множественного выравнивания последовательностей. Филогенетические деревья были сгенерированы с использованием программы MEGA 11 методом «Neighbor-Joining».

2.1.6. Среды и условия культивирования

Для роста штаммов бактерий использовали среду LB. Состав среды на 0,5 л: дрожжевой экстракт – 2,5 г, хлористый натрий – 5 г, триптон – 5 г. Для получения твердой среды добавляли 10 г агарозы. Для отбора бактериальных трансформантов на устойчивость к антибиотику в среду добавляли ампициллин в концентрации 500 тыс. МЕ/л. Также по методике можно добавлять зеоцин в концентрации 20 мг/л. Культивирование штаммов *E. coli* проводили при температуре 37°C.

Для культивирования штаммов дрожжей использовали среду YEPD. Состав среды на 0,5 л: глюкоза - 10 г, пептон - 10 г, дрожжевой экстракт - 5 г. Для получения твердой среды добавляли 10 г агарозы. Для отбора дрожжевых

трансформантов на устойчивость к антибиотику в среду добавляли зеоцину в концентрации 200 мкг/мл.

Также для выращивания штаммов дрожжей использовали минимальную среду Md. Состав среды на 0,5 л: CaCl₂ - 0,05 г, NaCl - 0,05 г, KН₂PO₄ - 0,425 г, K₂HPO₄·3H₂O - 0,1 г, MgSO₄·7H₂O - 0,501 г, (NH₄)₂SO₄ - 2,5 г; глюкоза - 10 г, витамины, микроэлементы (400 мкл/мл 2500х раствора); агар (в случае твёрдой среды) - 12,5 г.

Для индукции синтеза белка у дрожжей использовали среды BMGY и BMMY. Состав сред: дрожжевой экстракт – 1%, пептон – 2%, Yeast Nitrogen Base (YNB) – 1,34%, биотин – 4*10⁻⁵%, калий фосфатный буфер 10 мМ pH 6, глицерин 1% или метанол – 0,5%.

Культивирование дрожжей производили в термостате или в шейкере при температуре 30°C.

Для приготовления бактериальных компетентов бактерии высевали на чашку Петри с селективной средой, а затем пересеивали на среду TYM. Состав среды на 110 мл: сульфат магния семиводный - 2,71 г, триптон - 2,2 г, хлорид натрия - 0,64 г.

2.1.7. Выделение РНК

Тотальную РНК выделяли из образцов с использованием набора для выделения РНК GeneJET RNA Purification Kit (Thermo Fisher Scientific, США). Процедуру выполняли в несколько шагов:

Первый шаг: отбирали гомогенат (30 мг) и тщательно измельчали с помощью ступки и пестика. Затем переносили измельченную ткань в микроцентрифужную пробирку объемом 1,5 мл, содержащую 300 мкл буфера для лизиса, дополненного β-меркаптоэтанолом. Тщательно перемешали в течение 10 секунд.

Второй шаг: добавляли 600 мкл разбавленной протеиназы, предварительно разведенной в буфере TE. И тщательно перемешали на вортексе и инкубировали при 15-25°C в течение 10 мин.

Третий шаг: центрифугировали в течение 5 мин при $\geq 12000 \times g$. А затем переносили супернатант в новую микроцентрифужную пробирку без RNase.

Четвертый шаг: добавляли 450 мкл этанола (96%) и перемешивали пипетированием.

Пятый шаг: переносили лизат в колонку для очистки РНК GeneJET, вставленную в пробирку для сбора. Центрифугировали колонку в течение 1 мин при $\geq 12000 \times g$. Отфильтрованную жидкость сливали и повторяли этот шаг до тех пор, пока весь лизат не был перенесен в колонку. Затем помещали GeneJET RNA Purification Column в новую микроцентрифужную пробирку для сбора объемом 2 мл.

Шестой шаг: добавляли 700 мкл промывочного буфера 1 (с добавлением этанола) в колонку для очистки РНК GeneJET и центрифугировали в течение 1 мин при $\geq 12000 \times g$. Сливали Отфильтрованную жидкость и помещали колонку для очистки обратно в пробирку.

Седьмой шаг: добавляли 600 мкл промывочного буфера 2 (с добавлением этанол) в колонку для очистки РНК GeneJET и центрифугировали в течение 1 мин при $\geq 12000 \times g$. Сливали Отфильтрованную жидкость и помещали колонку для очистки обратно в пробирку.

Восьмой шаг: добавляли 100 мкл воды, не содержащей нуклеазы, в центр мембраны колонки для очистки РНК GeneJET и центрифугировали в течение 1 мин при $\geq 12000 \times g$ для удаления РНК.

Использовали очищенную РНК для последующих исследований и хранили при температуре -20°C .

2.1.8. Амплификация и клонирование гена VP2 в бактериях *E.coli*

Последовательность гена оболочечного гликопротеина VP2 была получена в ходе обратной транскрипции (ОТ) и последующей амплификации методом полимеразной цепной реакции (ПЦР). Обратная транскрипция проводилась с использованием набора «RevertAid™ First Strand cDNA» (Fermentas) по методике производителя [36]. При этом использовали геноспецифичный обратный праймер

(VP2-R). Полученная кДНК служила матрицей для проведения ПЦР. При этом использовали набор «Encyclo Plus PCR kit» (Евроген, Россия) с применением следующих праймеров:

VP2- EcoRI -F 5'- AgaattcATGACAAACCTGCAAGATCA-3'

VP2- XbaI-R 5'- AtctagaAATGCTCCTGCAATCTTCAG -3'

Праймеры содержали сайты рестрикции: EcoRI и XbaI.

Использовали следующие параметры ПЦР: 95°C – 3 минуты, а затем 30 циклов: 95°C - 30 с, 53°C - 30 с, 72°C - 90 с. ПЦР-продукт, кодирующий ген оболочечного гликопротеина VP2, был очищен методом выделения из агарозного геля с помощью набора «Evrogen Cleanup standart kit» (Евроген, Россия) [37]. Очищенный ПЦР-продукт лигировали с линейаризованной плазмидой pAL2-T по методике, предложенной фирмой производителем набора Quick-TA kit (Евроген, Россия) [38].

2.1.9. Приготовление бактериальных компетентных клеток

Для приготовления бактериальных компетентов бактерии высевали на чашку Петри с селективной средой и культивировали при температуре 37°C. Затем отбирали несколько любых колоний и помещали в среду ТУМ. Клетки выращивали до плотности OD (550) = 0,35. Все дальнейшие процедуры проводили в холоде при 0°C. Клетки центрифугировали, сливали супернатант и тщательно отбирали остатки жидкости. Затем ресуспензировали в 10 мл TfB1 буфера (для приготовления 100 мл буфера взяли KCl – 0,7456 г, 15 мл глицерола, CaCl₂ – 0,111 г, KAc – 0,2945 г рН буфера привели к 6,8, далее добавляли 0,989 г MnCl₂·4H₂O). Центрифугировали смесь, сливали супернатант и ресуспензировали в 2 мл TfB2 (на 100 мл буфера: CaCl₂ – 0,8325 г, KCl - 0,07456 г, 15 мл глицерола, рН доводили до 6,8, а затем добавляли 0,209 г MOPS). Затем добавляли DMSO и разливали по аликвотам в 200 мл. Компетенты хранили при температуре -70°C [90].

2.1.10. Трансформация бактерий лигазной смесью

Для трансформации бактериальных клеток (100 мкл) добавляли 10 мкл лигазной смеси и инкубировали в ледяной бане в течение 30 минут при 0°C. Далее проводили тепловой шок, помещая пробирки в водяную баню при температуре 42°C в течение 30 секунд, после чего сразу переносили обратно в ледяную баню на 15 секунд. Далее к компетентным клеткам добавляли 900 мкл жидкой среды LB и инкубировали 1 час при 37°C, каждые 10-15 минут переворачивая пробирки.

После проведения трансформации пробирки центрифугировали в течение 2 минут на 6000 об/мин, затем сливали супернатант, ресуспендировали осадок клеток в остатках среды и высевали клетки на селективную среду с антибиотиком [90].

2.1.11. Электрофорез фрагментов ДНК

Для проведения электрофореза фрагментов ДНК использовали 0,7% агарозный гель в буфере TAE (40 mM ледяная уксусная кислота, 40 mM трис-HCl, 0,5 M ЭДТА pH 8.0). Для окрашивания препаратов ДНК на 50 мл раствора агарозы добавляли 3 мкл раствора бромистого этидия. Электрофорез проводили при напряженности поля 6-7 В/м [33]. В качестве маркера длин последовательностей нуклеотидов был использован маркер 1 kb DNA Ladder (ЕВРОГЕН, Россия) (рис. 3).

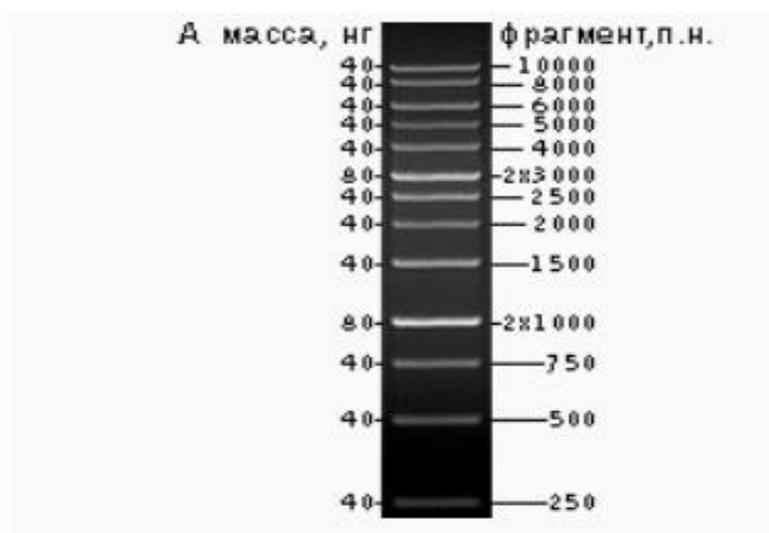


Рисунок 3 – Молекулярные веса фрагментов (1 kb DNA Ladder)

2.1.12. Методы работы с рекомбинантной ДНК

Гидролиз ДНК эндонуклеазами рестрикции проводили в буферах, предложенных фирмой-производителем фермента (Thermo Fisher Scientific Inc., USA). Рестрикционную смесь инкубировали в течение 1 часа при 37°C в термостате. Дефосфорилирование вектора производили при помощи фосфатазы FastAP в буферах, предложенных фирмой-производителем фермента (Thermo Fisher Scientific Inc., USA). Лигирование фрагментов ДНК проводили при помощи T4 ДНК лигазы (Евроген, РФ) при условиях, рекомендованных фирмой-изготовителем фермента.

2.1.13. Электропорация дрожжей

Суточную культуру дрожжей отбирали в количестве 1 мл и центрифугировали в микроцентрифужных пробирках 2 минуты при 7000 об/мин. Супернатант сливали и отбирали капли среды с дрожжевыми клетками. Далее добавляли 500 мкл буфера для электропорации (10 mM DTT, 0,6 M сорбитол и 10 mM трис-HCl, 100 mM LiAc, pH 7,5), время экспозиции 30 минут при комнатной температуре. Клетки центрифугировали в охлажденном буфере, супернатант сливали, а клетки ресуспензировали в 500 мкл холодного 1 M сорбитола. Далее дрожжевые клетки центрифугировали 3 минуты при 7000 об/мин и дважды повторяли предыдущий шаг. В пробирки с клетками добавляли раствор ДНК в сорбитоле, переносили в охлажденную кювету для электропорации, выставляли на электропораторе значение в 1600 вольт и проводили электрический разряд. После этого в кювету быстро добавляли 500 мкл сорбитола и 500 мкл жидкой YEPD, переносили суспензию в микроцентрифужные пробирки и ставили в термостат на 30°C на 1 час. После клетки центрифугировали при комнатной температуре 5 минут при 5000 об/мин, сливали супернатант и высевали клетки на чашки Петри с селективной средой [170].

2.1.14. Белковый электрофорез

Полиакриламидные гели для рутинного проведения электрофореза белков в денатурирующих условиях готовили согласно таблице 1. Для получения итоговых результатов использовали готовые градиентные гели Novex Tris-Glycine 8-16% (Thermo Fisher Scientific Inc., США).

Растворы для приготовления геля и проведения электрофореза: AL – акриламид: 30 г акриламида и 0.8 г бисакриламида в 100 мл, BL - буфер 1.5 М Трис-НСl pH 8.8: 18.2 г Трис-НСl в 100 мл H₂O, DL - буфер 0.5 М Трис-НСl pH 6.8: 6 г Трис-НСl в 100 мл H₂O, ПСА - персульфат аммония: 1 г ПСА в H₂O, TEMED - тетраметилэтилендиамин, x5 буфер - Трис-глициновый буфер x5 кратный: Трис-НСl 15 г, глицин 72 г в 1 л H₂O, додецилсульфат натрия. Стоковый раствор - 10% w/v (табл. 1).

Раствор для фиксации: 1 часть ЛУК (ледяная уксусная кислота), 4 части метанола; 5 частей H₂O (4:1:5)

Состав красителя Кумасси: 10 мл ЛУК, 0.5 г G-250 в 50 мл метанола и 40 мл H₂O.

Раствор для отмывки геля: 10 частей ЛУК, 25 частей ИПС (изопропиловый спирт), 65 частей H₂O.

Электрофорез проводили при напряжении 50 В для концентрации проб и 200 В для последующего разделения. После прохождения электрофореза пробы инкубировали в течение 15 минут в растворе для фиксации. Далее окрашивали его 2-4 часа с использованием красителя Кумасси, а затем отмывали от красителя.

Таблица 1 - Состав полиакриламидного геля для проведения электрофореза белков в денатурирующих условиях

Разделяющий гель 15%		Концентрирующий гель 6%		Буфер рабочий	
H ₂ O	0.98 мл	H ₂ O	1.08 мл	H ₂ O	160 мл
AL	1.8 мл	AL	0.4 мл	x5 буфер	40 мл
BL	0.94 мл	DL	0.5 мл	SDS 10% w/v	2 мл
ПСА	40 мкл	ПСА	20 мкл		
TEMED	4 мкл	TEMED	2 мкл		

2.1.15. Вестерн блот гибридизация

Для вестерн блот гибридизации брали неокрашенную часть геля после проведения белкового электрофореза и помещали в денатурирующий буфер, а затем ставили на 10 минут в шейкер. Затем гель промывали буфером для переноса (5 минут на шейкере). Далее гель помещали на нитроцеллюлозную мембрану и проводили перенос белков на неё при 75 В в течение 45 минут. Для этого использовали буфер для переноса. После переноса белков мембрану инкубировали в TBST (раствор трис-буфера с NaCl и с Твин 20) буфере с бычьим сывороточным альбумином (BSA) 3 часа (или ночь) при 25°C. Затем переносили мембрану в TBST буфер с BSA и первичными антителами (АТ) к с-Мус эпителию (PSM003-100, производитель ООО "СайСторЛаб", 2 мкл на 10 мл или 1:5000 об/об), инкубировали 2 часа при 37°C. Затем отмыли мембрану от первичных антител буфером TBST с BSA (3 раза по 5 мин в шейкере). Инкубировали в TBST

буфере с BSA и вторичными антителами в течение 1,5 часа (антитела козы, которую иммунизировали сывороткой мыши и конъюгированные с пероксидазой, А-9044, производитель Sigma Aldrich, 10 мкл / 10 мл). Промывали мембрану в буфере 10 mM Трис (8.0 pH) (3 раза по 5 мин). В буфере 10 mM Трис (8.0 pH) проводили реакцию с диаминобензидином и перекисью водорода.

Состав TBST буфера: 10 mM Трис, 150 mM NaCl, 1% BSA (бычий сывороточный альбумин).

Состав денатурирующего буфера на 200 мл: 1 M Трис pH 7,5, глицин – 0,585 г, ЭДТА 0,5%, мочевины 48 г, ДТТ 1 M.

2.1.16. Концентрация и очистка рекомбинантного белка

Концентрацию и очистку белка проводили при помощи набора колонок Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter Unit.

2.1.17. Определение концентрации белка

Определение концентрации белка в полученном препарате определяли с помощью прибора NanoDrop 2000c, Thermo Scientific.

2.1.18. Адьюванты

В качестве адьюванта использовали 6% гидроксид алюминия (ГОА), который добавляли к жидкости, содержащей рекомбинантный белок до конечной концентрации 0,3 % от общего объема вакцины. Полученные препарат смешивали на аппарате «Vortex» в течение 10 минут и вводили животным не ранее чем через 18 часов после приготовления (рис. 4).

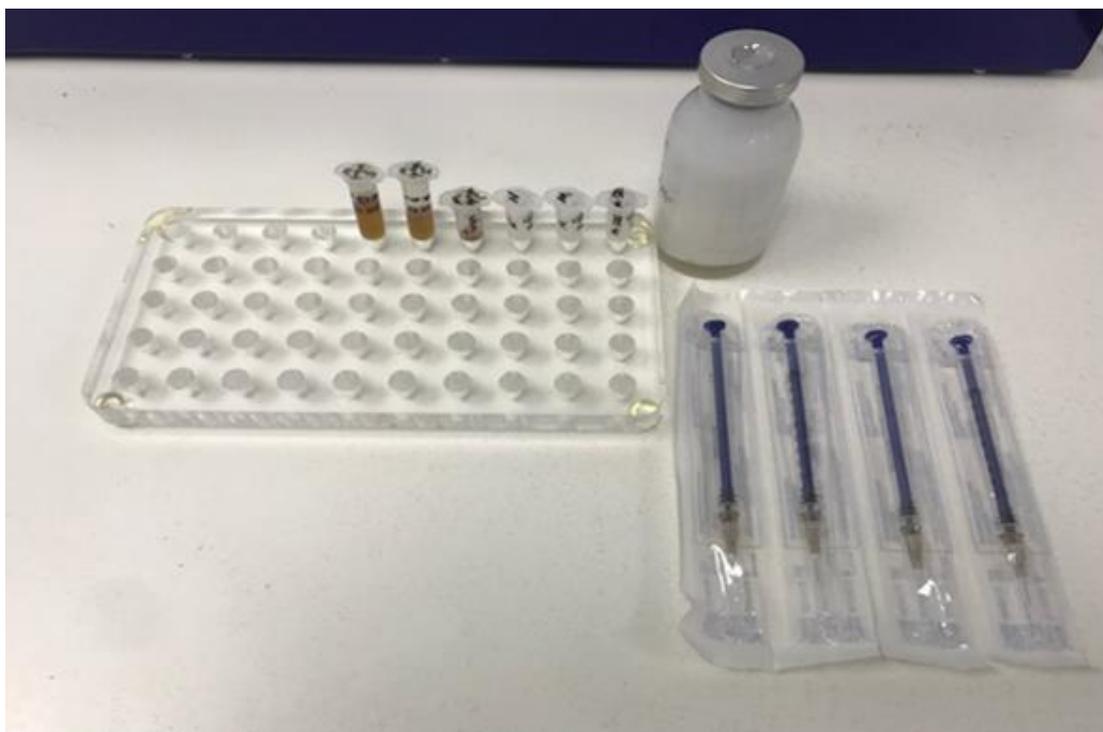


Рисунок 4 - Подготовленный антиген для смешивания с адьювантом

2.1.19. Определение стерильности

Для определения стерильности использовали ГОСТ 28085-2013 «Препараты биологические. Методы бактериологического контроля стерильности»

Проверку материалов на бактериальную контаминацию проводили посевами в МПБ, МПА, МППБ под вазелиновым маслом и на агаре Сабуро. Посевы выдерживали при $37\pm 1^\circ\text{C}$ в течение 7 суток, а на агаре Сабуро при $22,5\pm 2,5^\circ\text{C}$ в течение 14 суток.

По истечении указанного срока делали пересев, за исключением посевов на МПА. Пересевали пробы на те же питательные среды и в тех же объемах, что и при посеве. Вторичные посевы выдерживали 7 суток (агар Сабуро - 14 суток).

О стерильности материалов судили по отсутствию роста микроорганизмов на этих питательных средах.

2.1.20. Определение безвредности

Безвредность рекомбинантной вакцины против ИББ оценивали визуально по степени поражения подкожной клетчатки и тканей в месте введения 5-кратной

дозы препарата по критериям, предложенным H.D. Stone (1997г.) [154]: - легкие поражения; - средние поражения; - сильные поражения.

- легкие поражения проявляются в побледнение тканей, окружающих место инъекции, размером до 1,0 см в диаметре, признаки воспаления отсутствуют;

- при средних поражениях зона воспалительной реакции тканей, проявляющаяся отеком, побледнением или гиперемией, имеет размеры от 1 до 2 см в диаметре, присутствует диффузно расположенная вакцина;

- сильные поражения характеризуются очагом воспаления тканей с вовлечением поверхностных и глубоких мышц и образованием гранул в диаметре от 3 до 4 см, вакцина вытекала на разрезе или присутствовала в тканях в виде белой творожистой массы.

2.1.21. Эксперимент на цыплятах кросса Ломан Уайт и Ломан Браун.

В рамках исследования в период 2019-2021 гг. был проведен ряд экспериментов в виварии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования Санкт-Петербургский государственный университет ветеринарной медицины на цыплятах кросса Ломан Уайт и Ломан Браун. При проведении экспериментов выполняли требования и рекомендации по содержанию и кормлению для породы, в том числе нормы Федерального научного центра Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт птицеводства (ФНЦ ВНИТИП).

В опытах использовали цыплят с суточного возраста. Птица содержалась в клетках «БН-1» марки Стимул-Инк. Параметры микроклимата, условия содержания и кормления были одинаковы для всех групп птицы.

Кормление птицы осуществляли сухими полнорационными комбикормами (для цыплят кросса Ломан Уайт и Браун - «ПК2 - комбикорм для цыплят с 1-й по 7-ю неделю» производства ЗАО «Гатчинский ККЗ»

При проведении исследований использовалась следующая схема приготовления вакцин: в качестве антигена использовали рекомбинантный оболочечный гликопротеин VP2, полученный из дрожжей *P. pastoris* GS115. Антиген готовили как в исходной концентрации, так и разводили в фосфатном буферном растворе в разведении 1:5 (2 группа), 1:25 (3 группа). Антиген также смешивали с адьювантом: 6% ГОА до конечной концентрации 0,3 %.

Полученные препараты смешивали на аппарате Vortex в течение 10 минут и инкубировали 18 часов при 4°C.

Для постановки эксперимента было взято 4 группы цыплят по 10 в каждой группе: цыплятам 1-ой группы вводили вакцину с рекомбинантным белком VP2 в концентрации 1 мкг/мл в объеме 100 мкл (0,1 см³) подкожно (рис. 5); цыплятам 2-ой группы вводили вакцину с рекомбинантным белком VP2 в концентрации 0,2 мкг/мл в объеме 100 мкл (0,1 см³) подкожно; цыплятам 3-ой группы вводили вакцину с рекомбинантным белком VP2 в концентрации 0,04 мкг/мл в объеме 100 мкл (0,1 см³) подкожно; цыплятам 4-ой группы вакцину не вводили (контрольная группа). Вакцину вводили 14-суточным цыплятам однократно.



Рисунок 5 - Вакцинация цыплят подкожным методом.

В 14-й день вакцинация цыплят против ИББ проводилась с помощью шприца «Сокорекс». С целью исключения перегруппировки цыплят во время опыта они были помечены разной по цвету краской в различных частях тела. Во всех группах сыворотку крови для выявления антител к вирусу ИББ отбирали в возрасте 1, 14 и 40 дней.

Для определения отсутствия иммуносупрессии рекомбинантной вакцины определяли бурсальный индекс с расчетом по формуле:

$ИБ = МБ / МТ \times 1000$, где

ИБ - индекс бурсы

МБ - масса бурсы/грамм

МТ - масса тела/грамм.

В норме индекс бурсы у трех-четырёхнедельных цыплят должен быть в пределах 3 - 7. Иммунодепрессивное состояние характеризуется индексом бурсы меньше 3-х.

2.1.22. Серологические исследования

Серологические исследования проводили в боксе микробиологической безопасности БМБ-II-Ламинар-С-1,8 Lamsystems NEOTERIC на базе Научно-исследовательского консультационно-диагностического центра по птицеводству ФГБОУ ВО Санкт-Петербургский государственный университет ветеринарной медицины. Из серологических методов диагностики использовали иммуноферментный анализ (ИФА). ИФА проводили с использованием наборов «IDEXX» и «ID-Vet»(рис. 6) по методикам производителя.

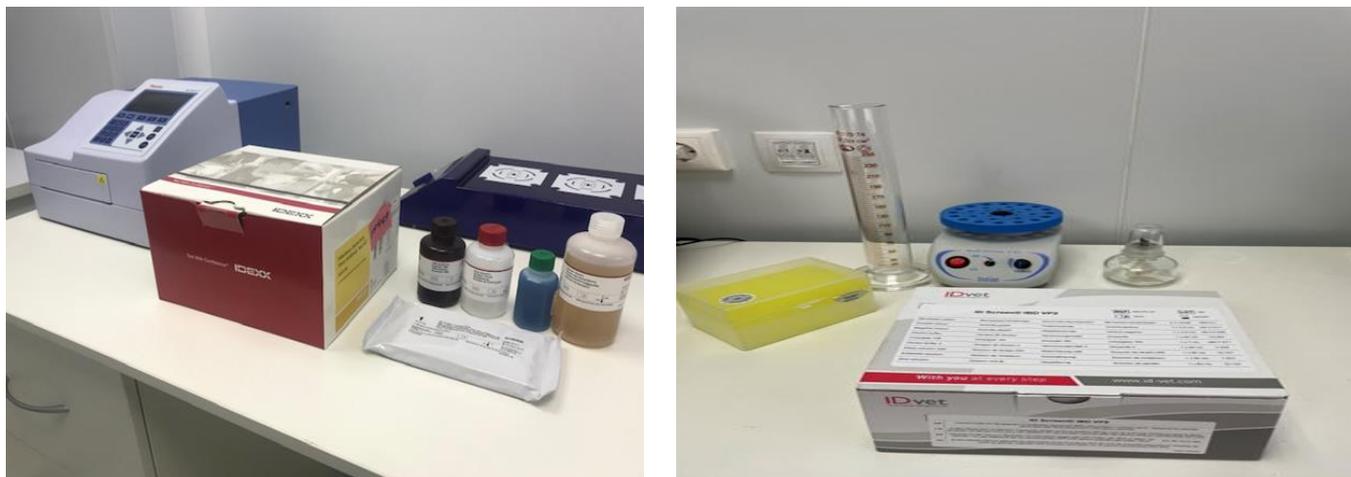


Рисунок 6 - Иммуноферментный набор на определение антител к ИББ производства «IDEXX» (слева) и «ID-Vet» (справа).

2.1.23. Статистическая обработка результатов

При анализе и статистической обработке результатов вычисление средней арифметической, средней геометрической, стандартного отклонения, критерия достоверности, коэффициента корреляции Пирсона проводили с использованием программы Excel для Windows.

При этом были приняты следующие обозначения:

n – число наблюдений или животных в опыте

r – коэффициент корреляции

P – критерий достоверности

Значения достоверности оценивали по таблице вероятностей Стьюдента-Фишера в зависимости от объёма анализируемого материала.

Вероятность различий считалась существенной при $P < 0,05$. Расчет значений коэффициента корреляции (r) и построение графиков проводили с использованием программного обеспечения Excel 2013 (Microsoft, США)

2.2. Результаты собственных исследований

2.2.1. Конструирование плазмид, содержащих ген VP2

На первом этапе клонировали в составе плазмиды pAL2-T последовательность гена VP2. Тотальную РНК выделяли из образцов гомогената. Используя выделенную РНК в качестве матрицы, проводили синтез кДНК методом обратной транскрипции (ОТ). При этом использовали геноспецифичный обратный праймер (VP2-R).

Полученную кДНК в свою очередь использовали для последующей амплификации последовательности гена VP2 методом полимеразной цепной реакции (ПЦР). При этом использовали праймеры VP2- EcoRI-F и VP2-XbaI-R.

VP2- EcoRI -F 5'- AgaattcATGACAAACCTGCAAGATCA-3'

VP2- XbaI-R 5'- AtctagaAATGCTCCTGCAATCTTCAG -3'

Праймеры содержали сайты рестрикции: EcoRI и XbaI.

Полученный фрагмент гена VP2 встраивали в плазмиду pAL2-T. Лигазной смесью трансформировали ДНК в клетки бактерий *E.coli*. Отбор трансформантов осуществляли на среде LB с ампициллином, IPTG и X-gal. Плазида pAL2-T-VP2 (Рис. 7), выделенная из нескольких клонов, была проверена на наличие вставки с помощью ПЦР с праймерами VP2- EcoRI-F и VP2-XbaI-R (Рис. 8).

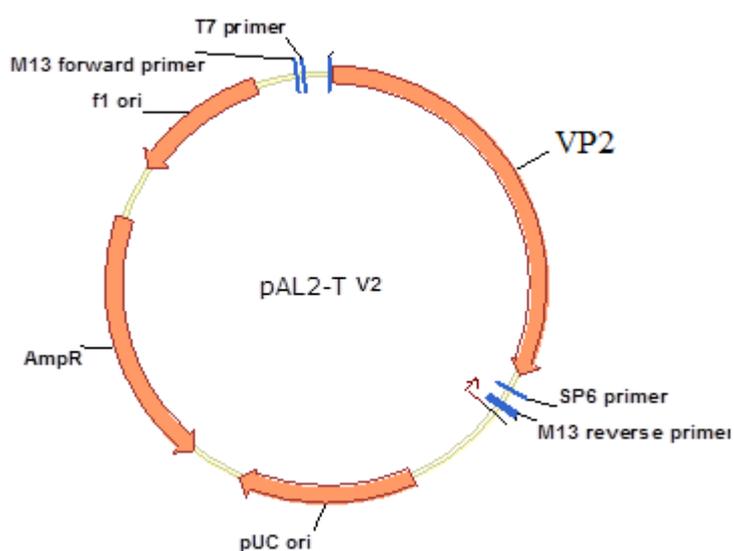


Рисунок 7 – Карта плазмиды pAL2-T- VP2.

Плазмида содержит фрагмент гена VP2, ориджины репликации (f1 ori и pUC ori), ген бета-лактамазы, кодирующий устойчивость к ампициллину (AmpR)

Как видно из рисунка 7 плазмида pAL2-T-VP2 содержит в своем составе нуклеотидную последовательность белка VP2 вируса инфекционной бурсальной болезни, а также последовательность нуклеотидов (f1 ori и pUC ori), на которых начинается инициация репликации. Кроме того, в плазмиде pAL2-T-VP2 есть участок (AmpR), отвечающий за устойчивость к ампициллину.

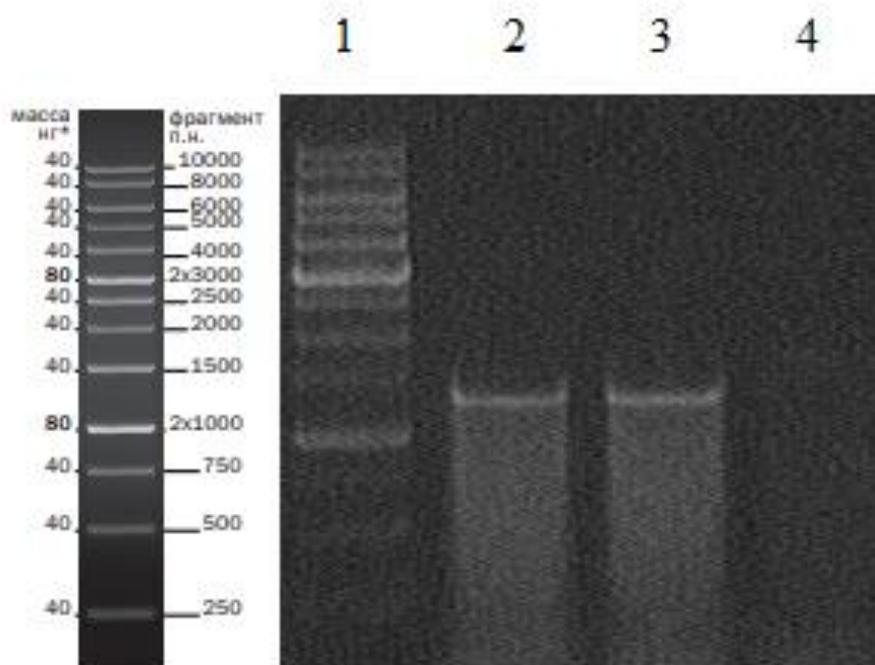


Рисунок 8 - Электрофореграмма продукта ПЦР-реакции плазмиды pAL2-T-VP2 с праймерами VP2- EcoRI-F и VP2-XbaI-R.

На рисунке 8 видна электрофореграмма продукта ПЦР-реакции, сверху обозначены номера дорожек:

- Дорожка №1-Ladder 1 kВ (Евроген, Россия)
- Дорожка №2- результаты рестрикции плазмиды pAL2-T-VP2 (клон№1)
- Дорожка №3- результаты рестрикции плазмиды pAL2-T-VP2 (клон№2)
- Дорожка №4-отрицательный контроль

По свечению фрагментов в дорожке №2, №3 с маркером молекулярных весов можно определить размер вставки, по нашим расчетам длина нуклеотидной

последовательности белка VP2 составляет 1339 пар нуклеотидов (п.н.) Размер полученных фрагментов соответствует теоретически ожидаемому (1339 п.н.)

Также структуру плазмиды проверили с помощью рестрикционного анализа (Рис. 9)

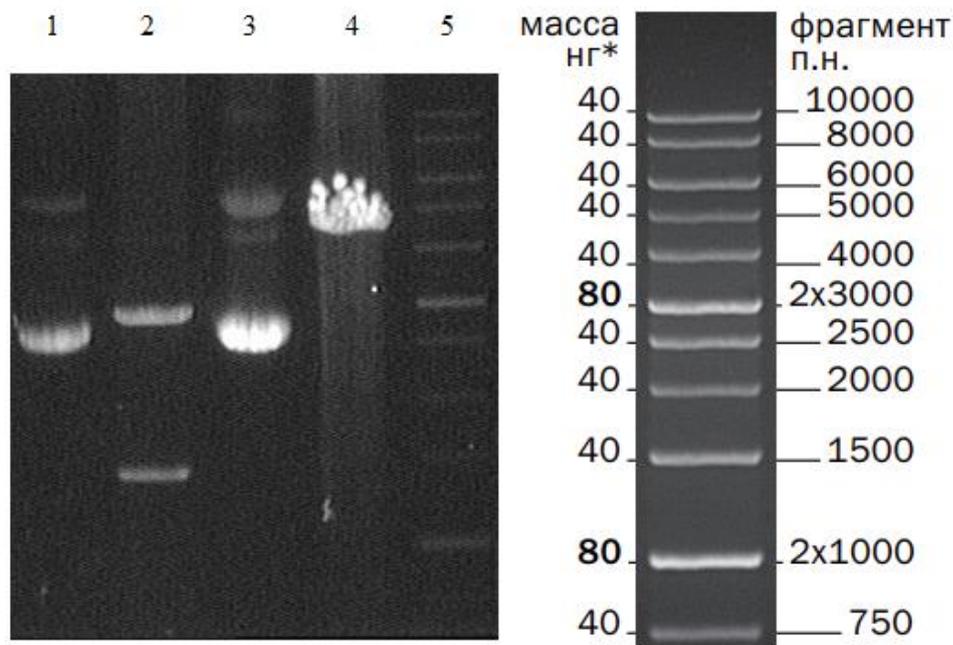


Рисунок 9 - Электрофореграмма результатов рестрикции плазмиды pAL2-T-VP2 по EcoRI и Xba I.

Размер полученных фрагментов соответствует теоретически ожидаемому.

На рисунке 9 изображены результаты электрофореграммы рестрикции плазмиды pAL2-T-VP2 по EcoRI и Xba I, сверху обозначены номера дорожек:

- Дорожки №1 и №3- нативная плазида pAL2-T-VP2
- Дорожка №2- результаты рестрикции плазмиды pAL2-T-VP2 по сайту EcoRI и XbaI (фрагменты 3000 + 1339 п.н.)
- Дорожка №4- результаты рестрикции плазмиды pAL2-T по EcoRI (фрагмент 4139 п.н.)
- Дорожка №5- Ladder 1 kВ (Евроген, Россия)

В результате рестрикции в дорожке №2 четко видны свечение фрагментов нативной плазмиды в районе 3000 пар нуклеотидов и вставки VP2 1339 пар

нуклеотидов. В дорожке №4 видно свечение фрагментов в районе 4400 пар нуклеотидов, поскольку рестрикция плазмиды pAL2-T только по EcoRI.

Предварительный этап клонирования последовательности гена VP2 в плазмиде pAL2-T позволил эффективно проанализировать его нуклеотидную последовательность. Для этого мы использовали Сэнгеровское секвенирование с праймерами M13, места посадки которых находятся в составе плазмиды.

В результате секвенирования была получена следующая последовательность (рис. 10)

При сравнении её с известной последовательностью гена VP2 (GenBank: KJ699103.1) с использованием алгоритма BLAST было обнаружено одиннадцать нуклеотидных замен. Десять из них оказались молчащие (синонимичные, выделены красным) и не приводят к изменению аминокислотной последовательности белка. Последняя (выделена синим) приводит к замене фенилаланина (F) на лейцин (L).

Также был проведен филогенетический анализ штамма «Синявинский» инфекционной бурсальной болезни. В результате была построена дендрограмма (рис. 11).

В результате филогенетического анализа установлено, что эпизоотический штамм «Синявинский» более близкородственен к высоковирулентным штаммам, выделенным на территории Российской Федерации и к классическому штамму «52/70» вируса ИББ, чем к другим классическим штаммам Cu-1, Ga-1, D78, STC и 23/82.

Далее последовательность гена VP2 встраивали в вектор pPICZ α -A, используемый при синтезе рекомбинантных белков в дрожжах *P. pastoris*. Для этого плазмиды pAL2-T-VP2 и pPICZ α A обрабатывали эндонуклеазами рестрикции XbaI и EcoRI. pPICZ α A дополнительно дефосфорилировали.

ATGACAAACCTGCAAGATCAAACCCAACAGATTGTTCCGTTCCATACGGAGCC
TTCTGATGCCAACAAACCGGACCGGCGTCCATTCCGGACGACACCCTAGAGAAGCAC
ACTCTCAGGTCAGAGACCTCGACCTACAATTTGACTGTGGGGGACACAGGGTCAGG
GCTAATTGTCTTTTTCCCTGG**I**TTCCCTGGCTCAATTGTGGGTGCTCACTACACACTG
CAGAGCAATGGGAACTACAAGTTCGATCAGATGCTCCTGACTGCCCAGAACCTACC
GGCCAGCTACAACACTGTCAGGCTAGTGAGTCGGAGTCTCACAGTGAGGTCAAGCA
CACTCCCTGGTGGCGTTTA**C**G**I**CTAAATGGCACCATAAACGCCGTGACCTTCCAAG
GAAGCCTGAGTGAACCTGACAGATGTTAGCTACAATGGGTTGATGTCTGCAACAGCC
AACATCAACGACAAAATCGGGAACGTCCTAGTAGGGGAAGGGGTAAACCGTCCTCAG
CTTACCCACATCATATGATCTTGGGTATGTGAGACTCGGTGACCCCATTTCCCGCTAT
AGGGCTCGACCCAAAATGGTAGCAACATGTGACAGCAGTGACAGGCCCAGAGTCT
ACACCATAACTGCAGCCGA**C**GATTACCAATTCTCATCACAGTACCAAGCAGGTGGG
GTAACAATCACACTGTTCTCAGCTAATATCGATGCCATCACAAGCCTCAGCATCGGG
GGAGAACTCGTGTTTCAAACAAGCGTCCAAGGCCTTATACTGGGTGCTACCATCTAC
CTTATAGGCTTTGATGGGACTGCGGTAATCACCAGAGCTGTGGCCGCAGACAATGG
GCT**A**ACGGCCGGCACTGACAACCTTATGCCATTCA**A**ATTGTGATTCCAACCAGCGA
GATAACCCAGCCAATCACATCCATCAAACCTGGAGATAGT**G**ACCTCCAAAAGTGG**C**G
GTCAGGCGGGGGATCAGATGTCATGGTCAGCAAGTGGGAGCCTAGCAGTGACGATC
CACGG**C**GGCAACTATCCAGGGGCCCTCCGTCCCGTCACACTAGTAGCCTACGAAAG
AGTGGCAACAGGATCTGTCGTTACGGTCGCCGGGGTGAGCAACTTCGAGCTGATCC
CAAATCCTGA**G**CTAGCAAAGAACCTGGTCAAGAAATACGGCCGATTTGACCCAGGA
GCCATGAACTACACAAAATTGATACTGAGTGAGAGGGACCGTCTTGGCATCAAGAC
CGTATGGCCAACAAGGGAGTACACTGACTTTCGCGAGTAC**C**TCATGGAGGTGGCCG
ACCTCAACTCTCCCCTGAAGATTGCAGGAGCA

Рисунок 10 - Нуклеотидная последовательность гена VP2 в плазмиде pAL2-T
*Примечание: красным выделены нуклеотидные замены, не приводящие к аминокислотным
заменам, синим, выделены нуклеотидные замены, приводящие к аминокислотным заменам

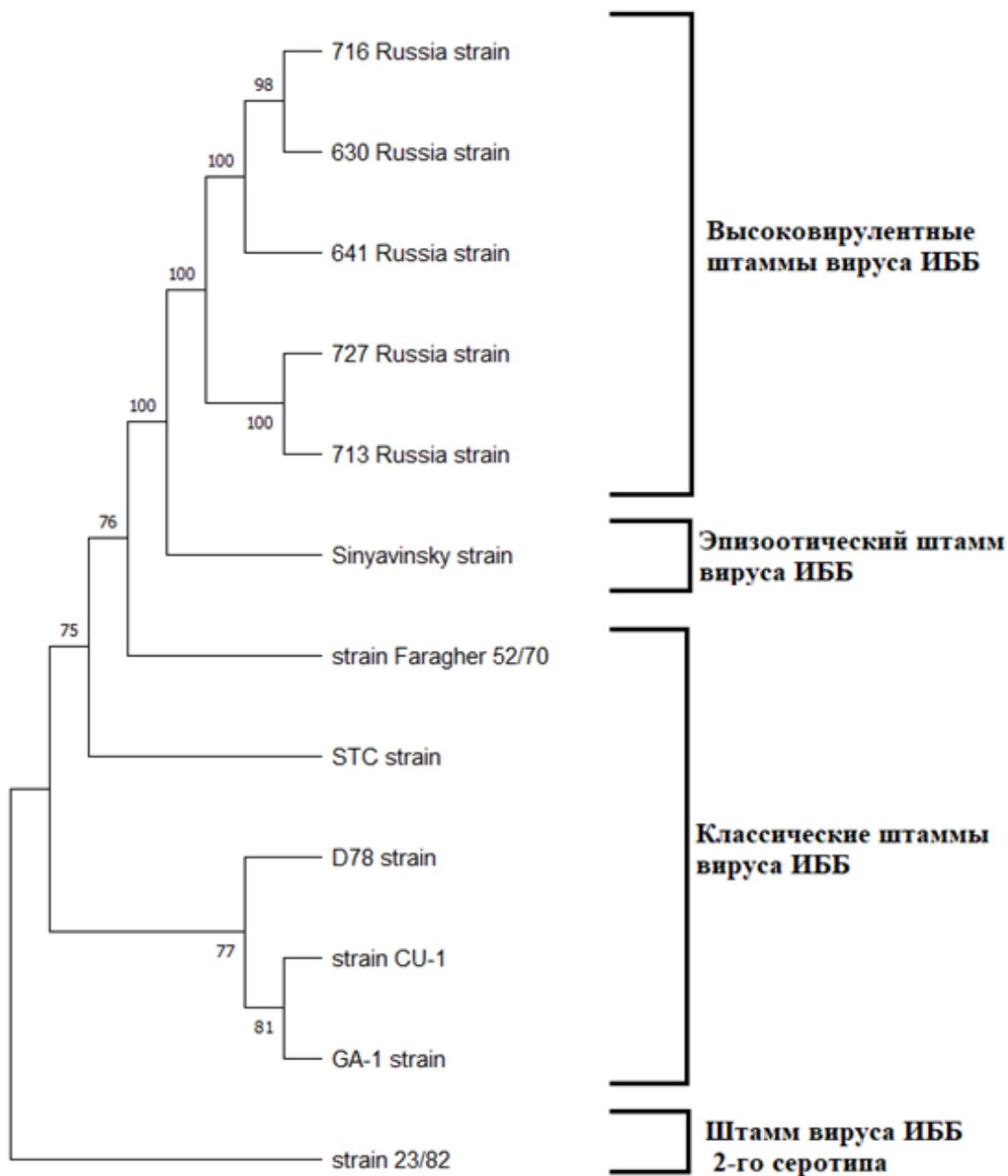


Рисунок 11 - Дендрограмма изученных штаммов инфекционной бурсальной болезни, построенная методом «Neighbor-Joining» с использованием программы MEGA 11.

Нужные фрагменты очищали с помощью электрофореза и лигировали. Лигазной смесью трансформировали клетки бактерий *E. coli* и отбирали трансформантов на среде LB с зеоцином. Плазмида pPICZ α -VP2 (Рис. 12) была проверена на наличие вставки с помощью ПЦР с парами праймеров VP2- EcoRI-F и VP2-XbaI-R, а также с помощью рестрикционного анализа.

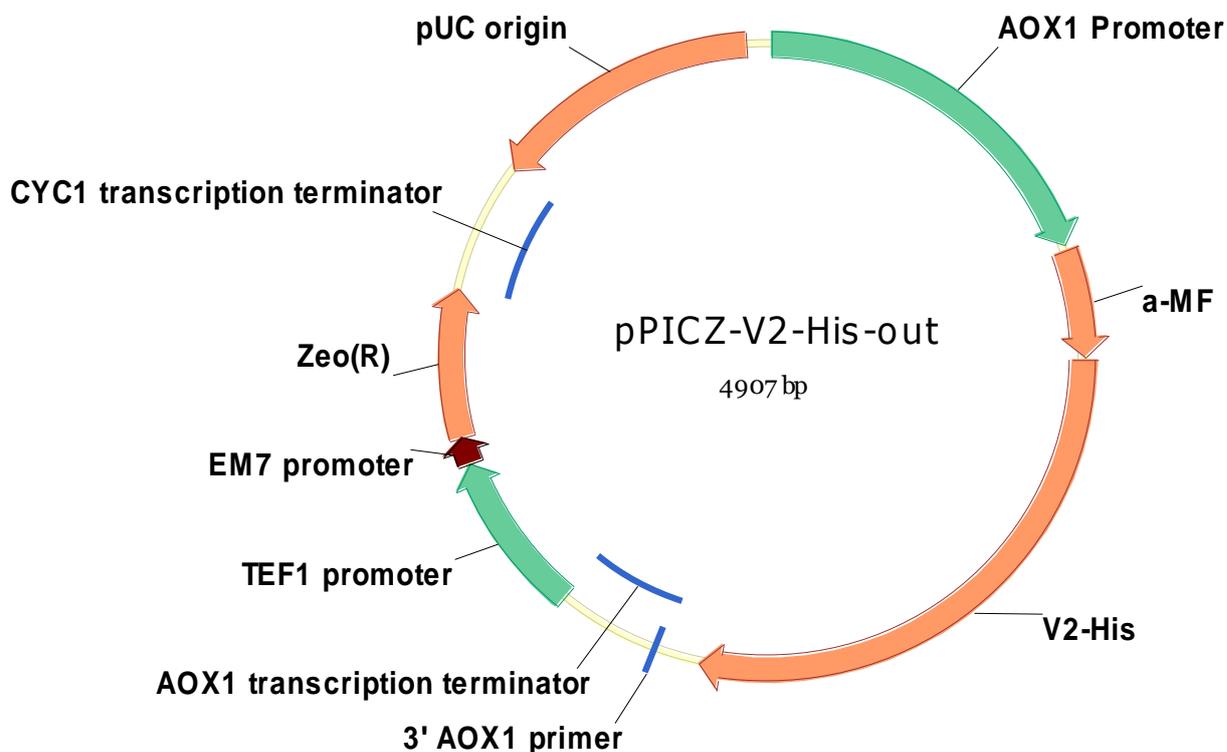


Рисунок 12 - Карта плазмиды pPICZ α -VP2.

На рисунке 12 видно, что плазмида содержит фрагмент гена VP2 (V2-His) в единой рамке считывания с последовательностью сигнала секреции aMF, а также с-тус эпитопом и 6х гистидиновой меткой. Также отмечены pUC origin – бактериальный ориджин репликации, ZeoR - ген устойчивости к антибиотику зеоцину, AOX1 promoter - промотора гена алкогольоксидазы дрожжей *P. pastoris* AOX1. Как уже было сказано ранее плазмида pPICZ α -VP2 была проверена на наличие вставки с помощью ПЦР. Результат ПЦР-реакции представлен на рисунке 13.

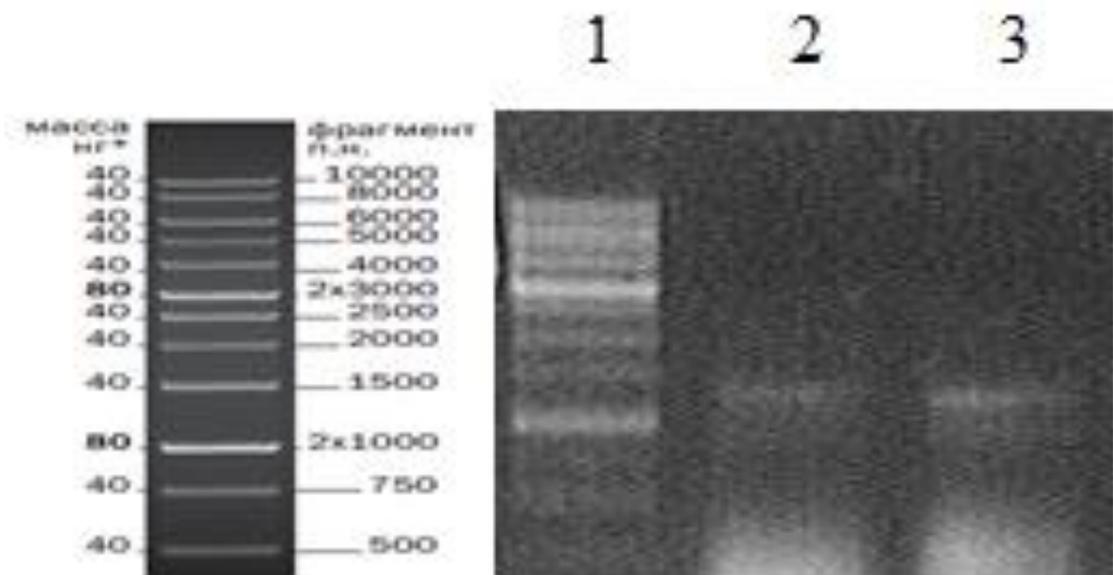


Рисунок 13 - Электрофореграмма результатов ПЦР-реакции с праймерами VP2-EcoRI-F и VP2-XbaI-R.

Размер полученных фрагментов соответствует теоретически ожидаемому (1339 п.н.). На рисунке 13 изображены результаты электрофореграммы pPICZ α -VP2 с праймерами VP2-EcoRI-F и VP2-XbaI-R, сверху обозначены номера дорожек:

- Дорожка №1- Ladder 1 kВ (Евроген, Россия)
- Дорожка №2- результаты ПЦР по плазмиде pPICZ α -VP2 (клон№1)
- Дорожка №3- результаты ПЦР по плазмиде pPICZ α -VP2 (клон№2)

Как и на рисунке 8 также отмечается свечение фрагментов в районе 1300 пар нуклеотидов, что соответствует теоретически ожидаемому (1339 п.н.).

2.2.2. Получение штамма дрожжей *P. pastoris*, синтезирующего белок VP2

Для интеграции плазмиды pPICZ α -VP2 в геном дрожжей *P. pastoris* плазмиду pPICZ α -VP2 линейризовали с помощью рестриктазы PmeI. Получившимся линейным фрагментом трансформировали штамм *P. pastoris* GS115 методом электропорации. Отбор трансформантов проводился на среде YEPDS с зеоцином.

Наличие необходимой интеграции в хромосомной ДНК штамма, трансформированного плазмидой pPICZ α -VP2, проверяли с помощью ПЦР с парой праймеров VP2-EcoRI-F – VP2-XbaI-R. В качестве матрицы использовали геномную ДНК полученных трансформантов. Результаты ПЦР анализа приведены на рисунке 14.

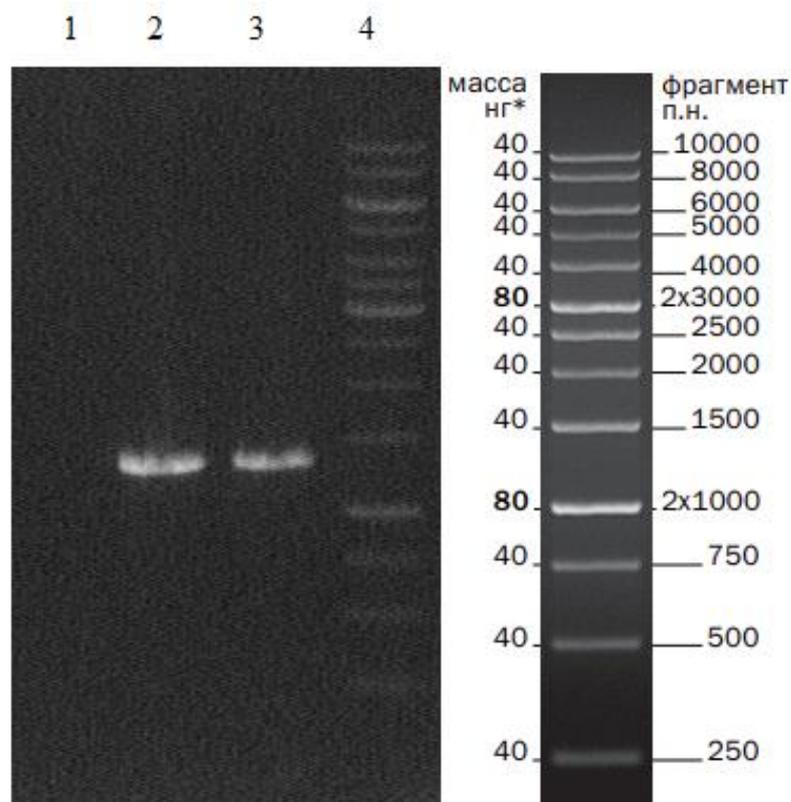


Рисунок 14 - Электрофореграмма результатов ПЦР-реакции с праймерами VP2- EcoRI-F и VP2-XbaI-R.

На рисунке 14 изображена электрофореграмму результатов ПЦР-реакции плазмиды pPICZ α -VP2 праймерами VP2- EcoRI-F и VP2-XbaI-R, сверху обозначены номера дорожек:

- Дорожка №1- отрицательный контроль
- Дорожка №2- геномная ДНК штамма VP2-GS115 в качестве матрицы (клон№1)
- Дорожка №3- геномная ДНК штамма VP2-GS115 в качестве матрицы (клон№2)
- Дорожка №4- Ladder 1 kВ (Евроген, Россия)

Также, как и на рисунке 8 и 13 размер полученных фрагментов соответствует теоретически ожидаемому (1339 п.н.).

Таким образом, был получен штамм VP2-GS115 дрожжей *P. pastoris*, содержащий кассету экспрессии с геном VP2. В этой кассете кодирующая последовательность VP2 находится в единой рамке считывания с последовательностями альфа-фактора, с-тус-эпитопа и 6х гистидиновой метки. Транскрипция этой кассеты обеспечивается за счёт работы промотора гена *AOX1*, индуцируемого в средах с метанолом. Добавленная к белку последовательность альфа-фактора обеспечивает выделение белка клетками дрожжей в среду и будет удалена в процессе секреции. Последовательность с-тус-эпитопа позволит эффективно анализировать синтез белка с помощью Вестерн-блот гибридизации.

2.2.3. Синтеза белка VP2 в дрожжах *P. pastoris*

Для индукции синтеза рекомбинантного белка полученный штамм VP2-GS115 культивировали в среде BMGY в течение 72 часов, после чего центрифугировали и переносили клетки в среду BMMY с метанолом на 72 часа для индукции промотора AOX1. Далее среду отделяли от клеток и концентрировали. Пробы наносили на градиентный ПААГ, проводили электрофоретическое разделение белков и их перенос на нитроцеллюлозную мембрану с последующей обработкой антителами. Результаты электрофореза и вестерн-блот гибридации приведены на Рис. 15.

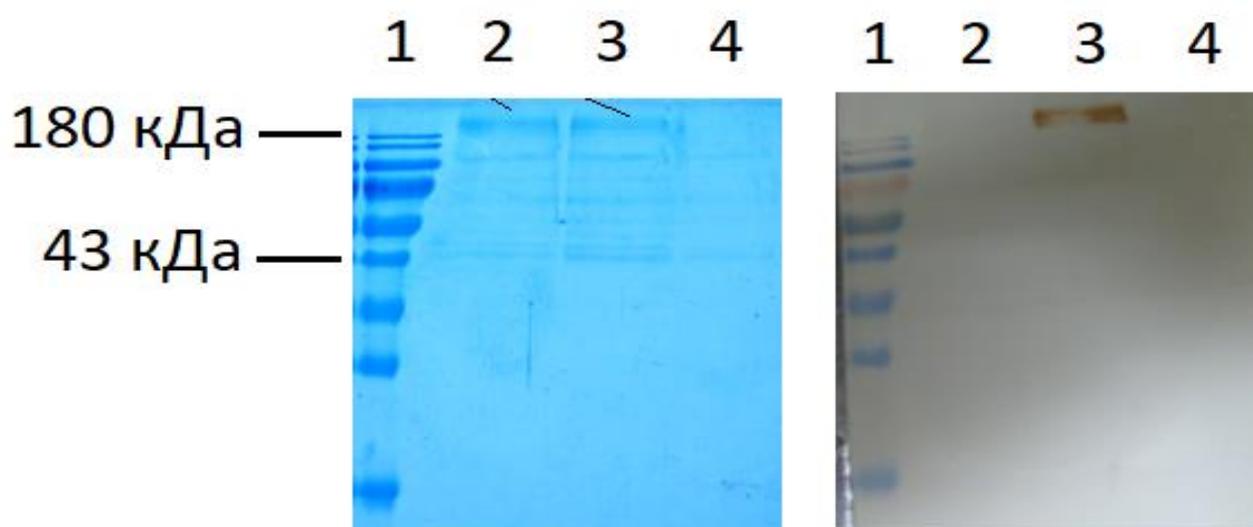


Рисунок 15 - Электрофореграмма (слева) и вестерн-блотинг (справа) секреторных белков.

На рисунке 15 изображены электрофореграмма (слева) и вестерн-блотинг (справа) секреторных белков, сверху обозначены номера дорожек:

- Дорожка №1- Маркер PageRuler Plus Prestained Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific, США).
- Дорожка №3 - Среда от штамма VP2-GS115 выделяющего секреторный белок с VP2 с-тус эпитопом и 6xHis-меткой

- Дорожка №4 Среда от штамма X-33, не синтезирующего рекомбинантных белков.

Секреторный белок синтезировался и секретировался. Но было отмечено, что он весь агрегировал и на электрофорезе проходит в области выше 180 кДа. В ожидаемом диапазоне 40 кДа, соответствующей ожидаемому размеру мономерного белка VP2, ничего не выявлялось при использовании вестерн-блот гибридации.

Как было далее выявлено, агрегация белка VP2 связана с кипячением проб в присутствии SDS, которое проводили перед электрофорезом. Если этот этап опустить, то можно увидеть, что в исходной культуральной среде белок VP2 либо находится в виде мономера, либо представляет собой агрегаты гораздо большего размера (Рис. 16).

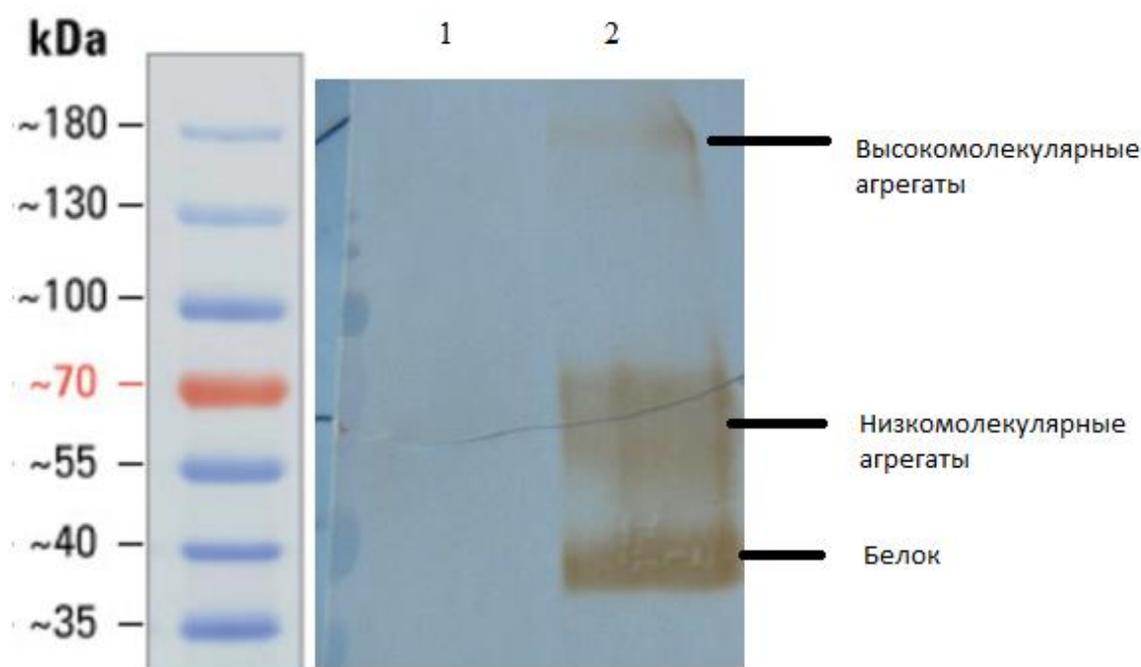


Рисунок 16 - Вестерн-блотинг секреторных белков

Как видно из рисунка 16 на нитроцеллюлозной бумаге белок VP2 проходит в области 40, 70 и 180 кДа, что говорит о том, что в исходной культуральной среде он присутствует не только в виде мономера. Сверху для удобства обозначены номера дорожек:

- Дорожка №1- Среда от штамма X-33, не синтезирующего рекомбинантных белков.
- Дорожка №2 - Среда от штамма VP2-GS115 выделяющего секреторный белок с VP2 с-тус эпитопом и 6xHis-меткой.

Слева от нитроцеллюлозной мембраны представлен маркер PageRuler Plus Prestained Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific, США)

Полученный штамм VP2-GS115 культивировали в среде BMGY в течение 48 часов, после чего центрифугировали и переносили клетки в среду BMMY на 72 часа для индукции промотора гена AOX1 и синтеза рекомбинантного белка. Клетки центрифугировали, после чего отбирали среду, содержащую секретированный белок. Среду концентрировали и использовали для последующей иммунизации.

2.2.4. Изучение антигенных свойств рекомбинантной вакцины.

Для исследования антигенных свойств рекомбинантной вакцины против инфекционной бурсальной болезни вакцинировали цыплят яичного направления на 14-е сутки и оценивали серологические показатели крови у суточных, 14 дневных и 40 дневных цыплят.

Для определения уровня поствакцинального иммунитета проводили иммуноферментный анализ сыворотки крови с использованием набора «IDEXX» и «ID-Vet».

Как видно в таблице 2 уровень материнских антител у суточных цыплят был не достаточно высок, поэтому на 14 сутки можно было увидеть невысокие титры антител.

Считается, что на выработку иммунитета на вакцину приходится около 3 недель, поэтому контрольный забор крови был проведен в 40 день.

Таблица 2 - Определение антигенной активности рекомбинантной вакцины против ИББ у цыплят кросса Ломан Браун методом ИФА (n=10) набором «IDEXX».

Номер Группы	Адьювант	Концентрация белка VP2,мкг	Путь введения	Объём препарата, мкл	Средний геометрический титр антител к VP2 в ИФА*		
					0 день	14 сут.	40 сут.
1	ГОА	1 мкг/мл	П/к	100	5806±250	211±10	657±20
2	ГОА	0,2 мкг/мл	П/к	100	5272±200	136±10	230±10
3	ГОА	0,04 мкг/мл	П/к	100	5790±250	153±10	186±10
4	-	-	-	-	6482±270	243±10	58±5

Примечание: * - Обратные значения титров антител в ИФА, (P<0,05)

По результатам проведенных исследований можно сказать, что иммунитет образовался только у группы №1, так как произошло увеличение титра антител при коэффициенте вариации 12,5%. В группе №2 и №3 иммунитет остался на уровне 14 дня, возможно, это связано с маленьким количеством рекомбинантного белка в вакцине. В контрольной группе титры антител почти полностью отсутствовали.

Для того чтобы поставить более чувствительный ИФА на рекомбинантный белок VP2 вируса инфекционной бурсальной болезни был приобретён набор производства ID-Vet (ID Screen IBД VP2) и повторно проведен анализ титров антител. Данные представлены в таблице 3.

Таблица 3 - Определение антигенной активности рекомбинантной вакцины против ИББ у цыплят кросса Ломан Браун методом ИФА (n=10) набором «ID-Vet».

Номер Группы	Адьювант	Концентрация белка VP2, мкг	Путь введения	Объём препарата, мкл	Средний геометрический титр антител к VP2 в ИФА*		
					0 день	14 сут.	40 сут.
1	ГОА	1 мкг/мл	П/к	100	5515±230	167±10	1664±100
2	ГОА	0,2 мкг/мл	П/к	100	5153±210	158±10	560±20
3	ГОА	0,04 мкг/мл	П/к	100	5320±230	169±10	315±15
4	-	-	-	-	5990±250	210±10	63±5

Примечание: * - Обратные значения титров антител в ИФА, (P<0,05)

Как видно в таблице 3 титры антител у группы №1 в 40 день значительно выше, чем на 14, что говорит об иммунном ответе на рекомбинантный белок VP2. У группы № 2 и 3 также видно увеличение титров антител по сравнению с данными из таблицы 2, но более стойкий иммунитет наблюдался у группы №1 при концентрации рекомбинантного белка 1 мкг/мл.

В результате проведения серологического исследования сывороток крови цыплят, привитых рекомбинантной вакциной против ИББ в возрасте 14 суток объёмом 0,1 см³ было установлено, что наиболее высокий уровень антител имеют цыплята первой группы. Уровень антител у цыплят в суточном возрасте достигал 1:5153 - 1:5990.

Полученные данные свидетельствуют о том, что рекомбинантная вакцина антигенно активна.

2.2.5. Определение стерильности вакцины

Определение стерильности лабораторных серий вакцины проводили по ГОСТ 28085-2013. Из образцов двух серий рекомбинантной вакцины делали посев на стерильные питательные среды: МПА, МПБ, Эндо, МППБ (рис. 17) под вазелиновым маслом и среду Сабуро – по три пробирки для жидких питательных сред и по две чашки Петри для твердых питательных сред. Для выявления аэробов и факультативно-анаэробных микроорганизмов высевали $0,5 \text{ см}^3$ посевного материала в пробирки, а для выявления анаэробов – $1,0 \text{ см}^3$. Пробирки с посевами на всех средах, кроме среды Сабуро, выдерживали в термостате при $(37,0 \pm 1) \text{ }^\circ\text{C}$ в течение 7 суток, на среде Сабуро – при $(22,5 \pm 2,5) \text{ }^\circ\text{C}$ в течение 14 суток.

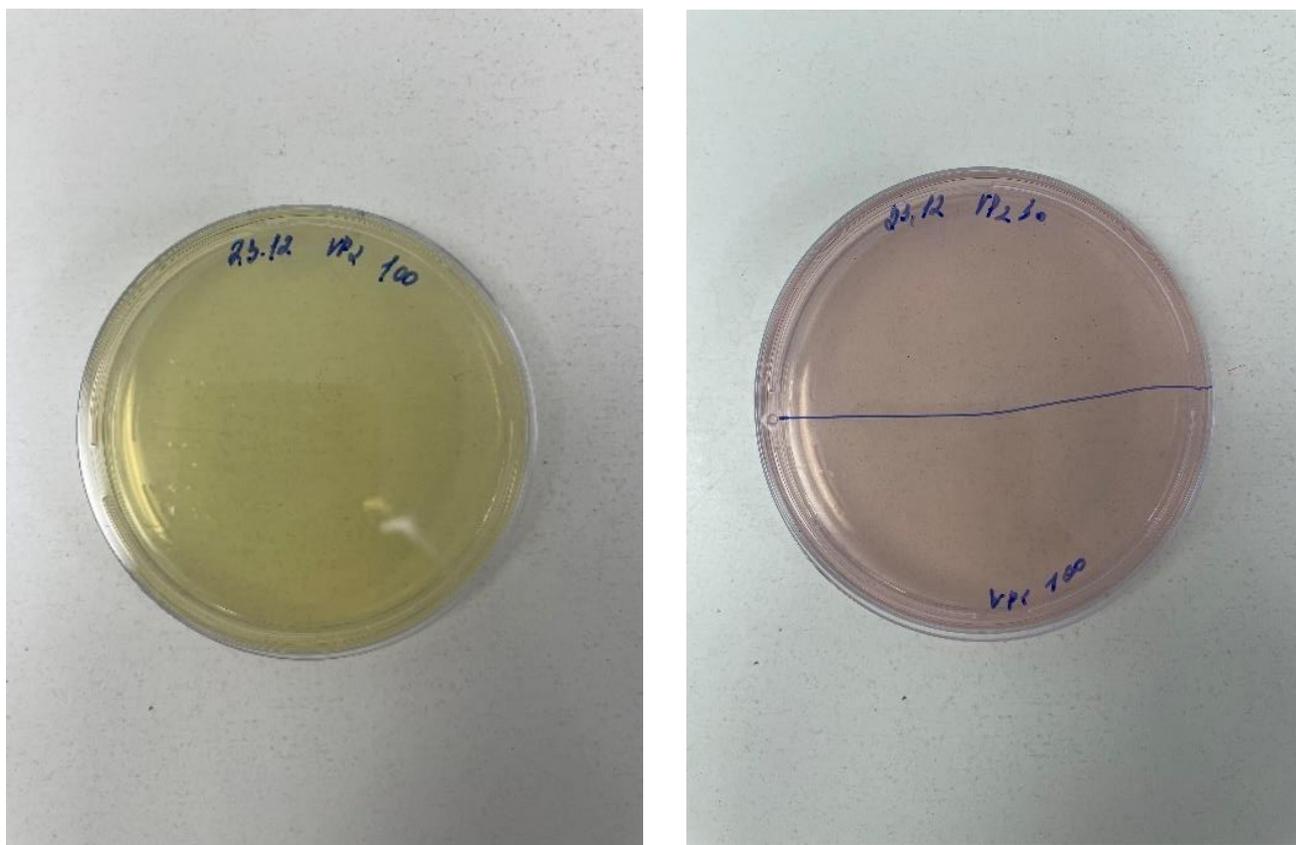


Рисунок 17 - Определение стерильности рекомбинантной вакцины против инфекционной бурсальной болезни на МПА (слева) и Эндо (справа).

По истечении указанного срока делали пересев, за исключением посевов на МПА. Пересевали пробы на те же питательные среды и в тех же объемах, что и при посеве. Вторичные посевы выдерживали 7 суток (агар Сабуро - 14 суток).

Установлено, что высевы лабораторных серий вакцины были свободны от контаминации бактериями и грибами.

2.2.6. Определение бурсального индекса и безвредности

Бурсальный индекс в опытной группе № 1 в возрасте 40 дней составил 6,3, в опытной группе № 2 - 6,9; в опытной группе № 3 - 5,4 в контрольной группе – 6,1. В норме индекс бурсы у трех-четырех недельных цыплят должен быть в пределах 3 - 7.

Иммунодепрессивное состояние характеризуется индексом бурсы меньше 3-х. Эти показатели говорят об отсутствии воспаления и атрофии бурсы Фабрициуса, что указывает на безопасность рекомбинантной вакцины.



Рисунок 18 - Проведения эктомии бурсы у цыплят в возрасте 40 дней.

Безвредность вакцины проверяли на пяти цыплятах введением 5-кратной прививной дозы (0,5 см³) подкожно в нижнюю треть шеи. За птицей вели

наблюдение в течение 21 сут. Результаты контроля показали, что образцы вакцины не вызывали воспалительных реакций в месте введения препарата в течение периода наблюдения, что подтверждает их безвредность

3. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

Птицеводство в России сегодня - одна из самых перспективных и быстроразвивающихся отраслей в сельском хозяйстве. Одновременно с ростом поголовья птицы появляется потенциальная возможность возникновения заразных и незаразных болезней. Основную опасность для птицефабрик представляют вирусные инфекционные болезни, которые наносят значительный экономический ущерб, обусловленный уменьшением объема продукции в результате снижения прироста живой массы и падежа поголовья [17]. Поддержание высокого уровня сохранности поголовья птиц в условиях современной птицефабрики возможно только в результате планирования и реализации комплекса ветеринарных мероприятий, в том числе обязательного элемента – специфической профилактики, эффективность которой напрямую зависит от выбора вакцин и схем их применения [7].

В промышленном птицеводстве, в том числе в связи с активным импортом птицы, одной из актуальных задач является профилактика инфекционной бурсальной болезни кур (ИББ, инфекционный бурсит, болезнь Гамборо), которая широко распространена и к настоящему времени зарегистрирована во всех странах мира. По данным Jackwood D.J. зараженность стад колеблется в широких пределах и достигает значения более 50% [101]. Течение ИББ сопровождается высокими показателями экономического ущерба от падежа и иммуносупрессии [1].

По мнению Джавадова Э.Д. разработка схем лечения ИББ затруднена в связи с вирусной этиологией болезни и особенностями ее течения, а единственный эффективный способ борьбы – специфическая профилактика [18]. Наиболее распространенными средствами против ИББ являются живые вирусвакцины, основу которых составляют ослабленные или аттенуированные варианты вируса [26]. Но применение этих вакцин у молодняка кур, по мнению Алиева А.С. [2], вызывает состояние иммунодепрессии, которое приводит к отрицательным показателям таким как: увеличение падежа, в основном из-за

колибактериоза, уменьшением набора массы и низким уровням антител после вакцинации птиц против Ньюкаслской болезни, болезни Марека, инфекционного бронхита кур.

Также, по мнению Pitcovski J., [141] массовое производство вакцины против ИББ часто требует закупку цыплят и куриных эмбрионов для размножения вируса; следовательно, альтернативные методы производства антигена с использованием прокариот или эукариот могут иметь положительный эффект как в плане благополучия животных, так и в плане затрат на производство вакцин [170,141].

В связи с этим возрастает интерес к инактивированным и рекомбинантным вакцинам, которые не вызывают иммуносупрессию и являются более безопасными.

Но, по мнению Pitcovski J. [141], существует несколько преимуществ рекомбинантной вакцины над инактивированной. Во-первых, рекомбинантная вакцина производится в ферментере, в то время как некоторые инактивированные вакцины производятся с использованием СПФ-цыплят. Процесс ферментации устраняет необходимость заражать животных для размножения вируса. Во-вторых, рекомбинантная вакцина не содержит остаточного биологического материала, полученного из бурсы, например, патогенных микроорганизмов, которые могут заразить вакцинированных птиц и, по мнению Macreadic I.G. [123], ее производство является более эффективным и менее дорогостоящим.

Для производства рекомбинантных вакцин против инфекционной бурсальной болезни больше всего подходит белок оболочки этого вируса (VP2). По мнению Mundt, E. [133], VP2 является основным антигеном вируса ИББ, защищающим птиц; он имеет высокую конформационную зависимость с тремя независимыми эпитопами, ответственными за индукцию нейтрализующих антител.

Поэтому на базе Научно-исследовательского консультативно-диагностического центра по птицеводству ФГБОУ ВО «СПбГУВМ» была

разработана рекомбинантная вакцина против инфекционной бурсальной болезни. Вакцина представляет собой субстанцию, состоящую из рекомбинантного белка VP2, дрожжевой среды и адьюванта (ГОА), предназначена для вакцинации цыплят промышленных кроссов.

Так как сообщения ряда авторов [32,43] указывают на антигенную неоднородность штаммов вируса ИББ, выделенных в России и других странах, с чем связывают неудачи применения существующих вакцин при профилактике заболевания, поэтому для создания и успешного применения рекомбинантных вакцин был изучен эпизоотический штамм «Синявинский», выделенный на территории Российской Федерации.

Для этого было проведено Сэнгеровское секвенирование нуклеотидной последовательности гена VP2 с праймерами M13 сравнение нуклеотидной последовательности гена VP2 штамм «Синявинский» с известными последовательностями гена VP2, находящихся в международной базе (GenBank: KJ699103.1). Результатом проведенного анализа было то, что данная последовательность имеет десять нуклеотидных замен. Девять из них оказались молчащие и не приводят к изменению аминокислотной последовательности белка, но последняя приводит к замене фенилаланина (F) на лейцин (L).

Также был приведён генетический анализ последовательности гена белка VP2 вируса инфекционной бурсальной болезни штамма «Синявинский», который антигенно родственен эталонному штамму «52/70», с последовательностями классических и высоковирулентных штаммов.

Из данных дендронграммы (рис. 11) можно увидеть, что исследуемый штамм «Синявинский» является близкородственным близкородственным к высоковирулентным штаммам, выделенных на территории Российской Федерации и штамму 52/70, который выделен у больных цыплят в Англии и описан А.С. Выgrave и J.T Faragher в 1970 г [101], что подтверждает данные Алиевой А. К. [5] о антигенной идентичности этих штаммов. Максимальную степень отличия от всех представленных штаммов имеют штаммы Cu-1, Ga-1,

D78, STC. Обособленность данных штаммов, вероятно, может объясняться их относительно давним сроком выделения и использование этих штаммов в производстве вакцин, которые редко применялись на территории Российской Федерации. Также понятна высокая степень отличия штамма «Синявинский» от штамма 23/82, ведь он относится к 2-му серотипу вируса инфекционной бурсальной болезни.

Похожие данные были получены Щербаковой Л.О., которая так же использовала вариабельную область VP2 для филогенетического анализа, что позволяет нам сделать вывод о том, что эпизоотический штамм «Синявинский» генетически ближе к высоковирулентным штаммам и классическому штамму «52/70» вируса ИББ, выделенным при появлении болезни в Европе, чем к другим классическим штаммам [43].

Также по мнению Щербаковой Л.О. все штаммы вируса ИББ можно разделить по группам [44]. Группа I является наиболее многочисленной и объединяет большинство российских изолятов и изоляты, выделенные в разных регионах мира во время вспышек ИББ, характеризующихся острым течением болезни и высоким уровнем смертности. Высоковирулентные изоляты DV86 (Голландия), 661 и 74/89А (Великобритания), выделенные во время первых вспышек ИББ, имеют высокую степень гомологии с изолятами, выделенными впоследствии в самых разных регионах мира. Предполагается, что высоковирулентные штаммы проникли из Европы в Азию и там широко распространились, практически не изменяясь. К этой группе можно отнести и эпизоотический штамм «Синявинский», так как данный штамм, выделен во время острой вспышки на птицеводческом предприятии Российской Федерации и по нашим данным был близкородственен к высоковирулентным штаммам.

II группа включает аттенуированные вакцинные штаммы BUR706, CU-1 и ряд других, генетически близких к ним вакцинных штаммов. К этой группе относятся и шесть российских изолятов. Интересно отметить, что апатогенные изоляты, относящиеся к этой группе, выделяют в разных странах, что, вероятно,

связано с широким применением данных вакцин. Эти данные согласуются с нашими, так как эпизоотический штамм «Синявинский» имел максимальную степень отличия от штамма Cu-1. Выделенные несколько десятилетий назад классические вирулентные штаммы относятся к группе III. Группа IV включает антигенные варианты, выделенные в Америке в конце 80-х гг. Наиболее удаленную от всех остальных групп штаммов (V) формируют изоляты, выделенные в Австралии, что, вероятно, можно объяснить географической изоляцией и строгими ограничениями на импорт птицы, введенными в этой стране [43].

Известно, что синтез гетерологичных белков в *P. pastoris* является быстрым, простым и недорогим [63]. По сравнению с широко используемыми системами экспрессии дрожжи *Pichia pastoris* имеют множество преимуществ. По мнению Cereghino J.L. *P. pastoris* легче поддаются генетическим манипуляциям и культивированию, чем клетки млекопитающих, к тому же могут быть выращены до высокой плотности клеток [58]. А по мнению Daly R. *P. pastoris* является эукариотом, а посттрансляционные модификации, такие как гликозилирование, образование дисульфидных связей и протеолитическая обработка, необходимы для большинства белков [68]. Также эти авторы отмечают, что система экспрессии *P. pastoris* может производить чужеродные белки на высоком уровне, благодаря использованию сильного промотора, оптимизированных кодонов и экспрессии, оптимизированных кодонов и конструирования мультиэкспрессионных кассет, как внутриклеточно, так и внеклеточно.

И, по мнению Resina D. дрожжевые системы имеют более низкую стоимость, легко ферментируются и пригодны для использования в коммерческом производстве вакцин [144].

Поэтому в работе была использована экспрессионная система дрожжей *P. pastoris*. Для синтеза рекомбинантного белка использовали полученный штамм дрожжей *P. pastoris* VP2-GS115.

В итоге было показано, что белок VP2 секретированный дрожжами *P. pastoris* штаммом VP2-GS115 был получен. Но также была отмечена агрегация белка VP2, связанная с кипячением проб в присутствии SDS, которое проводили перед электрофорезом. После опущения этого этапа можно было увидеть, что в исходной культуральной среде белок VP2 либо находится в виде мономера, либо представляет собой агрегаты гораздо большего размера. Затем среду с рекомбинантным белком VP2 концентрировали и использовали для последующей иммунизации.

Стоит отметить, что не случайно для иммунизации птиц использовали именно среду дрожжей, а не чистый белок, поскольку, по мнению Gaboardi G.C. [81], иммунизация животных с использованием среды дрожжей *P. pastoris* приводит к модулированию иммунной системы птиц, повышая титры антител на вакцинацию против болезни Ньюкасла и Гамборо по сравнению с контролем.

Также было проведено исследование рекомбинантной вакцины на антигенную активность, стерильность, безвредность и установление оптимальной концентрации рекомбинантного белка в вакцине. Для этого цыплят кур-несушек кросса Lohmann Brown и Lohmann White вакцинировали рекомбинантной вакциной против инфекционной бурсальной болезни с различными концентрациями рекомбинантного белка VP2 в составе вакцины (1 мкг/мл, 0,2 мкг/мл и 0,04 мкг/мл).

Средний титр антител на первые сутки составлял более 5000, что говорит о не высоком титре материнских антител, поэтому и титры на 14 день были не такими высокими. По литературным данным период активного снижения титра антител в крови у суточных цыплят занимает до первых трех недель жизни [110]. В основе расчета сроков вакцинации лежат закономерности элиминации материнских антител - равномерное снижение титра антител до нулевой отметки. Снижение уровня антител вдвое осуществляется за определенный период времени. Этот промежуток времени называется периодом полураспада (ПП). Данная величина определена в лабораторных условиях. Она зависит от уровня

метаболизма и интенсивности роста птицы. Для несушек период полураспада составляет пять дней, родителей несушки – пять-пять с половиной дней, для бройлеров – три – три с половиной дня, родителей бройлеров – четыре с половиной дня [23].

Итоговые титры на 40 день показали действие вакцины только в первой группе, так они были на уровне 600, хотя на 14 день уже опускались к 100.

Для того чтобы убедиться в том, что антитела вырабатываются именно на рекомбинантный белок, был закуплен ИФА набор ID-Vet (ID Screen IBD VP2) и повторно проведен анализ титров антител. Титры антител в первой группе были существенно выше, чем группе №2 и №3 и составляли 1664 ± 100 , поэтому был сделан вывод, что оптимальной концентрацией белка является 1 мкг/мл.

Можно сделать вывод, что количество рекомбинантного белка существенно влияет на поствакцинальный иммунитет и следующие опыты нужно проводить с большими концентрациями рекомбинантного белка VP2.

По мнению Алиевой А.К. [4], при титре антител в ИФА ниже 1:500 процент защиты цыплят невысокий, а при уровне 1:850 и выше наблюдается высокая степень устойчивости птицы к заражению вирулентным штаммом вируса ИББ. Поэтому рекомбинантная вакцина вызывала защитные титры антител против инфекционной бурсальной болезни.

Исследования по изучению стерильности рекомбинантной вакцины проводили по ГОСТ 28085-2013. Установлено, что высевы лабораторных серий вакцины были свободны от контаминации бактериями и грибами.

Безвредность вакцины проверяли по Н.Д. Stone (1997г.) [154]. Все куры в течение указанного времени остались живыми, без видимых клинических признаков переболевания и в месте введения вакцины отсутствовали воспалительные реакции в течение периода наблюдения.

Завершая обсуждение результатов проведенных исследований можно сделать вывод, что разработана технология производства рекомбинантной вакцины против инфекционной бурсальной болезни. Рекомбинантная вакцина

против ИББ на основе белка VP2 является безвредной и стерильной, обладает выраженной антигенной активностью, создает иммунитет к вирусу инфекционной бурсальной болезни, а также после дополнительных опытов и широких клинических испытаний может быть рекомендована к применению в ветеринарной практике.

4. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Разработана рекомбинантная вакцина против инфекционной бурсальной болезни, представляющая собой субстанцию, состоящую из рекомбинантного белка VP2, дрожжевой среды и адьюванта (ГОА), предназначенная для вакцинации цыплят промышленных кроссов.

2. Изучена нуклеотидная последовательность гена VP2 вируса инфекционной бурсальной болезни штамма «Синявинский», который более близкородственен к высоковирулентным штаммам, выделенным на территории Российской Федерации и к классическому штамму «52/70» вируса ИББ.

3. Разработан алгоритм получения рекомбинантного белка VP2 вируса инфекционной бурсальной болезни размером 40 кДа и синтезирован на дрожжах *Pichia pastoris*.

4. Подобраны праймеры для амплификации гена VP2 вируса инфекционной бурсальной болезни (прямой VP2- EcoRI -F и обратный VP2- XbaI-R):

- VP2- EcoRI -F 5' - AgaattcATGACAAACCTGCAAGATCA-3'

- VP2- XbaI-R 5' - AtctagaAATGCTCCTGCAATCTTCAG -3'

5. Разработан алгоритм изготовления рекомбинантной вакцины против инфекционной бурсальной болезни, заключающийся во встраивании плазмидной ДНК с участком нуклеотидной последовательности белка VP2 вируса ИББ в дрожжевые клетки *Pichia pastoris*, с последующим синтезом и очисткой его.

6. Рекомбинантная вакцина против инфекционной бурсальной болезни вызывает выработку вируснейтрализующих антител в организме цыплят кур-несушек через три недели после вакцинации (средний титр 1600 в иммуноферментном анализе).

7. Установлена концентрация белка в рекомбинантной вакцине против инфекционной бурсальной болезни, которая вызывает защитный иммунитет к ИББ у иммунизированных кур - 1 мкг/мл в объеме 0,1 см³.

8. Рекомбинантная вакцина против инфекционной бурсальной болезни не вызывает иммуносупрессию в бурсе Фабрициуса у цыплят кур-несушек и воспалительных реакций в месте введения пятикратной дозы препарата (0,5 см³) в течение 21 дня наблюдения.

ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ

Основные положения работы и ее практические результаты рекомендуется использовать в схеме лечебно-профилактических мероприятий птицеводческих хозяйств, а также для хозяйств, имеющих низкие показатели сохранности и продуктивности птицы.

Рекомендуем проведение производственных испытаний на птицефабриках с целью производства на территории Российской Федерации и импортозамещению существующих коммерческих вакцин.

Рекомендуем использовать рекомбинантный белок VP2 вируса ИББ для производства и разработки наборов ИФА на определение антител на векторные и рекомбинантные вакцины.

Рекомендуем для производства и применения рекомбинантных вакцин против инфекционной бурсальной болезни, на основе белка VP2, использовать штаммы, выделенные на территории Российской Федерации (эпизоотический штамм «Синявинский», 641_Russia, 716_Russia, 630_Russia, 727_Russia, 713_Russia) либо классический штамм «52/70».

Использовать технологию получения рекомбинантного белка VP2 вируса ИББ, включающую выделение нуклеотидной последовательности белка VP2 и встраивание в плазмиду, с последующей трансформацией дрожжевых клеток и синтеза его для производства вакцин нового поколения в промышленном птицеводстве.

ПРЕСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ

Полученные данные позволяют в дальнейшем разработать нормативно-техническую документацию (НТД) для регистрации вакцины. Это позволит проводить широкие производственные испытания рекомбинантной вакцины против инфекционной бурсальной болезни, с последующим производством на биопредприятии и применением на птицефабриках.

Кроме того, использование рекомбинантных белков вируса ИББ, которые не присутствуют в векторных или рекомбинантных вакцинах (например, использование антигена VP3 в ИФА), позволило бы реализовать стратегию DIVA, при которой птице, вакцинированные векторной или рекомбинантной субъединичной вакцинами (например, без анти-VP3 антител) могут быть дифференцированы от инфицированных животных (например, с анти-VP3 антителами), в соответствии с принципом DIVA.

Перспективным является также разработка и изучение рекомбинантных вакцин против других вирусных и бактериальных болезней сельскохозяйственной птицы (ньюкаслской болезни, инфекционного бронхита кур, синдрома снижения яйценоскости и прочих).

БЛАГОДАРНОСТЬ

Работа была выполнена на базе ФГБОУ ВО СПбГУВМ, поэтому хочется выразить особую благодарность моему научному руководителю Джавадову Э.Д. за большой вклад в работу и за большое количество полученного опыта в сфере инфекционной патологии птиц. Также хочу поблагодарить коллектив НКДЦ по птицеводству Тарлавина Н.В. и Вихреву И.Н. за помощь в проведении всех этапов работы. Также особую благодарность выражаю научному коллективу биологического факультета кафедры генетики и биотехнологии ФГБОУ ВО СПбГУ Румянцеву А.М. и Падкиной М.В. за получение опыта в сфере молекулярной биологии и биотехнологии.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- А.о. - аминокислотный остаток
- БГ - болезнь Гамборо
- БИ - бурсальный индекс
- БМ - болезнь Марека
- ВБГ - вирус болезни Гамборо
- ВВ - штаммы высоковирулентные штаммы
- ВИББ - вирус инфекционной бурсальной болезни
- ВНА - вируснейтрализующие антитела
- ГОА гель гидроокиси алюминия
- ДСН - додецилсульфат натрия
- Дц РНК - двухцепочечная рибонуклеиновая кислота
- ИББ - инфекционная бурсальная болезнь
- ИБК - инфекционный бронхит кур
- Ипс - изопропиловый спирт
- ИФА - иммуноферментный анализ
- кДНК - ДНК копия с РНК-матрицы
- кДа - килодальтон
- КФ - кислая фосфатаза
- КЭ - куриные эмбрионы
- МБ - масса бурсы/грамм
- МТ - масса тела/грамм.
- МА - материнские антитела
- МАТ - моноклональные антитела
- МПА - мясо-пептонный агар
- МПБ - мясо-пептонный бульон
- МППБ - мясо-пептонный печеночный бульон
- НБ - Ньюкаслская болезнь
- ОТ-ПЦР - обратнo-транскриптазная полимеразная цепная реакция

Пааг - полиакриламидный гель
ПКЭ - культура клеток почки куриного эмбриона
П.н. - пар нуклеотидов
ПЭГ - полиэтиленгликоль
РН - реакция нейтрализации
РТГА - реакция торможения гемагглютинации
РФ - Российская Федерация
СПФ - аббревиатура от англ. Specific-pathogen-free (свободные от специфических патогенов)
ССЯ-76 - синдром снижения яйценоскости
ТАЕ - Трис-ацетатный буфер
ФЭК - фибробласты эмбрионов японских кур
ЦПЭ - цитопатический эффект
ЦИК - циркулирующие иммунные комплексы
ХАО - хориоаллантаисная оболочка
АОХ1 - (промотор алкоголь оксидазы)
BSNV -пятнистый вирус змееголова
CPNV -вирус преджелудочкового некроза цыплят
RdRp - РНК-зависимую РНК-полимеразу
Sds - додецилсульфат натрия
Bsa – бычий сывороточный альбумин
Fld - формальдегиддегидрогеназа
Fda - Управление по контролю за продуктами питания и лекарствами

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Алиев А.С. Болезнь Гамборо у бройлеров / А.С. Алиев, Ф.С. Кудрявцев, А.М. Калашников // Сб. науч. трудов/ ВНИТИП. М., 1989. № 5. С. 33-38.
2. Алиев А.С. Инфекционная бурсальная болезнь / А.С. Алиев // СПб., 2010. – 250 с.
3. Алиев А.С. Реакция непрямой гемагглютинации при инфекционном бурсите кур / А.С. Алиев, Э.Д. Джавадов, М.М. Леонтьева, Э.М. Амдий // Тезисы докладов Всесоюзной научно-производственной конференции “Комплексная система ветеринарных мероприятий в птицеводстве - резерв повышения эффективности производства”. – Л. – 1989. - С. 16-18.
4. Алиева А. К. Иммунобиологические свойства живой вакцины против инфекционной бурсальной болезни птицы / А. К. Алиева, В. И. Смоленский // Птица и птицепродукты. – 2011. – № 4. – С. 16-18.
5. Алиева А. К. Эпизоотологические аспекты проявления бирновиральной инфекции птиц / А. К. Алиева, А. С. Алиев // Международный вестник ветеринарии. – 2011. – № 3. – С. 6-10.
6. Бакулин В. А. Патоморфогенез и патоморфологическая диагностика инфекционной бурсальной болезни птиц: специальность 16.00.02: автореферат диссертации на соискание ученой степени доктора ветеринарных наук / Бакулин Валерий Александрович. – Санкт-Петербург, 1992. – 35 с.
7. Бакулин В.А. Болезни птиц / В.А. Бакулин. – СПб., 2006. – 762 с.
8. Бирман Б.Я. Инфекционная бурсальная болезнь [Эпизоотология, этиология, патогенез, клинические признаки, диагностика, меры борьбы и патанатомия вирусной высоконтагиозной болезни цыплят 3-6 недельного возраста. / Б.Я. Бирман // Минск; 2003. 111 с.
9. Борисов А.В. Разработка мер по диагностике и профилактике инфекционной бурсальной болезни (ИББ) птиц в птицеводческих хозяйствах Российской Федерации / А.В. Борисов, А.А. Гусев // Проблемы инфекционной патологии с/х животных: Тез. докл. Конф., посвящ. 100 – летию открытия вируса ящура. – Владимир, 27-31 октября 1997. – Владимир. – 1997. - С. 139-140.
10. Борисов А.В. Разработка средств и методов диагностики и специфической профилактики инфекционной бурсальной болезни: специальность 16.00.02: автореферат диссертации на соискание ученой степени доктора ветеринарных наук / Борисов Александр Владимирович - Владимир, 2000. – 58 с.

11. Борисов В.В. Инактивированные вакцины – возможные варианты применения в промышленном птицеводстве / В.В. Борисов, А.В. Борисов, С.К. Старов и др. // Материалы конф. по птицеводству. – М., 2003. – С. 208-209.
12. Будченко А.А. Новые принципы вакцинопрофилактики для достижения высокой сохранности и продуктивности / А.А. Будченко, Ф.И. Полежаев, Э.Д. Джавадов // Ветеринарный вестник Одесщины. - май 2002. - С.2
13. Веретенников В. В. Особенности разработки рекомбинантной вакцины против инфекционной бурсальной болезни / В. В. Веретенников, Э. Д. Джавадов, Н. В. Тарлавин // Мировое и российское птицеводство: состояние, динамика развития, инновационные перспективы : Материалы XX Международной конференции, Сергиев Посад, 08–10 октября 2020 года / Российское отделение Всемирной научной ассоциации по птицеводству, НП "Научный центр по птицеводству". – Сергиев Посад: Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт птицеводства, 2020. – С. 609-610.
14. Веретенников В. В. Применение рекомбинантной вакцины против инфекционной бурсальной болезни / В. В. Веретенников, Н. В. Тарлавин // Материалы национальной научной конференции профессорско-преподавательского состава, научных сотрудников и аспирантов СПбГУВМ, Санкт-Петербург, 25–29 января 2021 года. – Санкт-Петербург: Санкт-Петербургский государственный университет ветеринарной медицины, 2021. – С. 24-25.
15. Веретенников В.В. Использование рекомбинантного белка VP2 в качестве субъединичной вакцины против инфекционной бурсальной болезни / В.В. Веретенников, Э.Д. Джавадов, А.М. Румянцев, Н.В. Тарлавин // Международный вестник ветеринарии. – 2021. – № 3. – С. 9-14 – DOI 10.17238/issn2072-2419.2021.3.9.
16. Верховский О.А. Иммуноферментные тест-системы для оценки иммунного статуса птиц / О.А. Верховский, Т.А. Тимофеева, С.Л. Кальнов // Био. – 2004. - № 5. – С. 31.
17. Гусева Е.В. Вирусные болезни кур: обзор литературы/ Е.В.Гусева, Т.А. Сатина. - Владимир: ОКНИИиМС, 1999.- 59С.
18. Джавадов Э. Д. Вирус-индуцированные иммуносупрессии и способы их предупреждения в промышленном птицеводстве: специальность 16.00.03: автореферат диссертации на соискание ученой степени доктора ветеринарных наук / Джавадов Эдуард Джавадович. – Москва, 2004. – 49 с.

19. Джавадов Э. Д. Использование инактивированных вакцин для профилактики инфекционной бурсальной болезни / Э. Д. Джавадов, А. И. Иванов, Ф. С. Кудрявцев // Ветеринария. – 2002. – № 5. – С. 22-26.
20. Джавадов Э. Д. Особенности применения иммунокомплексной вакцины против инфекционной бурсальной болезни / Э. Д. Джавадов, Н. В. Тарлавин, В. В. Веретенников // Мировое и российское птицеводство: состояние, динамика развития, инновационные перспективы : Материалы XX Международной конференции, Сергиев Посад, 08–10 октября 2020 года / Российское отделение Всемирной научной ассоциации по птицеводству, НП "Научный центр по птицеводству". – Сергиев Посад: Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт птицеводства, 2020. – С. 607-608.
21. Джавадов Э. Д. Особенности разработки рекомбинантной вакцины против инфекционной бурсальной болезни / Э. Д. Джавадов, В. В. Веретенников, Н. В. Тарлавин // Мировое и российское птицеводство: состояние, динамика развития, инновационные перспективы : Материалы XX Международной конференции, Сергиев Посад, 08–10 октября 2020 года / Российское отделение Всемирной научной ассоциации по птицеводству, НП "Научный центр по птицеводству". – Сергиев Посад: Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт птицеводства, 2020. – С. 609-610.
22. Джавадов Э. Д. Разработка схемы вакцинации на птицефабриках с учетом технологических особенностей птицеводческих предприятий / Э. Д. Джавадов // Инновации в АПК: проблемы и перспективы. – 2017. – № 4(16). – С. 97-101.
23. Джавадов Э. Прогрессивные методы вакцинопрофилактики / Э. Джавадов // Животноводство России. – 2020. – № S3. – С. 42-45.
24. Джавадов Э.Д. Методические рекомендации по применению иммуноферментного анализа для диагностики инфекционной бурсальной болезни. Э.Д. Джавадов, Ф.С. Кудрявцев, А.С. Алиев и др. Л., 1988. – 14 С.
25. Джавадов Э.Д. Применение иммуноферментного анализа для выявления вируса инфекционного бурсита кур / Э.Д. Джавадов, А.С. Алиев, Ф.С. Кудрявцев и др. // Ветеринария. – 1987. - № 12. – С. 40-42.
26. Джавадов Э.Д. Стандартизация реакции диффузионной преципитации и испытание ее для диагностики болезни Гамборо / Э.Д. Джавадов, А.С. Алиев Ф.С. Кудрявцев, А.Б. Терюханов // Современные методы исследований в животноводстве и птицеводстве. - Л., 1989. - С. 25-26.

27. Джавадова И.М. Реакция агглютинации латекса для диагностики инфекционного бурсита кур / И.М. Джавадова, Ф.С. Кудрявцев, Э.Д. Джавадов // Ветеринария. – 1990. - №12. - С. 30-31.
28. Каргилл П.В. Вакцинирование промышленных стад птицы / П.В. Каргилл, Д. Джонстон // РацВетИнформ. – 2004. - № 2. – С. 11-12.
29. Каргилл П.В. Проблема организации программ вакцинации в промышленном птицеводстве / П.В. Каргилл // Био. – 2004. - № 1. – С. 6-8.
30. Лагуткин Н.А. Инфекционная бурсальная болезнь птиц / Н.А. Лагуткин, И.Ф. Вишняков // Ветеринарная газета. – 1996. - № 14. – С. 4.
31. Луговская Н. Н. Выявление антител к вирусу инфекционной бурсальной болезни в непрямом варианте иммуноферментного анализа с использованием рекомбинантного антигена VP3 / Н. Н. Луговская, И. А. Лебенко, А. В. Щербаков [и др.] // Труды Федерального центра охраны здоровья животных. – 2006. – Т. 4. – С. 172-177.
32. Овчинникова Е. В., Старова А. С., Зиняков Н. Г., Дрыгин В. В. / Сравнение первичной структуры фрагмента гена VP2 вакцинных штаммов и полевых изолятов вируса инфекционной бурсальной болезни кур // Ветеринария и кормление. – 2013. – № 5. – С. 40-42.
33. Остерман Л. А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот: Электрофорез и ультра-центрифугирование: (практическое пособие). / Л. А. Остерман // Наука, 1981.
34. Петрова О. Г. Импортозамещение в организации продовольственной безопасности инфекционных болезней животных / О. Г. Петрова // Агропродовольственная политика России. – 2019. – № 1(85). – С. 39-42
35. Радчук Л.А., Диагностика болезни Гамборо / Л.А. Радчук, Ф.С. Кудрявцев // Ветеринария. - 1980. - № 1. - С. 68-69
36. Санкт-Петербург [Электронный ресурс] // Thermo Fisher Scientific: «RevertAid™FirstStrand cDNA». URL:https://www.thermofisher.com/document/connect/document%20connect.html?url=https%3A%2F%2Fassets.thermofisher.com%2FTFS%20Assets%2FSLSG%2Fmanuals%2FMAN0012716_RevertAid_FirstStrand_cDNA_Syn_K1622_UG.pdf (дата обращения 06.04.2021)
37. Санкт-Петербург [Электронный ресурс] // Евроген: Набор Cleanup Standard. URL: <https://evrogen.ru/kit-user-manuals/BC022.pdf> (дата обращения 06.04.2021)
38. Санкт-Петербург [Электронный ресурс] // Евроген: Набор для быстрого клонирования ПЦР продуктов Quick-TA kit. URL: <https://evrogen.ru/kit-user-manuals/Quick-TA.pdf> (дата обращения 06.04.2021)

39. Скутарь И.Г. Рекомендации по профилактике и борьбе с инфекционным бурситом (болезнью Гамборо). / И.Г. Скутарь, И.В. Грушко, Н.Ф. Талмазан и др. // Кишенев-Агроинформ-реклама., 1993. – 23 С.
40. Стегний Б. Т. Биологические свойства эпизоотического изолята вируса инфекционной бурсальной болезни / Б. Т. Стегний, Е. А. Гаврюшенко, Д. В. Музыка // Эпизоотология, иммунобиология, фармакология и санитария. – 2018. – № 2. – С. 30-36.
41. Тарлавин Н.В. Экспрессия генов IL-6 и IL8L2 в тканях фабрициевой сумки кур-несушек при вакцинации иммунокомплексной вакциной из штамма «ВНИВИП» / Н.В. Тарлавин, В.В. Веретенников, Э.Д. Джавадов, О.В. Козыренко [и др.] // Птица и птицепродукты. – 2021. – № 6. – С. 42-44. – DOI 10.30975/2073-4999-2021-23-6-42-44.
42. Фернандес Д.Ф. Концептуальные основы вакцинопрофилактики инфекционных заболеваний цыплят-бройлеров / Д.Ф. Фернандес, Д. Фурнье // Био. – 2004. - № 7. – С. 6-7.
43. Щербакова Л. О. Молекулярная эпизоотология ИББ в России / Л. О. Щербакова, А. В. Борисов, Ю. А. Бочков, В. В. Дрыгин // Аграрная Россия. – 2002. – № 2. – С. 16-19.
44. Щербакова Л.О. Сравнительный анализ варибельной области гена VP2 вируса инфекционной бурсальной болезни / Л.О. Щербакова // Мол. Генетика, вирусология и микробиология. – 1998. -№1. – С.35 - 40.
45. Abdel-Alim, G., and Y. Saif. 2001. Immunogenicity and antigenicity of very virulent strains of infectious bursal disease viruses. // Avian Dis. 44(1):92–101.
46. Arnold, Marina et al. “Protective vaccination against infectious bursal disease virus with whole recombinant *Kluyveromyces lactis* yeast expressing the viral VP2 subunit.” // *PLoS one* vol. 7,9 (2012): e42870. doi:10.1371/journal.pone.0042870
47. Azad A.A. [и др.]. Deletion mapping and expression in *Escherichia coli* of the large genomic segment of a birnavirus. // *Virology*. 1987.161:145–152.
48. Azad A.A., Barrett S.A., Fahey K.J. The characterization and molecular cloning of the double- stranded RNA genome of an Australian strain of infectious bursal disease virus. // *Virology*. 1985.143:35–44.

49. Bayliss C.D. [и др.]. A comparison of the sequences of segment A of four infectious bursal disease virus strains and identification of a variable region in VP2. // *J Gen Virol.* 1990.71(6):1303–1312.
50. Becht H. [и др.]. Comparative studies on structural and antigenic properties of two serotypes of infectious bursal disease virus. // *J Gen Virol.* 1988.69(3):631–640.
51. Becht H. Infectious bursal disease virus. // *Curr Top Microbiol Immunol.* 1980.90:107–121.
52. Birghan C. [и др.]. A non-canonical lon proteinase lacking the ATPase domain employs the ser-Lys catalytic dyad to exercise broad control over the life cycle of a double-stranded RNA virus. // *Embo J.* 2000.19:114–123.
53. Boot H.J. [и др.]. Rescue of very virulent and mosaic infectious bursal disease virus from cloned cDNA: VP2 is not the sole determinant of the very virulent phenotype. // *J Virol.* 2000.74:6701–6711.
54. Brandt M. [и др.]. Molecular determinants of virulence, cell tropism, and pathogenic phenotype of infectious bursal disease virus. // *J Virol.* 2001. 75:11974–11982.
55. Brown F. The classification and nomenclature of viruses: summary of results of meetings of the International Committee on Taxonomy of Viruses in Sendai. // *Intervirology.* 1986. 25:141–143
56. Bublot M. [и др.]. Use of a vectored vaccine against infectious bursal disease of chickens in the face of high-titred maternally derived antibody. // *Journal of comparative pathology.* 2007. (137 Suppl 1). C. S81-4.
57. Burgers P.M., Percival K.J. Transformation of yeast spheroplasts without cell fusion. // *Anal. Biochem.* 1987. 163, 391–397.
58. Cereghino J.L., Cregg J.M. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* // *FEMS Microbiol Rev* 2000;24(1):45–66.
59. Chevalier C. [и др.]. Structural peptides of a nonenveloped virus are involved in assembly and membrane translocation. // *J Virol.* 2005.79:12253–12263.

60. Chevalier C. J. [и др.]. 2004. The last C-terminal residue of VP3, glutamic acid 257, controls capsid assembly of infectious bursal disease virus. *J Virol.* 78:3296–3303.
61. Cheville N.F. Studies on the pathogenesis of Gumboro disease in the bursa of Fabricius, spleen, and thymus of the chicken. // *Am J Pathol.* 1967.51:527–551.
62. Chui C.H., Thorsen J. Experimental infection of turkeys with infectious bursal disease virus and the effect on the immunocompetence of infected turkeys. // *Avian Dis.* 1984.28:197–207.
63. Clare J. J. [и др.]. High-level expression of tetanus toxin fragment C in *Pichia pastoris* strains containing multiple tandem integrations of the gene. // *Biotechnology (N. Y.)* 1991. 9:455–460.
64. Cosgrove A. S. An apparently new disease of chickens-avian nephrosis. // *Avian Dis.* 1962. 6:385-389.
65. Coulibaly F. [и др.]. The birnavirus crystal structure reveals structural relationships among icosahedral viruses. // *Cell.* 2005. 120:761–772.
66. Cullen G.A., Wyeth P.J. Letter: Quantitation of antibodies to infectious bursal disease. // *Vet Rec.* 1975. 97:315.
67. Da Costa [и др.]. The capsid of infectious bursal disease virus contains several small peptides arising from the maturation process of pVP2. // *J Virol.* 2002. 76:2393–2402.
68. Daly R., Hearn M.T. Expression of heterologous proteins in *Pichia pastoris*: a useful experimental tool in protein engineering and production. // *J Mol Recognit* 2005;18(Mar–April (2)):119–38
69. De Schutter [и др.]. Genome sequence of the recombinant protein production host *Pichia pastoris*. // *Nat. Biotechnol.* 2009. 27, 561–566.
70. De Wit J.J. [и др.]. Validation of five commercially available ELISAs for the detection of antibodies against infectious bursal disease virus (serotype 1). // *Avian Pathol.* 2001.30:543–549.

71. Delmas B. [и др.]. Birnaviridae. In: Virus Taxonomy: Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. // Academic Press, London. 2004.561–569.
72. Dobos P. [и др.]. Biophysical and biochemical characterization of five animal viruses with bisegmented double-stranded RNA genomes. // J Virol. 1979.32:593–605.
73. Dobos P. Peptide map comparison of the proteins of infectious bursal disease virus. // J Virol. 1979. 32:1047–1050.
74. Dohms J.E. [и др.]. Plasma cell changes in the gland of Harder following infectious bursal disease virus infection of the chicken. // Avian Dis. 1981. 25:683–695.
75. Edgar S. A. Infectious bursal disease (Gumboro disease) prevention and control. // 10th Annual Poultry Health and Management Short Course, Clemson, South Carolina. 1966. pp. 93-98.
76. Edgar S. A., Cho Y. The epizootiology of infectious bursal disease and prevention of it by immunization. // Dev. Biol. Standard. 1976. 33:349-356.
77. Eterradossi N. C. [и др.]. Critical amino acid changes in VP2 variable domain are associated with typical and atypical antigenicity in very virulent infectious bursal disease viruses. // Arch Virol. 1998. 143:1627–1636.
78. Fahey K.J., Erny K., Crooks J. A conformational immunogen on VP-2 of infectious bursal disease virus that induces virus-neutralizing antibodies that passively protect chickens. // J Gen Virol. 1989. 70(6):1473–1481.
79. Fahey K.J. [и др.]. Virus-neutralizing and passively protective monoclonal antibodies to infectious bursal disease virus of chickens. // Avian Dis. 1991.35:365–373.
80. Feldman A.R., Lee J., Delmas B. Crystal structure of a novel viral protease with a serine/ lysine catalytic dyad mechanism. // J Mol Biol. 2006. 358:1378–1389.
81. Gaboardi G.C. [и др.]. Influence of *Pichia pastoris* X-33 produced in industrial residues on productive performance, egg quality, immunity, and intestinal

- morphometry in quails. // *Sci Rep* **9**. 2019. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-51908-0>
82. Garriga D. [и др.]. Activation mechanism of a noncanonical RNA-dependent RNA polymerase. // *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007. 104:20540–20545.
 83. Garriga D. [и др.]. The 2.6-Angstrom structure of infectious bursal disease virus-derived T=1 particles reveals new stabilizing elements of the virus capsid. // *J Virol*. 2006. 80:6895–6905.
 84. Gay L., Mundt E. Testing of a new disinfectant process for poultry viruses. // *Avian Dis*. 2010.54:763–767.
 85. Goodman M. Market watch: Sales of biologics to show robust growth through to 2013. // *Nat. Rev. Drug Discov*. 2009. 8, 837.
 86. Gorbalenya A.E. [и др.]. The palm subdomain- based active site is internally permuted in viral RNA- dependent RNA polymerases of an ancient lineage. // *J Mol Biol*. 2002. 324:47–62.
 87. Gough R.E. [и др.]. Isolation of birnavirus and reovirus-like agents from penguins in the United Kingdom. // *Vet Rec*. 2002. 151:422–424.
 88. Granzow H. [и др.]. A second form of infectious bursal disease virus-associated tubule contains VP4. // *J Virol*. 1997. 71:8879–8885.
 89. Guan J. [и др.]. Infectious bursal disease virus as a surrogate for studies on survival of various poultry viruses in compost. // *Avian Dis*. 2010.54:919–922.
 90. Hanahan D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids // *Journal of molecular biology*. – 1983. – Т. 166. – №. 4. – С. 557-580.
 91. Hartner F.S., [и др.]. Promoter library designed for fine-tuned gene expression in *Pichia pastoris*. // *Nucleic Acids Res*. 2008. 36, e76.
 92. Heine H.G. [и др.]. Sequence analysis and expression of the host-protective immunogen VP2 of a variant strain of infectious bursal disease virus which can circumvent vaccination with standard type I strains. // *J Gen Virol*. 1991. 72(8):1835–1843.
 93. Hon C.C. [и др.]. Phylogenetic evidence for homologous recombination within the family Birnaviridae. // *J Gen Virol*. 2008. 89:3156–3164.

94. Hon C.C. [и др.]. Phylogenetic analysis reveals a correlation between the expansion of very virulent infectious bursal disease virus and reassortment of its genome segment B. // *J Virol*. 2006.80:8503–8509.
95. Hudson P.J., McKern N.M., Power B.E. Genomic structure of the large RNA segment of infectious bursal disease virus. // *Nucleic Acids Res*. 1986. 14:5001–5012
96. Irigoyen N. [и др.]. Autoproteolytic activity derived from the infectious bursal disease virus capsid protein. // *J Biol Chem*. 2009.284:8064–8072.
97. Islam M.R., Zierenberg K., Muller H. The genome segment B encoding the RNA-dependent RNA polymerase protein VP1 of very virulent infectious bursal disease virus (IBDV) is phylogenetically distinct from that of all other IBDV strains. // *Arch Virol*. 2001.146:2481–2492
98. Ismail N.M., Saif Y.M. Immunogenicity of infectious bursal disease viruses in chickens. // *Avian Dis*. 1991.35:460–469.
99. Ivanyi J. Immunodeficiency in the chicken. II. Production of monomeric IgM following testosterone treatment or infection with Gumboro disease. // *Immunol*. 1975. 28:1015–1021.
100. Ivanyi J., Morris R. Immunodeficiency in the chicken. IV. An immunological study of infectious bursal disease. // *Clin Exp Immunol*. 1976. 23:154–165.
101. Jackwood D.J. Advances in vaccine research against economically important viral diseases of food animals: Infectious bursal disease virus. // *Vet Microbiol*. 2017 Jul;206:121-125. doi: 10.1016/j.vetmic.2016.11.022. Epub 2016 Nov 22. PMID: 27916318.
102. Jackwood D.J., Saif Y.M., Hughes J.H. Nucleic acid and structural proteins of infectious bursal disease virus isolates belonging to serotypes I and II. // *Avian Dis*. 1984. 990–1006.
103. Jackwood D.J., Sommer-Wagner S.E. Detection and characterization of infectious bursal disease viruses in broilers at processing. // *Prev Vet Med*. 2010. 97:45–50.

104. Jackwood D.J., Sommer-Wagner S.E., Pharo H.J. The use of gamma irradiation for the inactivation of infectious bursal disease virus. // *Avian Dis.* 2007. 51:606–608.
105. Jagadish M.N., Azad A.A. Localization of a VP3 epitope of infectious bursal disease virus. // *Virology.* 1991. 184:805–807
106. Jeon W.J. [и др.]. Very virulent infectious bursal disease virus isolated from wild birds in Korea: epidemiological implications. // *Virus Res.* 2008.137:153–156.
107. Kasanga C.J. [и др.]. Detection of infectious bursal disease virus (IBDV) genome in free-living pigeon and guinea fowl in Africa suggests involvement of wild birds in the epidemiology of IBDV. // *Virus Genes.* 2008.36:521–529.
108. Kibenge F.S., Dhillon A., Russell R. Biochemistry and immunology of infectious bursal disease virus. // *J Gen Virol.* 1988.69:1757–1775.
109. Kibenge F.S., Dhillon A., Russell R. Growth of serotypes I and II and variant strains of infectious bursal disease virus in Vero cells. // *Avian Dis.* 1988.298–303
110. Kumar K., Singh K. C., Prasad C. B. Immune responses to intermediate strain IBD vaccine at different levels of maternal antibody in broiler chickens. // *Tropical animal health and production.* 2000. № 6 (32). С. 357–360.
111. Kuroda K. [и др.]. Production of Man5GlcNAc2-type sugar chain by the methylotrophic yeast *Ogataea minuta*. // *FEMS Yeast Res.* 2006. 6, 1052–1062.
112. Lana D.P., Beisel C.E., Silva R.F. Genetic mechanisms of antigenic variation in infectious bursal disease virus: analysis of a naturally occurring variant virus. // *Virus Genes.* 1992. 6:247–259.
113. Le Gros F. [и др.]. Field efficacy trial of a novel HVT-IBD vector vaccine for 1-day-old broilers. // *Vaccine.* 2009.27:592–596.
114. Le Nouen C. [и др.]. Very virulent infectious bursal disease virus: reduced pathogenicity in a rare natural segment-B-reassorted isolate. // *J Gen Virol.* 2006. 87:209–216.

115. Lee C.C. [и др.]. Crystal structure of infectious bursal disease virus VP2 subviral particle at 2.6Å resolution: implications in virion assembly and immunogenicity. // *J Struct Biol.* 2006.155:74–86.
116. Lejal N. [и др.]. Role of Ser-652 and Lys-692 in the protease activity of infectious bursal disease virus VP4 and identification of its substrate cleavage sites. // *J Gen Virol.* 2000. 81:983–992
117. Letzel T. [и др.]. Molecular and structural bases for the antigenicity of VP2 of infectious bursal disease virus. *J Virol.* 2007.81:12827–12835.
118. Liu M., Vakharia V.N. Nonstructural protein of infectious bursal disease virus inhibits apoptosis at the early stage of virus infection. // *J Virol.* 2006. 80:3369–3377.
119. Liu Y., Wei Y., Wu X. Preparation of ChIL-2 and VP2 fusion protein by baculovirus expression system. // *Cellular & Molecular Immunology*, 2005. 2, 231235105
120. Lombardo E. [и др.]. VP5, the nonstructural polypeptide of infectious bursal disease virus, accumulates within the host plasma membrane and induces cell lysis. // *Virology.* 2000.277:345–357.
121. Lombardo E. [и др.]. VP1, the putative RNA- dependent RNA polymerase of infectious bursal disease virus, forms complexes with the capsid protein VP3, leading to efficient encapsidation into virus-like particles. // *J Virol.* 1999.73:6973–6983.
122. Macdonald R.D. Immunofluorescent detection of double-stranded RNA in cells infected with reovirus, infectious pancreatic necrosis virus, and infectious bursal disease virus. // *Can J Microbiol.* 1980. 26:256–261.
123. Macreadic I.G. [и др.]. Passive protection against infectious bursal disease virus by viral VP2 expressed in yeast. // *Vaccine* 1990;8:549–52
124. Maraver A. [и др.]. The oligomerization domain of VP3, the scaffolding protein of infectious bursal disease virus, plays a critical role in capsid assembly. // *J Virol.* 2003.77:6438–6449

125. Marquardt W. [и др.]. An indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for measuring antibodies in chickens infected with infectious bursal disease virus. // *Avian Dis.* 1980.375–385.
126. Mattanovich D. [и др.]. Genome, secretome and glucose transport highlight unique features of the protein production host *Pichia pastoris*. // *Microb. Cell. Fact.* 2009. 8, 29.
127. McFerran J.B. [и др.]. Isolation and serological studies with infectious bursal disease viruses from fowl, turkeys and ducks: demonstration of a second serotype. // *Avian Pathol.* 1980.9:395–404.
128. Mekkes D., Wit J.D. Report of the second international ring trial for Infectious Bursal Disease Virus (IBDV) antibody detection in serum. // *Annual Report and Proceedings 2002 of COST Action. 839: Immunosuppressive Viral Diseases.* 2002. 210–226
129. Morgan M.M. [и др.]. Sequence of the small double-stranded RNA genomic segment of infectious bursal disease virus and its deduced 90-kDa product. // *Virology.* 1988.163:240–242.
130. Müller H. [и др.]. Current status of vaccines against infectious bursal disease. // *Avian Pathol.* 2012.41:133–139
131. Müller H., Nitschke. R. The two segments of the infectious bursal disease virus genome are circularized by a 90,000-Da protein. *Virology.* 159:174–177.
132. Müller H., Scholtissek C., Becht H. The genome of infectious bursal disease virus consists of two segments of double-stranded RNA. // *J Virol.* 1987.31:584–589.
133. Mundt E., Beyer J., Müller H. Identification of a novel viral protein in infectious bursal disease virus-infected cells. // *J Gen Virol.* 1995. 76:437–443.
134. Mundt E., Köllner B., Kretzschmar D. VP5 of infectious bursal disease virus is not essential for viral replication in cell culture. // *J Virol.* 1997.71:5647–5651.

135. Mundt E., Müller H. Complete nucleotide sequences of 5'-and 3'-noncoding regions of both genome segments of different strains of infectious bursal disease virus. // *Virology*. 1995.209:10–18.
136. Nagy E. [и др.]. Mapping of the large RNA genome segment of infectious pancreatic necrosis virus by hybrid arrested translation. // *Virology*. 1987.158:211–217.
137. Nick H., Cursiefen D., Becht H. Structural and growth characteristics of infectious bursal disease virus. // *J Virol*. 1976. 18:227–234.
138. Nusbaum K., Lukert P., Fletcher O. Experimental infections of one-day-old poultts with turkey isolates of infectious bursal disease virus. // *Avian Pathol*. 1988. 17:51–62.
139. Ogawa M. [и др.]. Seroprevalence of infectious bursal disease virus in free-living wild birds in Japan. // *J Vet Med Sci*. 1998. 60:1277–1279.
140. Oppling V., Muller H., Becht H. Heterogeneity of the antigenic site responsible for the induction of neutralizing antibodies in infectious bursal disease virus. // *Archives of Virology*, 1989. 119, 211223.107
141. Pitcovski J. [и др.]. Insect cell-derived VP2 of infectious bursal disease virus confers protection against the disease in chickens. // *Avian Dis*. 1996. 40:753–761.
142. Qi X. [и др.]. An improved method for infectious bursal disease virus rescue using RNA polymerase II system. // *J Virol Methods*. 2007.142:81–88.
143. Rautenschlein S. [и др.]. Role of intrabursal T cells in infectious bursal disease virus (IBDV) infection: T cells promote viral clearance but delay follicular recovery. // *Arch Virol*. 2002.147:285–304.
144. Resina D. [и др.]. Expression of a *Rhizopus oryzae* lipase in *Pichia pastoris* under control of the nitrogen source-regulated formaldehyde dehydrogenase promoter. // *J. Biotechnol*. 2004. 109, 103–113.
145. Rinaldi A., Cervio G., Mandelli G. Aspetti epidemiologici, anatomo-clinici ed istologici di una nuova forma morbosa dei polli verosimilmente identificabile con

- la cosiddetta Malattia di Gumboro. In: Atti Conv Patol Aviar. // Societa Italiana de Patologia Aviare. 1965. 77–83.
146. Rocha S.N., Abrahao-Neto, J., Cerdan M.E., Gonzalez-Siso M.I. Heterologous expression of glucose oxidase in the yeast *Kluyveromyces marxianus*. // *Microb. Cell Fact.* 2010. 9: 4.
147. Rong J. [и др.]. Large-scale manufacture and use of recombinant VP2 vaccine against infectious bursal disease in chickens. // *Vaccine.* 2007. 25, 79007908.108
148. Sanchez M. [и др.]. Transformation of *Kluyveromyces lactis* by electroporation. *Appl. // Environm. Microbiol.* 1993. 59, 2087–2092.
149. Schnitzler D. [и др.]. The genetic basis for the antigenicity of the VP2 protein of the infectious bursal disease virus. // *J Gen Virol.* 1993.74:1563–1571.
150. Sharma J.M., Rautenschlein S., Yeh H.Y. The role of T cells in immunopathogenesis of infectious bursal disease virus. In: *International Symposium on Infectious Bursal Disease and Chicken Infectious Anaemia.*// Rauschholzhausen, Germany. 2001. 324–327.
151. Snyder D., Vakharia V., Savage P. Naturally occurring-neutralizing monoclonal antibody escape variants define the epidemiology of infectious bursal disease viruses in the United States. // *Arch Virol.* 1992.127:89–101
152. Song B. [и др.]. Prokaryotic Expression and Anti-IBDV Activity of Chicken Interleukin-18 and Interferon- γ . // *Cytogenet Genome Res.* 2017;153(1):36-45. doi: 10.1159/000481522. Epub 2017 Nov 24. PMID: 29169149.
153. Steger G., Müller H., Riesner D. Helix-coil transitions in double-stranded viral RNA. Fine resolution melting and ionic strength dependence. // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Nucleic Acids and Protein Synthesis.* 1980.606:274–284.
154. Stone H.D. Newcastle disease oil emulsion vaccines prepared with animal, vegetable? And synthetic oils . // *Avian Dis.* 1997. - V.41. - P. 591- 597.
155. Tacken M.G. [и др.]. Infectious bursal disease virus capsid protein VP3 interacts both with VP1, the RNA-dependent RNA polymerase, and with viral double-stranded RNA. // *J Virol.* 2002.76:11301–11311.

156. Tanimura N. [и др.]. Association between pathogenicity of infectious bursal disease virus and viral antigen distribution detected by immunohistochemistry. // Avian Dis. 1995. 9–20.
157. Tripathi N.K. [и др.]. High yield production of heterologous proteins with Escherichia coli. // Defence Science Journal 2009. 59, 137–146.
158. Ursula H., Blanco J., Kaleta E. Neutralizing antibodies against infectious bursal disease virus in sera of free-living and captive birds of prey from central Spain (preliminary results). In: Proceedings II International Symposium on Infectious Bursal Disease and Chicken Infectious Anaemia Rauschholzhausen. // Germany. 2001. 247–251
159. Vakharia V.N. [и др.]. Infectious bursal disease virus structural proteins expressed in a baculovirus recombinant confer protection in chickens. // Journal of General Virology. 1993. 74, 12011206109
160. Van A. [и др.]. Alteration of amino acids in VP2 of very virulent infectious bursal disease virus results in tissue culture adaptation and attenuation in chickens. // J Gen Virol. 2002.83:121–129.
161. Van den Berg [и др.]. Experimental inoculation of game/ ornamental birds with a very virulent strain of IBDV. // COST839 Rauschholzhausen, Germany. 2001. 236–246.
162. Van den Berg, Gonze T. M., Morales D. Acute infectious bursal disease in poultry: immunological and molecular basis of antigenicity of a highly virulent strain. // Avian Pathol. 1996. 25:751–768.
163. Van der Marel [и др.]. Antigenic characterization of IBDV field isolates by their reactivity with a panel of monoclonal antibodies. // Dtsch Tieraerztl Wochenschr. 1991. 97:81–83.
164. Von Einem [и др.]. VP1 of infectious bursal disease virus is an RNA-dependent RNA polymerase. // J Gen Virol. 2004.85:2221–2229.

165. Wang Y.S. [и др.]. Development of a multi-mimotope peptide as a vaccine immunogen for infectious bursal disease virus. // *Vaccine*, 2007. 25, 44474455.110
166. Wei L. [и др.]. Infectious bursal disease virus activates the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/Akt signaling pathway by interaction of VP5 protein with the p85 α subunit of PI3K. // *Virology*. 2011.417:211–220.
167. Withers D.R., Young J.R., Davison T.F. Infectious bursal disease virus-induced immunosuppression in the chick is associated with the presence of undifferentiated follicles in the recovering bursa. // *Viral Immunol*. 2005.18:127–137.
168. Woolcock P.R., Chin R.P., Saif Y.M. Personal communication. 1995.
169. Wu H. [и др.]. Immunization of chickens with VP2 protein of infectious bursal disease virus expressed in *Arabidopsis thaliana*. // *Avian Diseases*, 2004. 48, 663668.110
170. Wu S., Letchworth G. J. High efficiency transformation by electroporation of *Pichia pastoris* pretreated with lithium acetate and dithiothreitol // *Biotechniques*. – 2004. – Т. 36. – №. 1. – С. 152-154.
171. Yamaguchi T. [и др.]. Epitope mapping of capsid proteins VP2 and VP3 of infectious bursal disease virus. // *Arch Virol*. 1996. 141:1493–1507.
172. Yamaguchi T. [и др.]. Epitope mapping of capsid proteins VP2 and VP3 of infectious bursal disease virus. // *Arch Virol*. 1996. 141:1493–1507.
173. Yurimoto H. Molecular basis of methanol-inducible gene expression and its application in the methylotrophic yeast *Candida boidinii*. *Biosci.* // *Biotechnol. Biochem*. 2009. 73, 793–800.
174. Zierenberg K. [и др.]. Generation of serotype 1/serotype 2 reassortant viruses of the infectious bursal disease virus and their investigation in vitro and in vivo. *Virus Res*. 2004. 105:23–34.

ПРИЛОЖЕНИЕ

Акт комиссионных испытаний



Утверждаю:

Врио ректора ФГБОУ ВО
СПбГУВМ, член-корр. РАН,
доктор ветеринарных наук,

К.В. Племяшов

«20» декабря 2021 г.

АКТ

комиссионной апробации рекомбинантной вакцины против инфекционной бурсальной болезни.

В соответствии с приказом № 211 от 04.09.2018 в ФГБОУ Санкт-Петербургский государственный университет ветеринарной медицины комиссией в составе: Козыренко О.В., профессора кафедры эпизоотологии им В.П. Урбана, доктора ветеринарных наук (председатель), Кузьмина В. А., профессора кафедры эпизоотологии им В.П. Урбана, доктора ветеринарных наук, Джавадова Э. Д., профессора кафедры эпизоотологии им В.П. Урбана, доктора ветеринарных наук, Фогеля Л. С., доцента кафедры эпизоотологии им В.П. Урбана, кандидата ветеринарных наук, Данко Ю. Ю., доцента кафедры эпизоотологии им В.П. Урбана, доктора ветеринарных наук составлен акт в том, что в период с 10 июня по 10 декабря 2021 года проведены комиссионные испытания рекомбинантной вакцины против инфекционной бурсальной болезни.

На комиссионные испытания были предоставлены две лабораторные (опытные) серии рекомбинантной вакцины против инфекционной бурсальной болезни, изготовленные серия №1 - февраль 2021 г., серия №2 – апрель 2021 г.

В процессе комиссионных испытаний был проведен контроль вакцины на стерильность, безвредность и антигенную активность.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

1. Контроль стерильности.

Определение стерильности 2-х лабораторных серий вакцины проводили по ГОСТ 28085-2013. Из каждого образца рекомбинантной вакцины делали посев на стерильные питательные среды: МПА, МПБ, Эндо, МППБ под вазелиновым маслом и среду Сабуро – по три пробирки для жидких питательных сред и по две чашки Петри для твердых питательных сред. Для выявления аэробов и факультативно-анаэробных микроорганизмов высевали 0,5 см³ посевного материала в одну пробирку, а для выявления анаэробов – 1,0 см³.

Пробирки с посевами на всех средах, кроме среды Сабуро, выдерживали в термостате при (37,0±1) °С в течение 7 суток, на среде Сабуро – при (22,5±2,5) °С в течение 14 суток.

По истечении указанного срока делали пересев, за исключением посевов на МПА. Пересевали пробы на те же питательные среды и в тех же объемах, что и при посеве. Вторичные посевы выдерживали 7 суток (агар Сабуро - 14 суток).

Установлено, что высевы лабораторной серий вакцины были свободны от контаминации бактериями и грибами.

2. Контроль безвредности.

Безвредность вакцины проверяли на пяти цыплятах введением 5-кратной прививной дозы (0,5 см³) подкожно в нижнюю треть шеи. За птицей вели наблюдение в течение 21 сут. Результаты контроля показали, что образцы вакцины не вызывали воспалительных реакций в месте введения препарата в течение периода наблюдения, что подтверждает их безвредность.

3. Контроль антигенной активности.

Для исследования антигенных свойств рекомбинантной вакцины против инфекционной бурсальной болезни вакцинировали цыплят яичного направления на 14-е сутки и оценивали серологические показатели крови.

Для постановки эксперимента было взято 4 группы цыплят по 10 в каждой группе: цыплятам 1-ой группы вводили вакцину с рекомбинантным белком VP2 в концентрации 1 мкг/мл в объеме 100 мкл (0,1 см³) подкожно; цыплятам 2-ой группы вводили вакцину с рекомбинантным белком VP2 в концентрации 0,2 мкг/мл в объеме 100 мкл (0,1 см³) подкожно; цыплятам 3-ой группы вводили вакцину с рекомбинантным белком VP2 в концентрации 0,04 мкг/мл в объеме 100 мкл (0,1 см³) подкожно; цыплятам 4-ой группы вакцину не вводили (контрольная группа). Вакцину вводили 14-суточным цыплятам однократно

Для определения уровня поствакцинального иммунитета проводили иммуноферментный анализ сыворотки крови с использованием набора «IDEXX» и «ID-Vet» у суточных, 14 дневных и 40 дневных цыплят. Как видно в таблице 1 уровень материнских антител у суточных цыплят был не достаточно высок, поэтому на 14 сутки можно было увидеть невысокие титры антител.

Таблица 1. Определение антигенной активности рекомбинантной вакцины против ИББ у цыплят кросса Ломан Браун методом ИФА (n=10) набором «ID-Vet»

Номер Группы	Адьювант	Концентрация белка VP2, мкг	Путь введения	Объем препарата, мкл	Средний геометрический титр антител к VP2 в ИФА*		
					0 день	14 сут.	40 сут.
1	ГОА	1 мкг/мл	П/к	100	5515±230	167±10	1664±100
2	ГОА	0,2 мкг/мл	П/к	100	5153±210	158±10	560±20

3	ГОА	0,04 мкг/мл	П/к	100	5320±230	169±10	315±15
4	-	-	-	-	5990±250	210±10	63±5

Примечание: * - Обратные значения титров антител в ИФА, (P<0,05)

Как видно в таблице 1 титры антител у группы №1 в 40 день значительно выше, чем на 14, что говорит об иммунном ответе на рекомбинантный белок VP2. У группы № 2 и 3 также видно увеличение титров антител, но более стойкий иммунитет наблюдался у группы №1 при концентрации рекомбинантного белка 1 мкг/мл.

В результате проведения серологического исследования сывороток крови цыплят, привитых рекомбинантной вакциной против ИББ в возрасте 14 суток объёмом 0,1 см³ было установлено, что наиболее высокий уровень антител имеют цыплята первой группы. Уровень антител у цыплят в суточном возрасте достигал 1:5153 - 1:5990.

Полученные данные свидетельствуют о том, что рекомбинантная вакцина антигенно активна.

ПРЕДЛОЖЕНИЯ

На основании данных, полученных в ходе исследований подготовить проект нормативно-технической документации для изготовления, контроля и применения рекомбинантной вакцины против инфекционной бурсальной болезни (Технологический регламент, Стандарт организации (СТО) по контролю рекомбинантной вакцины, Инструкцию по применению рекомбинантной вакцины).

Председатель комиссии:



Козыренко О.В.

Члены комиссии:



Кузьмин В.А.



Джавадов Э.Д.



Фогель Л.С.



Данко Ю.Ю.