

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

На правах рукописи

Тарлавин Николай Владимирович

ИММУНОГЕННЫЕ СВОЙСТВА ИММУНОКОМПЛЕКСНОЙ 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

ОГЛАВЛЕНИЕ

ОГЛАВЛЕНИЕ.....	2
ВВЕДЕНИЕ	5
ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ.....	12
1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	12
1.1. Строение и физиология иммунной системы птиц.....	12
1.2. История развития и распространения инфекционной бурсальной болезни	16
1.3. Характеристика вируса инфекционной бурсальной болезни	20
1.4. Патогенез инфекционной бурсальной болезни в клетках иммунной системы птиц.....	23
1.5. Эпизоотологические особенности инфекционной бурсальной болезни	27
1.6. Средства специфической профилактики	35
1.7. Расчет времени вакцинации.....	42
1.8. Экспрессия генов иммунитета.....	45
2. СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ	48
2.1. Материалы и методы исследований.....	48
2.1.1. Создание вакцины	49
2.1.2. Эксперимент на цыплятах кросса Ломан Уайт и цыплятах кросса Росс-308 на базе вивариев Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования “Санкт-Петербургский государственный университет ветеринарной медицины”.....	51
2.1.3. Метагеномные исследования.....	54
2.1.4. Анализ экспрессии генов	55
2.1.5. Математическая и статистическая обработка результатов.....	56
2.2. Результаты собственных исследований	56

2.2.1. Исследование сыворотки крови гипериммунизированных птиц в реакции диффузионной преципитации для создания иммунокомплексной вакцины.	56
2.2.2. Комбинация вирусодержащего материала с полученной гипериммунной сывороткой для создания вакцины	59
2.2.3. Подготовка проекта нормативно-технической документации для изготовления, контроля и применения иммунокомплексной вакцины против инфекционной бурсальной болезни из штамма “ВНИВИП”	60
2.2.3.1. Контроль изготовленной серии вакцины	60
2.2.3.2. Исследование антигенной активности иммунокомплексной вакцины	61
2.2.3.2.1. Титр антител в крови цыплят кросса Ломан Уайт после введения иммунокомплексной вакцины в суточном возрасте	61
2.2.3.2.2. Титр антител в крови цыплят кросса Росс-308 после введения иммунокомплексной вакцины в суточном возрасте	66
2.2.4. Зоотехнические показатели подопытных птиц	70
2.2.5. Морфологические изменения в организме птиц при введении иммунокомплексной вакцины против инфекционной бурсальной болезни из штамма “ВНИВИП”	72
2.2.6. Влияние иммунокомплексной вакцины против инфекционной бурсальной болезни из штамма “ВНИВИП” на патогенные и условно-патогенные микроорганизмы кишечника птиц.	76
2.2.8. Влияние иммунокомплексной вакцины на экспрессию генов, участвующих в иммунном ответе птиц	81
2.2.8. Предполагаемая экономическая эффективность внедрения иммунокомплексной вакцины против инфекционной бурсальной болезни из штамма “ВНИВИП”	91
3. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЙ	93
4. ЗАКЛЮЧЕНИЕ	105

ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ.....	107
ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ	108
БЛАГОДАРНОСТЬ.....	109
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	110
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	111
ПРИЛОЖЕНИЕ	139

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность.

В России, как и в других странах мира, птицеводческая отрасль является одной из ведущих, так как обеспечивает не только высококачественными натуральными продуктами питания, но и сырьем для промышленной переработки (пером, пухом и пометом) [8, 20]. С каждым годом наблюдается прирост продукции производимой птицеводческой отраслью. Это стало возможным благодаря внедрению новых технологий, касающихся производства кормов и самой системы кормления птицы на фермах, но в тоже время из-за высокой скученности птицепоголовья и стрессовых факторов возрастает количество вспышек инфекционных болезней [7, 101, 127, 167]. Наиболее опасными из них являются иммунодепрессивные болезни (микотоксикозы и некоторые вирусные болезни). К таким болезням относятся: болезнь Марека, инфекционная бурсальная болезнь и инфекционная анемия цыплят [26, 42, 56].

Во всех регионах мира, производящих птицу, вирус инфекционной бурсальной болезни (ИББ) продолжает оставаться одной из главных проблем для птицеводов. Вирус вызывает у цыплят анемию и обезвоженность мышечной ткани, также кровоизлияния в мышцах голени, бедра, крыльев и груди [13, 46, 235]. Основной опасностью ИББ является вызываемое ей иммунодепрессивное состояние [55, 203, 230].

Последствием иммуносупрессии, связанной с ИББ, является восприимчивость цыплят к условно-патогенным микроорганизмам. Также показано, что инфицированные ИББ птицы могут стать распространителями других вирусных патогенов.

Вакцинация является наиболее важной мерой борьбы с ИББ. Используемые в настоящее время живые вирусные вакцины эффективны против ИББ, но имеют определенные недостатки [3, 27, 142, 218, 199]. В популяции привитых кур одинакового возраста титры антител сходны. Их цыплята через желточный мешок получают материнские антитела (МА), которые обеспечивают защиту в течение

первых двух-трех недель после вылупления. При этом у потомства различных вакцинированных популяций могут быть разные титры антител к вирусу ИББ. При совместном выращивании это может привести к различному уровню МА в потомстве и разделить стадо на особей с низкой или высокой восприимчивостью к вирулентному вирусу ИББ [30, 62, 50].

Иммунокомплексная вакцина нового поколения обеспечивает доступный и простой метод защиты птицы от ИББ. Иммунокомплексные вакцины считается возможным применять *in ovo* на 18 день инкубации, либо подкожно в возрасте 1 дня, причем вакцинация подкожно вызывает задержку репликации вируса в клетках фабрициевой сумки, за счет чего стойкий иммунитет может начать формироваться позже [47, 137]. Механизм работы иммунокомплексной вакцины заключается в отложенной репликации вакцинного вируса в клетках фабрициевой сумки цыпленка, что позволяет дождаться снижения уровня материнских антител и успеть колонизировать клетки фабрициевой сумки раньше, чем это успеет сделать полевой штамм ИББ. Отложенная репликация вакцинного вируса достигается за счет взаимодействия иммунного комплекса с фолликулярными дендритными клетками [48, 144, 235]. Когда связь между вируснейтрализующим иммуноглобулином и вакцинным вирусом ослабевает, вирус высвобождается в кровяное русло и получает возможность колонизировать клетки фабрициевой сумки, тем самым формируя иммунный ответ. Также вакцинный вирус распространяется по прочим органам птицы, участвующим в формировании иммунного ответа: селезенке, тимусу, миндалевидной железе. Предлагаемая нами вакцина пригодна к введению 1-суточному цыпленку как внутримышечно, так и подкожно. В качестве штамма используются штамм “ВНИВИП”, который обладает большим антигенным родством с циркулирующими на территории Российской Федерации штаммами инфекционной бурсальной болезни.

Степень разработанности темы.

Ранее известны были способы иммунизации птиц против ИББ вакциной, содержащей в комплексе антитела и вирус ИББ штамма, который позволял

добиться требуемого эффекта невосприимчивости птицы к болезни Гамборо [123, 225]. Данный эффект достигался за счет безопасного и эффективного штамма ИББ, который можно вводить in-ovo, и, кроме того, возможно обеспечить экономически эффективный процесс производства вакцины для защиты от ИББ. Недостатком данного способа является то, что предлагаемая схема вакцинации in-ovo не подходит для большинства российских птицефабрик ввиду отсутствия необходимого оборудования для данного способа вакцинации [257, 92, 201]. Вакцина, иммуногенные свойства которой исследовалась в данной работе, пригодна к введению 1-2-суточному цыпленку как внутримышечно, так и подкожно [120, 226]. Также, в качестве вакцинного штамма использовался штамм “ВНИВИП”, который обладает большим антигенным родством с циркулирующими на территории Российской Федерации штаммами инфекционной бурсальной болезни.

Цель и задачи исследований.

Изучение иммуногенных свойств иммунокомплексной вакцины против инфекционной бурсальной болезни из штамма “ВНИВИП”.

В ходе работы были поставлены следующие задачи:

1. Разработать иммунокомплексную вакцину против инфекционной бурсальной болезни из штамма “ВНИВИП”.
2. Научно обосновать проект нормативно-технической документации для изготовления, контроля и применения иммунокомплексной вакцины.
3. Изучить влияние иммунокомплексной вакцины против инфекционной бурсальной болезни из штамма “ВНИВИП” на иммунитет птицы и закономерности экспрессии генов, связанных с иммунным ответом при вакцинации цыплят иммунокомплексной вакциной против инфекционной бурсальной болезни из штамма “ВНИВИП”.
4. Изучить планируемый годовой экономический эффект при применении иммунокомплексной вакцины против инфекционной бурсальной болезни из штамма “ВНИВИП”.

Научная новизна.

В результате впервые на территории Российской Федерации была разработана иммунокомплексная вакцина нового поколения на основе отечественного штамма, пригодная к применению в первые сутки жизни цыплят без учета уровня специфических материнских антител, препятствующих своевременному развитию иммунитета у птиц. Действие данной вакцины на организм птицы было исследовано с применением комплекса серологических, молекулярно-генетических и метагеномных методов.

Также впервые рассмотрены закономерности экспрессии основных иммунокомпетентных генов в тканях фабрициевой сумки под действием данной вакцины. Установлены закономерности экспрессии иммунных генов птицы (*IL6*, *IL8L2*, *AvBD-9*, *AvBD-10*, *IRF7*, *PTGS-2*) отвечающих за клеточный иммунный ответ, в иммунных тканях организма птицы под влиянием вирусного вмешательства.

Теоретическая и практическая значимость.

Ориентировочная потребность российского рынка в наиболее востребованных живых вакцинах от инфекционной бурсальной болезни для цыплят-бройлеров и кур-несушек родительских и промышленных стад и составляет 6,8-7,0 млрд доз в год. Данная потребность лишь частично удовлетворяется вакцинами отечественного производства, тогда как большую долю российского рынка удовлетворяют импортные зарубежные вакцины. Применение разработанной иммунокомплексной вакцины против инфекционной бурсальной болезни из штамма “ВНИВИП” поможет как сократить зависимость отечественного птицеводства от зарубежных поставок, так и облегчит работу ветеринарного врача на птицефабрике за счет допустимости применения в первые сутки жизни цыпленка.

На сегодняшний день в отечественной науке практически отсутствует понимание особенности процессов жизнедеятельности микрофлоры кишечника птиц под влиянием вакцинации, либо заражения. Также остаются неизвестными

закономерности работы генов неспецифического иммунитета при внедрении в организм птицы вирусных агентов. Таким образом, изучение микробного состава кишечника птицы под влиянием вакцинации против вирусных болезней поможет в создании эффективных схем вакцинации на промышленных предприятиях, а изучение закономерностей экспрессии генов неспецифического иммунитета поможет понять характер комплексного иммунного ответа организма сельскохозяйственной птицы.

Результаты исследований были использованы в том числе при создании руководства «Методические рекомендации по использованию современных биотехнологий для оценки экспрессии генов, связанных с продуктивностью и устойчивостью птицы к неблагоприятным факторам», утверждённого УМК ФЗТА в ФГБОУ ВО МГАВМиБ - МВА имени К.И. Скрябина (протокол №13 от 3.11.2019).

Проведенные исследования были поддержаны грантом, предоставляемым Советом по грантам Президента Российской Федерации №МД-2579.2021.5 «Изучение экспрессии генов иммунитета сельскохозяйственной птицы при вакцинации иммунокомплексной вакциной против инфекционной бурсальной болезни».

Получен патент на изобретение RU №2761566 – Вакцина иммунокомплексная против инфекционной бурсальной болезни птиц из штамма “ВНИВИП”, зарегистрированный в Государственном реестре РФ 10 декабря 2021 г.

Методология и методы исследований.

В работе использовали методологические принципы, учитывающие условия содержания птицы на птицефабриках, режим кормления и поения, факторы передачи возбудителя, схемы вакцинации на птицефабриках.

В работе использованы следующие методы исследований: клинический, патологоанатомический, серологический, молекулярно-генетический и статистический.

Объектом исследования служили цыплята кроссов Ломан Уайт (яйценоский кросс) и Росс-308 (мясной бройлерный кросс). Штамм “ВНИВИП” вируса инфекционной бурсальной болезни был использован для создания иммунокомплексной вакцины.

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. Личный вклад составляет 90,0%.

Основные положения, выносимые на защиту:

- Иммунокомплексная вакцина против инфекционной бурсальной болезни из штамма “ВНИВИП” состоит из живого вируса инфекционной бурсальной болезни из штамма "ВНИВИП" в смеси с сывороткой крови SPF-кур, содержащей иммуноглобулины G против вируса инфекционной бурсальной болезни.

- Введение цыплятам иммунокомплексной вакцины против инфекционной бурсальной болезни из штамма “ВНИВИП” в первые сутки жизни вызывает формирование титра антител, способного защитить цыпленка при попадании в организм патогенного вируса.

- При вакцинации цыплят иммунокомплексной вакциной против инфекционной бурсальной болезни из штамма “ВНИВИП” возникает активная экспрессия иммунокомпетентных генов.

Степень достоверности и апробация результатов.

Научные положения и выводы обоснованы и базируются на аналитических и экспериментальных данных. Выводы и предложения основаны на научных

исследованиях, проведенных с использованием современных методов анализа и расчёта.

Материалы исследований научной работы были представлены:

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

- на 3-й Международной научно-практической конференции «Молекулярно-генетические технологии анализа экспрессии генов продуктивности и устойчивости к заболеваниям животных», Москва, 2021.

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

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

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

Публикация результатов исследований.

По теме диссертации опубликовано 18 научных работ, из них 7 работ в изданиях, рекомендованных ВАК при Министерстве науки и высшего образования РФ, 7 публикаций в материалах научных и научно-практических конференций, две работы индексируются в международной базе данных Scopus. Также материалы исследований были включены в одну монографию, и стали основой для одних методических рекомендаций. Получен один патент.

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 142 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, собственных исследований, обсуждения полученных результатов, заключения, списка использованной литературы и приложений. Работа иллюстрирована 13 таблицами и 31 рисунком. Список литературы включает 265 источник, в том числе 209 источник зарубежных авторов.

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Строение и физиология иммунной системы птиц

Иммунная система птиц состоит из центральных и периферических органов [96, 227]. К центральным органам иммунитета домашних птиц относятся желточный мешок в эмбриональную стадию, красный костный мозг, тимус и фабрициева сумка [146, 148, 265]. Желточный мешок – первичный и главнейший кроветворный орган развивающегося эмбриона. Желточный мешок формируется в первые несколько дней развития эмбриона, используя желточную массу в качестве энергетического материала. Желточный мешок втягивается в брюшную полость перед началом процесса вылупления и в течение нескольких суток полностью рассасывается [75, 227]. На вторые сутки инкубации начинается формирование сердца и кровеносных сосудов. Первые клетки крови формируются в задней части зародышевого диска эмбриона цыпленка. Скопления данных клеток обнаруживают в виде кровяных островков в стенке желточного мешка с 21 по 24 час после начала инкубации. Данные клетки не имеют гемоглобина.

В примитивных клетках крови начинает появляться гемоглобин со стартом циркуляции крови по организму. Клетки становятся круглыми, активно делятся митотически. При формировании эритроцитов происходит активная мультипликация примитивных форм. Данные клетки являются материнскими клетками лимфоцитов [118, 182].

Максимум активности при формировании крови в стенках желточного мешка наступает на 11-е и 12-е сутки инкубации. К 18-м суткам происходит уменьшение активности. Малые лимфоциты, гранулярные лейкоциты и тромбоциты не обнаруживаются в крови до последнего дня инкубации [86, 93, 152]. На 12-е сутки в процесс гемопоэза в организме птицы включается селезенка. Она продуцирует лимфоциты, гранулярные лейкоциты и эритроциты. Особенно активно селезенка осуществляет гемопоэз между 14-ми и 18-ми сутками инкубации. До 12-х суток костный мозг функционирует на низком уровне, но к окончанию инкубации его

активность постепенно возрастает, и он берет на себя ведущую роль в осуществлении гемопоэза. Значительное увеличение числа эритроцитов и лейкоцитов в костном мозге отмечают у цыплят на 1-4 сутки постинкубационного периода и он становится центральным лимфоидным органом, а также источником полипотентных стволовых клеток.

Печень как таковая важным гемопоэтическим органом у эмбриона не является. Мезенхима, распределенная в различных частях тела птиц, способна формировать лимфоидные клетки, гранулярные лейкоциты и эритроциты. По завершении инкубации эта активность ограничивается в определенных органах, таких как фабрициева сумка (где эритроциты могут формироваться до 21 суток) тимус, селезенка, костный мозг, печень и поджелудочная железа [155, 212]. Формирование клеток крови у взрослой птицы происходит несколько иным путем, нежели в эмбрионе [10]. Во время стресса, оказывающего влияние на систему гемопоэза в организме, возможен частичный возврат к гемопоэзу эмбрионального типа [98]. Источником формирования эритроцитов и гранулоцитов в основном является костный мозг. Источником же лимфоцитов крови служат скопления диффузной лимфоидной ткани, расположенной вдоль кишечного тракта, в селезенке и в печени вместе с более или менее организованной модулярной лимфоидной тканью селезенки, тимуса, слепой кишки и носовых желез.

Наиболее многочисленной фракцией лейкоцитов в крови птицы являются лимфоциты. Данный вид лейкоцитов способен фиксировать токсический материал и, при помощи этой особенности осуществлять функцию защиты всего организма. Активное участие лимфоцитов в гидролизе жиров обусловлено высоким содержанием в них липазы. Лимфоциты активно переходят из тканей в кровяное русло и обратно. Особенно многочисленны скопления лимфоцитов в стенке кишечника [84, 107, 185].

Мононуклеарные лейкоциты, (полибласты), формируют защитный барьер между очагом хронического воспаления и здоровой тканью организма. Данные клетки происходят из лимфоцитов крови. Моноциты птиц бывает трудно отличить от большинства лимфоцитов. Моноциты представляют собой крупные клетки с

крупной, по сравнению с остальными лимфоцитами, цитоплазмой. Функции моноцитов крови птицы на сегодняшний день изучены недостаточно. Существует предположение, что моноциты могут мигрировать в очаг воспаления с последующим формированием крупных активных фагоцитов, способных утилизировать не только болезнетворных и чужеродных агентов, но и остатки клеточного материала собственно организма. Общее число лейкоцитов в крови у молодых цыплят больше, чем у взрослых кур.

Тимус состоит из 6-7 долек с каждой стороны шеи птицы и начинает формироваться как парный орган еще в эмбриональный период. Зачатки тимуса из мезенхимы можно наблюдать уже на 5-7-е сутки развития эмбриона. Лимфоциты в тимусе обнаруживаются на 10-е сутки там же происходит их созревание. Затем Т-лимфоциты покидают тимус, поступают в селезенку, лимфоидные образования слизистых оболочек кишечника, а также скопления бронхиальной лимфоидной ткани. При этом Т-лимфоциты приобретают способность стимулировать В-лимфоциты к пролиферации и дифференцировке в плазматические клетки, продуцирующие специфические антитела против антигена, так как являются хранителями иммунной памяти об антигене [168].

Также тимус обладает способностью к дифференцировке всех лимфоцитов в организме птицы, контролирует иммунологические функции всех лимфоидных органов и принимает участие в механизме определения инородного агента. Таким образом, данный орган представляет собой центральное звено специфической защиты организма птицы, поскольку Т-лимфоциты принимают прямое участие в регуляции синтеза антител [20, 21]. До момента вылупления цыплят миграция Т-лимфоцитов в периферические лимфоидные органы находится на низком уровне и продолжает сохраняться в течение первой недели жизни, а затем резко усиливается. Таким образом, созревание иммунной системы в постэмбриональный период развития заканчивается в течение первой недели, после чего иммунная система приобретает физиологическую полноценность [24].

Фабрициева сумка представляет собой слепой складчатый орган, являющийся дивертикулом клоаки. Паренхима сумки практически полностью

состоит из скоплений лимфоидных фолликулов, прилегающих к плоскому эпителию.

У цыплят сумка начинает развиваться на 20-е сутки инкубации и продолжается до достижения птицей состояния половой зрелости (4-5-месяцев) [9]. Стволовые клетки-предшественники В-лимфоцитов проникают в паренхиму сумки эмбриона и формируются по эритроидному и миелоидному путям. Другая их часть размножается и дифференцируется, образуя В-клетки. Клеточный цикл В-лимфоцитов в фабрициевой сумке птиц составляет от 8 до 10 часов. Таким образом, осуществляя быструю пролиферацию клеток, синтезируются тысячи лимфоидных фолликулов, каждый из которых содержит как зрелые лимфоциты, так и лимфоциты на различных этапах дифференцировки. Существует предположение, что корковый и мозговой слои фабрициевой сумки служат местом лимфопоэза, однако более активными являются процессы мозгового слоя. Затем В-лимфоциты покидают фабрициеву сумку, мигрируя в периферические лимфоидные ткани организма до завершения инкубации эмбриона, а также в первые недели и месяцы на этапе постэмбрионального развития птицы. В случае активации антигеном В-лимфоциты трансформируются в плазматические клетки, являющиеся продуцентами иммуноглобулинов, поступающих в кровь и осуществляющих основную иммунную защиту организма птицы. Выявлены три популяции В-клеток в крови 3-недельных цыплят, из которых около 60% являются лимфоцитами, происходящими из фабрициевой сумки. Продолжительность существования этих лимфоцитов составляет от 2 до 3 суток. Примерно 35% В-лимфоцитов крови - долгоживущие с периодом существования более 2 недель. Третья популяция В-лимфоцитов крови (около 5 %) является короткоживущей и представляет потомство постбурсальной В-лимфоцитарной продукции. Степень эмиграции лимфоцитов фабрициевой сумки в кровь и селезенку составляет около 1 % В-лимфоцитарной популяции [22].

На этапе эмбрионального развития птицы первыми появляются клетки, синтезирующие иммуноглобулин IgM [100, 153], а перед вылуплением в лимфоидной ткани эмбриона появляются клетки, способные синтезировать IgG.

Есть данные, что эти клетки происходят из клеток, синтезирующих IgM, но клеточное окружение или гуморальные факторы заставляют перестраиваться на синтез IgG. И лишь в начале постэмбрионального периода у птицы начинается синтез IgA. Согласно клонально-селекционной теории, в организме столько же лимфоцитов (клонов В-клеток), сколько имеется типов антител. Антиген взаимодействует с теми клеточными клонами, которые его распознают с последующей пролиферацией [77].

Периферическими лимфоидными органами птицы являются селезенка, лимфоидные узлы слепых отростков, Гардерова железа, лимфоидные скопления в глотке, гортани, бронхах и в кишечнике. Поскольку у птиц отсутствует четкая система лимфоузлов, в организме птицы присутствуют многочисленные и повсеместные скопления лимфоидной ткани, которые и обеспечивают активную защиту организма от болезнетворных агентов [79, 156, 157]. Лимфоидные образования в организме птицы в свою очередь представлены в виде центров скопления средних и больших лимфоцитов или в виде диффузной инфильтрации тканей малыми лимфоцитами. Следует отметить, что лимфоидные образования широко представлены в организме птиц в основном в пищеварительной и дыхательной системах [169]. Эта стратегия размещения иммунных клеток связана с наибольшей угрозой, которую патогенные возбудители представляют для данных систем. Селезенка формируется у эмбриона на 4 день, в виде скопления мезенхимальных клеток [71, 219]. В первые дни постэмбрионального развития в селезенке у цыпленка обнаруживают диффузные лимфоидные скопления. Функцию депо крови, в отличие от млекопитающих, селезенка не выполняет. Для нее характерен фагоцитоз, главным образом эритроцитов, образование антител и поглощение антигенов, лимфоцитов.

1.2. История развития и распространения инфекционной бурсальной болезни.

Инфекционная бурсальная болезнь - тяжелая, чрезвычайно заразная болезнь [104, 105]. Первые вспышки инфекционной бурсальной болезни зарегистрированы

в населённом пункте Гамборо, в США (1962 год), благодаря чему болезнь получила свое название[108, 161]. Спустя некоторое время аналогичные возбудители болезни (вирус семейства *Birnaviridae*) были обнаружены на территории Мексики, Бельгии и Англии[88]. В настоящее время вирус активно атакует все страны и континенты, на которых располагаются центры высокопродуктивного промышленного птицеводства[57, 113, 143, 199].

Многочисленные названия заболевания, такие как болезнь Гамборо, инфекционный нефрозонефрит, инфекционный бурсит, ИББ, инфекционная бурсальная болезнь, выражают высокую степень поражения жизненно важных органов куриного поголовья в короткий срок.

Основными клетками-мишенями являются лимфоидные, особенно В-клетки. А из тканей наиболее тяжелому поражению подвергается лимфоидная ткань клоакальной сумки. В 1957 году Cosgrove A.S., работая в качестве сотрудника лаборатории по птицеводству в Делавэре выявил синдром, позже названный «птичьим нефрозом», на бройлерной ферме недалеко от городка Гамборо, Делавэр[106]. Синдром стал известен как «Болезнь Гамборо» [8].

Первоначально при определении этиологического агента инфекционной бурсальной болезни (нефроза птиц) происходила путаница из-за присутствия вируса инфекционного бурсита в почках птиц, инфицированных естественным путем. Winterfield R.W. и Hitchner S.B. описали изолят инфекционного бурсита (Gray), который получили при полевом случае нефроза[127, 243]. По свойствам он не отличался от возбудителя синдрома инфекционного бурсита. Наблюдалась также схожесть поражений, вызванных вирусом Gray и нефрозом птиц, описанных Cosgrove A.S. Поэтому был сделан вывод, что именно вирус Gray является возбудителем заболевания. Однако дальнейшие исследования показали, что птицы с иммунитетом против вируса Gray могли быть инфицированы возбудителем инфекционного бурсита и при этом развивались патологические изменения в фабрициевой сумке, специфичных для болезни.

Позже при исследовании инфекционной бурсальной болезни птиц Winterfield R.W. успешно выделил возбудителя заболевания в оплодотворенных яйцах.

Характер смертности был неоднородным, и его трудно было сохранить в серийном пассаже. Изолят был назван "инфекционным бурсальным агентом" и идентифицирован в качестве истинной причины инфекционного бурсита. А вирус Gray определен как изолят инфекционного бурсита с нефротическими тенденциями. Hitchner S.B. впоследствии предложил термин инфекционная бурсальная болезнь в качестве названия болезни, вызывающей специфические патогномичные поражения Фабрицевой сумки [127].

Одним из первых симптомов присутствия инфекции в стаде являются попытки некоторых птиц клевать себе заднепроходное отверстие. Cosgrove A.S. в одном из отчетов описал загрязненные перья около заднепроходного отверстия, диарею с беловатым или водянистым пометом, анорексию, депрессию, взъерошенные перья, тремор, сильное изнеможение и в конце концов смерть [149]. Организм пораженных птиц обезвоживался, а температура на последних этапах заболевания понижалась. В 1972 году было сообщено, что инфекции, вызванные вирусом инфекционной бурсальной болезни птиц, в раннем возрасте приводят к подавлению иммунитета [68]. Признание способности вируса инфекционной бурсальной болезни птиц подавлять иммунитет в значительной мере повысило интерес к борьбе с инфекциями, вызываемыми вторичной микрофлорой. В 1980 году было сообщено о существовании второго серотипа. Контроль инфекций, вызванных вирусом инфекционной бурсальной болезни птиц, осложнялся наличием «вариантных» штаммов серотипа 1 вируса инфекционной бурсальной болезни, которые были обнаружены в области Делмарва, где ведется промышленное разведение домашних птиц [121]. Эти штаммы вызывали болезнь даже при наличии материнского иммунитета против «стандартных» штаммов. Таким образом, эти варианты либо уже присутствовали в природе и выделялись при подавлении иммунитета, либо были мутантами, которые появились и развились вследствие подавления иммунитета [66].

Инфекции, вызванные серотипом 1 вируса инфекционной бурсальной болезни птиц, распространены по всему миру и встречаются во всех областях, где ведется промышленное выращивание домашних птиц [73, 149, 200, 229].

Заболееваемость в этих областях очень высока. По существу, все стаи заражаются вирусом на ранних этапах жизни. Поэтому большинство производителей осуществляют вакцинацию и именно поэтому все куры в конце концов сероположительны на вирус инфекционной бурсальной болезни[66, 99]. Однако в США клинические случаи наблюдаются редко, потому что инфекции либо меняются материнскими антителами или являются продуктом действия вариантных штаммов, которые сами по себе болезнь не вызывают, но могут привести к подавлению иммунитета[99].

Сильно вирулентные штаммы, первоначально выделенные в Нидерландах и охарактеризованные Chettle N. в 1989 году, причина сильных вспышек с высокой смертностью в частях мира [88]. Инфекции, вызванные серотипом 2 вируса инфекционной бурсальной болезни птиц, также нередко распространены по всему миру и встречаются у кур, индеек и уток [1]. Инкубационный период инфекционной бурсальной болезни составляет до 3 дней, а клинические признаки болезни начинают проявляться спустя 2-3 дня после заражения [5]. Были выявлены гистологические признаки инфекции в фабрициевой сумке через 24 часа после инфицирования [51]. Используя методы иммуофлюоресценции были выявлены инфицированные макрофаги, связанные с кишечником, и лимфоидные клетки через 4-5 часов после орального заражения вирусом инфекционной бурсальной болезни. Инфицированные вирусом клетки присутствовали в фабрициевой сумке к 11 часу после орального инфицирования и через 6 часов после непосредственного воздействия вируса на фабрициеву сумку. В чувствительных поголовьях болезнь проявляется внезапно. При этом уровень заболеваемости достигает обычно 100%. Смертность может быть как нулевой, так и выше 20-30%. Падеж обычно начинается на 3 день после инфицирования, достигает пика и начинает снижаться через 5-7 дней.

В конце 1980 годов проблемой стран с развитым птицеводством стали штаммы чрезвычайно вирулентного вируса инфекционной бурсальной болезни[61, 117, 213]. Некоторые из этих изолятов приводили к смерти от 90% до 100% у 4-недельных чувствительных кур породы леггорн. Штамм 52/70 сравнивался с двумя

изолятами сильно вирулентного вируса инфекционной бурсальной болезни. Он вызывал 50-процентную смертность по сравнению с 90-процентной смертностью для штаммов очень вирулентного вируса инфекционной бурсальной болезни [42]. Первые вспышки на ферме обычно протекают наиболее остро. Возвратные вспышки у потомства проходят менее остро и часто остаются незамеченными. Многие инфекции проходят незаметно благодаря возрасту птиц (менее 3 недель), инфицированию авирулентными полевыми штаммами или инфицированию в присутствии материнских антител [6].

1.3. Характеристика вируса инфекционной бурсальной болезни

Возбудителем вируса инфекционной бурсальной болезни является вирус из семейства Birnaviridae, размером 55-65 нм, с диаметром капсомеров 8-12 нм [74, 134, 196]. Морфология вириона соответствует гексамерно-пентамерной модели, имеющей икосаэдрическую (кубическую) симметрию [194, 258]. Капсид вируса однослойный, с четырьмя капсомерами на грани. Плавающая плотность в хлористом цезии составляет 1,34-1,42 г/мл. Наряду с вирусами с типичной морфологией встречаются вирусоподобные трубчатые образования равные им по диаметру и также покрытые одним слоем капсомеров, но достигающие в длину 570 и более нм.

Геном вируса сформирован двунигчатой РНК. Геном вируса инфекционной бурсальной болезни делится на сегменты А и В: Структура вируса основана на решетке $T=13$, и капсидные субъединицы преимущественно тример-кластеризованы [59]. Более крупный сегмент А кодирует полипротеин (pVP2-VP4-VP3) [135], который имеет длину 3,261 нуклеотида и кодирует белок-предшественник 110 кДа [83, 101]. Этот полипротеин может быть переработан до белка VP2 (1-512 аминокислот), VP4- (513-791 аминокислоты) и VP3- (792-1, 012 аминокислоты) белков путем аутопротеолиза VP4 для получения зрелых белков VP2–VP4 для вирусной сборки. VP2, являясь основным защитным капсидным антигеном, содержит по меньшей мере два эпитопа для нейтрализации антител [145], которые защищают восприимчивого хозяина от вируса инфекционной бурсальной болезни и являются детерминантой для клеточного тропизма,

адаптации вируса к ткани-мишени и патогенных проявлений вируса инфекционной бурсальной болезни. Белок VP2 имеет три основных домена, а именно базовый, оболочечный и проекционный домены. Сохраненные аминокислоты образуют домены основания и оболочки, в то время как домен проекции формируется гипервариабельной областью VP2, охватывающей аминокислоты 206-350 [49]. Исследования экспрессии/делеции показали, что белок VP2 представляет собой крупный конформационный нейтрализующий антигенный домен, называемый гипервариабельной областью, которая включает в себя наиболее вариабельную область, важную для клеточных антигенных и патогенных вариаций [43]. Большинство мутаций и изменений аминокислотных остатков в VP2 происходит в четырех гидрофильных петлях вирусного капсида. Эти мутации указывают на то, что селективное давление для развития вируса непосредственно ориентировано на капсидные области, которые подвергаются воздействию иммунной системы [139].

VP3 (32 кДа) является группоспецифичным белком вируса, обладает перекрестной реактивностью как с серотипами 1, так и с серотипами 2, и после заражения наиболее ранние появляющиеся антитела направляются в сторону VP3. Сегмент А также кодирует 17 кДа неструктурного белка VP5 [85, 119]. VP5 представляет собой мембранный белок класса 2 с цитоплазматическим N-концевым и внеклеточным C-концевым доменом и играет важную роль в патогенезе [116]. Этот белок является высокоосновным, богатым цистеином и полуконсервированным среди всех серотипов вируса инфекционной бурсальной болезни. VP5 накапливается в клеточной мембране, что приводит к разрушению клеток и высвобождению вирионов. Меньший сегмент В кодирует VP1 (97 кДа) [171], РНК-зависимую РНК-полимеразу, и он существует как свободный полипептид, так и в качестве геном-связанного белка. Он играет ключевую роль в формировании капсидных вирусных частиц и взаимодействует с VP3 для того чтобы сформировать комплекс VP1-VP3 который дает структурную целостность для вирусных частиц [189].

Вирус способен проходить через миллиметровые фильтры размером 300, 200, 150 нм. В капсиде вируса, очищенного методом электрофореза в

полиакриламидном геле, определено 4 основных полипептида с молекулярной массой 110000, 50000, 32000, 25000 дальтон. Считается, что основным иммуногеном считается полипептид с молекулярной массой 32000 дальтон[211, 250].

Сегмент В вируса кодирует белок VP1, РНК-зависимую РНК-полимеразу, связанную с геномными сегментами вируса, в то же время сообщается о свободном VP1 в частицах[59]. Две частично перекрывающиеся открытые рамки считывания в сегменте А кодируют основные компоненты вируса[210]. Первая ORF кодирует неструктурный белок VP5 (17 кДа), а другая кодирует полипротеин рVP2-VP4-VP3, который затем расщепляется вирусной протеазой VP4 (28 кДа) для высвобождения рVP2 (54,4 кДа) и VP3 (32 кДа) в инфицированных клетках. С-конец рVP2 дополнительно обрабатывается как VP4, так и пуромицин-чувствительной аминопептидазой, а затем, наконец, расщепляется сам по себе, давая зрелый VP2 [54]. Зрелый VP2 с VP3, каркасным белком с активностью связывания РНК, собирают капсид, сопровождаемый некоторыми пептидами, возникающими из расщепленного рVP2[129, 233].

Вирус инфекционной бурсальной болезни очень устойчив во внешней среде[177]. В помете птиц, воде, корме не теряет инфекционных свойств в течение 56 дней, на оборудовании птицефабрик до 122 дней и значительно дольше. 20°C является оптимальной температурой для передачи вируса инфекционной бурсальной болезни на большие расстояния воздушно-капельным путем[151]. При нагревании до 60°C вирус сохраняет инфекционность в течение 90 минут. Также устойчив к замораживанию и оттаиванию. При 56°C вирус не инактивируется в течение 24 часов, при 37°C через 10 дней титр снижается только на 1,2 Lg. При +4°C сохраняет инфекционность более 3 месяцев, а при -20°C – 6 месяцев и значительно дольше. При рН – 2,0 вирус сохраняет патогенные свойства в течение 60 минут, при рН 7,3 – в течение 30 минут[215]. Препараты йода инактивируют вирус за 2 минуты, 0,5% раствор хлорамина – за 10 минут, 1% раствор фенола, крезола, формалина – в течение 60 минут, 0,5% раствор формалина – за 6 часов, 20% раствор эфира – в течение 18 часов[215]. Вирус устойчив к актиномицину и

устойчив к трипсину, 5-йод-2-дезоксисуридину, ультрафиолетовому и оптическому облучению. Достаточно эффективными дезинфектантами против вируса ИББ считаются 2% раствор хлорамина (с 24-16% активного хлора).

1.4. Патогенез инфекционной бурсальной болезни в клетках иммунной системы птиц.

Примерно через 48 часов после проникновения вируса в организм птиц фабрициева сумка зараженных птиц заметно увеличивается в размерах и весе за счет возникновения отеков и гиперемии[65, 136]. Виремия и повышение температуры тела развивается вместе с воспалительной реакцией Фабрициевой сумки. Вслед за виремией и повышением общей температуры тела возникает спленомегалия, соответствующая увеличению фабрициевой сумки – средней или тяжелой степени[167]. Данное явление обычно возникает через 72 часа после проникновения вируса через защитные барьеры организма птицы. Общие поражения тимуса обычно характеризуются как менее тяжелые по сравнению с поражениями Фабрициевой сумки и селезенки и появляются несколько позже, чем в вышеперечисленных органах.

Исследование окрашенных мазков крови через 2 и 3 дня после инокуляции выявляют лимфоцитопению. Также мазки на стадии пика протекающих воспалительных процессов указывают на тяжелую лейкопению. Данное явление длится 9 дней после заражения, после чего большинство типов лейкоцитов возвращается к состоянию нормы[126].

Общая картина сывороточных белков при заражении вирусом инфекционной бурсальной болезни остается нормальной, за исключением цыплят, у которых можно обнаружить сниженный уровень сывороточного альбумина на 4 и 5 сутки после заражения. Через 6 дней после заражения снижение сывороточного альбумина становится незначительным. Глобулины крови птицы патологическим изменениям не подвергаются и остаются в пределах нормы[224].

Наиболее явные клеточные изменения при заражении птицы вирусом инфекционной бурсальной болезни обнаруживаются в медуллярной области

фабрициевой сумки уже спустя 36 ч после заражения и состоят главным образом из перерождения и некроза отдельных лимфоцитов[150]. Происходит дегенерация, характеризующаяся ядерным пикнозом и накоплением липидных. капель в цитоплазме, присутствует в разбросанных лимфоцитах в лимфоидных фолликулах. Крупные бледные фагоцитарные ретикулярные клетки (макрофаги) развиваются рядом с некротическими лимфоцитами[150]. Цитоплазма макрофагов содержит остатки ядер и прочих частиц, подвергнутых пикнозу лимфоцитов. Эти небольшие очаговые плотные области не окрашиваются в реакции Фельгена, становятся ярко-желтыми с акридиновым оранжевым и сильно реагируют с кислотной фосфатазой и красителем Шиффа [187].

Спустя 48 часов после заражения медуллярные области пораженных фолликулов становятся полностью лишены мелких лимфоцитов. Лимфоидные фолликулы, пораженные на ранней стадии заболевания беспорядочно разбросаны по фабрициевой сумке [56]. Данные фолликулы были облитерированы ретикулоэндотелиальной гиперплазией, тогда как соседние фолликулы начинают проявлять повреждения, характерные для ранней стадии вирусного поражения. В коре фабрициевой сумки обнаруживаются очаги некроза лимфоцитов и фагоцитоза их остатков[110]. Мозговое вещество и кора фабрициевой сумки крайне насыщены нейтральными липидами. Повышена митотическая активность кортикотимедуллярного эпителиального слоя фабрициевой сумки, который содержали пиронинофильные плазмобласты, а на более поздней стадии плазматические клетки.

На третьи-четвертые сутки после заражения изменения распространяются по всем лимфоидным фолликулам в фабрициевой сумке. Сильный отек, гиперемия и заметные скопления гетерофилов вызывают увеличение массы пораженной фабрициевой сумки[224]. Большие глобулы нейтральных липидов (жировая дегенерация) присутствовали во всех типах клеток в сумке, включая межфолликулярные клетки соединительной ткани. Плазматические клетки связаны с большим количеством фагоцитарных ретикулярных клеток, которые содержат большие плотные шарики PAS-положительного материала.

По мере уменьшения интенсивности воспалительной реакции в медуллярных областях лимфоидных фолликулов формируются кистозные полости[232]. Некроз и фагоцитоз гетерофилов и плазматических клеток присутствовал не только внутри фолликула, но в межфолликулярной соединительной ткани. Фиброплазия ответственна за образование межфолликулярной соединительной ткани[97].

Пролиферация бурсального эпителиального слоя приводит к образованию железистой структуры, столбчатые эпителиальные клетки которой содержат множество глобул муцина. Этот материал присутствует в цитоплазме эпителиальных клеток и в просвете, о чем свидетельствует сильная реактивность к альциановому синему.

Обнаружение вирусного антигена возможно произвести за счет обнаружения конъюгированного противовирусного глобулина, который, как показывает специфическая флуоресценция, был впервые обнаружен в цитоплазме нескольких разбросанных клеток в мозговом веществе нескольких бурсальных лимфоидных фолликулов 48 часов после заражения[106]. К 72 часам после заражения многие флуоресцирующие скопления глобулинов присутствуют во всех пораженных фолликулах [39]. Бурсальная ткань, исследованная через 4-5 дней после заражения, имеет широко распространенную цитоплазматическую флуоресценцию, предположительно, в макрофагах[202].

Дегенерирующие лимфоциты сморщены и содержат липидные вакуоли и общую дезорганизацию цитоплазматических органелл. Ядерная мембрана искажена, хроматин агрегирован, выступает и иногда заполняет ядро. Некротические лимфоциты представляют собой массу электронно-плотного материала и обычно присутствуют в цитоплазме крупных макрофагов [4].

Агрегаты вирусных частиц находятся внутри макрофагов, гетерофилов или эндотелиальных клеток и чаще всего связаны с электронно-плотными миелиновыми фигурами в лизосомных остатках[131]. Большие пиронинофильные бластные клетки, клетки проплазмы и плазматические клетки действительно не содержат вирусных частиц[193].

В атрофированной фабрициевой сумке после болезни не обнаруживается никаких признаков вирусных частиц в базальных эпителиальных клетках или в муцинсодержащих (бокаловидных) клетках рядом с просветом ни при флуоресцентной, ни при электронной микроскопии[103].

В селезенке в данные сроки после заражения наблюдается гиперемия, активизация ретикулярных клеток и макрофагальная реакция в области артериальных гильз, пикноз и рексис лимфоцитов в периартериальных лимфатических влагищах и фолликулах[253]. В тимусе отмечается гиперемия, особенно венозная, незначительное увеличение количества, а также размеров телец Гассалья[178]. В корковом слое долек чаще выявляются пикнотичные лимфоциты, ретикулярные клетки активизированы. В эзофагальных и цекальных миндалинах — гиперемия, умеренная макрофагальная реакция, пикноз и рексис лимфоцитов. В костном мозге — снижение общего числа клеточных элементов, выраженная макрофагальная реакция, пикноз и рексис лимфоцитов.

На 7 сутки после заражения фолликулы Фабрициевой сумки уменьшены в размере в 2—3 раза, часто имеют структуру в виде «пчелиных сот» [18]. Корковый слой фолликулов выражен крайне слабо, а в некоторых случаях дифференцировать его как таковой невозможно[255]. 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[248]. 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[217]. 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[133]. 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[260]. 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 [52].

На 12 сутки после заражения складки слизистой оболочки фабрициевой сумки истончены, имеют много бухтообразных впячиваний, крипт, которые придают им ветвистый вид. В складках преобладает строма, представленная бурно развивающейся соединительной тканью[70]. Соединительнотканые перегородки утолщены в 10-30 раз по сравнению с нормой. Чаще 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 [26].

1.5. Эпизоотологические особенности инфекционной бурсальной болезни

К вирусу восприимчивы цыплята различного возраста, но чаще заболевание наблюдается у 4—10-недельных птиц, как яичных, так и мясных кроссов. При заражении коммерческих цыплят 1-2-дневного возраста вирусом инфекционной бурсальной болезни как I, так и II серотипа развитие традиционной патологии не

происходит, несмотря на присутствие специфической иммунофлуоресценции в лимфоидной ткани Фабрицевой сумки[224].

Серотип I вируса инфекционной бурсальной болезни распространен во всем мире, во всех основных районах птицеводства[190]. 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 инфекционной бурсальной болезни. В Европе[93, 235], Африке[189], Азии[261] и на юге Америки преобладают высоковирулентные штаммы ИББ[173, 240, 245, 254]. В США было показано, что антитела к инфекционной бурсальной болезни серотипа II были широко распространены у кур, хотя II авирулентен для них, и в стадах индейки, что указывает на общую распространенность инфекции[86].

Несмотря на это, вирус инфекционной бурсальной болезни II серотипа, выделенный от индеек и считающийся апатогенным для кур, при заражении 1-дневных СПФ цыплят может вызвать субклиническое течение болезни с гистологическими изменениями средней интенсивности в фабрицевой сумке, селезенке. Характер изменений в лимфоидных органах бывает такой же, как при заражении вирусом инфекционной бурсальной болезни I серотипа[244]. У СПФ цыплят, зараженных вирусом II серотипа в 4-недельном возрасте, изменения в лимфоидных органах также очень незначительны, в виде умеренного обеднения лимфоцитами фолликулов фабрицевой сумки и уменьшения плазматических клеток в гардеровой железе[222]. В то же время заражение индеек вирусом инфекционной бурсальной болезни I серотипа, выделенным от цыплят, не сопровождается клиническим проявлением заболевания[191]. Однако у 3-6-недельных индюшат через 5 суток после заражения методом флуоресцирующих антител в фабрицевой сумке выявляется антиген вируса инфекционной бурсальной болезни, а также незначительная дегенерация лимфоцитов[191]. В последующем у птиц наблюдается интенсивная сероконверсия.

Установлены генетические различия среди яйценосных кроссов в восприимчивости к заражению вирусом инфекционной бурсальной болезни. Некоторые кроссы кур отличались также и в способности отвечать на результаты вакцинации инактивированной вакциной против инфекционной бурсальной болезни. Птицы мясных кроссов пород более восприимчивы к заражению вирусом инфекционной бурсальной болезни, чем куры яичных кроссов[222]. Есть сведения о восприимчивости к заражению вирусом инфекционной бурсальной болезни перепелов и воробьев. Антитела обнаружены также у грачей, диких фазанов, и несколько редких видов птиц; в антарктических пингвинах; у уток, чаек и буревестников; и вороны, чайки и соколы.

Утки и гуси, как и индейки, устойчивы к заражению вирусом ИББ серотипа, но у них происходит выработка вируснейтрализующих и преципитирующих антител и также в крови находят и самого возбудителя [41]. 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 фабрициевой сумки[89].

Белые мыши в 1-11-дневном возрасте восприимчивы к интраперитонеальному, а 12-дневные к интрацеребральному заражению вирусом инфекционной бурсальной болезни, с последующим переболеванием с признаками поражения нервной системы и гибелью на 5-13 сутки после инфицирования[204]. 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 инфекционной бурсальной болезни, 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 инфекционной бурсальной болезни, в сыворотке крови выявляются преципитирующие антитела.

Источником инфекции может быть зараженная птица, оборудование, инвентарь, корма, вода, спецодежда обслуживающего персонала. Заболевшие цыплята выделяют возбудитель болезни с помётом, заражают пищу, воду, подстилочный материал, подсобный инвентарь[77]. Заражённые корма переносятся по всему помещению (и далее) не только курами, но и вредителями (мыши, крысы), что затрудняет процесс локализации очага заражения[204]. Ранее допускался трансвариальный путь передачи вируса. Однако экспериментальные данные, подтверждающие подобный способ распространения инфекции, отсутствуют. Носителями вируса будут и пухопереды, попавшие на курицу, например, от инфицированного воробья, случайно залетевшего на куриный двор. Отличительной особенностью возбудителя является его устойчивость и длительность воздействия в окружающей среде[180]. Вода, пища, помёт птиц сберегают его до 56 дней, подсобный инвентарь, инфицированная одежда контактирующего персонала и др. — более 120 дней. Возможен перенос вируса инфекционной бурсальной болезни мучными 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 фабрициеву сумку[264]. Но вероятней, что фабрициева сумка является и первичным, и основным (мишениевым) органов для вируса инфекционной бурсальной болезни. В организме цыплят после заражения вирус локализуется в фабрициевой сумке 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[202]. При этом максимальный срок выделения вируса 14 дней. В период первой волны распространения в СССР острой формы инфекционной бурсальной болезни (1957—1979 г.) уровень смертности цыплят при спонтанном течении заболевания колебался от 1 до 56%. Затем, до появления высокопатогенных штаммов вируса

инфекционной бурсальной болезни, в нашей стране, в основном, встречалось субклиническое течение болезни, имевшей очень широкое распространение в СССР (за небольшим исключением отдельных северных районов страны, в т. ч. Республика Коми, некоторые районы Сибири и Дальнего Востока) и обычно проявлявшееся при возрасте птиц 30 дней [18]. Цыплята и куры большинства птицефабрик в те годы от инфекционной бурсальной болезни не вакцинировались [149]. К указанному возрасту цыплята постепенно освобождались от факторов специфической (наследственной) резистентности к инфекционной бурсальной болезни и в их организм проникал персистирующий в хозяйстве вирус, обуславливая субклиническое течение инфекции. У бройлеров в возрасте 3-6 недель, в подобных ситуациях, заболеваемость неосложненной формой инфекционной бурсальной болезни была та же, но смертность редко превышала 3-5%. Длительность недуга составляет 5-6 дней, но овладевает большим количеством поголовья (40-100 %) за краткий период времени [134]. Подавление лейкоцитов ведёт к разрушению иммунитета и, как следствие, риску возникновения других опасных болезней: колибактериоз, кокцидиоз, клостридиоз. Субклиническое течение инфекционной бурсальной болезни на некоторых птицефабриках провоцировало латентную аденовирусную инфекцию и при наличии еще некоторых условий возникала патология, обусловленная двумя вирусами, наносившая значительный урон иммунокомпетентной, пищеварительной, эндокринной и других систем организма птиц [70, 99, 221]. При ассоциированном течении субклинических форм инфекционной бурсальной болезни и аденовирусного гепатита с включениями, смертность бройлеров, как и молодняка яйценокских кроссов цыплят, за период выращивания составляла 30% и более [73, 183]. Субклиническое течение инфекционной бурсальной болезни встречается во многих птицеводческих хозяйствах и в настоящее время, несмотря на повсеместно применяющиеся, но не всегда удачные, различные варианты специфической профилактики болезни [17]. Но теперь, аденовирусная инфекция значительно «помолодела» и регистрируется при трансвариальной передаче даже у цыплят первых дней жизни, а также несколько позднее, и сама срывает

результаты вакцинации против инфекционной бурсальной болезни или провоцирует последнюю. Подобный альянс двух инфекций, учитывая многовариантный тропизм их возбудителей (у аденовирусов наличие не только гепато- и эпителиотропных, но при некоторых ситуациях и пантропных свойств) часто завершался и в настоящее время приводит к активизации и реализации патогенных свойств вторичной микрофлоры и других эпителиотропных вирусов (Ньюкаслской болезни, инфекционного бронхита кур, инфекционного ларинготрахеита и реовирусов)[65, 127]. С 1987 г. в некоторых странах единично начали встречаться новые, одиночные случаи острой формы инфекционной бурсальной болезни, возникавшей даже в условиях применения вакцин. Затем вспышки острой формы инфекционной бурсальной болезни, вызванные высоковирулентными штаммами I серотипа со смертностью кур яйценосных пород до 80% (в возрасте 3—14 недель) и с отходом до 30% у бройлеров, были зарегистрированы в Европе[112, 231], на Среднем Востоке, в Северной и Южной Америке[160, 188], Китае. Видимо, спонтанное повышение вирулентности вируса инфекционной бурсальной болезни произошло без каких-либо изменений в его антигенной структуре. В России «победное шествие» второй волны острой формы началось примерно в 1991 году и охватило в первую очередь вышеприведенные регионы, ранее свободные от инфекционной бурсальной болезни. При попадании в хозяйство высоковирулентного штамма вируса инфекционной бурсальной болезни заболевали цыплята самого разного возраста, с характерными клинико-патологоанатомическими признаками болезни и высокой смертностью».

Первостепенной целью вируса является уничтожение лейкоцитов в органах иммунокомпетентной системы:

1. фабрициевой сумке;
2. щитовидной железе;
3. селезёнке;
4. миндалевидной железе.

Фабрициева сумка растёт, отекает, становится желтовато-бурого цвета из-за кровоизлияний, которые имеют место также в грудных и бедренных мышцах,

миндалины слепой кишки, слизистой оболочке железистого желудка[248]. Разрушению подвергаются и почки. Они увеличиваются и приобретают цвет от светло-серого до тёмно-коричневого, ураты (мочекислые камни, состоящие из кристаллов солей мочевой кислоты) заполняют каналы и мочеточники[207]. Серьёзность заражения заключается в чрезвычайно быстрой передаче вирусного материала между контакторами (в данном случае птицами), а также через пищу, воду, подстилку и инвентарные приспособления по обслуживанию кур.

Заболевшие цыплята становятся источником инфекции, так как выделяют возбудитель болезни с помётом, заражают пищу, воду, подстилочный материал, подсобный инвентарь. Заражённые корма переносятся по всему помещению (и далее) не только курами, но и вредителями (мыши, крысы), что затрудняет процесс локализации очага заражения.

Важно отметить, что инфекционная бурсальная болезнь имеет два типа течения недуга [13]:

1. клинический;
2. субклинический (скрытый).

Первый обладает очевидной острой клинической картиной выявления болезни.

Симптоматика инфекционного бурсита включает:

- сильный понос беловато-жёлтого цвета;
- взъерошенность оперения; слабость и подавленность птицы (депрессия);
- озноб;
- значительное ухудшение аппетита (отказ от корма);
- признаки нарушения координации (в ряде случаев);
- сильный зуд вокруг клоаки (частое явление);
- обезвоживание;
- восприимчивость к патогенным организмам.

Обычно вспышки инфекционной бурсальной болезни длятся до 6 дней, причем пик смертности проявляется на 3–4 день[235]. Переболевшие особи

выздоровливают за неделю. Однако ослабленный иммунитет птицы подвержен атаке иных бактериальных и вирусных инфекций.

Субклиническая, или скрытая, форма инфекционной бурсальной болезни не имеет ярко выраженных симптомов проявления, однако сльвёт более опасной [55].

Она включает:

- угнетённое состояние;
- отставание в росте;
- незащищённость иммунитета заболевшей птицы.

Резко снижается перевариваемость и усвояемость питательных веществ любого корма больным поголовьем. Инфекционная бурсальная болезнь чаще поражает кур яичной породы 6–8 недельного возраста, а мясной — 3–4 недельного. И всё же окончательный диагноз могут подтвердить лишь лабораторные исследования, которые направлены на выявление вируса, его идентификацию и обнаружение антител в крови.

Патологоанатомические изменения на разных стадиях болезни различны. Вначале отмечают гипертрофию фабрициевой сумки и петехии в ее слизистой, экссудат с хлопьями фибрина между ее складками, геморрагии в грудных мышцах и мышцах голени, на серозных оболочках внутренних органов [46]. Через неделю поражения становятся иными: серофиброзный перикардит, гепатит и нефрит [203]. Через месяц после инфекции фабрициева сумка атрофируется и имеет размер в 3—4 раза меньший, чем у здоровой птицы того же возраста. Микроскопические изменения, характерные для инфекционной бурсальной болезни, находят в фабрициевой сумке больных птиц [230]. В основном они представлены некрозами лимфоидных и гиперплазией ретикулоэндотелиальных клеток, утолщением межфолликулярных соединительных перегородок, образованием вместо фолликулов железистых структур.

Лабораторная диагностика инфекционной бурсальной болезни [92, 124, 141, 239, 242] основана на анализе эпизоотологических данных, выявлении антител в сыворотке крови в РН, РДП, встречного иммуноэлектрофореза, на результатах гистологических исследований фабрициевых сумок [138, 214], 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[125].

Биопробу и выделение вируса) проводят на СПФ-цыплятах или коммерческих цыплятах, свободных от антител к вирусу инфекционной бурсальной болезни. С помощью бурсального индекса (соотношения массы фабрициевой сумки к массе тела цыпленка) определяют чувствительность цыплят к заражению вирусом инфекционной бурсальной болезни [19]. Из общей группы цыплят произвольно отбирают 5—10 голов, выясняют живую массу каждой птицы, затем их убивают, взвешивают взятые от них Фабрициевы сумки и вычисляют по формуле индекс сумки (ИС)[58].

Специального лечения инфекционного бурсита нет. Основным методом противодействия вспышкам инфекционной бурсальной болезни является вакцинация. Самым главным критерием успешной стратегии борьбы с инфекционной бурсальной болезнью является своевременное обнаружение заболевших птиц, установление границ эпизоотического очага и изолирование больного поголовья. Наиболее слабых больных птиц необходимо уничтожить[186]. Остальных заболевших кур определяют в другое помещение. Заражённую территорию очищают и несколько раз обрабатывают формалином, фенолом и иными спецсредствами. Подстилочный материал от больных птиц и остатки корма подлежат уничтожению. Болезнь встречается в любое время года и проявляется в неодинаковых климатических условиях [44].

1.6. Средства специфической профилактики

В качестве обязательной и наиболее эффективной профилактической меры против инфекционной бурсальной болезни используется вакцинация, как правило обычными живыми аттенуированными и инактивированными вирусными вакцинами[67]. Однако противостоять стойкому и устойчивому вирусу ИББ в условиях птицефабрики является сложной задачей, поскольку вирус остается

заразным в течение 122 дней в птичнике и в течение 52 дней в корме и воде. Следовательно, для борьбы с вирусом инфекционной бурсальной болезни необходимо строго соблюдать обычные санитарные меры для своевременного удаления вируса с территории птицефабрики[198]. Дезинфекция может снизить вирусную нагрузку и, таким образом, снизить риск передачи. Необходимо уничтожить механических переносчиков, таких как комары, мучные черви и мелкие грызуны. На фермах, где произошли вспышки инфекционной бурсальной болезни, вирус можно считать эндемическим[142]. Также молодых птиц в раннем возрасте подвергает опасности заражения вирусом инфекционной бурсальной болезни неправильная чистка вентиляции на птицефабрике. Ранняя субклиническая инфекция является основной причиной экономических потерь, поскольку болезнь может вызвать серьезное и продолжительное подавление иммунной системы, а птицы с ослабленным иммунитетом плохо вырабатывают иммунитет при вакцинации и более восприимчивы к другим инфекциям, вызываемым условно-патогенной микрофлорой[128]. Выбраковка инфицированных цыплят и борьба с заражением других стай обходятся дорого. Таким образом, вакцинация остается методом выбора для борьбы с инфекционной бурсальной болезнью. Тем не менее, одним из первых методов профилактики является заражение молодых цыплят низковирулентным вирусом инфекционной бурсальной болезни, и этот метод хотя и снижает смертность, но часто приводит к иммуносупрессии и дальнейшему распространению полевого вируса и субклиническому течению болезни [2]. Были разработаны живые аттенуированные вакцины на основе полевых изолятов после пассажирования на SPF-эмбрионах[78]. Они все еще широко используются сегодня в родительском поголовье в качестве основной вакцины для борьбы с инфекционной бурсальной болезнью во многих странах, в том числе и в Российской Федерации. До 1980-х годов смертность от инфекционной бурсальной болезни эффективно контролировалась вакцинацией[87]. Появление вариантных штаммов вируса инфекционной бурсальной болезни в США в штате Делавэр в середине 1980-х годов и последующее появление этих вариантных штаммов вируса в Европе и Азии в 1989

году привело к неудачам вакцинации [7]. Важно предотвратить инфекцию в раннем возрасте, чтобы можно было контролировать иммуносупрессивный эффект инфекционной бурсальной болезни[241]. Этого можно добиться путем иммунизации родительского стада. Инактивированные вакцины вместе с масляными адъювантами усиливают иммунный ответ, а материнский иммунитет может быть продлен до 3–5 недель. Определение правильного времени вакцинации имеет важное значение, поскольку в период, когда молодые цыплята должны быть вакцинированы аттенуированными вакцинами, слишком ранняя вакцинация может привести к нейтрализации вакцины материнскими антителами, и, наоборот, птицы могут остаться незащищенными, если вакцинация произведена слишком поздно из-за низкого уровня переданных им материнских антител[64]. Мониторинг уровня антител в родительском стаде или его потомстве может помочь в определении правильного времени для вакцинации. Уровень материнских антител может быть определен путем серологического мониторинга, а также может быть определено правильное время вакцинации. Вакцины можно вводить внутримышечной инъекцией, распылением или смешиванием с питьевой водой[218]. Цыплята, вакцинированные против инфекционной бурсальной болезни в раннем возрасте и ревакцинированные инактивированной вакциной против инфекционной бурсальной болезни с масляным адъювантом в 18-недельном возрасте, могут продуцировать и поддерживать высокие уровни вируснейтрализующих антител в течение 10 месяцев после начала яйцекладки[176]. Более того, из-за ранней вакцинации вирус вакцины будет распространяться по птицефабрике и косвенно может обеспечивать иммунный ответ другим восприимчивым цыплятам.

1.6.1. Живые аттенуированные и инактивированные вакцины.

Живые аттенуированные вакцины называются мягкими, промежуточными или «промежуточными плюс» (горячими) вакцинами в зависимости от способности вызывать гистопатологические поражения различной степени и подходят для массовой вакцинации, предпочтительно через питьевую воду, для индукции стойкого клеточного и гуморального иммунитета[142]. Мягкие вакцины

не вызывают повреждения бурсальной сумки у цыплят, но имеют низкую эффективность при наличии высокого уровня материнских антител или в состоянии уже произошедшего инфицирования вирусом инфекционной бурсальной болезни [3]. Вакцины с более высокой патогенностью (промежуточная или «промежуточная плюс») могут преодолевать высокий уровень материнского иммунитета, но могут вызывать поражения бурсальной сумки с последующей иммуносупрессией, ведущей к инфекции, вызываемой вторичной условно-патогенной микрофлорой [45]. Кроме того, они могут не защищать от заражения вирусом инфекционной бурсальной болезни 49 или его антигенными вариантами [257].

Инактивированные вакцины, в основном приготовленные в виде эмульсий вода-в-масле, обычно вводятся племенным курам для вертикальной передачи высоких, однородных и стойких титров антител потомству. Промежуточные и «горячие» вакцины в основном используются для преодоления уровня материнских антител у молодняка бройлеров [201]. У вакцин данного типа присутствует несколько нежелательных побочных эффектов, например: возможность возврата штамма к вирулентности, образование вариантных штаммов, а также реакции на вакцину, приводящие к заболеванию или потере продуктивности [27]. Из-за этих ограничений были разработаны вакцины нового поколения для борьбы с вирусом инфекционной бурсальной болезни [218].

1.6.2. Субъединичные вакцины.

Главный капсидный белок VP2 оказался важной мишенью для генерации клеточного и гуморального иммунного ответа против инфекционной бурсальной болезни [220, 246]. Полипротеин VP2 воспроизводился в различных системах, таких как *Escherichia coli*, *Lactococcus lactis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris* [25], вирус оспы птиц, бакуловирусы, и даже системы экспрессии растений. В экспериментальных исследованиях белок VP2 может вызывать частичную [29] или 100% защиту [195]. Рекомбинантные вакцины могут позволить разработать стратегию дифференциации инфицированных от вакцинированных животных

(DIVA) для дифференциации вакцинированных птиц от инфицированных. Однако эту вакцину нового поколения необходимо вводить вместе с адъювантами парентерально, а ревакцинация увеличивает стоимость ее производства. На сегодняшний день рекомбинантные вакцины на основе VP2, экспрессируемой в *E. coli*, *P. pastoris* [11] и бакуловирусе, лицензированы для коммерческого использования[247].

1.6.3. Вакцина на основе вирусоподобных частиц (VLP).

VLP - это надежные белковые комплексы размером до нескольких нанометров, которые имитируют общую структуру вирионов профилактируемого вируса, но не содержат полного вирусного генома. Урезанные гены VP2 и VP3 вируса инфекционной бурсальной болезни генерировали VLP в системе экспрессии бакуловируса[251]. Атенуированные патогены обычно являются отличными индукторами как клеточного, так и гуморального звеньев иммунного ответа, но, как обсуждалось ранее, имеют шанс вновь обрести вирулентность. Неинфекционные субъединицы патогенов, такие как рекомбинантные белки, пептиды или сахара, слабо иммуногенны и должны быть приготовлены с иммуностимулирующими адъювантами. Иммуногенность, продуцируемая вакциной на основе VLP, намного лучше, чем у субъединиц белка VP2 и продуктов экспрессии полипротеинов вируса инфекционной бурсальной болезни[130]. Каркас VLP образуется за счет электростатического взаимодействия между белками VP2 и VP3. Также существует модель вакцины, при которой были получены субвирусные частицы (SVP) размером 23 нм в системе дрожжей (*P. pastoris*), которые обеспечивали частичную защиту при пероральном заражении вирусом инфекционной бурсальной болезни и полную защиту при внутримышечном заражении[162]. Вакцина против ИББ на основе субвирусных частиц может полностью защитить птиц от заражения вирусом инфекционной бурсальной болезни и вызывать как гуморальный, так и клеточно-опосредованный иммунный ответ. Однократная вакцинация SVP от инфекционной бурсальной болезни в

инкубатории может исключить дорогостоящую и трудоемкую вакцинацию в полевых условиях даже в присутствии высокого уровня материнских антител[181].

1.6.4. ДНК-вакцины.

Компоненты ДНК-вакцины, вызывающие экспрессию белка VP2, могут вызывать как гуморальный, так и клеточный иммунный ответ, но защитная эффективность варьируется от 40% до 80% и часто приводит к поражению фабрициевой сумки, что ведет к иммуносупрессии. Для получения лучших результатов проводится вакцинация *in ovo* или в суточном возрасте с последующей ревакцинацией инактивированной вакциной или векторной вакциной на основе вируса птичьей оспы[197]. Однако вакцинация *in ovo* без ревакцинации вакцины не вызывает формирования достаточного уровня иммунитета. Однако уровень защиты зависит от количества ДНК, используемой в первичной вакцине, используемого контрольного штамма вирусов, возраста птицы и способа вакцинации. ДНК-вакцина, несущая ген VP2 вируса инфекционной бурсальной болезни и интерлейкин-18, усиливала иммунный ответ и эффективность защиты против вируса инфекционной бурсальной болезни до 93%[179]. В исследовании сообщалось о полной защите с помощью ДНК-вакцины, кодирующей белок VP2 вируса инфекционной бурсальной болезни совместно с геном дефензина (AvBD-9), при этом ДНК-вакцина, кодирующая только белок VP2, обеспечивала защиту на 80%[249]. Химерная ДНК-вакцина, кодирующая С-концевой белок HSP70 в *Mycobacterium tuberculosis*, слитый с полноразмерным геном белка VP2 вируса инфекционной бурсальной болезни, вызвала хорошо выраженный иммунный ответ на обе инфекции и полностью защитила птиц при ревакцинации вакциной на основе субвирусных белков, в которой VP2 был экспрессирован в *Salmonella cerevisiae*. Флагеллиновый (fliC) лиганд TLR-5-антиген *Salmonella Typhimurium* при слиянии с N-концом белка VP2 и инъекции в качестве ДНК-вакцины обеспечивал защиту на 80%, но также вызывал иммунитет против обеих инфекций как со стороны гуморального, так и клеточного иммунитета. Для достижения успешной иммунизации ДНК-вакциной против инфекционной бурсальной болезни

решающее значение имеют возраст птицы, способ введения вакцины и вирулентность контрольного вируса[159].

1.6.5. Иммунокомплексные вакцины.

Иммунокомплексная вакцина представляет собой смесь живых штаммов вируса, смешанных с антителами против вируса инфекционной бурсальной болезни, полученными из гипериммунной сыворотки цыплят или рекомбинантных нейтрализующих антител, и на сегодняшний день уже коммерчески доступна в том числе и на территории Российской Федерации[225]. Данную вакцину можно вводить подкожно суточным цыплятам даже в присутствии материнских антител [28, 53], что приводит к возникновению активного иммунного ответа, не вызывающего какой-либо иммуносупрессии, индуцированной вакциной[226]. Иммунокомплексные вакцины также используются для вакцинации *in ovo* на 18-й день инкубации с использованием автоматизированной технологии для достижения очень точной вакцинации[120]. При таком способе введение вакцины вызывает образование большего количества зародышевых центров в селезенке, что приводит к локализации вируса инфекционной бурсальной болезни в фолликуло-дендритических клетках селезенки, а также фолликулах фабрициевой сумки [47, 48]. Было обнаружено, что эффективность иммунокомплексной вакцины против инфекционной бурсальной болезни после заражения равна или лучше, чем у обычных живых вакцин[91]. Принцип, лежащий в основе этой технологии, заключается в том, что антитела к вирусу инфекционной бурсальной болезни в иммунокомплексной вакцине образует комплекс с вирусом, что вызывает задержку обнаружения вируса (до 5 дней) и маскировки его от материнских антител[123]. Сообщается также, что иммунокомплексная вакцина в ряде исследований приводила к плохому иммунному ответу, поскольку титр ИФА к вирусу инфекционной бурсальной болезни был отрицательным в трехнедельном возрасте, что может быть объяснено тем, что вирус в вакцине все еще связывается некоторыми факторами нейтрализации вирусов, приводящий к снижению активного иммунитета, но титр антител значительно увеличивался в возрасте 28

дней[144]. Иммуный ответ на вакцину из штаммов промежуточные плюс (228E) считался отрицательным в возрасте 21 дня, но он стал значительно более высоким после применения ее в возрасте старше двух недель (до 28 дней), в то время как Wyeth и Chettle сообщили, что сероконверсию к вакцине из штаммов промежуточные плюс для коммерческих бройлеров с высоким уровнем материнских антител можно ожидать через 18 дней после вакцинации[259].

1.6.6. Живые векторные вакцины.

Понимание генома вируса инфекционной бурсальной болезни помогает при создании вакцин учитывать характер взаимодействия специфических антигенных белков вируса и микроорганизма, а также реконструировать вирус для создания живых векторных вакцин. Полное секвенирование генома вируса инфекционной бурсальной болезни дало возможность для разработки системы обратной генетической вакцины. Гипервариабельная область гена, кодирующего белок VP2, была заменена на аттенуированный мутантный штамм вируса инфекционной бурсальной болезни с помощью сайт-направленного мутагенеза и затем восстановлена с помощью обратной генетики[132]. Мутантный вирус был способен защищать как от классических, так и от антигенных вариантов штаммов вируса инфекционной бурсальной болезни. Имеется несколько сообщений об использовании рекомбинантных живых вирусных векторов, включая вирус герпеса индеек, вирус болезни Ньюкасла, вирус оспы птиц и птичий аденовирус, включающий ген VP2 с целью защиты птиц от инфекционной бурсальной болезни с помощью стратегии DIVA[166, 209]. Вакцина HVT-VP2 была лицензирована в нескольких странах и признана безопасной, поскольку вирус слабо чувствителен к материнским антителам, не вызывает поражений бурсальной сумки и обладает подтвержденной эффективностью, подтвержденной в исследованиях на предприятиях. Эту вакцину можно вводить как *in-ovo*, так и подкожно суточным цыплятам[163].

1.7. Расчет времени вакцинации

Уровень материнских антител высок у цыплят, полученных от кур, иммунизированных в раннем возрасте, однако он быстро снижается после 21-го дня жизни. Примечательно, что антитела возможно обнаружить в крови цыпленка до 28-го дня и позднее [62]. Были продемонстрированы следы материнских антител в крови цыплят до 11-19-го дня и позже на 23-й день после вылупления [256]. Другие исследователи утверждали, что антитела сохраняются до 28-го дня, 29-го дня, 30-го дня и на 20-й день после вылупления [50]. Эти существенные различия можно объяснить количеством антител, передаваемых от курицы к цыпленку через яйцо. Был сделан вывод, что уровень материнских антител зависит в том числе и от количества яичного желтка, в котором локализуется большинство антител [216].

Также было замечено, что период полураспада материнских антител, специфичных к вирусу инфекционной бурсальной болезни составляет от 3 до 5 дней [174]. Аналогично, другие исследования сообщили, что период полураспада материнских антител против вируса инфекционной бурсальной болезни у цыплят составлял 3,46 дня и уменьшался каждые 4 дня. Было сообщено, что темпы снижения были примерно наполовину каждые 5 дней и между 4 и 5 днями. У только что вылупившихся цыплят уровень материнских антител демонстрирует линейное или криволинейное снижение со средним периодом полураспада от 5 до 6 дней. Отдельные авторы сообщили о периоде полураспада материнских антител, специфичных к вирусу инфекционной бурсальной болезни, равном 6,7 дням [109]. Обычно считается, что период полураспада материнских антител у цыплят мясных пород значительно короче, чем у яйценокских пород, и составляет примерно 3 дня. Данные этого исследования показали, что снижение уровня антител против вируса инфекционной бурсальной болезни является переменным в течение периода выращивания. Это расхождение может быть объяснено влиянием на период полувыведения материнских антител, типа вакцины, временем ее применения у кур и, вероятно, иммунным статусом кур. Более того, в то время как титры антител могут не сильно различаться у птиц в одном стаде одинакового возраста, потомство различных вакцинированных стад может демонстрировать различные титры антител против вируса инфекционной бурсальной болезни. Когда потомство

разных родительских стад выращивается вместе, это может привести к различному уровню материнских антител и разделению стада на особей с низкой или высокой восприимчивостью к вирулентному вирусу инфекционной бурсальной болезни. Однако в полевых условиях картина распада материнских антител, специфичных к вирусу инфекционной бурсальной болезни оказалась более сложной, поскольку она в значительной степени зависит от начальных уровней антител, которые могут варьироваться между поголовьями, а также внутри поголовья, что затрудняет прогнозирование оптимального времени вакцинации [30].

Результаты этого исследования соответствуют наблюдениям, что наиболее оптимальным временем является время, когда уровень антител ниже порога уровня защиты (дни 21-35)[63]. Исследователи подтвердили, что уровень материнских антител у цыплят (56,6%) был ниже уровня защиты через 3 недели или через 15-20 дней после вылупления. У всех пород цыплят из вакцинированного родительского стада было обнаружено высокое содержание материнских антител на 1-й день, которое постепенно снижалось ниже уровня защиты в течение 15-20 дней после вылупления. Задолго до этого было показано, что он снижался ниже уровня защиты в течение 2,5–3,5 недель после вылупления[205]. В отличие от этого, другие исследователи отметили, что количество антител часто уменьшалось в течение 7-14 дней с момента вылупления[206]. Расхождение, скорее всего, отражает использование различных типов вакцин и графиков вакцинации. Также был сделан вывод, что промежуточные плюс вакцины индуцируют более высокие титры антител, чем другие вакцины, хотя некоторые промежуточные вакцины индуцируют аналогичные титры[184]. Результаты этого исследования также согласуются с результатами, которые говорят о том, что титры антител в ИФА при вакцинации вакцинами из промежуточных штаммов были самыми низкими во всех интервалах, в то время как титры антител от вакцины из штаммов промежуточные плюс были самыми высокими[69]. Поэтому время, в течение которого уровень антител ниже уровня защиты от патогенного штамма, является переменным.

Ранняя вакцинация не смогла стимулировать иммунную систему цыплят, потому что материнские антитела реагируют с живым вакцинным вирусом и

нейтрализуют их [31]. Несколько исследований в лабораторных условиях показали, что высокий уровень материнских антител во время вакцинации против инфекционной бурсальной болезни может влиять на эффективность вакцины, нейтраловать вакцинный вирус и задерживать или даже предотвращать индукцию гуморального иммунитета. Это означает, что вакцинация в первые дни не дала цыпленку никакой защиты от болезни. Тем не менее, увеличение титра наблюдалось при проведении вакцинации в течение 14 дней[158].

Отдельные ученые рекомендовали вакцинировать кур в возрасте 2 недель промежуточными штаммами вируса инфекционной бурсальной болезни и ревакцинировать их "горячей" вакциной в возрасте 3 недель в закрытой системе[223]. Сообщалось о расчетных оптимальных сроках вакцинации против вируса инфекционной бурсальной болезни для каждого поголовья в трех точках отбора проб в возрасте от 16 до 24 дней[234]. Аналогично указали, что оптимальное время вакцинации составляет от 17 до 23 дней после вылупления на основе формулы Девентера[76], в то время как другие авторы предположили, что цыплята бройлеров, вакцинированные на 8, 15 и 23 дни живой аттенуированной вакциной или живой аттенуированной вакциной с последующей инактивированной вакциной на 8 и 21 день, могут быть адекватно защищены от клинической формы инфекционной бурсальной болезни[172].

1.8. Экспрессия генов иммунитета

Широко известно, что организм реагирует на агрессивные и инфекционные воздействия внешней среды в том числе посредством активации процессов экспрессии генов иммунного ответа в клетках и тканях различных органов, в ходе чего образуется матричная РНК, комплементарная ДНК экспрессирующихся генов. Экспрессия генов является пространством для эволюционных изменений, поскольку изменение времени, места и количества экспрессии одного гена может влиять на функцию других генов во всем организме. Регулирование экспрессии генов позволяет клеткам контролировать свою собственную структуру и функцию и является основой клеточной дифференцировки, морфогенеза и адаптации[208].

Так, в ответ на инъекцию в организм микробиального субстрата организм изменяет уровень экспрессии свыше 250 генов, среди которых наиболее активными в отношении патогенных агентов являются гены, регулирующие выработку защитных цитокинов и хемокинов. Цитокины-это важные белки, секретируемые клетками, которые играют центральную роль в иммунных и воспалительных реакциях[94]. Они являются эффекторными посланниками врожденных и адаптивных иммунных систем, которые иницируют и управляют иммунными реакциями, направленными на искоренение микробных патогенов[60]. Хемокины-это класс цитокинов, которые обладают хемоаттрактантной активностью, которая контролирует движение иммунных клеток. В качестве регуляторов инициации и поддержания защитных сил организма хозяина цитокины в конечном счете определяют тип иммунного ответа и эффекторные механизмы, генерируемые для опосредования резистентности. Цитокины, такие как интерферон гамма (IFN γ) и интерлейкины (ILs) являются важными компонентами иммунной системы [38]. Эти молекулы служат важным связующим звеном между врожденной и адаптивной иммунными системами[80]. В дополнение к соединению как адаптивных, так и врожденных аспектов иммунной системы, эти молекулы обеспечивают начальные сигналы, предупреждающие иммунную систему о потенциальных угрозах. Также существует корреляция между активностью гуморального звена иммунного ответа и тканеспецифической экспрессии мРНК генов IFN γ , IL-12 и IL-18 у цыплят-бройлеров[147].

Заражение организма вирусом инфекционной бурсальной болезни имеет свои особенности. Так, результаты показывают, что инфекционный процесс, вызываемый вирусом ИББ, включает в себя острую фазу, характеризующуюся очень активной репликацией вируса, высвобождением высоких титров вируса и массивным апоптотическим ответом, который убивает большинство инфицированных клеток [40]. Клетки, выжившие в начальной острой фазе, остаются постоянно инфицированными, поддерживая пролиферацию клеток, в то же время выдерживая сильно ослабленную репликацию вируса. Длительное поддержание устойчиво инфицированных клеток DF-1 приводит к отбору

популяций клональных клеток, неспособных реагировать на интерферон I типа (IFN)[192].

Также, было обнаружено, что ключевые гены, вовлеченные в активацию и сигнализацию В-клеток (TNFSF13B, CD72 и GRAP) могут также сигнализировать об иммуносупрессии, опосредованной вирусом инфекционной бурсальной болезни[102]. Более того, клетки реагировали на инфекцию, экспрессируя противовирусные I-IFN I типа и стимулированные I-IFN гены, что, как предполагается, может способствовать его вирулентности.

Это подтверждается исследованиями ученых, которые утверждают, что в большинстве случаев РНК-содержащий вирус, вызывающий инфекционную болезнь у птиц, попав в клетки, запускает врожденный иммунный ответ в клетках-хозяевах за счет вовлечения клеточного куриного MDA5 (chMDA5) в вирусную РНК, а затем активирует нижестоящий фактор транскрипции IRF3/IRF7, индуцируя продукцию интерферона типа I (I-IFN, который впоследствии связывается с рецептором интерферона, инициируя следующий путь передачи противовирусного сигнала)[164]. Однако в случае инфекции ИББ было обнаружено, что белок VP3 прочно связывается с MDA5, блокируя его распознавание dsRNA, PAMP ИББ, тем самым значительно ингибируя экспрессию I-IFN[262].

Данная работа по экспрессии генов позволяет предположить, что в случае инфицирования организма птицы интерферон не играет такой существенной защиты, как при других инфекционных болезнях, вызываемых РНК-содержащими вирусами[81]. Исследования дали более подробную характеристику иммунного ответа цыплят на заражение вирусом инфекционной бурсальной болезни, и указали на важность в противовирусном ответе цитокинов и хемокинов, и, соответственно, количественного определения экспрессии кодирующих их генов.

2. СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Материалы и методы исследований

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, предоставляемому Советом по грантам Президента Российской Федерации №МД-2579.2021.5 «Изучение экспрессии генов иммунитета сельскохозяйственной птицы при вакцинации иммунокомплексной вакциной против инфекционной бурсальной болезни».

Был поставлен опыт *in vivo* на цыплятах кросса Ломан Уайт (яйценоский кросс кур) и цыплятах кросса Росс-308 (мясной кросс кур). Эксперимент на цыплятах кросса Ломан Уайт и цыплятах кросса Росс-308 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, биоинформационный и статистический.

Материалом для лабораторных исследований служили образцы сыворотки крови птиц, а также ткани фабрициевой сумки и слепых отростков кишечника.

Лабораторные исследования содержания антител в сыворотке крови проводили в Научно-исследовательском консультационно-диагностическом центре по птицеводству ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет ветеринарной медицины», исследование экспрессии иммунокомпетентных генов в тканях фабрициевой сумки проводили в

молекулярно-генетической лаборатории компании ООО «БИОТРОФ». Схемы и результаты исследований приведены в соответствующих разделах диссертации.

2.1.1. Создание вакцины

Для получения антител для создания иммунокомплексной вакцины против инфекционной бурсальной болезни из штамма «ВНИВИП» использовали гипериммунизированных SPF-кур кросса Ломан Уайт. Для иммунизации использовалась живая вакцина против инфекционной бурсальной болезни из штамма «ВНИВИП». Штамм «ВНИВИП» был получен от компании «Кронвет». Вакцинацию осуществляли двукратно: интраназально и интраокулярно. Затем через 2 недели проводили ревакцинацию инактивированной вакциной против инфекционной бурсальной болезни из штамма «ВНИВИП». Спустя 3 недели отбирали у птицы сыворотку крови с соблюдением методов асептики и антисептики. Данную сыворотку крови исследовали в реакции диффузионной преципитации. Титр антител составил 1:256. Для проведения реакции диффузионной преципитации использовали набор антигенов и сывороток для выявления специфических антител и антигенов вируса инфекционной бурсальной болезни в реакции диффузионной преципитации "БИОТЕСТ-РДП".

Производственный штамм «ВНИВИП» вируса инфекционной бурсальной болезни освежали путем одно-двукратного пассирования на развивающихся СПФ-куриных эмбрионах 10-12-суточного возраста.

Перед заражением эмбрионы овоскопировали и отбирали пригодные для работы: подвижные, с хорошо развитой сосудистой системой. Сбоку эмбриона между кровеносными сосудами отмечали участок для прокола скорлупы и инокуляции вируса. Скорлупу со стороны пуги и место прокола дезинфицировали спиртом, и фламбировали. В центре пуги пробойником делали отверстие, эмбрион клали горизонтально и с помощью специальной присоски, прикрепленной со стороны пуги и пробойника сбоку формировали искусственную пугу. Заражение эмбрионов проводили на хориоаллантаоисную оболочку в объеме 0,2 см³

производственного штамма «ВНИВИП» вируса инфекционной бурсальной болезни, разведенного 1:100 стерильным физиологическим раствором.

Зараженные и контрольные эмбрионы инкубировали при $(37,0 \pm 0,5)$ °С в течение 5 суток. В процессе инкубации эмбрионы овоскопировали два раза в сутки через 12 часов. Эмбрионы, погибшие в течение первых 48 часов после заражения уничтожали, считая их гибель неспецифичной.

Через 5 суток инкубации все эмбрионы охлаждали при температуре 4-6°С в течение 16-18 часов и вскрывали.

Перед вскрытием эмбрионов скорлупу под пугой дезинфицировали спиртом и фламбировали. Вскрывали, собирали тушки эмбрионов и хорионлантоисные оболочки и готовили гомогенат на физиологическом растворе в соотношении 1:1. Гомогенат центрифугировали в течение 30 мин. при 3000-5000g. Надосадок расфасовывали в стерильные пенициллиновые флаконы и хранили их в низкотемпературном морозильнике при температуре -80°С.

Контроль: проводили, как описано выше, но вместо аллантоисной жидкости из куриного эмбриона в свободные 4 лунки панели вносили по 0,4 - 0,5 мл буферно-солевого раствора рН 7,2 +/- 0,2.

Вычисление биологического титра проводили по методу Рида и Менча [26].

Иммунокомплексная вакцина против инфекционной бурсальной болезни из штамма «ВНИВИП» была приготовлена путем смешивания нативного вируса инфекционной бурсальной болезни из штамма «ВНИВИП» с полученной вышеописанным образом специфической гипериммунной сывороткой. Вирусодержащий материал добавляли в гипериммунную сыворотку при постоянном помешивании. Одна доза вакцины содержала не менее $10^{3,0}$ ЭИД₅₀/см³.

Контроль внешнего вида вакцины осуществляли по ГОСТ 33821-2016 [15]. Контроль вакцины на стерильность проводили по ГОСТ 28085-2013 [14]. Из каждого образца иммунокомплексной вакцины против инфекционной бурсальной болезни из штамма «ВНИВИП» производили посев на стерильные питательные среды: МПА, МПБ, МППБ (среда Китт-Тароцци), бульон Сабуро, агар Хейфлика – по три пробирки. Для выявления аэробных микроорганизмов высевали 0,5 см³

посевного материала на пробирку, для выявления анаэробных микроорганизмов - 1 см³. Пробирки с посевами на МПА, МПБ, выдерживали в термостате при (37,0±1) °С в течение 7 суток, на МППБ и агаре Хейфлика – при (37,0±1) °С в течение 14 суток, на среде Сабуро – при (22,5±2,5) °С в течение 7 суток. По истечении указанного срока аналогичным образом выполняли пересев на те же питательные среды, исключая МПА, и инкубировали в течение 7 суток (посевы на МППБ – в течение 14 суток). Одновременно проводили контроль стерильности питательных сред: три пробирки с каждой средой выдерживали в термостате в течение 7 суток при (37,0±0,5) °С, с МППБ в течение 14 суток при (37,0±0,5) °С, со средой Сабуро – при (22,5±2,5) °С.

Безвредность вакцины проверяли по ГОСТ 28085-2013 [14] на десяти 40-дневных SPF-курах породы Ломан Уайт введением 10-кратной прививной дозы внутримышечно в грудную мышцу. За птицей вели наблюдение в течение 14 сут.

2.1.2. Эксперимент на цыплятах кросса Ломан Уайт и цыплятах кросса Росс-308 на базе вивариев Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования “Санкт-Петербургский государственный университет ветеринарной медицины”.

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 (таблица 1) и цыплятах кросса Росс-308 (таблица 2). 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).

Птицу содержали в групповых клеточных батареях в условиях вивария Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования “Санкт-Петербургский государственный университет

ветеринарной медицины”. Клетки были оборудованы автоматическими системами поения. Клетки различных исследуемых групп были расположены в отдельных боксах с изолированными системами поения.

В день вывода цыплята индивидуально взвешивались и размещались в клеточных батареях по 3 клетки в двух боксах. В течение первых 7 дней цыплятам обеспечили бумажную подстилку, после 7 дней подстилку убрали.

Кормление птицы осуществляли сухими полнорационными комбикормами (для цыплят кросса Ломан Уайт – «ПК2 - комбикорм для цыплят с 1-й по 7-ю неделю» производства ЗАО «Гатчинский ККЗ», для бройлеров - комбикорм «ПК-5 - комбикорм для цыплят-бройлеров с 1-й по 4-ю неделю» производства ЗАО «Гатчинский ККЗ»). Птице предоставлялся свободный доступ к воде и кормам. Состав комбикорма: пшеница, шрот соевый, кукуруза, шрот подсолнечный, ячмень без пленки, рыбная мука, премикс П5 старт У, масло растительное, фосфат дефторированный, L-лизин моногидрохлорид, DL-метионин, соль поваренная, сульфат натрия, L-треонин. Производителем в корм введены ферменты Ровабио эксель АП 50,0 г/т и хостазим Р10000 50,0 г/т. Обменная энергия, не менее 285 ккал/100г.

Суточные цыплята были разделены в случайном порядке на 2 группы по 30 цыплят – вакцинированную и контрольную. Птицу опытной группы вакцинировали подкожно в область шеи изготовленной ранее иммунокомплексной вакциной против инфекционной бурсальной болезни из штамма “ВНИВИП” в дозе 0,3 мл³ в суточном возрасте.

Таблица 1 - Итоговое разделение по группам цыплят кросса Ломан Уайт

№	Группа птиц	Вакцина	Количество голов
1	Контрольная группа цыплят кросса Ломан Уайт.	Без вакцинации	50
2	Вакцинированная группа цыплят кросса Ломан Уайт.	Вакцинация иммунокомплексной вакциной против инфекционной бурсальной болезни из штамма "ВНИВИП"	50

Таблица 2 - Итоговое разделение по группам цыплят кросса Росс-308

№	Группа птиц	Вакцина	Количество голов
1	Контрольная группа цыплят кросса Росс-308.	Без вакцинации	30
2	Вакцинированная группа цыплят кросса Росс-308.	Вакцинация иммунокомплексной вакциной против инфекционной бурсальной болезни из штамма "ВНИВИП"	30

Контрольную и вакцинированную группы размещали и содержали в отдельных боксах.

Образцы тканей фабрициевой сумки для анализа экспрессии генов отбирали от случайным образом выбранных птиц всех исследуемых групп (n=3) через 5 недель после вакцинации (35 день опыта).

Образцы предварительно выдерживали при -20°C для транспортировки в молекулярно-генетическую лабораторию компании ООО «БИОТРОФ».

Отбор крови у цыплят осуществлялся в возрасте 7, 14 и 35 суток. Полученную сыворотку крови исследовали на базе Научно-исследовательского консультационно-диагностического центра ФГБОУ ВО "СПбГУВМ" на фотометре микропланшетного формата Multiskan FC методом иммуноферментного анализа и в реакции диффузионной преципитации. Для проведения реакции диффузионной преципитации использовали набор антигенов и сывороток для выявления специфических антител и антигенов вируса инфекционной бурсальной болезни в реакции диффузионной преципитации "БИОТЕСТ-РДП". Для постановки реакции

использовался набор The Infectious Bursal Disease Virus Antibody test kit производства компании BioChek согласно инструкции производителя.

2.1.3. Метагеномные исследования

Метагеномные исследования выполняли методом NGS-секвенирования, путём анализа гена прокариотической 16S-рибосомальной РНК (16S рРНК).

Тотальную ДНК из исследуемых образцов выделяли с использованием набора «Genomic DNA Purification Kit» («Fermentas, Inc.», Литва) следуя рекомендациям производителя. Концентрацию полученной ДНК определяли с помощью флуориметра Qubit («Invitrogen, Inc.», США) с использованием наборов «Quant-iT dsDNA Broad-Range Assay Kit» («Invitrogen, Inc.», США), согласно рекомендациям производителя. Амплификацию для последующего проведения NGS-секвенирования проводили с использованием ДНК-амплификатора Verity («Life Technologies, Inc.», США) с помощью эубактериальных праймеров (IDT), 343F (5'-CTCCTACGGRRSGCAGCAG-3') и 806R (5'-GGACTACNVGGGTWTCTAAT-3'), фланкирующих участок V1V3 гена 16S рРНК [36]. Метагеномное секвенирование осуществляли на геномном секвенаторе MiSeq («Illumina, Inc.», США) с набором MiSeq Reagent Kit v3 («Illumina, Inc.», США). Максимальная длина полученных последовательностей составила 2 x 300 нт. Химерные последовательности были исключены из анализа с помощью программы «USEARCH 7.0» (<http://drive5.com/usearch/>). Обработка полученных ридов 2 x 300 нт происходила с помощью биоинформатической платформы «CLC Bio GW 7.0» («Qiagen», Нидерланды) и включала в себя перекрывание, фильтрацию по качеству (QV>15), триммирование праймеров. Определение таксономической принадлежности микроорганизмов до рода проводили с применением программы «16S Metagenomics» («Illumina, Inc.», США). Классификация основана на базе данных Greengenes (<http://greengenes.lbl.gov/>). Результатом этого рабочего процесса является классификация операций чтения на нескольких таксономических уровнях: царство, тип, класс, порядок, семейство, род и виды.

2.1.4. Анализ экспрессии генов

Анализ уровня относительной экспрессии генов иммунитета проводили методом ПЦР в реальном времени (qPCR). Общая РНК из образцов была выделена с использованием набора Aurum™ Total RNA Mini Kit (Bio-Rad) в соответствии с инструкциями производителя. Ткань разрезали на мелкие кусочки (<5 мм длиной) и измельчали до тонкого порошка с помощью пестика и ступки, содержащей жидкий азот. Ткани измельчались и гомогенизировались с добавлением раствора PureZOL™.

С использованием набора iScript™ обратной транскрипции Supermix (Bio-Rad) проводили реакцию обратной транскрипции для получения кДНК с использованием матрицы РНК. Программа термоциклера: подготовка в течение 5 мин при 25°C, обратная транскрипция в течение 20 мин при 46°C, инактивация в течение 1 мин при 95°C.

Реакцию амплификации с генными праймерами проводили с использованием набора SsoAdvanced™ Universal SYBR® Green Supermix (Bio-Rad) в соответствии с протоколом производителя.

Расчет относительной экспрессии был произведен при помощи метода 2⁻ΔΔCt. В качестве референсного гена был выбран ген белка b-Actin. Список праймеров приведен в таблице 3.

Таблица 3 - Список праймеров для исследования генов

Буквенное обозначение гена	Наименование гена/белка	Последовательность нуклеотидов праймера
<i>AvBD-10</i> (<i>Gal-10</i>)	Бета-дефензины	F: GCTCTTCGCTGTTCTCCTCT R: CCCAGAGATGGTGAAGGTG
<i>AvBD-9</i> (<i>Gal-9</i>)		F: AACACCGTCAGGCATCTTCACA R: CGTCTTCTTGGCTGTAAGCTGGA
<i>IL-6</i>	Цитокины	F: AGGACGAGATGTGCAAGAAGTTC R: TTGGGCAGGTTGAGGTTGTT
<i>IL8L2</i>		F: GGAAGAGAGGTGTGCTTGGGA R: TAACATGAGGCACCGATGTG
<i>PTGS2</i>	Простагландин-эндопероксид-синтаза-2 (циклооксигеназа 2)	F: TAAGTGCGATTGTACCCGGAC R: TTTGTAGCCATAGTCAGCATTGT
<i>IRF7</i>	Регуляторный фактор интерферона 7	F: GAGACTGGCTATTGGGGGAG R: GACCGAAATGCTTCCAGGG
<i>b- Actin</i>	Бета-актин	F: ATTGTCCACCGCAAATGCTTC R: AAATAAAGCCATGCCAATCTCGTC

2.1.5. Математическая и статистическая обработка результатов

Математический и статистический анализ результатов был выполнен с использованием стандартной методики дисперсионного анализа с использованием Excel XP/2010.

2.2. Результаты собственных исследований

2.2.1. Исследование сыворотки крови гипериммунизированных птиц в реакции диффузионной преципитации для создания иммунокомплексной вакцины.

При постановке РДП нами было отмечено, что искомые (диагностические) полосы преципитации образуются в агаре между лунками с испытуемыми гомологичными пробами, только тогда, когда активность антигенов и антител находятся в оптимальных соотношениях. При этом число видимых линий преципитации соответствует числу пар антиген-антитело в исследуемой системе. В противном случае использование в реакции хотя бы одного из основных

компонентов в несбалансированном разведении (иначе в слишком активном виде) не позволяет получать диагностических полос преципитации, даже в случае гомологии пары антиген-антитело. Вероятно, более слабый компонент реакции не способен под давлением более активного диффундировать за пределы лунки с испытуемой пробой. В этом случае линия преципитации, даже если образуется, остается невидимой на границе агара и лунки со слабым компонентом. Для повышения диагностической чувствительности РДП мы предлагаем проводить предварительное шахматное титрование по образцу, представленному в табл. 4.

Таблица 4 - Титрование сыворотки крови при постановке РДП

Разведение антигена	Разведение сыворотки							
	Ц.	2	4	8	16	32	64	128
Ц.	+	+	+	+	+	+	+	-
2	-	+	+	+	+	+	+	-
4	-	-	+	+	+	+	+	-
8	-	-	-	+	+	+	+	-
16	-	-	-	-	-	+	+	-
32	-	-	-	-	-	+	+	-
64	-	-	-	-	-	-	+	-



Рисунок 1 - Образование диагностических полос преципитации в агаре в зависимости от разведений гомологичных антигена и сыворотки

Титр антител в γ -глобулиновой фракции, обнаруженных вышеописанным методом в реакции диффузионной преципитации, составил 1:64.

Из полученной сыворотки крови осаждали γ -глобулиновую фракцию путем добавления полиэтиленгликоля. К 100 мл сыворотки крови птиц добавили 12 мл водного раствора полиэтиленгликоля до конечной концентрации при постоянном перемешивании. Осадок иммуноглобулинов отделяли путем декантации и центрифугирования в течение 15-30 мин при 3000 об/мин на центрифуге с охлаждением. Осадок промыли 300-400 мл дистиллированной воды. Осадок иммуноглобулинов растворили в охлажденном 0,9%-ном растворе хлорида натрия до содержания белка около 5-6% рН 6,3. После растворения осадка препарат центрифугировали 15 мин при 3000 об/мин на центрифуге с охлаждением для удаления нерастворимых примесей. К раствору после центрифугирования добавили глюкозу до конечной концентрации 2% в качестве стабилизатора.

2.2.2. Комбинация вирусодержащего материала с полученной гипериммунной сывороткой для создания вакцины.

Иммунокомплексная вакцина против инфекционной бурсальной болезни из штамма “ВНИВИП” была приготовлена путем смешивания нативного вируса инфекционной бурсальной болезни из штамма “ВНИВИП” с полученной вышеописанным образом специфической гипериммунной сывороткой. Вирусодержащий материал добавляли в гипериммунную сыворотку при постоянном помешивании.



Рисунок 2 - Пробирка объемом 15 мл с опытной партией иммунокомплексной вакцины против инфекционной бурсальной болезни из штамма “ВНИВИП” (светло-розовый цвет, однородная жидкость, хранение при $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$)

2.2.3. Подготовка проекта нормативно-технической документации для изготовления, контроля и применения иммунокомплексной вакцины против инфекционной бурсальной болезни из штамма “ВНИВИП”.

2.2.3.1. Контроль изготовленной серии вакцины.

В процессе производства опытных партий вакцины для обоих опытов (на цыплятах кросса Ломан Уайт и цыплятах кросса Росс-308) был проведен контроль вакцины на стерильность и безвредность.

Результаты испытаний:

1. Контроль внешнего вида вакцины.

Внешний вид вакцины оценивали по ГОСТ 33821-2016 [15]. Вакцина представляет собой однородную жидкость светло-розового цвета, без хлопьев и осадка. Пробные партии вакцины были расфасованы в стерильные пластиковые пробирки объемом 15 мл, по 2 мл вакцины на пробирку. Хранение расфасованной вакцины перед проведением испытаний осуществлялось в пределах температуры -20°C - -80 °C. Трещин пробирок, нарушений укупорки, наличия посторонних примесей, изменений цвета либо консистенции обнаружено не было.

2. Контроль вакцины на стерильность.

Определение стерильности 2-х лабораторных серий вакцины проводили по ГОСТ 28085-2013 [14]. Установлено, что высевы 2-х лабораторных серий вакцины были свободны от контаминации аэробными и анаэробными бактериями, грибами и микоплазмами.

3. Контроль вакцины на безвредность.

Безвредность вакцины проверяли по ГОСТ 28085-2013 [14]. Все куры в течение указанного времени остались живыми, без видимых клинических признаков переболевания и в месте введения вакцины отсутствовали следы воспалительной реакции.

2.2.3.2. Исследование антигенной активности иммунокомплексной вакцины.

Поскольку при иммунизации организма вакцинами против инфекционной бурсальной болезни иммуногенность напрямую коррелирует со значением титра антител, были проведены испытания антигенной активности иммунокомплексной вакциной против инфекционной бурсальной болезни из штамма “ВНИВИП”. Организм птицы считается защищенным от полевого штамма вируса инфекционной бурсальной болезни при титре антител большем либо равным 500 в иммуноферментном анализе, и при цельном титре антител в реакции диффузионной преципитации.

2.2.3.2.1. Титр антител в крови цыплят кросса Ломан Уайт после введения иммунокомплексной вакцины в суточном возрасте.

Основным эффектом вакцинации иммунокомплексной вакциной против инфекционной бурсальной болезни из штамма “ВНИВИП” является формирование защитного титра антител у птиц в момент снижения у птицы титра материнских антител до достаточных значений, чтобы вакцинный вирус инфекционной бурсальной болезни из штамма “ВНИВИП” смог проникнуть в клетки-мишени, располагающиеся главным образом в фабрициевой сумке и слепых отростках кишечника.

Для контроля снижения у птиц титра материнских антител формирования титра поствакцинального титра были взяты образцы сыворотки крови. Таким образом, результаты можно видеть на рисунке 3 и в таблице 5.

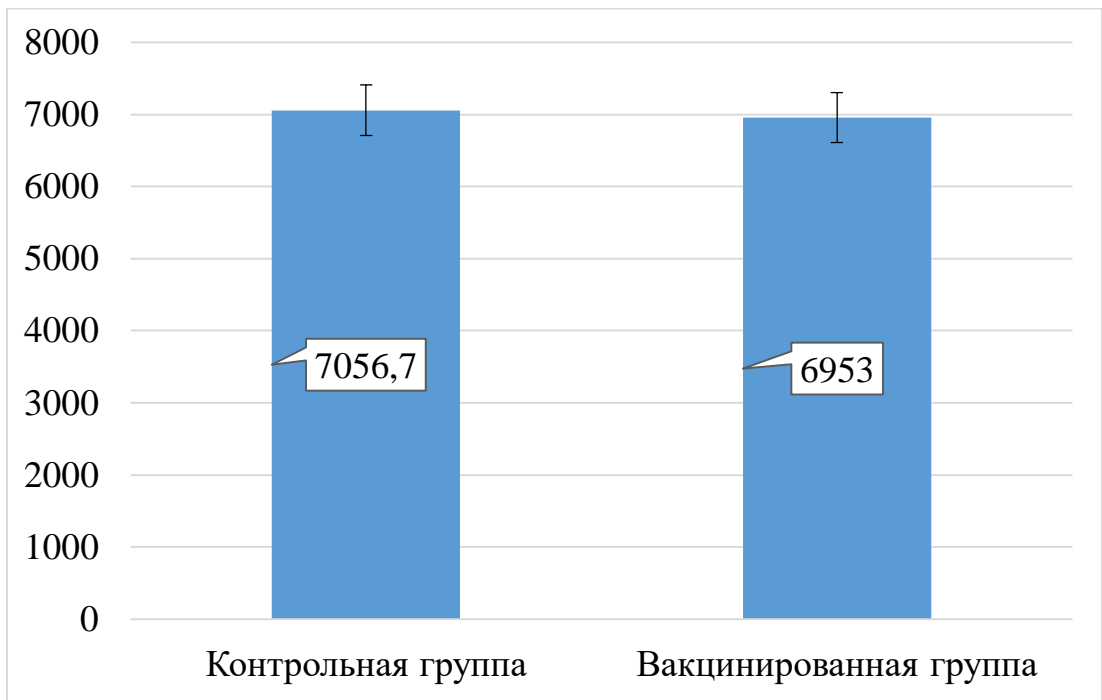


Рисунок 3 - Титр антител в крови цыплят кросса Ломан Уайт, 1 сутки, ИФА, n=50

Таблица 5 - Титр антител в крови цыплят кросса Ломан Уайт, 1 сутки, РДП, n=50

Группа птиц	Разведение сыворотки							
	Ц	2	4	8	16	32	64	128
Контрольная группа цыплят кросса Ломан Уайт	+	+	+	+	-	-	-	-
Вакцинированная группа цыплят кросса Ломан Уайт	+	+	+	+	-	-	-	-

Данные рисунка 3 показывают, что антитела в крови суточных цыплят кросса Ломан Уайт в среднем обнаруживались в контрольной группе цыплят в пределах титра 7056, а в вакцинированной группе цыплят – в среднем 6953 (в иммуноферментном анализе). Данный показатель характерен для уровня материнских антител и является следствием иммунизации матерей перед яйцекладкой. В реакции диффузионной преципитации обнаруживался титр антител в разведении сыворотки 1:8 (таблица 5).

Данные рисунка 4 указывают на результаты иммуноферментного анализа сыворотки крови 14-суточных цыплят кросса Ломан Уайт. Титр антител к вирусу инфекционной бурсальной болезни на 14 сутки составил 3281 (контрольная группа цыплят) и 3395 (вакцинированная группа цыплят). Из результатов иммуноферментного анализа можно сделать вывод, что на 14 сутки материнские антитела у цыплят кросса Ломан Уайт все еще активны, выполняют свои защитные функции.

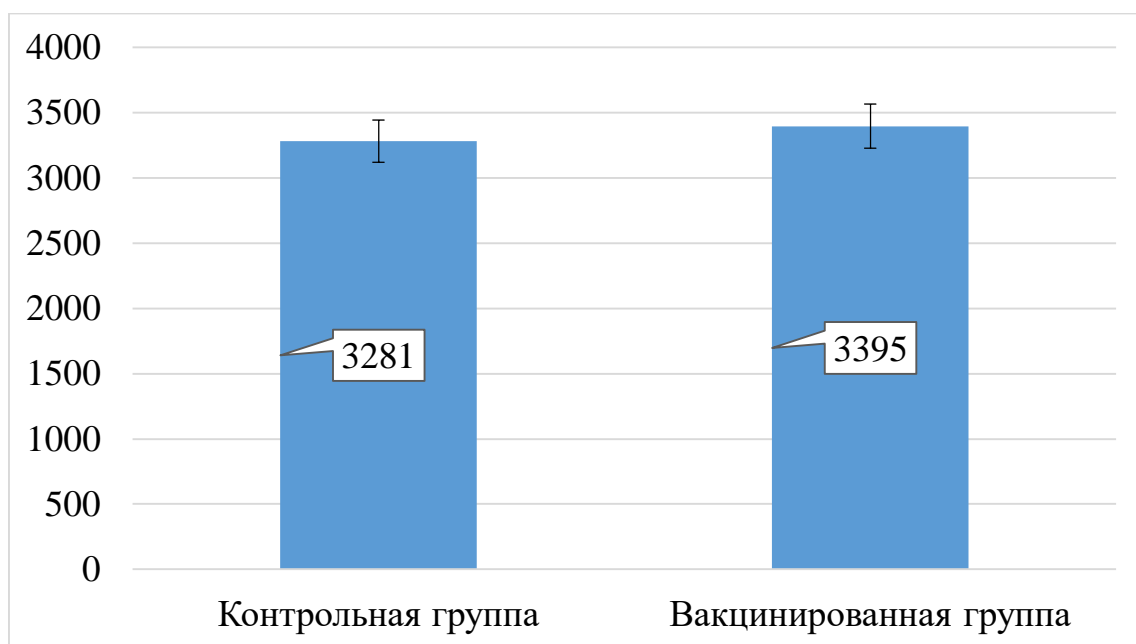


Рисунок 4 - Титр антител в крови цыплят кросса Ломан Уайт, 14 сутки, ИФА, n=50

Таблица 6 - Титр антител в крови цыплят кросса Ломан Уайт, 14 сутки, РДП, n=50

Группа птиц	Разведение сыворотки							
	Ц	2	4	8	16	32	64	128
Контрольная группа цыплят кросса Ломан Уайт	+	+	+	-	-	-	-	-
Вакцинированная группа цыплят кросса Ломан Уайт	+	+	+	-	-	-	-	-

В реакции диффузной преципитации (таблица 6) результат исследования антител в сыворотке крови цыплят составил 1:4 – предельное разведение, в котором диагностировались антитела к вирусу бурсальной болезни.

Рисунок 5 демонстрирует, что на 35 сутки жизни уровень иммунитета цыплят кросса Ломан Уайт к вирусу инфекционной бурсальной болезни сильно различается. Можно видеть, что в иммуноферментном анализе показатель титра антител к вирусу инфекционной бурсальной болезни в среднем составляет 68 (контрольная группа цыплят) и 514 (вакцинированная группа цыплят). В реакции диффузионной преципитации антитела обнаруживались в цельном титре (таблица 7).

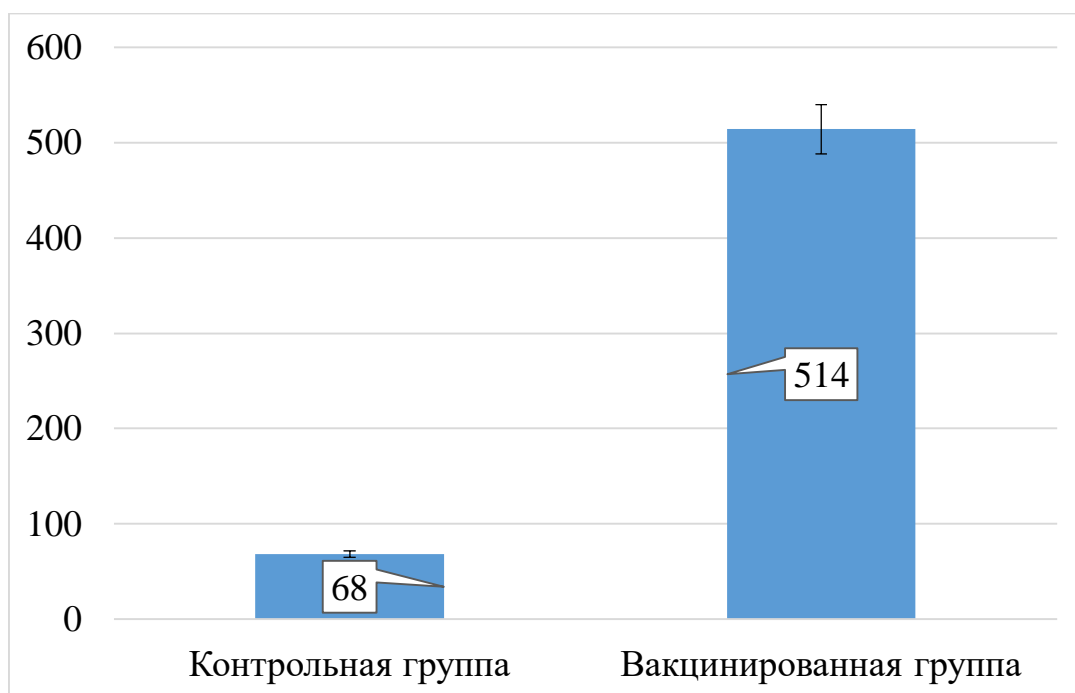


Рисунок 5 - Титр антител в крови цыплят кросса Ломан Уайт, 35 сутки, ИФА, n=50

Таблица 7 - Титр антител в крови цыплят кросса Ломан Уайт, 35 сутки, РДП, n=50

Группа птиц	Разведение сыворотки							
	Ц	2	4	8	16	32	64	128
Контрольная группа цыплят кросса Ломан Уайт	-	-	-	-	-	-	-	-
Вакцинированная группа цыплят кросса Ломан Уайт	+	-	-	-	-	-	-	-

Результаты серологических исследований сывороток крови вакцинированной группы является положительным согласно инструкции к набору The Infectious Bursal Disease Virus Antibody test kit. Данный уровень антител свидетельствует об активности вакцинного вируса в иммунных клетках-мишенях организма цыплят кросса Ломан Уайт. Также данный уровень антител способен защитить организм цыплят от полевых штаммов вируса инфекционной бурсальной болезни.

2.2.3.2.2. Титр антител в крови цыплят кросса Росс-308 после введения иммунокомплексной вакцины в суточном возрасте.

В возрасте 1 суток средний титр материнских антител в контрольной группе цыплят кросса Росс-308 составил по результатам иммуноферментного анализа 5692,75, а в вакцинированной группе – 5851 (рисунок 6). По результатам реакции диффузионной преципитации титр материнских антител в обеих группах обнаруживался в разведении 1:8 (таблица 8). Это высокий уровень материнских антител, вызванный вакцинацией матерей перед яйцекладкой. Данный титр антител способен уничтожить любой штамм вируса инфекционной бурсальной болезни, вакцинный либо полевой [26].

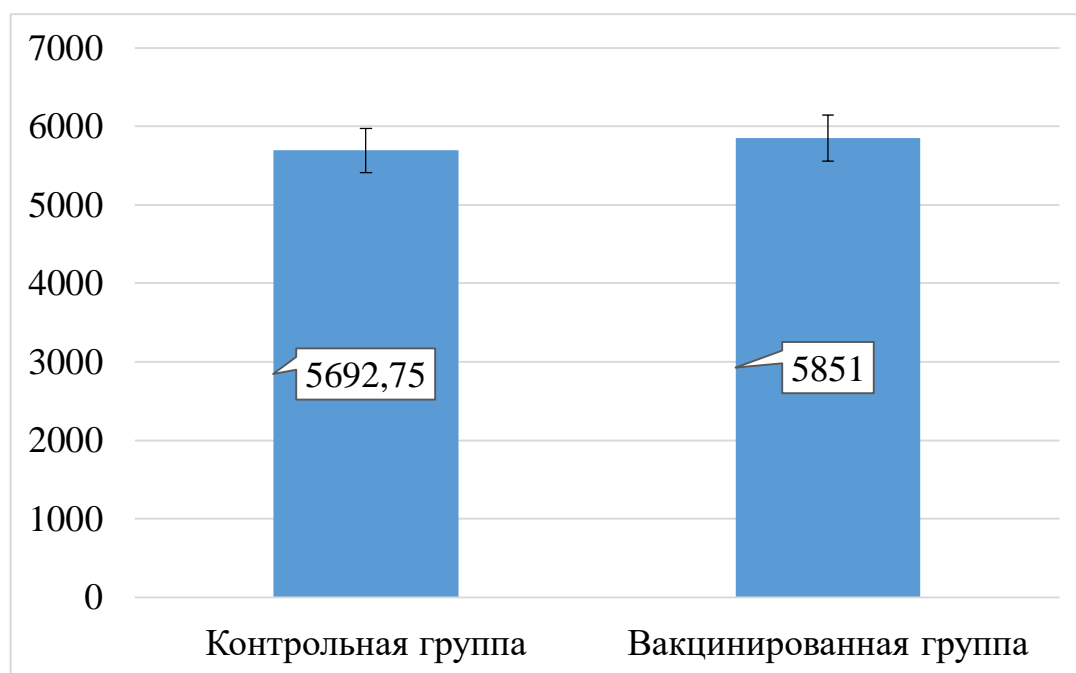


Рисунок 6 - Титр антител в крови цыплят кросса Росс-308, 1 сутки, ИФА, n=30

Таблица 8 - Титр антител в крови цыплят кросса Росс-308, 1 сутки, РДП, n=30

Группа птиц	Разведение сыворотки							
	Ц	2	4	8	16	32	64	128
Контрольная группа цыплят кросса Росс-308	+	+	+	+	-	-	-	-
Вакцинированная цыплят кросса Росс-308	+	+	+	+	-	-	-	-

Титр материнских антител в возрасте 14 суток у птицы сильно снизился по сравнению с титром материнских антител в возрасте 1 суток. Однако, поскольку титр антител в обеих группах практически одинаков (в контрольной группе в ИФА он составил 1958, в вакцинированной группе – 2014 (рисунок 7), а в РДП в обеих группах – 1:2 (таблица 9), данный уровень материнских антител достаточен, чтобы освобождающийся из защитных иммуноглобулинов вакцинный вирус все еще подлежал нейтрализации.

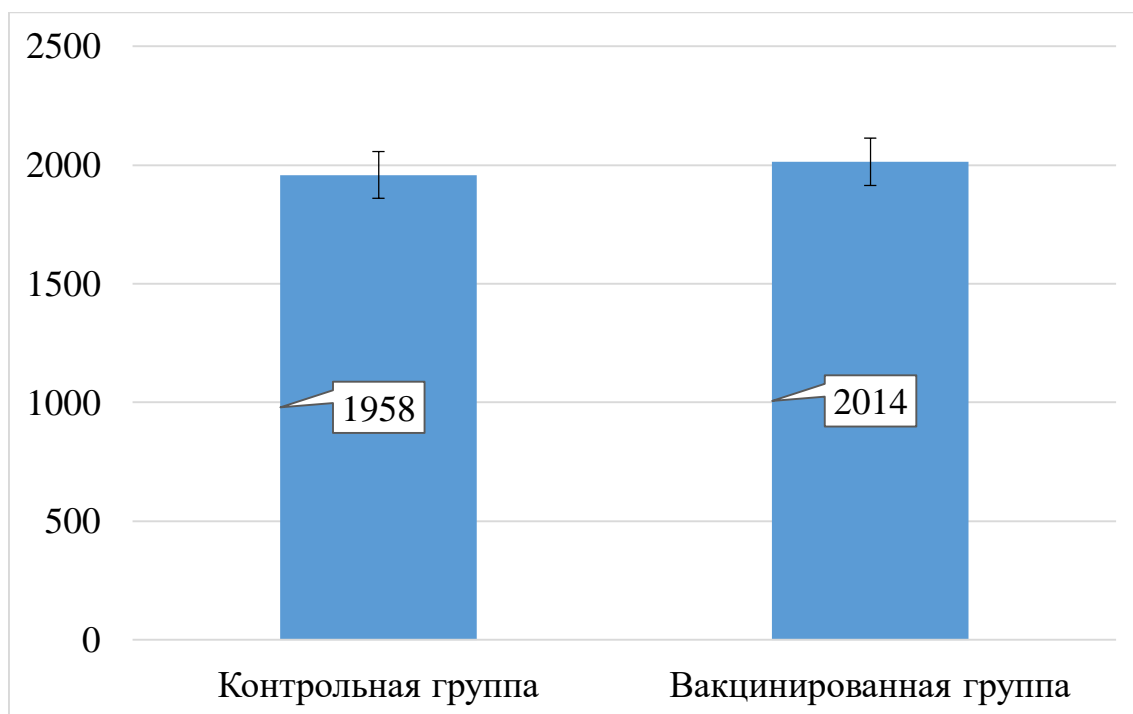


Рисунок 7 - Титр антител в крови цыплят кросса Росс-308, 14 сутки, ИФА, n=30

Таблица 9 - Титр антител в крови цыплят кросса Росс-308, 14 сутки, РДП, n=30

Группа птиц	Разведение сыворотки							
	Ц	2	4	8	16	32	64	128
Контрольная группа цыплят кросса Росс-308	+	+	-	-	-	-	-	-
Вакцинированная группа цыплят кросса Росс-308	+	+	-	-	-	-	-	-

В возрасте 35 суток, на момент окончания опыта, результаты ИФА и РДП показали, что уровень антител у двух групп сильно различается. В контрольной группе в иммуноферментном анализе был обнаружен титр 47, а реакция диффузной преципитации дала отрицательные результаты. Это говорит о том, что материнские антитела полностью разрушены и контакта с полевым либо вакцинным вирусом у птиц контрольной группы не произошло.

При исследовании сыворотки крови птиц вакцинированной группы было обнаружено, что в иммуноферментном анализе средний титр антител против вируса инфекционной бурсальной болезни составил 3240 (рисунок 8), а в реакции диффузионной преципитации – 1:4 (таблица 10). Данный уровень антител никак не может являться материнским, поскольку по прошествии 35 суток материнские антитела не могут сохраниться в организме птицы. Также, обнаруженный уровень антител превышает уровень антител, обнаруженный в ИФА и РДП на 14-е сутки после вылупления, что означает, что данный результат может являться только следствием действия иммунокомплексной вакцины.

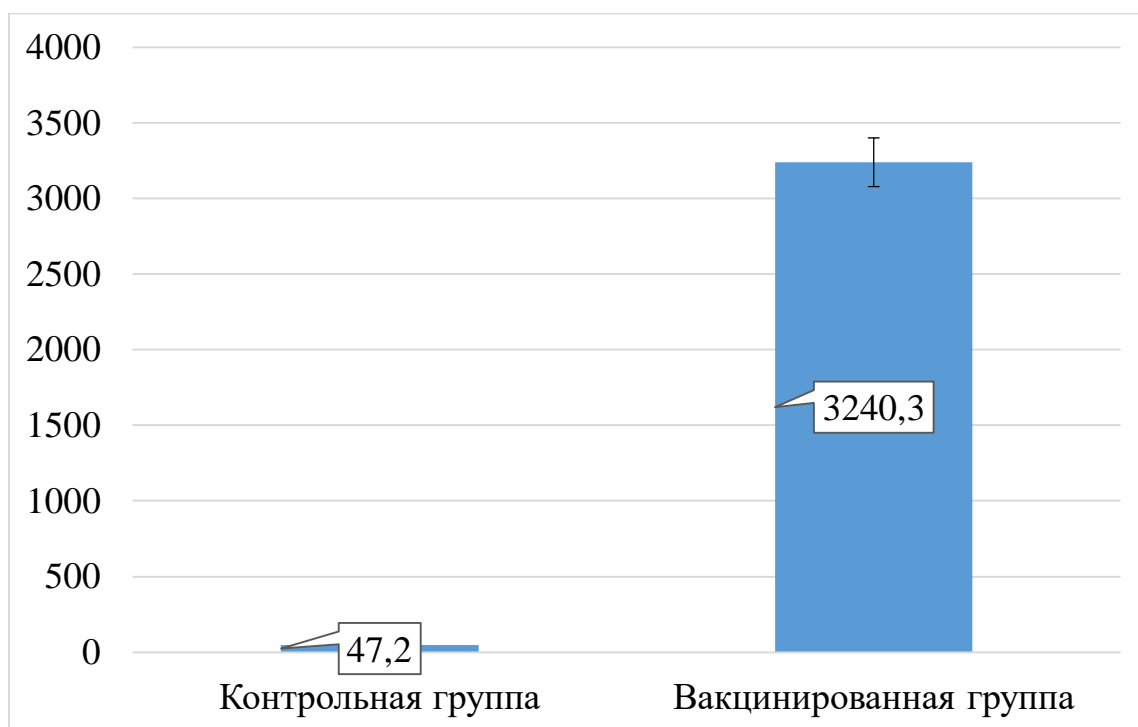


Рисунок 8 - Титр антител в крови цыплят кросса Росс-308, 35 сутки, ИФА, n=30

Таблица 10 - Титр антител в крови цыплят кросса Росс-308, 35 сутки, РДП, n=30

Группа птиц	Разведение сыворотки							
	Ц	2	4	8	16	32	64	128
Контрольная группа цыплят кросса Росс-308	-	-	-	-	-	-	-	-
Вакцинированная группа цыплят кросса Росс-308	+	+	+	-	-	-	-	-

Титр 3240 в иммуноферментном анализе способен защитить организм цыпленка от большинства штаммов вируса инфекционной бурсальной болезни, циркулирующих на территории Российской Федерации – как слабо- так и высоковирулентных.

Вышеперечисленные результаты контроля внешнего вида вакцины, контроля стерильности и безвредности вакцины, оценки антигенной активности вакцины, стали основой для разработанного проекта нормативно-технической документации для изготовления, контроля и применения иммунокомплексной вакцины против

инфекционной бурсальной болезни из штамма “ВНИВИП” (Технологического регламента, Стандарта организации (СТО) по контролю иммунокомплексной вакцины, Инструкции по применению иммунокомплексной вакцины).

2.2.4. Зоотехнические показатели подопытных птиц

Таблица 11 демонстрирует, что иммунокомплексная вакцина против инфекционной бурсальной болезни из штамма “ВНИВИП” не оказала существенного влияния на зоотехнические показатели цыплят кросса Ломан Уайт, поскольку разница в весе между обеими группами была в пределах 10-20 грамм, что не является достоверным отличием.

Как видно из таблицы 11, в начале эксперимента средняя масса тела цыплят кросса Росс-308 в обеих группах составляла 38 г. Однако уже на 7 сутки птицы, получившие дозу иммунокомплексной вакцины в суточном возрасте, превосходили средний вес контрольной птицы на 20 г. К концу опыта этот показатель в опытной и контрольной группах был равен $2341,25 \pm 155$ г и $2056,3 \pm 184$ г соответственно, что составляет разницу практически в 300 г. Таким образом можно сделать вывод, что иммунокомплексная вакцина против инфекционной бурсальной болезни из штамма “ВНИВИП” позитивно влияет на привесы цыплят-бройлеров (Таблица 12).

Таблица 11 - Показатели живой массы цыплят кросса Ломан Уайт, г ($M \pm m$, $n=50$)

До заражения	Суточные цыплята	7-суточные цыплята	14-суточные цыплята	21-суточные цыплята	28-суточные цыплята	35-суточные цыплята
Контрольная группа цыплят кросса Ломан Уайт	$36 \pm 1,1$	$120,7 \pm 1,12$	$204 \pm 2,26$	$290 \pm 3,4$	$415 \pm 4,8$	$523 \pm 6,3$
Вакцинированная группа цыплят кросса Ломан Уайт	$36 \pm 1,1^*$	$125,7 \pm 2,4$	$227 \pm 2,12$	$280,4 \pm 3,8$	$396,8 \pm 4,3^*$	$512,25 \pm 5,9^*$

*-при сравнении групп контрольной и вакцинированной групп, $p \leq 0,05$

Таблица 12 - Показатели живой массы цыплят кросса Росс-308, г (M±m)

До заражения	Суточные цыплята	7-суточные цыплята	14-суточные цыплята	21-суточные цыплята	28-суточные цыплята	35-суточные цыплята
Контрольная группа цыплят кросса Росс-308	38 ± 1,85	154,9 ± 1,9	379 ± 2,4	894,1±104	1468±233	2056,3±184
Вакцинированная группа цыплят кросса Росс-308	38 ± 1,85*	175,9 ± 2,4	481,7±81	1056,8±54	1703,9 ±231*	2341,25±155*

*-при сравнении групп контрольной и вакцинированной групп, $p \leq 0,05$

2.2.5. Морфологические изменения в организме птиц при введении иммунокомплексной вакцины против инфекционной бурсальной болезни из штамма “ВНИВИП”



Рисунок 9 - Нормальный размер капсулы фабрициевой сумки цыплят кросса Ломан Уайт, вакцинированная группа, 35 день эксперимента



Рисунок 10 - Отсутствие кровоизлияний на слизистой оболочке вскрытой фабрициевой сумки цыплят кросса Ломан Уайт, вакцинированная группа, 35 день эксперимента

На рисунках №9-10 видно, что Фабрициева сумка у цыплят кросса Ломан Уайт не подверглась дегенеративным изменениям, характерно возникающим после

применения живых вакцин против инфекционной бурсальной болезни. Стенка фабрициевой сумки гладкая, напряжена, розового цвета. Складчатость внутренней поверхности ровная, без кровоизлияний, наложений и пролиферативных включений. В качестве обнаруженных изменений можно отметить усиленное кровенаполнение сосудов фабрициевой сумки, что может свидетельствовать о неких внутренних воспалительных процессах, являющихся следствием действия вакцинного вируса. Прочие внутренние органы также не подверглись патологическим и дегенеративным изменениям.



Рисунок 11 - Нормальный размер капсулы фабрициевой сумки цыплят кросса Росс-308, вакцинированная группа, 35 день эксперимента

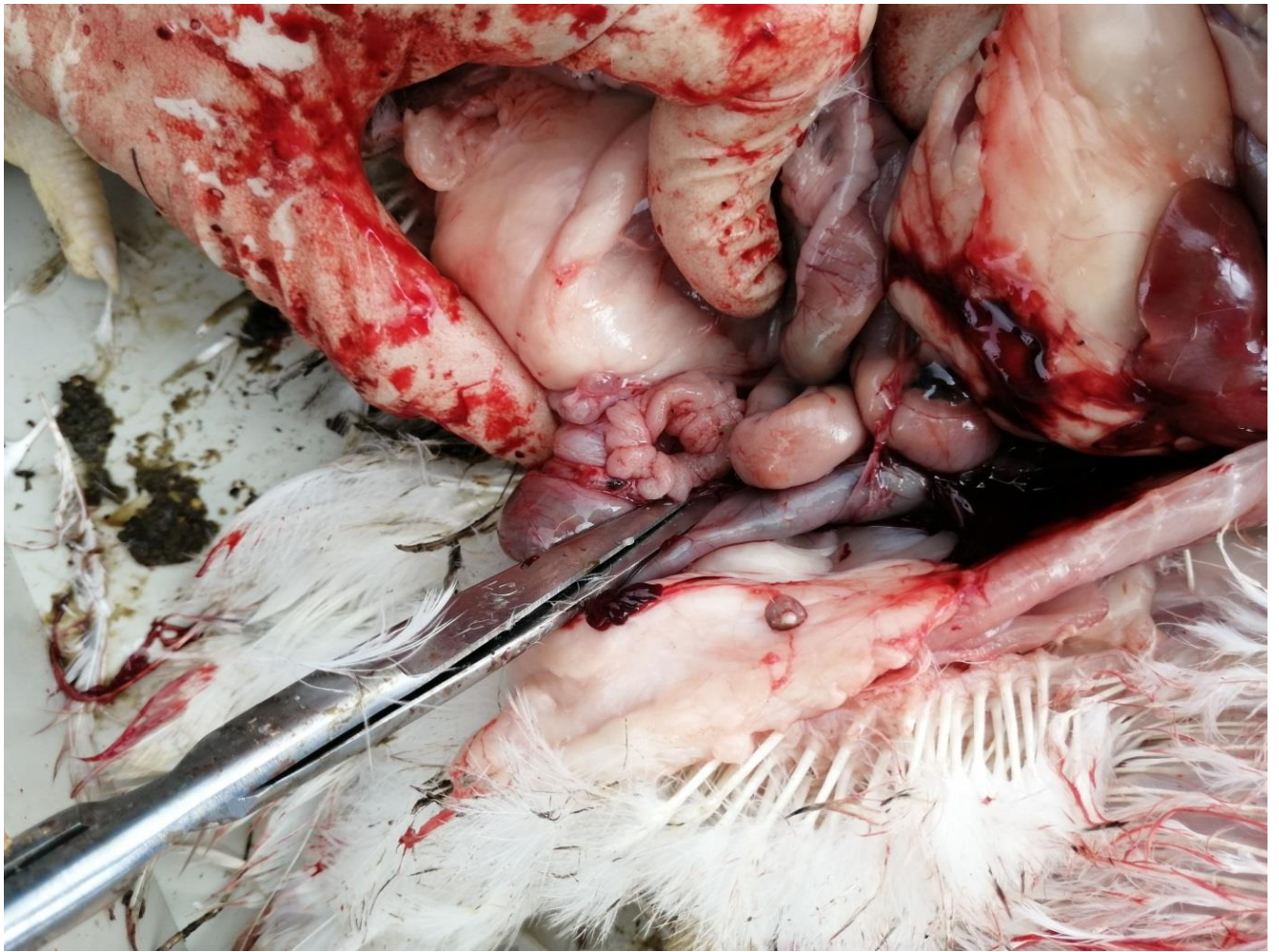


Рисунок 12 - Отсутствие кровоизлияний на слизистой оболочке вскрытой фабрициевой сумки цыплят кросса Росс-308, вакцинированная группа, 35 день эксперимента

Из результатов патоморфологического осмотра фабрициевой сумки цыплят кросса Росс-308 можно сделать вывод о более интенсивном характере влияния иммунокомплексной вакцины против инфекционной бурсальной болезни из штамма “ВНИВИП” на Фабрицеву сумку, по сравнению с таковыми у цыплят кросса Ломан Уайт. Наибольшие изменения закономерно коснулись фабрициевой сумки, как наиболее целевого органа для вакцинного штамма вируса инфекционной бурсальной болезни. Капсула фабрициевой сумки дряблая, овальной формы (в норме – ровный шар), с проступающими снаружи складками.

При вскрытии был отмечен след жизнедеятельности вакцинного вируса инфекционной бурсальной болезни. Отчетлива видна гиперемия складчатых

стенок фабрициевой сумки, наличие точечных кровоизлияний в подслизистой основе стенок фабрициевой сумки. Складки дряблые и ненапряжены.

Таким образом данные патоморфологического осмотра подтверждают данные по формированию антител и экспрессии иммунокомпетентных генов – в организме цыплят кросса Ломан Уайт вакцинный вирус оказал менее интенсивное влияние на ткани-мишени по сравнению с организмом цыплят кросса Росс-308.

2.2.6. Влияние иммунокомплексной вакцины против инфекционной бурсальной болезни из штамма “ВНИВИП” на патогенные и условно-патогенные микроорганизмы кишечника птиц.

При помощи модифицированного метода NGS-секвенирования был проведён сравнительный анализ бактериальных сообществ в вакцинированной и контрольной группах. Данный метод подтвердил результаты анализа экспрессии иммунокомпетентных генов.

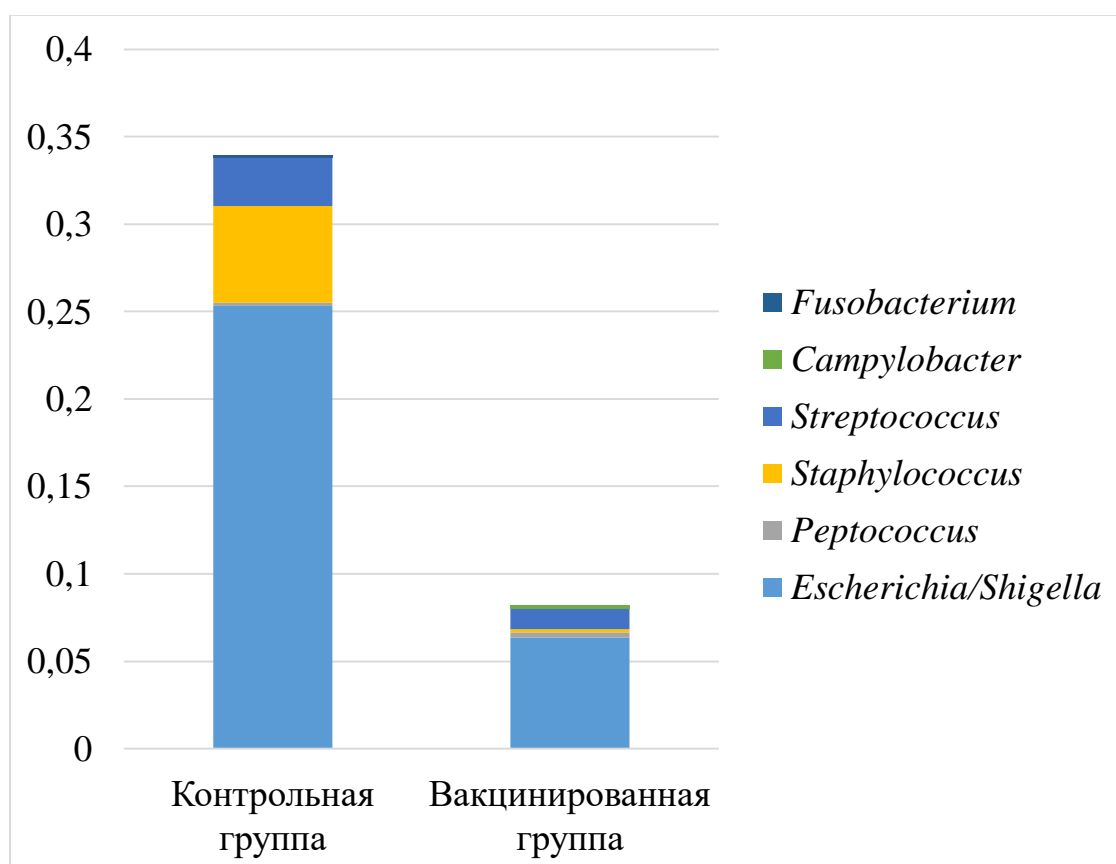


Рисунок 13 - Процентное соотношение патогенных родов микроорганизмов в исследованных образцах кишечника цыплят кросса Ломан Уайт, %

Рис. 13 отражает относительное содержание патогенных и условно-патогенных микроорганизмов в слепых отростках желудочно-кишечного тракта цыплят кросса Ломан Уайт на 35 день. Из данных NGS-секвенирования видно, что относительное содержание патогенных и условно-патогенных микроорганизмов в кишечнике цыплят вакцинированной группы на 0,25% меньше, нежели в кишечнике контрольной группы. Данное явление связано с активацией местного иммунитета и усилением неспецифических иммунных реакций в слепых отростках кишечника, в состав ткани которых также входят разрозненные иммунные клетки, поражаемые вакцинным вирусом. Эти данные подтверждаются также анализом экспрессии иммунокомпетентных генов в клетках ткани фабрициевой сумки, имеющих одну природу с иммунными клетками, входящими в состав тканей слепых отростков кишечника.

Из рисунка видно, что различия между патогенными и условно-патогенными таксонами содержимого слепых отростков кишечника цыплят кросса Ломан Уайт контрольной и вакцинированной групп обуславливают определенные группы микроорганизмов. Так, наибольшие различия обуславливает относительное содержание бактерий родов *Staphylococcus* и *Escherichia/Shigella*. Бактерии семейства *Enterobacteriaceae* были представлены главным образом такими родами микроорганизмов, как *Klebsiella*, *Leminorella*, *Kosakonia* и прочие. Прочие патогенные и условно-патогенные микроорганизмы также были подобраны для сравнения у групп птиц по своим патогенным свойствам, либо способности к проявлению таковых при снижении иммунитета. На рисунках 14-15 отражена видовая представленность данных патогенных и условно-патогенных родов.

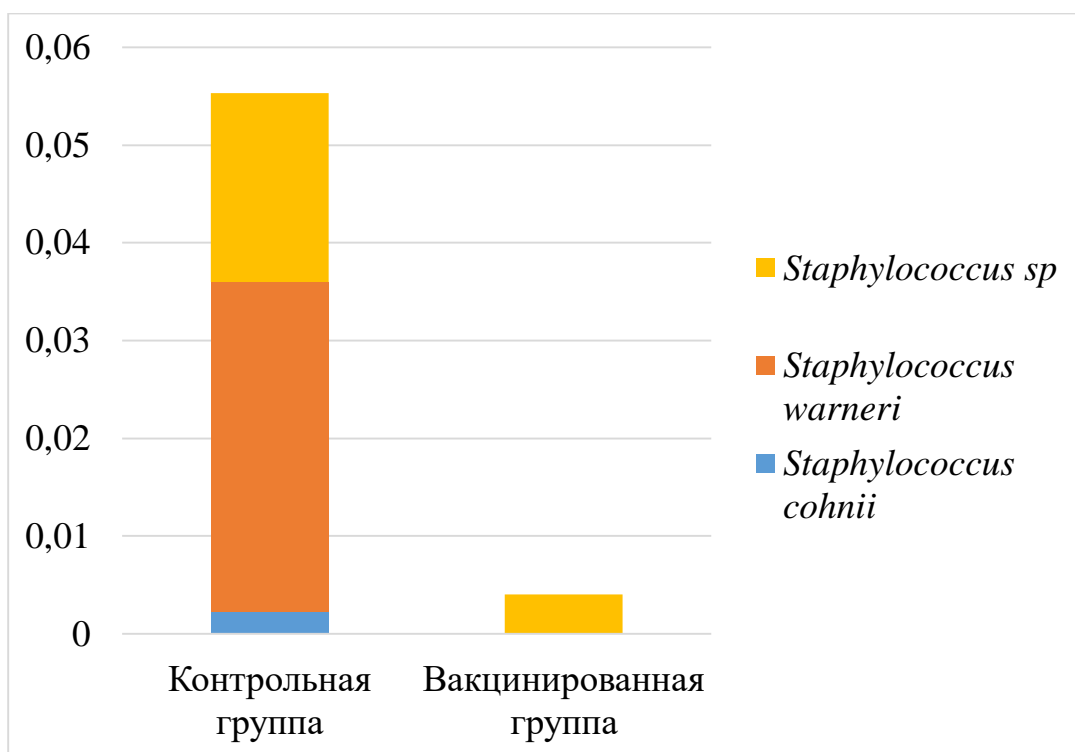


Рисунок 14 - Процентное соотношение бактерий рода *Staphylococcus* в исследованных образцах кишечника цыплят кросса Ломан Уайт, %

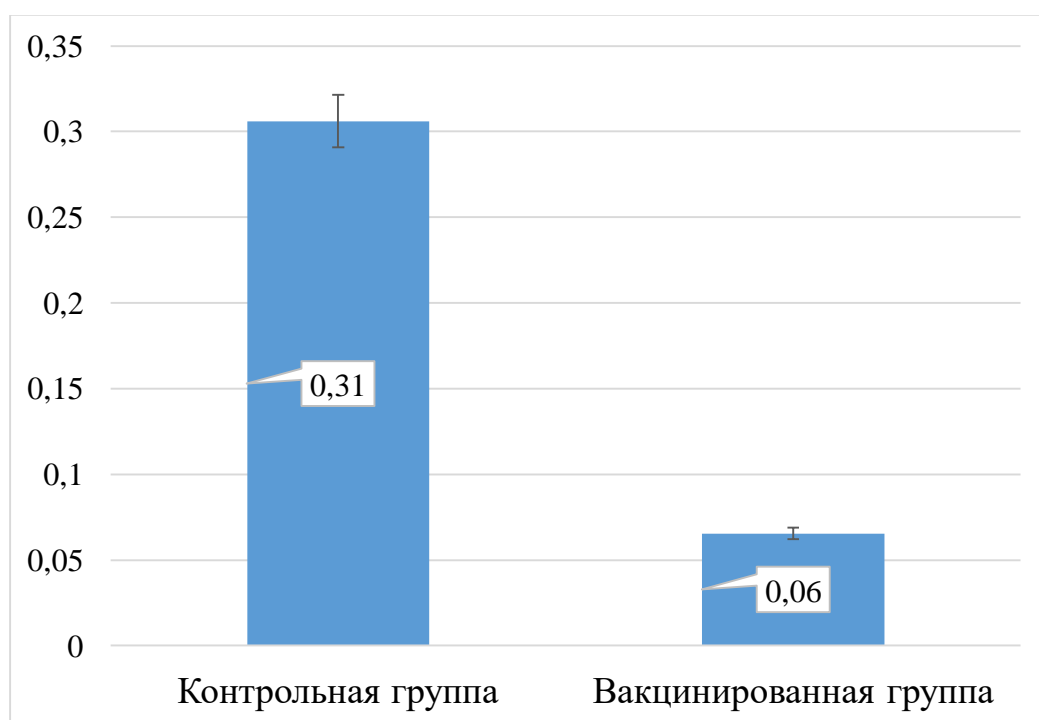


Рисунок 15 - Процентное соотношение бактерий семейства *Enterobacteriaceae* в исследованных образцах кишечника цыплят кросса Ломан Уайт, %

Как можно наблюдать на рис. 16, количество патогенных микроорганизмов в слепых отростках желудочно-кишечного тракта цыплят кросса Росс-308

вакцинированной группы было существенно ниже, чем в кишечнике цыплят кросса Росс-308 контрольной группы. В данном случае, основное различие было обусловлено содержанием микроорганизмов рода *Mycoplasma*, *Escherichia/Shigella* и *Streptococcus*. Основными представителями рода *Mycoplasma* являлись такие условно-патогенные виды, как *Mycoplasma conjunctivae*, *Mycoplasma dispar*, *Mycoplasma canadense* и прочие. Все эти микроорганизмы вызывают инфекционные болезни, либо являются участниками патогенных процессов, и были открыты при исследовании пораженных органов и тканей. Основными представителями рода *Streptococcus* являлись такие микроорганизмы, как *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus cristatus* и прочие, способные участвовать в септических процессах, обсеменять органы и ткани, а также активно размножающиеся при снижении иммунитета у птицы.

Видовая представленность данных родов микроорганизмов отражена на рисунках 17-19.

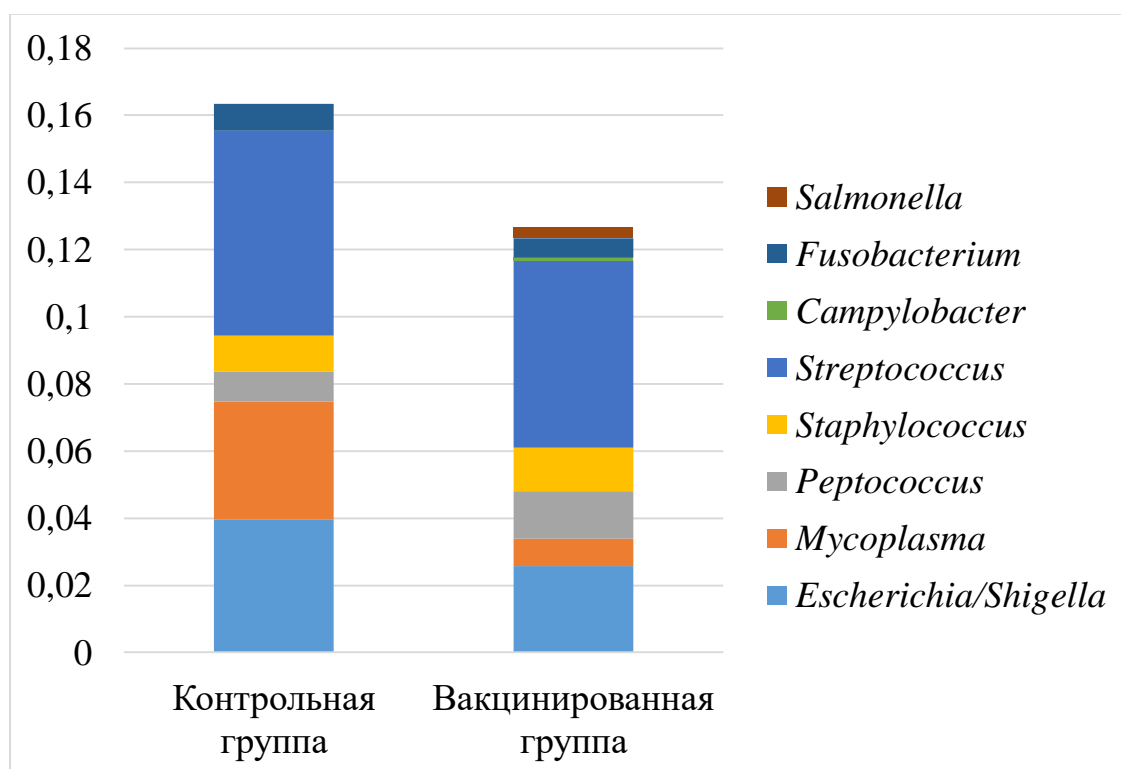


Рисунок 16 - Процентное соотношение патогенных родов микроорганизмов в исследованных образцах цыплят кросса Росс-308, %

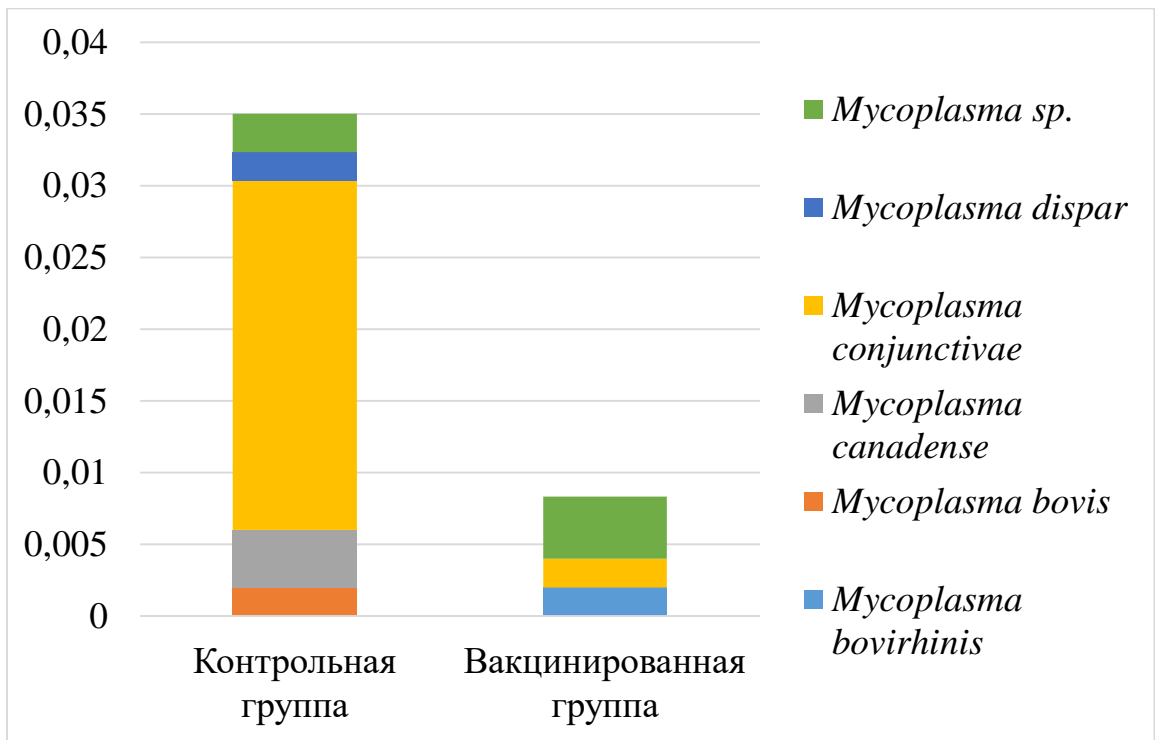


Рисунок 17 - Процентное соотношение микроорганизмов рода *Mycoplasma* в исследованных образцах цыплят кросса Росс-308, %

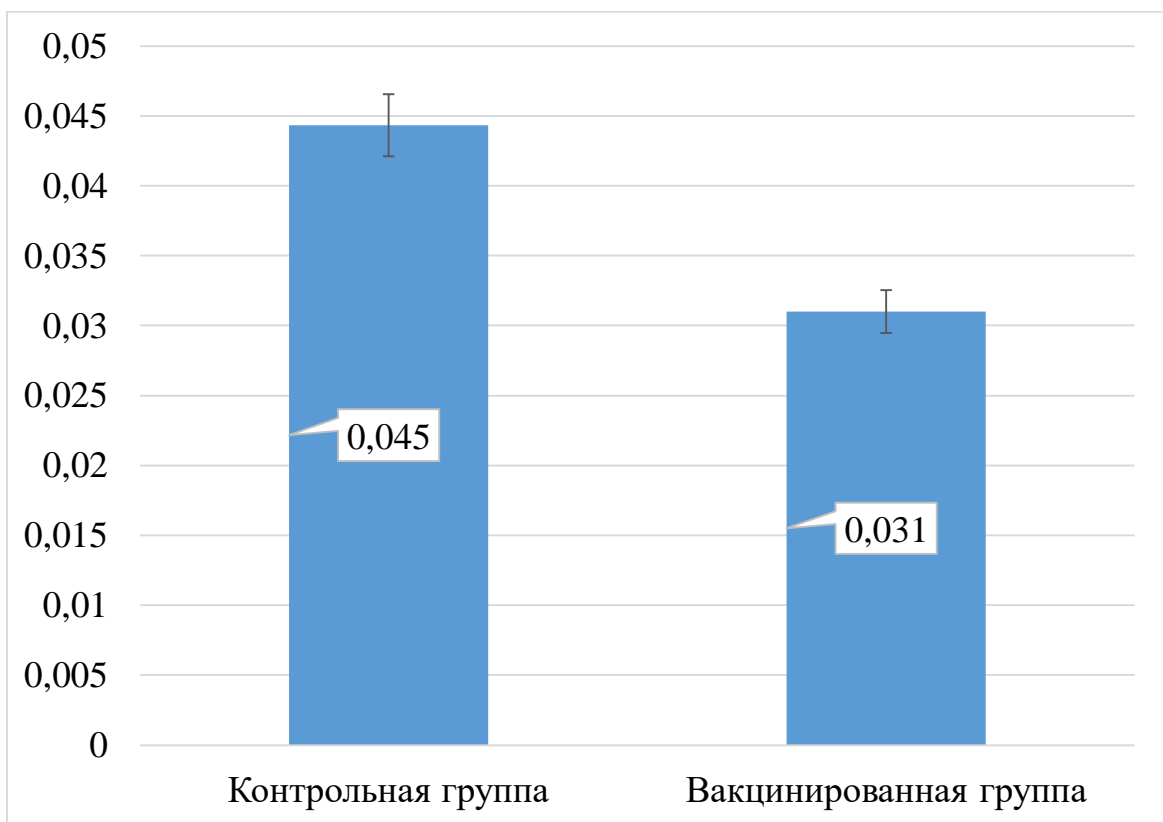


Рисунок 18 - Процентное соотношение бактерий семейства *Enterobacteriaceae* в исследованных образцах кишечника цыплят кросса Росс-308, %

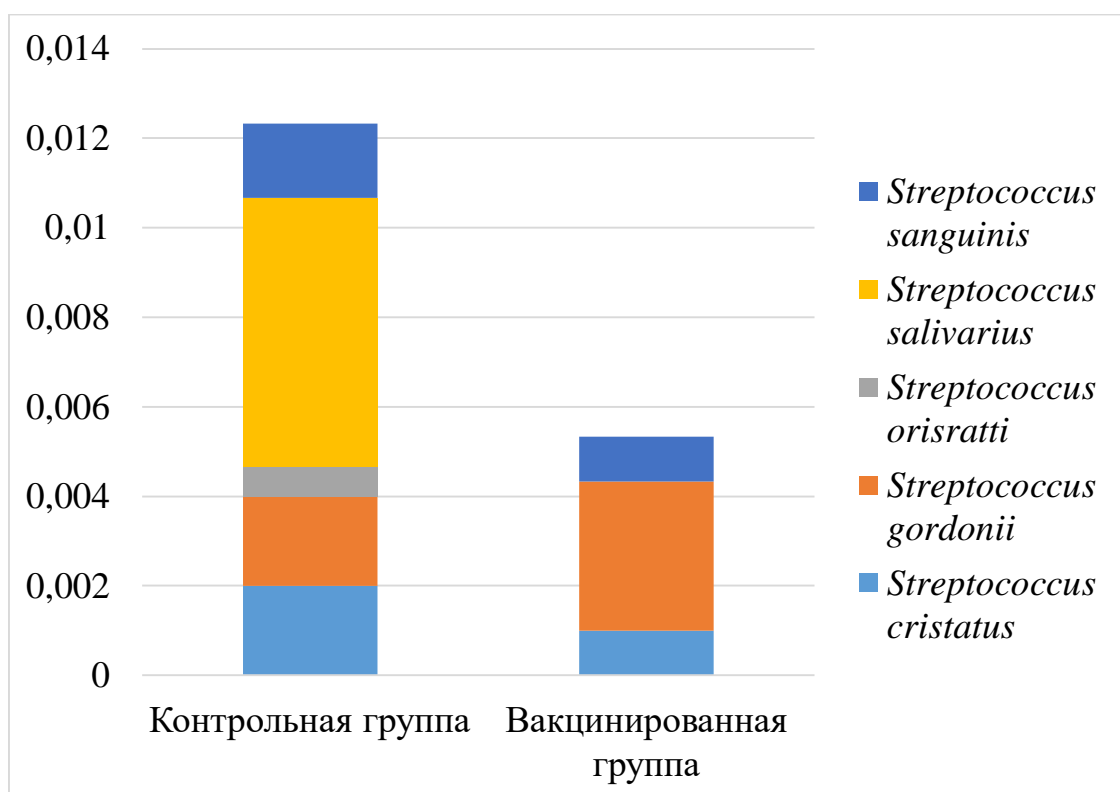


Рисунок 19 - Процентное соотношение микроорганизмов рода *Streptococcus* в исследованных образцах цыплят кросса Росс-308, %

2.2.7. Влияние иммунокомплексной вакцины на экспрессию генов, участвующих в иммунном ответе птиц.

В работах некоторых авторов показано, что наиболее выраженные изменения в уровне экспрессии генов, связанных с иммунитетом, отмечаются именно в органах, в которых вирус реплицируется наиболее интенсивно. В связи с этим степень реакции в ответ на вакцинацию птицы через экспрессию генов была исследована в конце опыта в возрасте 35 дней. Были выбраны некоторые ключевые гены, связанные с иммунитетом цыплят для оценки действия вакцинного вируса на фабрициеву сумку (*AvBD-10*, *AvBD-9*, *Gal-9*, *IL-6*, *IL8L2*, *PTGS2*, *IRF7*).

По результатам наших исследований с применением метода ПЦР с обратной транскрипцией было показано, что на 35 сутки после введения вакцины в организм цыплят кросса Ломан Уайт экспрессия гена галлинацина 10 (*AvBD-10*) во всех группах в 3,17 раз превосходила уровень контроля (рисунок 20). При этом

тенденция увеличения экспрессии галлинацина-10 у цыплят кросса Ломан Уайт после вакцинации иммунокомплексной вакциной против инфекционной бурсальной болезни из штамма “ВНИВИП” сохраняется также и у цыплят кросса Росс-308 (рисунок 21), правда в значительно большем объеме.

В конце обоих опытов было отмечено сильное увеличение экспрессии гена *AvBD10*, однако в организме бройлеров увеличение экспрессии составило 1382,76 раза по отношению к контролю. Данные результаты свидетельствуют о более активном действии вакцинного вируса в организме цыплят кросса Росс-308 по сравнению с организмом цыплят кросса Ломан Уайт, что подтверждается также и данными патоморфологического осмотра.

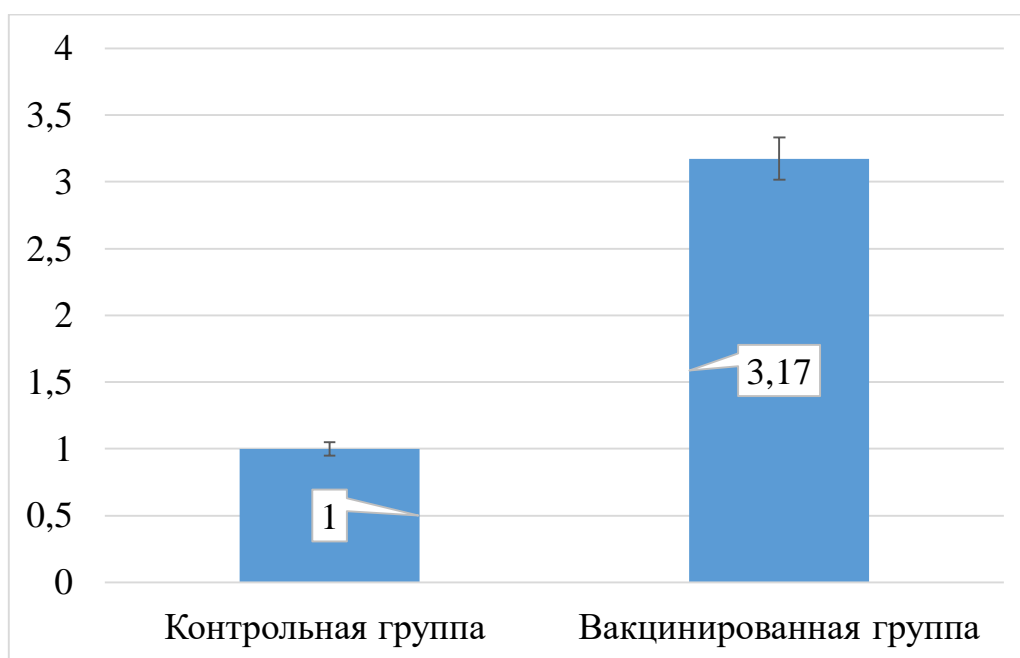


Рисунок 20 - Экспрессия гена *AvBD-10*, фабрициева сумка цыплят кросса Ломан Уайт

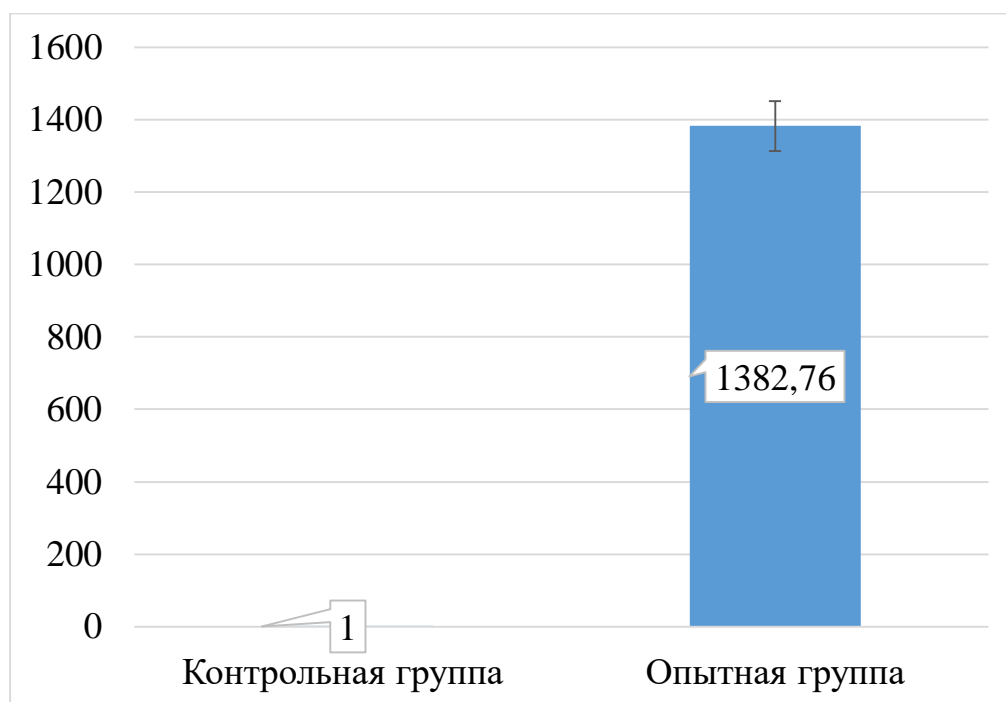


Рисунок 21 - Экспрессия гена *AvBD-10*, фабрициева сумка цыплят кросса Росс-308

Одним из наиболее активно экспрессирующихся генов в клетках фабрициевой сумки цыплят кросса Росс-308 был ген *AvBD-9* (галлинацин-9). Введение иммунокомплексной вакцины в организм бройлеров вызвало колоссальную ответную экспрессию гена *AvBD-9*, и на 35 сутки после введения вакцины в организм цыплят кросса Росс-308 сравнительная экспрессия данного гена в вакцинированной группе превышала уровень контроля более чем в 16000 раз (рисунок 28). В организме вакцинированных цыплят кросса Ломан Уайт данный ген также активно экспрессировался, однако существенно ниже, нежели в вакцинированной группе бройлеров (экспрессия повысилась в 10 раз по отношению к контролю, рисунок 29).

По результатам наших исследований с применением метода ПЦР с обратной транскрипцией было показано, что на 35 сутки после введения вакцины в организм цыплят кросса Ломан Уайт экспрессия гена галлинацина 10 (*AvBD-10*) во всех группах в 3,17 раз превосходила уровень контроля (рисунок 20). При этом тенденция увеличения экспрессии галлинацина-10 у цыплят кросса Ломан Уайт после вакцинации иммунокомплексной вакциной против инфекционной

бурсальной болезни из штамма “ВНИВИП” сохраняется также и у цыплят кросса Росс-308 (рисунок 21), правда в значительно большем объеме.

В конце обоих опытов было отмечено сильное увеличение экспрессии гена *AvBD10*, однако в организме бройлеров увеличение экспрессии составило 1382,76 раза по отношению к контролю. Данные результаты свидетельствуют о более активном действии вакцинного вируса в организме цыплят кросса Росс-308 по сравнению с организмом цыплят кросса Ломан Уайт, что подтверждается также и данными патоморфологического осмотра.

Через 35 суток после вакцинации было также отмечено увеличение уровня экспрессии гена *IL6* в вакцинированной группе в сравнении с контрольной группой (рисунок 22). Уровень экспрессии в организме цыплят кросса Росс-308 также сильно превосходил уровень экспрессии в организме цыплят кросса Ломан Уайт и составлял превосходство более чем в 523 раза по отношению к контрольной группе (рисунок 23).

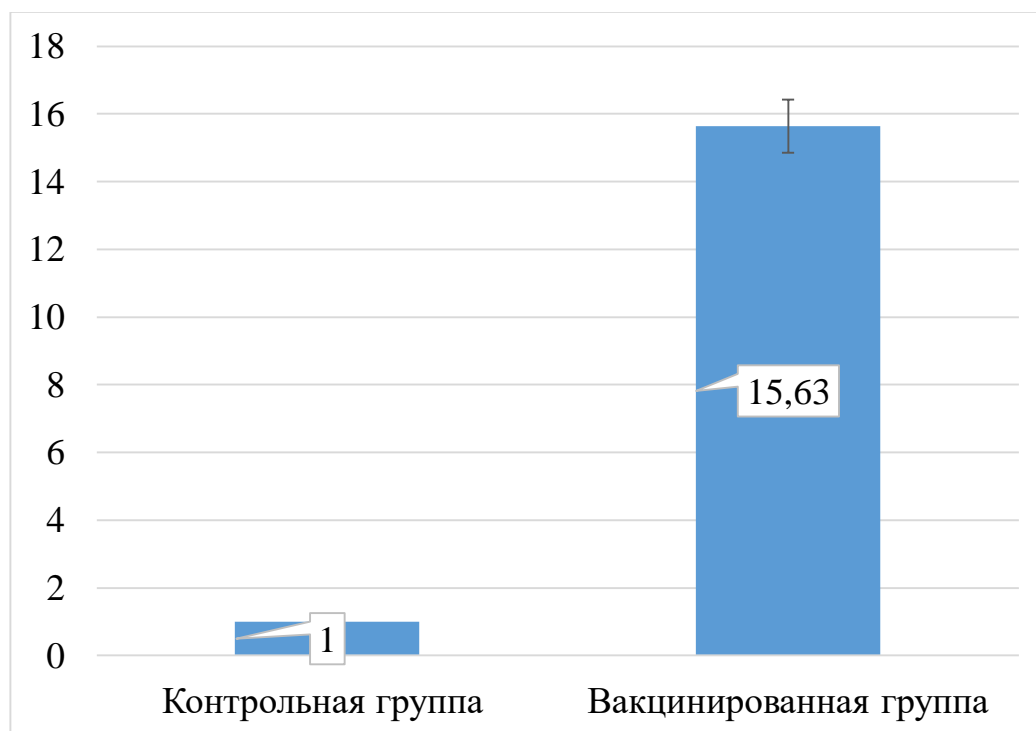


Рисунок 22 - Экспрессия гена *IL6*, фабрициева сумка цыплят кросса Ломан Уайт

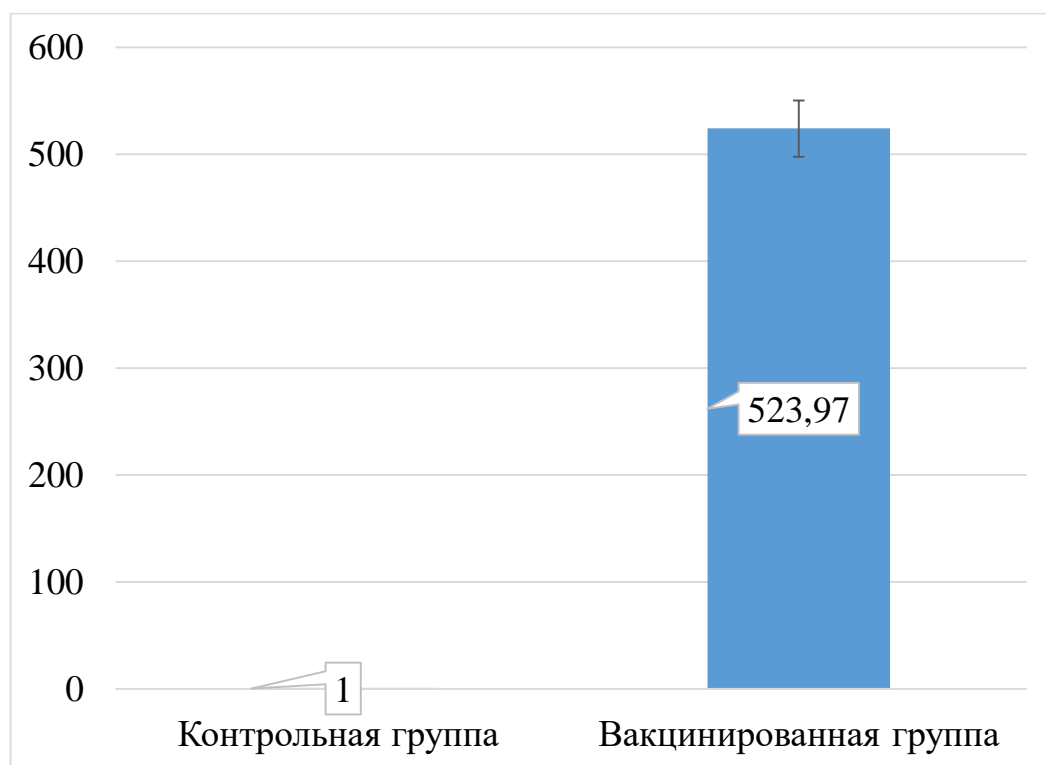


Рисунок 23 - Экспрессия гена *IL6*, фабрициева сумка цыплят кросса Росс-308

Также на 35 сутки после вакцинации иммунокомплексной вакциной цыплят кросса Ломан Уайт было отмечено значительное увеличение (до 21,5 раз) уровня экспрессии гена *IL8L2* (рисунок 24) в вакцинированной группе по сравнению с контролем, что может свидетельствовать о значительном контакте клеток фабрициевой сумки цыплят кросса Ломан Уайт с вакцинным вирусом. У цыплят кросса Росс-308 интенсивность экспрессии гена *IL8L2* была выше и составила увеличение в 88,4 раза по сравнению с экспрессией данного гена в контрольной группе (рисунок 25).

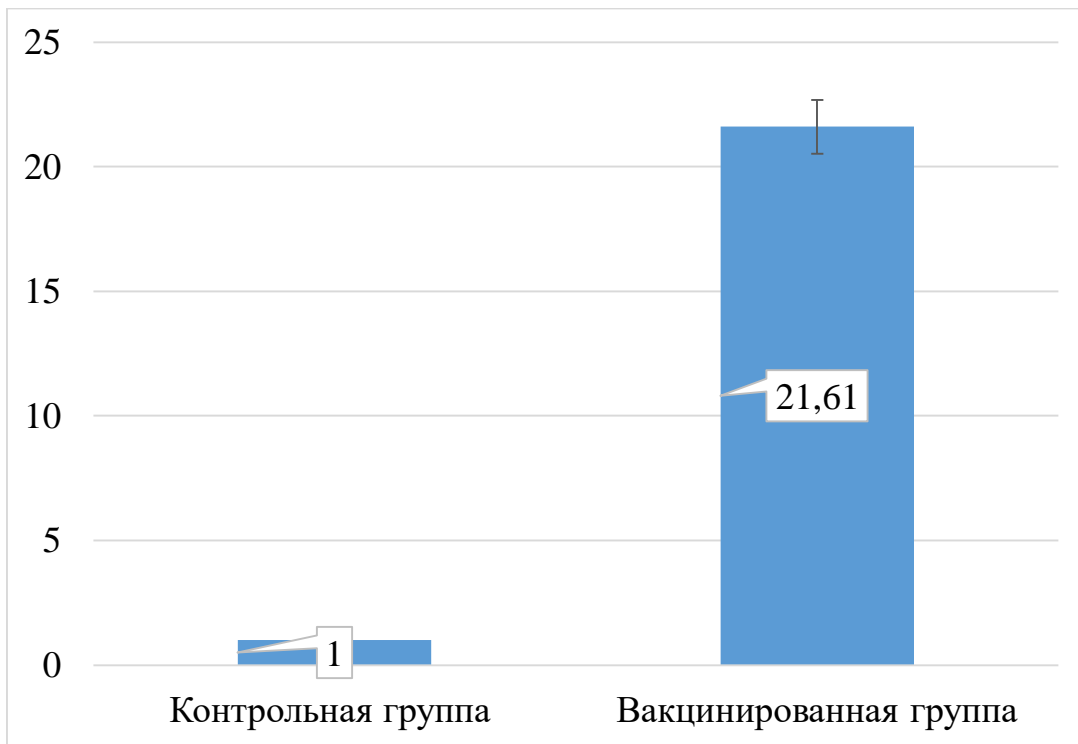


Рисунок 24 - Экспрессия гена *IL8L2*, фабрициева сумка цыплят кросса Ломан Уайт

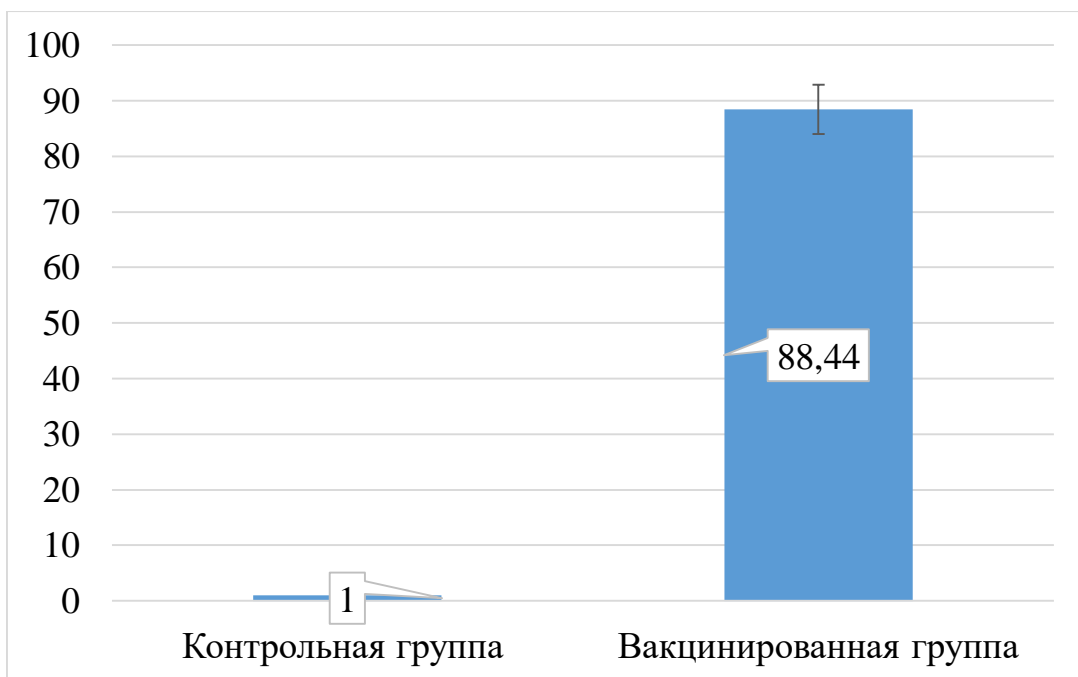


Рисунок 25 - Экспрессия гена *IL8L2*, фабрициева сумка цыплят кросса Росс-308

Интересные данные были обнаружены при исследовании сравнительной экспрессии гена *IRF7*. Согласно имеющимся литературным источникам, данный ген практически не задействуется при инфицировании организма птицы двухцепочечными РНК-содержащими вирусами, хотя в целом играет

значительную роль в неспецифическом иммунном ответе, являясь геном, регулирующим выработку интерферона. Таким образом, относительная экспрессия гена *IRF7* в группе кур в вакцинированной группе цыплят кросса Ломан Уайт превысила контроль в 1,6 раз (рисунок 26), а в вакцинированной группе цыплят кросса Росс-308 – в 1,2 раза (рисунок 25).

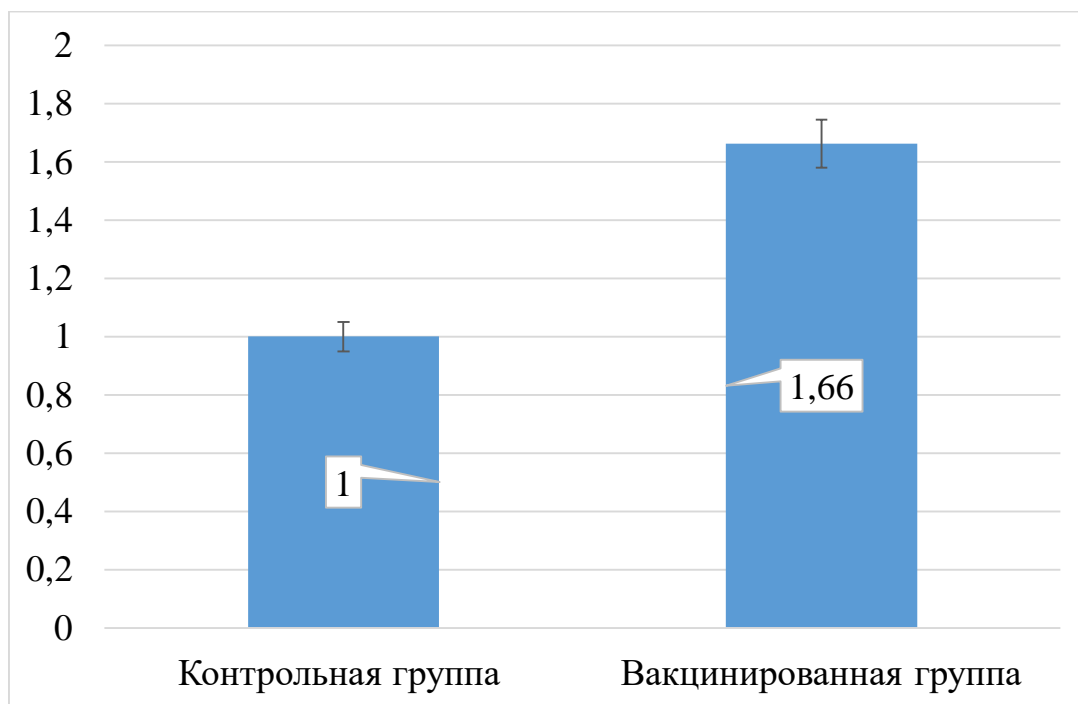


Рисунок 26 - Экспрессия гена *IRF7*, фабрициева сумка цыплят кросса Ломан Уайт

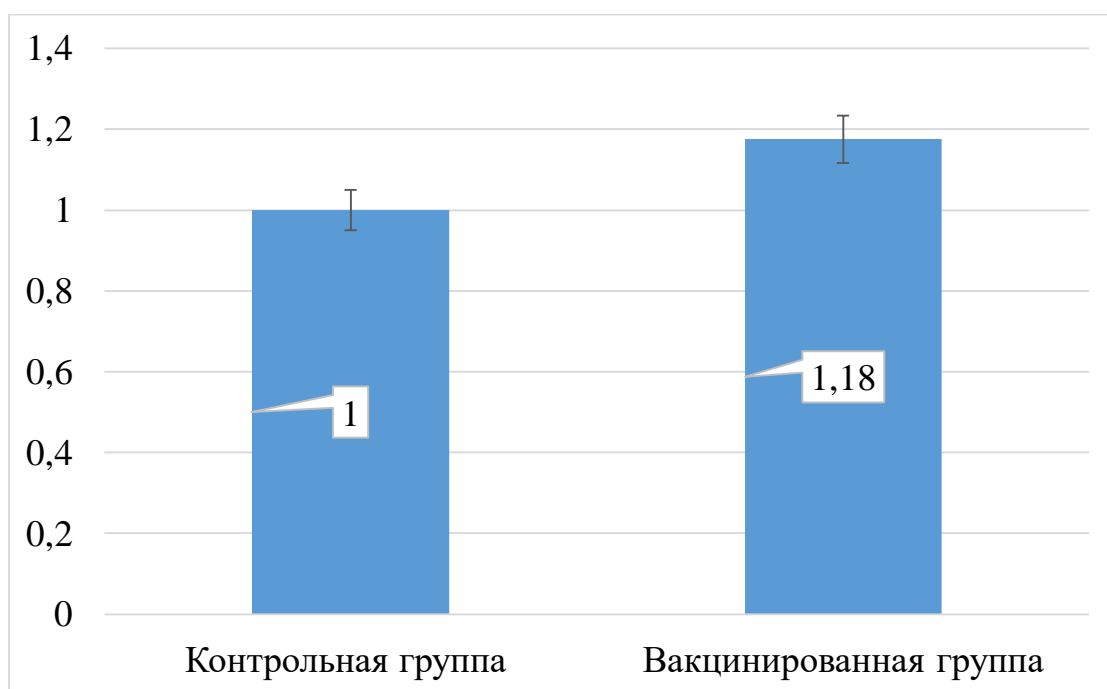


Рисунок 27 - Экспрессия гена *IRF7*, фабрициева сумка цыплят кросса Росс-308

Одним из наиболее активно экспрессирующихся генов в клетках фабрициевой сумки цыплят кросса Росс-308 был ген *AvBD-9* (галинацин-9). Введение иммунокомплексной вакцины в организм цыплят кросса Росс-308 вызвало колоссальную ответную экспрессию гена *AvBD-9*, и на 35 сутки после введения вакцины в организм цыплят кросса Росс-308 сравнительная экспрессия данного гена в вакцинированной группе превышала уровень контроля более чем в 16000 раз (рисунок 29). В организме вакцинированных цыплят кросса Ломан Уайт данный ген также активно экспрессировался, однако существенно ниже, нежели в вакцинированной группе цыплят кросса Росс-308 (экспрессия повысилась в 10 раз по отношению к контролю, рисунок 29).

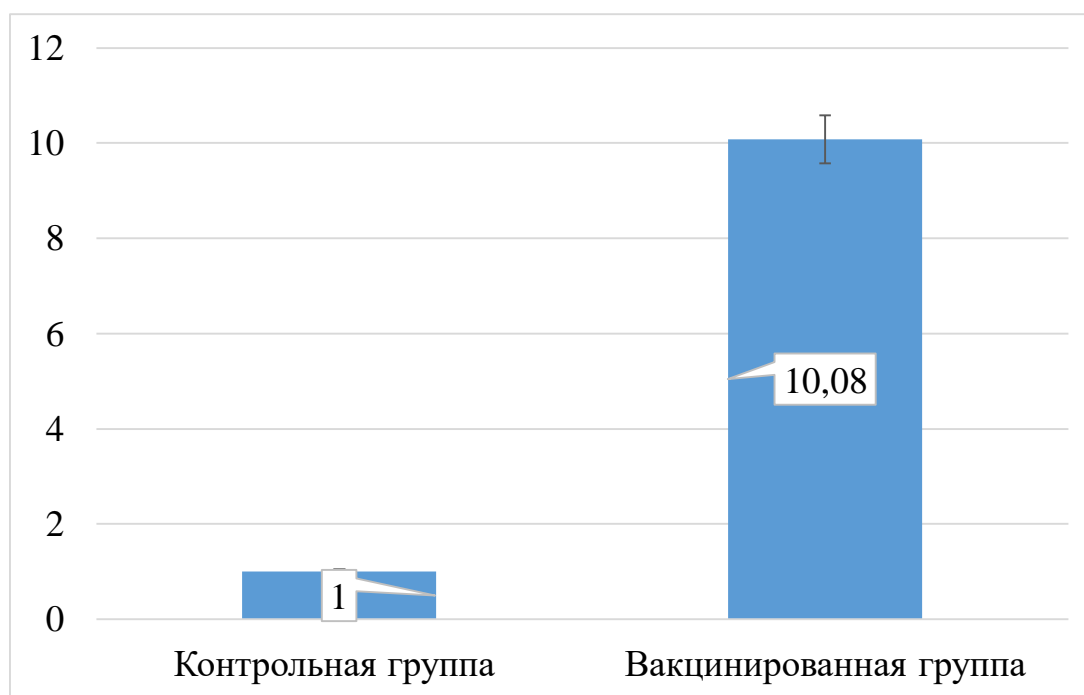


Рисунок 28 - Экспрессия гена *AvBD-9*, фабрициева сумка цыплят кросса Ломан Уайт

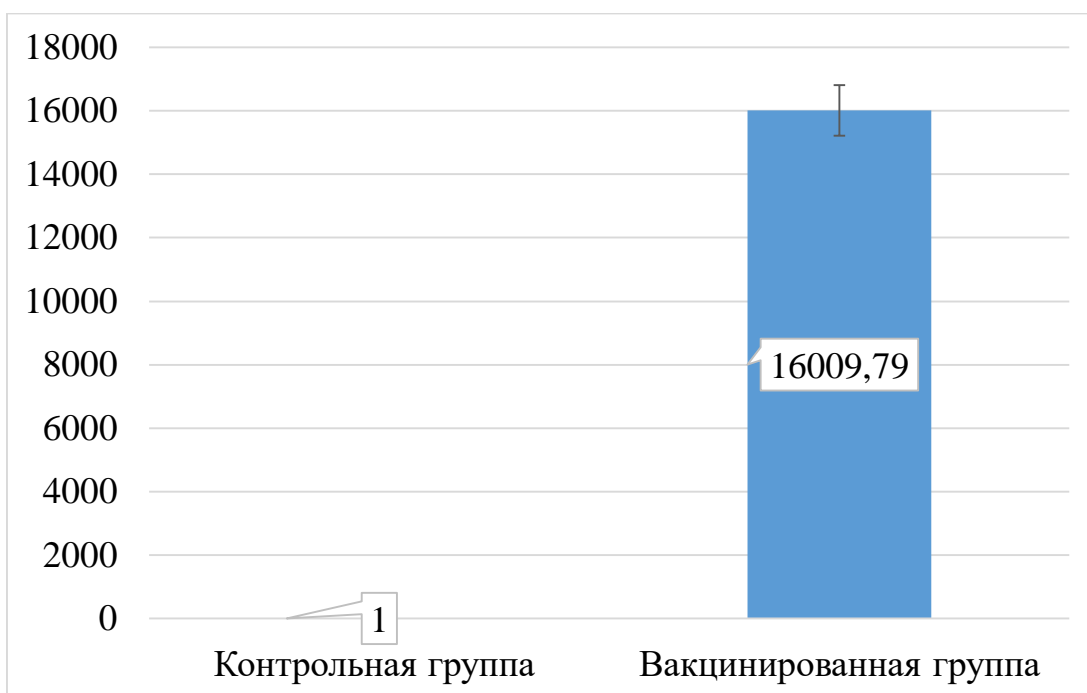


Рисунок 29 - Экспрессия гена *AvBD-9*, фабрициева сумка цыплят кросса Росс-308

Также была происследована относительная экспрессия гена синтеза циклооксигеназы-2 (*PTGS-2*). Ген *PTGS-2* кодирует циклооксигеназу-2, чьей функцией является синтез прекурсора простагландина I₂ из арахидоновой кислоты. Установлено, что в отличие от конститутивной ЦОГ-1, синтез ЦОГ-2 индуцируется только при наличии определенных состояний, таких как воспалительный процесс, что делает экспрессию кодирующего данный фермент гена более явным маркером воспаления. Таким образом, по уровню экспрессии гена *PTGS-2* можно судить о наличии воспалительного процесса. Относительная экспрессия данного гена была чрезвычайно велика как в вакцинированной группе цыплят кросса Ломан Уайт, так и в вакцинированной группе цыплят кросса Росс-308. Традиционно, в вакцинированной группе бройлеров экспрессия данного гена была значительно выше по сравнению с группой цыплят кросса Ломан Уайт. Повышение экспрессии в вакцинированной группе цыплят кросса Ломан Уайт составило 26,6 раз по отношению к экспрессии в контрольной группе (рисунок 30), а в вакцинированной группе цыплят кросса Росс-308 – 4492,6 раза по отношению к экспрессии в контрольной группе (рисунок 31).

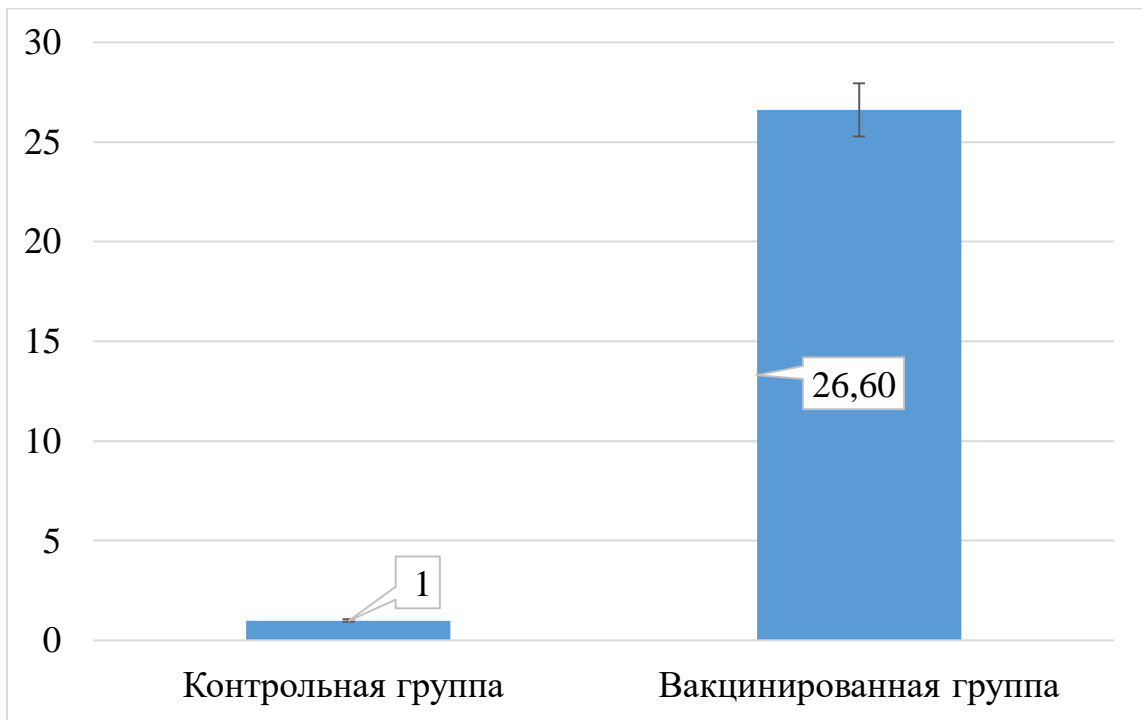


Рисунок 30 - Экспрессия гена *PTGS-2*, фабрициева сумка цыплят кросса Ломан Уайт

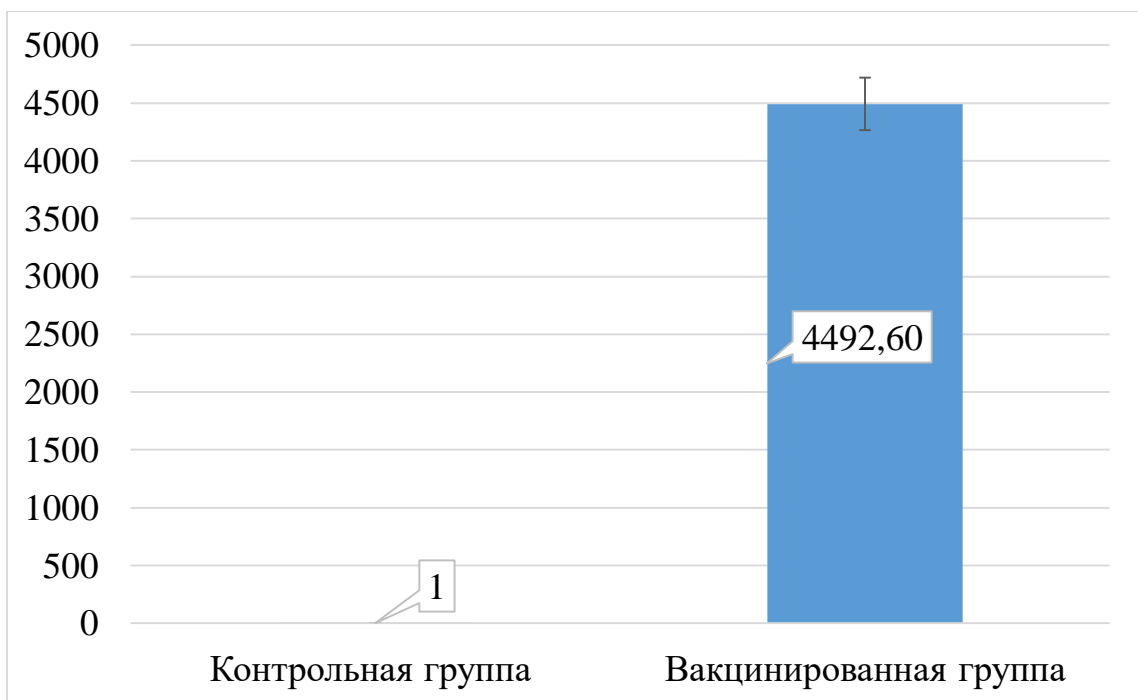


Рисунок 31 - Экспрессия гена *PTGS-2*, фабрициева сумка цыплят кросса Росс-308

Таким образом, анализируя действие иммунокомплексной вакцины против инфекционной бурсальной болезни из штамма “ВНИВИП” на активацию генов иммунитета, можно заключить, что вакцина вызывает существенную стимуляцию иммунокомпетентных генов. В особенности, наиболее активно данные иммунные

реакции протекают в организме вакцинированных бройлеров, поскольку отличия от экспрессии в клетках фабрициевой сумки вакцинированных цыплят кросса Ломан Уайт составляли от нескольких десятков до нескольких тысяч раз.

Данные результаты коррелируют с данными по образовавшемуся титру антител и анализу патоморфологических изменений на вскрытии. Данные методы исследований показали, что контакт вакцины с организмом цыплят кросса Ломан Уайт был значительно слабее, нежели с организмом цыплят кросса Росс-308.

2.2.8. Предполагаемая экономическая эффективность внедрения иммунокомплексной вакцины против инфекционной бурсальной болезни из штамма “ВНИВИП”

Внедрение иммунокомплексной вакцины против инфекционной бурсальной болезни из штамма “ВНИВИП” для профилактики болезни Гамборо экономически оправдано. Затраты для производства 100 тысяч доз иммунокомплексной вакцины против инфекционной бурсальной болезни из штамма “ВНИВИП” в лабораторных условиях представлены в таблице 13.

Таблица 13 - Расчет себестоимости иммунокомплексной вакцины против инфекционной бурсальной болезни из штамма “ВНИВИП”, 100 тысяч доз

Наименование	Ед. изм.	Количество	Цена
Материалы	руб.		18 798,25
Заработная плата сотрудников лаборатории	руб.		56 39,48
Налоговые начисления на заработную плату	%	27,1	1 528,30
Накладные расходы	%	20	5 193,21
ИТОГО	руб.		31 159,24

Как показали расчеты, исходя из закупочных цен на компоненты иммунокомплексной вакцины, себестоимость ее составит 31 159 рублей 24 копейки

за 100 тысяч доз или 311 рублей 59 копеек за 1 тысячу доз. Рыночная цена вакцины Poulvac® Bursaplex® производства компании Zoetis, США (наиболее близкий аналог иммунокомплексной вакцины против инфекционной бурсальной болезни из штамма “ВНИВИП”) составляет от 889 рублей за 1 тысячу доз. Техническая возможность Научно-исследовательского консультационно-диагностического центра ФГБОУ ВО “СПбГУВМ” позволяет выпускать не менее 100,0 тыс. доз вакцины в месяц и, следовательно, 1200,0 тыс. доз вакцины в год. Планируемый годовой экономический эффект методом преимущества в цене определялся по формуле:

$$\text{Эг} = \Delta\text{Ц} \times \text{ОР}$$

Где $\Delta\text{Ц}$ – преимущество в цене (руб.)

ОР – объем реализации продукции в натуральном выражении

$$\text{Эг} = (889 \text{ рублей} - 312 \text{ руб.}) * 1200 \text{ тыс. доз} = 692\,400 \text{ руб.}$$

Таким образом, планируемый годовой экономический эффект при применении иммунокомплексной вакцины против инфекционной бурсальной болезни из штамма “ВНИВИП” в количестве 1200 тыс. доз в год составляет 692 400 рублей.

Ориентировочная потребность российского рынка в наиболее востребованных живых вакцинах от инфекционной бурсальной болезни для цыплят-бройлеров и кур-несушек родительских и промышленных стад составляет 6,8-7,0 млрд доз в год. Соответственно, при старте промышленного производства иммунокомплексной вакцины против инфекционной бурсальной болезни из штамма “ВНИВИП” планируемый годовой экономический эффект может быть существенно увеличен.

3. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЙ

Птицеводство в России является одной из наиболее высокоразвитых и социально-значимых отраслей сельского хозяйства, так как оно обеспечивает население дешевой и питательной животноводческой продукцией. Спецификой отрасли является единовременное содержание на территориях птицефабрик большого поголовья птицы, что превращает эти предприятия в потенциальные очаги вирусных и бактериальных болезней. Наиболее опасными из них являются иммунодепрессивные болезни: болезнь Марека, инфекционная бурсальная болезнь и инфекционная анемия цыплят. Наибольший ущерб в хозяйствах вызывает инфекционная бурсальная болезнь (болезнь Гамборо, ИББ).

В условиях промышленного птицеводства самым эффективным способом предотвращения ИББ является вакцинация. По данным Mahgoub H.A. [178], Lone N.A. [172] и других исследователей [104, 143, 186, 246], профилактика ИББ осуществляется главным образом за счет использования иммунизации птицы живыми вакцинами, причем цыплята, произведенные из яиц от вакцинированных матерей, через желточный мешок получают материнские антитела, которые обеспечивают защиту в течение первых двух недель после вылупления.

Следует отметить, что у потомства различных вакцинированных популяций могут быть разные титры антител к вирусу ИББ. По данным Vublott M. [82], совместное выращивание не приводит к выравниванию уровней материнских антител в потомстве, поэтому в стаде одновременно будут присутствовать особи как с низкой, так и с высокой восприимчивостью к полевым штаммам вируса ИББ.

Доступную и надежную защиту птицы от инфекционной бурсальной болезни обеспечивают иммунокомплексные вакцины нового поколения. Iván J. [137] докладывал о возможности применять их *in ovo* на 18-й день инкубации либо подкожно в суточном возрасте. Однако вакцинация подкожно вызывает задержку репликации вируса в клетках фабрициевой сумки, из-за чего формирование стойкого иммунитета может начаться позже. Механизм действия иммунокомплексной вакцины заключается в отложенной репликации вакцинного вируса в клетках фабрициевой сумки цыпленка, что позволяет после снижения

уровня материнских антител успеть колонизировать клетки фабрициевой сумки раньше, чем это успеет сделать высоковирулентный полевой штамм болезни Гамборо. Отложенная репликация вакцинного вируса достигается за счет взаимодействия иммунного комплекса с фолликулярными дендритными клетками. Когда связь между вируснейтрализующим иммуноглобулином и вакцинным вирусом ослабевает, вирус высвобождается и, перемещаясь с током крови, получает возможность колонизировать клетки фабрициевой сумки, тем самым формируя иммунный ответ [60, 72, 91, 176]. Кроме того, вакцинный вирус распространяется в прочих органах птицы, участвующих в формировании иммунного ответа: в селезенке, тимусе, миндалевидной железе. Также вакцинный вирус распространяется по прочим органам птицы, участвующим в формировании иммунного ответа: селезенке, тимусу, миндалевидной железе (по данным Sedeik M. [226]).

Стойкий иммунитет при введении иммунокомплексной вакцины *in ovo* на 18 день инкубации формируется к 21-26 дню. При введении иммунокомплексной вакцины подкожно в первые сутки после вылупления стойкий иммунитет к болезни Гамборо выявляется в возрасте позднее 28 суток (Haddad E.E. [123]).

По такому же принципу на базе Научно-исследовательского консультативно-диагностического центра по птицеводству ФГБОУ ВО «СПбГУВМ» была разработана иммунокомплексная вакцина против инфекционной бурсальной болезни из штамма «ВНИВИП», пригодная для введения суточным цыплятам. Данная вакцина позволяет вакцинировать птицу, не делая поправку на уровень материнских антител и без затрат на определение уровня иммунитета по формуле Deventer. Период полураспада материнских антител, специфичных к вирусу инфекционной бурсальной болезни составляет от 3 до 5 дней[174]. Аналогично, другие исследования сообщили, что период полураспада материнских антител против вируса инфекционной бурсальной болезни у цыплят составлял 3,46 дня и уменьшался каждые 4 дня. У только что вылупившихся цыплят уровень материнских антител демонстрирует линейное или криволинейное снижение со средним периодом полураспада от 5 до 6 дней. Отдельные авторы сообщили о

периоде полураспада материнских антител, специфичных к вирусу инфекционной бурсальной болезни, равном 6,7 дням [109].

Иммунокомплексная вакцина против инфекционной бурсальной болезни птиц из штамма “ВНИВИП” представляет собой субстанцию, состоящей из одной части вируссодержащей аллантоисной жидкости SPF-эмбриона курицы, зараженного ослабленным вирусом инфекционной бурсальной болезни птиц штамма “ВНИВИП” в объеме 0,2 мл с активностью 10^5 ЭИД₅₀/см³ в смеси с двумя частями сыворотки крови гипериммунизированных кур, содержащей иммуноглобулины G против белка VP2 вируса инфекционной бурсальной болезни с титром в ИФА 10000 – 30000. Активность полученной сыворотки составила 10000 – 30000 в ИФА.

Одна доза вакцины содержала не менее 10^3 ЭИД₅₀/см³.

В процессе производства опытных партий вакцины для обоих опытов (на цыплятах кросса Ломан Уайт и цыплят кросса Росс-308) был проведен контроль вакцины на стерильность и безвредность.

Контроль внешнего вида вакцины.

Внешний вид вакцины оценивали по ГОСТ 33821-2016 [15]. Вакцина представляет собой однородную жидкость светло-розового цвета, без хлопьев и осадка. Пробные партии вакцины были расфасованы в стерильные пластиковые пробирки объемом 15 мл, по 2 мл вакцины на пробирку. Хранение расфасованной вакцины перед проведением испытаний осуществлялось в пределах температуры -20°C - -80 °C. Трещин пробирок, нарушений укупорки, наличия посторонних примесей, изменений цвета либо консистенции обнаружено не было. Поскольку на сегодняшний день в России не существует ГОСТа на разработку живой вакцины против инфекционной бурсальной болезни, было решено воспользоваться ГОСТом на создание данной вакцины [15].

Определение стерильности 2-х лабораторных серий вакцины проводили по ГОСТ 28085-2013 [14]. Установлено, что высевы 2-х лабораторных серий вакцины были свободны от контаминации аэробными и анаэробными бактериями, грибами и микоплазмами.

Безвредность вакцины проверяли по ГОСТ 28085-2013 [14]. Все куры в течение указанного времени остались живыми, без видимых клинических признаков переболевания и в месте введения вакцины отсутствовали следы воспалительной реакции.

В рамках исследования в период 2019-2021 гг. был проведен ряд экспериментов в виварии Санкт-Петербургского государственного университета ветеринарной медицины на цыплятах кросса Ломан Уайт – по 50 голов в группе и цыплятах кросса Росс-308 – по 30 голов в группе.

Цыплята содержались до 35-дневного возраста, когда гарантированно уходил титр материнских антител. По наступлении 35 дней цыплята были забиты и вскрыты, у них отбирали кровь на иммуноферментный анализ и реакцию диффузной преципитации, ткани фабрициевой сумки на экспрессию генов, и микрофлору слепых отростков кишечника на метагеномные исследования. Материал был отобран и законсервирован. Данная методика исследований была описана в работах российских и зарубежных исследователей [61, 110, 178, 218].

Далее было оценено формирование титра антител под влиянием иммунокомплексной вакцины. У цыплят кросса Ломан Уайт титр антител в первые сутки достигал порядка 7 тысяч, у бройлеров колебался от 5692 до 5851. В реакции диффузионной преципитации данный титр выражался как 1:8 как у цыплят кросса Ломан Уайт, так и у цыплят кросса Росс-308.

Были получены результаты серологического анализа сыворотки крови 14-суточных птиц. Титр антител к вирусу инфекционной бурсальной болезни у цыплят кросса Ломан Уайт на 14 сутки в иммуноферментном анализе составил 3281 (контрольная группа цыплят) и 3395 (вакцинированная группа цыплят). Из результатов иммуноферментного анализа можно сделать вывод, что на 14 сутки материнские антитела у цыплят кросса Ломан Уайт все еще активны, выполняют свои защитные функции. В реакции диффузной преципитации результат исследования антител в сыворотке крови цыплят составил 1:4 – предельное разведение, в котором диагностировались антитела к вирусу бурсальной болезни. У цыплят кросса Росс-308 титр материнских антител в возрасте 14 суток также

сильно снизился по сравнению с титром материнских антител в возрасте 1 суток. Титр антител в обеих группах был схож (в контрольной группе в ИФА он составил 1958, в вакцинированной группе – 2014, а в РДП в обеих группах – 1:2. Данный уровень материнских антител достаточен, чтобы освобождающийся из защитных иммуноглобулинов вакцинный вирус все еще подлежал нейтрализации. По литературным данным период активного снижения титра антител в крови у суточных цыплят занимает до первых трех недель жизни [107, 120, 144, 158, 160, 171, 184]. 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 [30, 31, 44].

Затем, по прошествии 35 дней также была взята кровь и проведено сравнение титра антител: в контрольной группе у цыплят кросса Ломан Уайт антитела упали до следового количества и титр составил 68, у вакцинированной группы – 514. У цыплят кросса Росс-308 титр антител в контрольной группе упал до 47,2, а в вакцинированной группе составил 3240, что является защитным титром против данной болезни. В среднем, организм птицы считается защищенным от вируса инфекционной бурсальной болезни при титре антител в иммуноферментном анализе выше 500 [76, 92, 110, 137, 158, 232].

В реакции диффузионной преципитации это выразилось как цельный титр в вакцинированной группе цыплят кросса Ломан Уайт и 1:4 в вакцинированной группе цыплят кросса Росс-308.

На сегодняшний день на некоторых российских птицефабриках используется схема вакцинации, которая включает в себя применение зарубежных иммунокомплексных вакцин. Наиболее близким аналогом является вакцина

Poulvac® Bursaplex® производства компании Zoetis, США. Согласно опубликованным исследованиям, проведенным Sedeik M.E. с соавторами, обратный титр антител при применении данной вакцины составляет от 1000 до 3500 на 35 сутки жизни бройлеров [226]. Таким образом, иммунокомплексная вакцина против инфекционной бурсальной болезни из штамма «ВНИВИП» обладает антигенной активностью, равной антигенной активности зарубежных импортных коммерческих вакцин.

Вышеперечисленные результаты контроля внешнего вида вакцины, контроля стерильности и безвредности вакцины, оценки антигенной активности вакцины стали основой для разработанного проекта нормативно-технической документации для изготовления, контроля и применения иммунокомплексной вакцины против инфекционной бурсальной болезни из штамма «ВНИВИП» (Технологический регламент, Стандарт организации (СТО) по контролю иммунокомплексной вакцины, Инструкция по применению иммунокомплексной вакцины).

При исследовании зоотехнических показателей был сделан вывод, что средний вес цыплят кросса Ломан Уайт практически не изменился (средний вес контрольной группы превосходил средний вес опытной группы на 10,25 г), тогда как средний вес вакцинированной группы цыплят кросса Росс-308 сильно превышал вес невакцинированной группы (превышение составило 284,95 г по сравнению с невакцинированной группой). Из зарубежных исследователей Chung E. также подчеркивал позитивное влияние вакцинации на привесы в опытной группе [90].

Была рассмотрена представленность патогенных бактерий в кишечнике цыплят кросса Ломан Уайт на фоне введения иммунокомплексной вакцины. По причине воздействия живого вакцинного вируса на организм цыплят кросса Ломан Уайт происходил сильный иммунный ответ, повышавший общую резистентность организма птиц опытной группы, в том числе и в отношении большинства обнаруженных условно-патогенных микроорганизмов кишечника кур. Количество патогенных родов, обнаруженных в кишечнике вакцинированных групп меньше, чем в кишечнике контрольных групп. Так, сильнее всего в кишечнике

вакцинированных цыплят кросса Ломан Уайт снижалось количество условно-патогенных стафилококков и энтеробактерий. Род *Staphylococcus* был представлен в основном бактериями *Staphylococcus warneri* и *Staphylococcus cohnii*, выявляющимися при процессах снижения иммунитета и являющимися участниками патогенных процессов. Также есть данные о способности *Staphylococcus cohnii* к развитию антибиотикорезистентности. Прочие патогенные и условно-патогенные микроорганизмы также были подобраны для сравнения у групп птиц по своим патогенным свойствам, либо способности к проявлению таковых при снижении иммунитета. К примеру, была происследована концентрация патогенных и условно-патогенных энтеробактерий. Бактерии семейства *Enterobacteriaceae* были представлены главным образом такими родами микроорганизмов, как *Klebsiella*, *Leminorella*, *Kosakonia* и прочие. В кишечнике вакцинированных цыплят кросса Росс-308 снижалась концентрация условно-патогенных энтеробактерий, стрептококков и микоплазм. Основными представителями рода *Mycoplasma* являлись такие условно-патогенные виды, как *Mycoplasma conjunctivae*, *Mycoplasma dispar*, *Mycoplasma canadense* и прочие. Все эти микроорганизмы вызывают инфекционные болезни, либо являются участниками патогенных процессов, и были открыты при исследовании пораженных органов и тканей. Основными представителями рода *Streptococcus* являлись такие микроорганизмы, как *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus cristatus* и прочие, способные участвовать в септических процессах, обсеменять органы и ткани, а также активно размножающиеся при снижении иммунитета у птицы.

Из литературных данных, Tarabees R. и рядом исследователей также было отмечено положительное влияние вакцинации на разнообразие условно-патогенной микрофлоры в кишечнике [122, 237, 238, 263].

Нами была рассмотрена сравнительная экспрессия генов неспецифического иммунитета (*AvBD-10*, *AvBD-9*, *Gal-9*, *IL-6*, *IL8L2*, *PTGS2*, *IRF7*), осуществляющего большую часть иммунной реактивности по отношению как к чужеродным вирусам, так и бактериям, и прочим агентам.

Цитокины, выработка которых кодируется генами *IL6* и *IL8L2*, являются важными медиаторами процессов воспаления и регуляторами иммунных процессов, протекающих в инфицированном вирусом организме. Их основная функция — управлять активностью клеток иммунной системы. Однако мало что известно о роли данных цитокинов в патогенезе и иммунных реакциях, вызванных вирусом инфекционной бурсальной болезни. Исследования по схожей тематике проводились Liu H. с соавторами [170], которые пришли к выводу, что инфицирование организма белых леггорнов вирусом ИББ приводит к 30-кратному увеличению экспрессии интерлейкинов в опытной группе по отношению к контролю. Активнее всего экспрессировался ген синтеза интерлейкина-8, поскольку данный цитокин является мощным стимулятором эффективности работы НК-клеток (естественных киллеров) и его активность сравнима по интенсивности с экспрессией гена *IFN-γ*, отвечающего за синтез интерферона. Farhanah M.I. с соавторами сообщают [111], что при заражении SPF-цыплят крайне вирулентным вирусом болезни Гамборо заметно увеличивалась экспрессия таких цитокинов, как интерлейкин-12 (β -субъединица), интерлейкин-15 и интерлейкин-6.

В наших исследованиях между вакцинированной и контрольной группами цыплят кросса Ломан Уайт имеется существенное различие в уровнях экспрессии генов *IL6* и *IL8L2*. Так, под влиянием действия иммунокомплексной вакцины из штамма «ВНИВИП» экспрессия гена *IL6* увеличилась в 15,63 раза, а экспрессия гена *IL8L2* — в 21,61 раза по сравнению с контролем.

Данные изменения указывают на интенсивные иммунные процессы, протекающие в клетках фабрициевой сумки. Так, ген *IL6* активно экспрессируется в ответ на инфицирование тканей организма, и этот процесс строго контролируется транскрипционными и посттранскрипционными механизмами во избежание возникновения нерегулируемого непрерывного синтеза. Кроме того, интерлейкин-6 является пирогенным цитокином и свидетельствует о повышении температуры, характерном для инфекционного процесса [236]. Увеличение экспрессии гена *IL6*

в вакцинированной группе кур по сравнению с контрольной подтверждает действие вакцины на клетки и ткани фабрициевой сумки птицы.

Ген *IL8L2* — хемокин, включающийся в работу при инфицировании организма вирусами. Так, Luo C. с соавторами сообщают [175], что данный ген начинает активно работать при инфицировании птицы вирусами гриппа H5N1 (высокопатогенного птичьего гриппа) и H9N2 (низкопатогенного птичьего гриппа). Поскольку фабрициевы сумки птиц опытной группы были колонизированы двухцепочечным РНК-содержащим вакцинным вирусом ИББ, повышение в этой группе экспрессии гена *IL8L2* в 21,61 раза по отношению к контролю является закономерным следствием иммунного ответа организма.

Интерферон традиционно считается основным защитным фактором, позволяющим организму справляться с вирусной нагрузкой. Так, Wang Y. и др [252] сообщают о противодействии вирусу лейкоза птиц со стороны интерферона 1 типа, выработанного под воздействием регуляторного фактора интерферона *IRF7*. Однако не при всех вирусных инфекциях интерферон играет ключевую защитную роль в организме птицы. Li J. с соавторами сообщает [165], что при инфицировании вирусом инфекционной бурсальной болезни белок VP3 двухцепочечного вируса ИББ прочно связывается с внутриклеточным рецептором опознавания паттерна, блокируя распознавание вируса ИББ, тем самым значительно ингибируя экспрессию интерферона 1 типа.

Относительная экспрессия данного гена в опытной (вакцинированной) группе цыплят кросса Ломан Уайт превышала таковую в контрольной группе в 1,66 раза, а в опытной группе цыплят кросса Росс-308 – в 1,2 раза. Данный результат позволяет предположить большую вовлеченность интерферона в организме цыплят кросса Ломан Уайт в процессы ответа на инфицирование вирусом инфекционной бурсальной болезни.

Также необходимо отметить, что экспрессия под воздействием живого вируса в целевых клетках возрастала лишь на 60% у цыплят кросса Ломан Уайт и на 20% у цыплят кросса Росс-308, тогда как при заражении вирусом лейкоза птиц наблюдалась по меньшей мере двукратная экспрессия данного гена [252], а при

заражении вируса птичьего гриппа экспрессия гена *IRF7* на 35-е сутки достигала 10-кратного превосходства над уровнем контроля и продолжала увеличиваться по мере дальнейшей репликации вируса [152]. Также данный ген активно экспрессируется при других опасных иммунодепрессивных вирусных заболеваниях, вызванных ДНК-, а не РНК-содержащими вирусами. К примеру, Feng Z. сообщает о трехкратном превышении экспрессии данного гена по отношению к контролю у цыплят, инфицированных вирусом болезни Марека [114].

Одним из наиболее активно экспрессирующихся генов в клетках фабрициевой сумки цыплят кросса Росс-308 был ген *AvBD9* (галинацин 9). Благодаря конформации β -дефензины птиц проявляют более выраженную эффективность в отношении грамположительных бактерий. Дефензины, селективно рекрутируя моноциты, Т-лимфоциты, незрелые дендритные и тучные клетки в очаги инфекции, участвуют в реакциях адаптивного иммунитета. Дефензины связаны с усилением бактериостатической активности в отношении многих патогенов, включая *Klebsiella typhimurium*, *Streptococcus bovis*, *Enterococcus faecalis*, *Salmonella Typhimurium*. Введение иммунокомплексной вакцины в организм бройлеров вызвало колоссальную ответную экспрессию гена *AvBD9*, и на 35 сутки после введения вакцины в организм бройлеров сравнительная экспрессия данного гена в вакцинированной группе превышала уровень контроля более чем в 16000 раз. В организме вакцинированных цыплят кросса Ломан Уайт данный ген также активно экспрессировался, однако существенно ниже, нежели в вакцинированной группе цыплят кросса Росс-308 (экспрессия повысилась в 10 раз по отношению к контролю).

По результатам наших исследований с применением метода ПЦР с обратной транскрипцией было показано, что на 35 сутки после введения вакцины в организм цыплят кросса Ломан Уайт экспрессия гена галлинацина 10 (*AvBD10*) во всех группах в 3,17 раз превосходила уровень контроля. При этом тенденция увеличения экспрессии галлинацина-10 у цыплят кросса Ломан Уайт после вакцинации иммунокомплексной вакциной против инфекционной бурсальной

болезни из штамма “ВНИВИП” сохраняется также и у цыплят кросса Росс-308, правда в значительно большем объеме.

В конце обоих опытов было отмечено сильное увеличение экспрессии гена *AvBD10*, однако в организме бройлеров увеличение экспрессии составило 1382,76 раза по отношению к контролю. Данные результаты свидетельствуют о более активном действии вакцинного вируса в организме цыплят кросса Росс-308 по сравнению с организмом цыплят кросса Ломан Уайт, что подтверждается также и данными патоморфологического осмотра.

Ген *PTGS2* кодирует циклооксигеназу-2, чьей функцией является синтез прекурсора простагландина *I2* из арахидоновой кислоты. Установлено, что в отличие от конститутивной ЦОГ-1, синтез ЦОГ-2 индуцируется только при наличии определенных состояний, таких как воспалительный процесс, что делает экспрессию кодирующего данный фермент гена более явным маркером воспаления. Таким образом, по уровню экспрессии гена *PTGS2* можно судить о наличии воспалительного процесса. Относительная экспрессия данного гена была чрезвычайно велика как в вакцинированной группе цыплят кросса Ломан Уайт, так и в вакцинированной группе цыплят кросса Росс-308. Традиционно, в вакцинированной группе цыплят кросса Росс-308 экспрессия данного гена была значительно выше по сравнению с группой цыплят кросса Ломан Уайт. Повышение экспрессии в вакцинированной группе цыплят кросса Ломан Уайт составило 26,6 раз по отношению к экспрессии в контрольной группе, а в вакцинированной группе цыплят кросса Росс-308 – 4492,6 раза по отношению к экспрессии в контрольной группе.

Анализируя действие иммунокомплексной вакцины против инфекционной бурсальной болезни из штамма “ВНИВИП” на активацию генов иммунитета, можно заключить, что вакцина вызывает существенную стимуляцию иммунокомпетентных генов. В особенности, наиболее активно данные иммунные реакции протекают в организме вакцинированных бройлеров, поскольку отличия от экспрессии в клетках фабрициевой сумки вакцинированных цыплят кросса Ломан Уайт составляли от нескольких десятков до нескольких тысяч раз.

Данные результаты коррелируют с данными по образовавшемуся титру антител и анализу патоморфологических изменений на вскрытии. Данные методы исследований показали, что контакт вакцины с организмом цыплят кросса Ломан Уайт был значительно слабее, нежели с организмом цыплят кросса Росс-308.

Имеются литературные данные, описывающие характер экспрессии иммунокомпетентных генов *IL6*, *IL8L2*, *IRF7* и прочих под влиянием вакцинации либо заражения вирусом инфекционной бурсальной болезни [60, 102, 170]. Так, по данным различных исследований, экспрессия данных иммунокомпетентных генов под влиянием зарубежных вакцин имеет характер от 2- до 25-кратного превышения над уровнем экспрессии данных генов в группе контроля. Экспрессия генов, наблюдаемая нами при вакцинации птицы иммунокомплексной вакциной против инфекционной бурсальной болезни из штамма “ВНИВИП” существенно превосходит все результаты, ранее полученные при схожих исследованиях.

Внедрение иммунокомплексной вакцины против инфекционной бурсальной болезни из штамма “ВНИВИП” для профилактики болезни Гамборо экономически оправдано. Как показали расчеты, исходя из закупочных цен на компоненты иммунокомплексной вакцины, себестоимость ее составит 31 159 рублей 24 копейки за 100 тысяч доз или 311 рублей 59 копеек за 1 тысячу доз. Рыночная цена вакцины Poulvac® Bursaplex® производства компании Zoetis, США (наиболее близкий аналог иммунокомплексной вакцины против инфекционной бурсальной болезни из штамма “ВНИВИП”) составляет от 889 рублей за 1 тысячу доз. Техническая возможность Научно-исследовательского консультационно-диагностического центра ФГБОУ ВО “СПбГУВМ” позволяет выпускать не менее 100,0 тыс. доз вакцины в месяц и, следовательно, 1200,0 тыс. доз вакцины в год.

Таким образом, годовой экономический эффект при применении иммунокомплексной вакцины против инфекционной бурсальной болезни из штамма “ВНИВИП” в количестве 1200 тыс. доз в год составляет 692 400 рублей.

4. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Разработана иммунокомплексная вакцина против инфекционной бурсальной болезни из штамма “ВНИВИП”, представляющая собой живой вирус инфекционной бурсальной болезни штамма “ВНИВИП” в объединении с иммуноглобулинами класса G против белка VP2 вируса инфекционной бурсальной болезни.

2. Научно обоснован и подготовлен проект нормативно-технической документации для изготовления, контроля и применения иммунокомплексной вакцины против инфекционной бурсальной болезни из штамма “ВНИВИП”.

3. Иммунокомплексная вакцина против инфекционной бурсальной болезни из штамма “ВНИВИП” вызывает выработку вируснейтрализующих антител в организме цыплят яйценокских кроссов (средний титр до 514 в иммуноферментном анализе, цельный титр в реакции диффузионной преципитации) и цыплят мясных кроссов (средний титр до 3240 в иммуноферментном анализе и 1:4 в реакции диффузионной преципитации).

4. Иммунокомплексная вакцина против инфекционной бурсальной болезни из штамма “ВНИВИП” вызывает в Фабрицевой сумке сильный ответ неспецифических факторов иммунной защиты (простагландин, галлинацины, интерлейкины) в сравнении с контролем.

5. Иммунокомплексная вакцина против инфекционной бурсальной болезни из штамма “ВНИВИП” не вызывает патологоанатомических изменений в иммунокомпетентных органах цыплят, а также не вызывает у них иммунодефицита и поражений внутренних органов вследствие размножения вторичной микрофлоры.

6. Под влиянием иммунокомплексной вакцины против инфекционной бурсальной болезни из штамма “ВНИВИП” в организме цыплят яйценокских кроссов процентное соотношение патогенных и условно-патогенных родов микроорганизмов сокращается более чем в 3 раза, а в организме цыплят мясных кроссов – в 1,3 раза.

7. Планируемый годовой экономический эффект при применении иммунокомплексной вакцины против инфекционной бурсальной болезни из штамма “ВНИВИП” в количестве 1200 тыс. доз в год составляет 692 400 рублей.

ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ

Основные научные положения работы и ее практические результаты рекомендуется использовать на современных птицеводческих предприятиях ветеринарными специалистами и в учебном процессе студентов, аспирантов и слушателей курса повышения квалификации.

Материалы работы послужили основой для разработки и публикации методических рекомендаций «Методические рекомендации по использованию современных биотехнологий для оценки экспрессии генов, связанных с продуктивностью и устойчивостью птицы к неблагоприятным факторам», утвержденных УМК ФЗТА в ФГБОУ ВО МГАВМиБ - МВА имени К.И. Скрябина (протокол №13 от 3.11.2019).

Также предлагается к применению патент на изобретение RU №2761566 – Вакцина иммунокомплексная против инфекционной бурсальной болезни птиц из штамма “ВНИВИП”, зарегистрированный в Государственном реестре РФ 10 декабря 2021 г.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

Полученные выводы позволяют отметить следующие перспективы дальнейшей разработки темы:

- дальнейшее изучение иммунокомплексной вакцины против инфекционной бурсальной болезни из штамма “ВНИВИП” и изучение ее иммуногенных свойств при введении в организм цыплят яйценоских кроссов;

- разработка и изучение иммунокомплексных вакцин против прочих вирусных и бактериальных болезней сельскохозяйственной птицы (инфекционной анемии цыплят, инфекционного энцефаломиелита, реовирусного теносиновита и прочих);

- дальнейшее изучение и сравнение влияния вакцинных и полевых вирусов на микробиом и экспрессию иммунокомпетентных генов сельскохозяйственной птицы.

БЛАГОДАРНОСТЬ

Автор выражает благодарность своему научному руководителю Э.Д. Джавадову за постановку задачи, внимание к работе и обучение постановке эксперимента на живой птице, и коллеге по обучению и аспирантуре Веретенникову В.В. за помощь в проведении всех этапов работы. Также особую благодарность автор выражает коллективу ООО «БИОТРОФ» во главе с Лаптевым Г.Ю. и, в частности, коллективу отдела молекулярно-генетических исследований во главе с Ильиной Л.А. за подготовку и обучение молекулярно-генетическим методикам.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ, УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ, СИМВЛОВ, ЕДИНИЦ И ТЕРМИНОВ

БИ – бурсальный индекс

ВНИВИП – филиал ФНЦ ВНИТИП РАН, Всероссийский научно-исследовательский ветеринарный институт птицеводства

ИББ – инфекционная бурсальная болезнь

ИФА – иммуноферментный анализ

ПЦР – полимеразная цепная реакция

РДП – реакция диффузионной преципитации

СПФ – аббревиатура от англ. Specific-pathogen-free (свободные от специфических патогенов)

МПА – мясо-пептонный агар

МПБ – мясо-пептонный бульон

МППБ – мясо-пептонный печеночный бульон

УЕ – условная единица

ХАО – хориоаллантаическая оболочка

Н-цепи – тяжелые цепи иммуноглобулинов

IgA – иммуноглобулин класса А

IgG – иммуноглобулин класса G

IgM – иммуноглобулин класса M

L-цепи – легкие цепи иммуноглобулинов

VP2, pVP2 – белок вируса ИББ VP2

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Алиев А. С. Инфекционная бурсальная болезнь птиц / А. С. Алиев ; А. С. Алиев. – Санкт-Петербург: Изд-во НИИЭМ им. Пастера, 2010. – 208 с. – ISBN 978-5-904405-10-6.
2. Алиев А. С. Профилактика инфекционной бурсальной болезни в промышленном птицеводстве / А. С. Алиев, М. Г. Алиев // Птица и птицепродукты. – 2008. – № 5. – С. 26-28.
3. 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.
4. 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.
5. Бакулин В. А. Этиология иммунодефицитов птиц / В. А. Бакулин // Птицеводство. – 2021. – № 3. – С. 52-56.
6. Бачкова Р. С. Опыт, проверенный временем / Р. С. Бачкова // Птицеводство. – 2017. – № 4. – С. 6-13.
7. Бессарабов Б. Специфическая профилактика инфекционной бурсальной болезни цыплят / Б. Бессарабов, В. Демин // Птицеводство. – 2008. – № 3. – С. 61-62.
8. Бобкова Г. Н. Общая эпизоотология: Учебно-методическое пособие к лабораторно - практическим занятиям по курсу "Эпизоотология и инфекционные болезни" для студентов очной и заочной формы обучения, обучающихся по специальности 111801, 111201.65 – "Ветеринария" / Г. Н. Бобкова, А. В. Кривопушкин. – Брянск: Брянский государственный аграрный университет, 2012. – 72 с.

9. Болотников И. А. Практическая иммунология сельскохозяйственной птицы / И. А. Болотников, Ю. В. Конопатов. – Санкт-Петербург: Санкт-Петербургская издательско-книготорговая фирма "Наука", 1993. – 204 с. – ISBN 5-02-025816-4.
10. Васильева М. А. Анатомические особенности и онтогенез иммунной системы птицы / М. А. Васильева, В. А. Бакулин // Студенческий вестник. – 2018. – № 9-2(29). – С. 68-71.
11. 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.
12. Годизов П. Диагностика инфекционной бурсальной болезни / П. Годизов, А. Алиев // Птицеводство. – 2006. – № 1. – С. 18.
13. Годизов П. Х. Патогенность для цыплят различных штаммов вируса инфекционной бурсальной болезни / П. Х. Годизов // Вестник ветеринарии. – 2004. – № 4(31). – С. 29-31.
14. ГОСТ 28085-2013. СРЕДСТВА ЛЕКАРСТВЕННЫЕ БИОЛОГИЧЕСКИЕ ДЛЯ ВЕТЕРИНАРНОГО ПРИМЕНЕНИЯ. Методы контроля стерильности. М., 2013. 18 с.
15. ГОСТ 33821-2016. Средства лекарственные для ветеринарного применения. ВАКЦИНА ПРОТИВ ГРИППА ПТИЦ ИНАКТИВИРОВАННАЯ ЭМУЛЬГИРОВАННАЯ. Технические условия. М., 2018. 12 с.
16. Громов И. Н., Журов Д. О., Алиев А. С., Алиева А. К. / Патоморфологическая и дифференциальная диагностика инфекционной бурсальной болезни птиц: рекомендации; Учреждение образования "Витебская ордена "Знак Почета" государственная академия ветеринарной медицины". – Витебск : Учреждение образования "Витебская ордена "Знак Почета" государственная академия ветеринарной медицины", 2017. – 18 с. – ISBN 978-985-591-023-8.

17. Громов И. Н., Селиханова М. К., Алиев А. С. [и др.] Патоморфологические изменения у цыплят при ассоциативном течении инфекционной анемии и инфекционной бурсальной болезни // Ветеринарная патология. – 2012. – № 3(41). – С. 38-44.
18. Демидчик Л. Г. Некоторые вопросы эпизоотологии, клиники, патанатомии и специфической профилактики инфекционной бурсальной болезни птиц (Гамборо) на Васильевской птицефабрике Пензенской области / Л. Г. Демидчик // Ветеринария. Реферативный журнал. – 2000. – № 2. – С. 458.
19. Демидчик Л. Г. Разработка средств диагностики и специфической профилактики инфекционной бурсальной болезни / Л. Г. Демидчик // Ветеринария. Реферативный журнал. – 2001. – № 2. – С. 347.
20. Джавадов Э. Д., Вихрева И. Н., Прокофьева Н. И. [и др.] / Современное представление о функционировании иммунной системы птиц // Птица и птицепродукты. – 2017. – № 5. – С. 53-55.
21. Джавадов Э. Д., Вихрева И. Н., Прокофьева Н. И. [и др.] / Современное представление о функционировании иммунной системы птицы. Клеточные и гуморальные факторы специфического иммунитета // Птица и птицепродукты. – 2017. – № 6. – С. 28-29.
22. Джавадов Э. Д., Вихрева И. Н., Прокофьева Н. И. [и др.] / Современное представление о функционировании специфических факторов иммунной системы птицы // Актуальные вопросы сельскохозяйственной биологии. – 2017. – № 1(3). – С. 3-6.
23. Джавадов Э. Д., Вихрева И. Н., Прокофьева Н. И. [и др.] / Функциональная активность иммунной системы птицы // Вопросы нормативно-правового регулирования в ветеринарии. – 2017. – № 3. – С. 192-194.
24. Джавадов Э. Д., Вихрева И. Н., Прокофьева Н. И., Тарлавин Н. В. / Профилактика инфекционных болезней птицы: принципы и способы // Птица и птицепродукты. – 2018. – № 1. – С. 44-46.
25. Джавадов Э. Д., Румянцев А. М., Веретенников В. В., Тарлавин Н. В. / Использование рекомбинантного белка VP2 в качестве субъединичной вакцины

против инфекционной бурсальной болезни // Международный вестник ветеринарии. – 2021. – № 3. – С. 9-14. – DOI 10.17238/issn2072-2419.2021.3.9.

26. 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.

27. 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.

28. 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.

29. 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.

30. 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.

31. Джавадов Э. Прогрессивные методы вакцинопрофилактики / Э. Джавадов // Животноводство России. – 2020. – № S3. – С. 42-45.

32. Дубровин А. В. Экспрессия генов иммунитета промышленной птицы под влиянием препарата на основе смеси эфирных масел / А. В. Дубровин // Генетика, селекция и биотехнология животных: на пути к совершенству : Материалы научно-практической конференции с международным участием, Пушкин, 13–15 октября 2020 года. – Пушкин: Всероссийский научно-исследовательский институт генетики и разведения сельскохозяйственных животных РАСХН, 2020. – С. 96-97.
33. Завьянцев В. Е. Молекулярная характеристика РНК высоковирулентных штаммов вируса инфекционной бурсальной болезни, выделенных от цыплят на Тайване / В. Е. Завьянцев // Ветеринария. Реферативный журнал. – 2005. – № 3. – С. 780.
34. Зыбина Т. Н., Пяткина А. А., Кулако В. Ю. [и др.] / Определение порогового титра трансовариальных антител для применения вирусвакцины Гамборомикс // Ветеринария. – 2019. – № 2. – С. 55-64.
35. Зыбина Т. Н., Пяткина А. А., Мороз Н. В. [и др.] / Биологические свойства изолятов вируса инфекционной бурсальной болезни, выделенных на территории РФ в период 2017-2019 гг // Ветеринарная патология. – 2020. – № 3(73). – С. 22-29. – DOI 10.25690/VETPAT.2020.46.82.007.
36. Ёылдырым Е. А., Грозина А. А., Вертипрахов В. Г. [и др.] / Экспрессия генов, ассоциированных с иммунитетом, в тканях слепых отростков кишечника и поджелудочной железы цыплят-бройлеров (*Gallus Gallus* L.) при экспериментальном т-2 токсикозе // Сельскохозяйственная биология. – 2021. – Т. 56. – № 4. – С. 664-681.
37. Кочиш И. И., Мясникова О. В., Мартынов В. В., Смоленский В. И. / Микрофлора кишечника кур и экспрессия связанных с иммунитетом генов под влиянием пробиотической и пребиотической кормовых добавок // Сельскохозяйственная биология. – 2020. – Т. 55. – № 2. – С. 315-327.
38. Курченко Г. А. Исследование патогенеза и распределения в тканях коммерческих цыплят-бройлеров вариантного штамма вируса инфекционной бурсальной болезни в разные сроки после заражения. (США) / Г. А. Курченко // Ветеринария. Реферативный журнал. – 2006. – № 2. – С. 475.

39. Курченко Г. А. Исследования влияния супрессии Т-клеток циклоспорином-А на их роль в патогенезе инфекционной бурсальной болезни у экспериментально инфицированных цыплят. (Индия) / Г. А. Курченко // Ветеринария. Реферативный журнал. – 2005. – № 4. – С. 1272.
40. Курченко Г. А. Реакции клеток лимфоидных органов куриных эмбрионов на заражение вирусом инфекционного бурсита птиц. (США) / Г. А. Курченко // Ветеринария. Реферативный журнал. – 2009. – № 2. – С. 499.
41. Куфе Ф. Инфекционный бурсит птиц (особенности эпизоотологии, профилактики и меры борьбы): специальность 16.00.03: автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата ветеринарных наук / Куфе Франклин. – Одесса, 1993. – 17 с.
42. Макаров В. В. Россия: прошлое и настоящее (из истории борьбы против микробов и вирусов) Часть 3 / В. В. Макаров // Ветеринарная практика. – 2007. – № 3. – С. 3-10.
43. Малахов М. С. Морфогенез вируса болезни Гамборо / М. С. Малахов, В. В. Дмитренко, Б. В. Новиков // Вопросы ветеринарной вирусологии, микробиологии и эпизоотологии, Покров, 28–30 ноября 1990 года. – Покров: Всероссийский научно-исследовательский институт ветеринарной вирусологии и микробиологии РАСХН, 1990. – С. 104-106.
44. Мальцева Б. М. Диагностика и иммуномониторинг инфекционной бурсальной болезни (болезни Гамборо) в птицеводствах / Б. М. Мальцева // Ветеринария. Реферативный журнал. – 2001. – № 4. – С. 1173.
45. Мальцева Б. М. Разработка средств специфической профилактики инфекционной бурсальной болезни / Б. М. Мальцева // Ветеринария. Реферативный журнал. – 2001. – № 4. – С. 1233.
46. Метлицкая Д. А. Патологоанатомические изменения у цыплят при спонтанной инфекционной бурсальной болезни / Д. А. Метлицкая // Сборник научных статей по материалам XXI Международной студенческой научной конференции, Гродно, 15 мая 2020 года / Учреждение образования "Гродненский

государственный аграрный университет". – Гродно: Гродненский государственный аграрный университет, 2020. – С. 48-50.

47. Нечипуренко А. А., Иващенко О. А., Рыбак С. В. [и др.] / Первый опыт применения новой иммунокомплексной вакцины от болезни Гамборо в Российской Федерации // БИО. – 2021. – № 5(248). – С. 8-11.

48. Нечипуренко А. А. Первый опыт использования иммунокомплексной вакцины в Украине / А. А. Нечипуренко, О. А. Иващенко, С. И. Гаташ // Наше сельское хозяйство. – 2021. – № 6(254). – С. 10-13.

49. 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.

50. Осипова Н. И. Болезнь Гамборо: оценка оптимального срока вакцинации по формуле Девентера / Н. И. Осипова // Ветеринария. Реферативный журнал. – 2008. – № 2. – С. 427.

51. Руденко С. А. Болезнь Гамборо и ее влияние на иммунитет / С. А. Руденко // БИО. – 2020. – № 6(237). – С. 16-21.

52. Садчикова А. А. Патоморфология и иммуноморфологические реакции при инфекционном бурсите цыплят (болезни Гамборо) и при вакцинации: специальность 16.00.02: автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата ветеринарных наук / Садчикова Анна Алексеевна. – Москва, 2004. – 16 с.

53. Тарлавин Н. В. Применение иммунокомплексной вакцины против инфекционной бурсальной болезни / Н. В. Тарлавин, В. В. Веретенников // 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. 102-104.

54. Фомина Н. В. Сравнение нуклеотидной последовательности гипервариабельного региона гена VP2 полевых изолятов вируса инфекционной бурсальной болезни, полученных в Индии / Н. В. Фомина // Ветеринария. Реферативный журнал. – 2004. – № 2. – С. 440.
55. Фомина Н. В. Эпизоотология, патогенез, диагностика, свойства вируса и иммунопрофилактика острой формы инфекционной бурсальной болезни птиц. Обзор. (Бельгия) / Н. В. Фомина // Ветеринария. Реферативный журнал. – 2004. – № 4. – С. 1333.
56. Царукаева Д. В., Дулаев А. В., Никулина А. А. [и др.] / Иммуносупрессивные свойства вируса инфекционной бурсальной болезни // Известия Горского государственного аграрного университета. – 2012. – Т. 49. – № 4. – С. 152-155.
57. Abdel-Alim G., Awaad M. H. H., Saif Y. M. Characterization of Egyptian field strains of infectious bursal disease virus. // Avian diseases. 2003. № 4 (47). С. 1452–1457.
58. Abdul R. [и др.]. Persistence and tissue distribution of infectious bursal disease virus in experimentally infected SPF and commercial broiler chickens. // Avian diseases. 2013. № 4 (57). С. 759–766.
59. Abed M. [и др.]. Infectious bursal disease virus in Algeria: Detection of highly pathogenic reassortant viruses. // Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases. 2018. (60). С. 48–57.
60. Abou El-Fetouh M. S. [и др.]. Comparative bursal cytokine gene expression and apoptosis in vaccinated chickens following virulent infectious bursal disease virus challenge. // Virology. 2021. (558). С. 126–133.
61. Abou El-Fetouh M. S., Abdallah F. M. Genetic characterization of Infectious Bursal Disease Viruses isolated from the vaccinated broiler chicken flocks in Egypt during 2015-2016. // Polish journal of veterinary sciences. 2018. № 3 (21). С. 581–588.
62. Ahmed Z. [и др.]. Comparative Immune Response Pattern of Commercial Infectious Bursal Disease Vaccines Against Field Isolates in Pakistan // International Journal of Poultry Science. 2003. (2). С. 449–453.

63. Ahmed Z., Akhter S. Role of maternal antibodies in protection against infectious bursal disease in commercial broilers // *Int. J. Poult. Sci.* 2003. № 4 (2). С. 251–255.
64. Aida V. [и др.]. Novel Vaccine Technologies in Veterinary Medicine: A Herald to Human Medicine Vaccines. // *Frontiers in veterinary science.* 2021. (8). С. 654289.
65. Aihara N. [и др.]. Immunoreactivity and morphological changes of bursal follicles in chickens infected with vaccine or wild-type strains of the infectious bursal disease virus. // *The Journal of veterinary medical science.* 2015. № 8 (77). С. 913–918.
66. Ali Khan R. S. [и др.]. Phylogenetic analysis of Infectious Bursal Disease viruses according to newly proposed model of classification into geno-groups. // *Journal of infection and public health.* 2019. № 3 (12). С. 410–418.
67. Alkie T. N., Rautenschlein S. Infectious bursal disease virus in poultry: current status and future prospects. // *Veterinary medicine (Auckland, N.Z.).* 2016. (7). С. 9–18.
68. Allan W. H., Faragher J. T., Cullen G. A. Immunosuppression by the infectious bursal agent in chickens immunised against Newcastle disease. // *The Veterinary record.* 1972. № 18 (90). С. 511–512.
69. Amer M. [и др.]. The efficacy of live infectious bursal disease vaccines in commercial 10 days old chicks. // *Journal of Veterinary Medical Research.* 2008. (18). С. 23–33.
70. Armstrong L. D., Tabel H., Riddell C. Subclinical infectious bursal disease in commercial broiler flocks in Saskatchewan. // *Canadian journal of comparative medicine : Revue canadienne de medecine comparee.* 1981. № 1 (45). С. 26–33.
71. Babiuk L. A., Gomis S., Hecker R. Molecular approaches to disease control // *Poultry Science.* 2003. № 6 (82). С. 870–875.
72. Bar-Shira E., Sklan D., Friedman A. Establishment of immune competence in the avian GALT during the immediate post-hatch period. // *Developmental and comparative immunology.* 2003. № 2 (27). С. 147–157.
73. Barbour E. K. [и др.]. National surveillance of poultry diseases in Lebanon. // *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics).* 1997. № 3 (16). С. 770–775.

74. Berg T. P. van den [и др.]. Infectious bursal disease (Gumboro disease). // *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)*. 2000. № 2 (19). С. 509–543.
75. Berghman L. R. Immune responses to improving welfare // *Poultry Science*. 2016. № 9 (95). С. 2216–2218.
76. Block H. [и др.]. A field study on the significance of vaccination against infectious bursal disease virus (IBDV) at the optimal time point in broiler flocks with maternally derived IBDV antibodies. // *Avian pathology : journal of the W.V.P.A.* 2007. № 5 (36). С. 401–409.
77. Boudaoud A. [и др.]. Virus mutations and their impact on vaccination against infectious bursal disease (Gumboro disease). // *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)*. 2016. № 3 (35). С. 875–897.
78. Brisse M. [и др.]. Emerging Concepts and Technologies in Vaccine Development. // *Frontiers in immunology*. 2020. (11). С. 583077.
79. Broom L. J., Kogut M. H. The role of the gut microbiome in shaping the immune system of chickens // *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 2018. (204). С. 44–51.
80. Broto L. [и др.]. Type I Interferon acts as a major barrier to the establishment of infectious bursal disease virus (IBDV) persistent infections. // *Journal of virology*. 2020. № 5 (95).
81. Broto L. [и др.]. Type I Interferon Acts as a Major Barrier to the Establishment of Persistent Infectious Bursal Disease Virus Infections // *Journal of Virology*. 2021. № 5 (95). С. e02017-20.
82. 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). С. S81-4.
83. Busnadiego I. [и др.]. The infectious bursal disease virus RNA-binding VP3 polypeptide inhibits PKR-mediated apoptosis. // *PloS one*. 2012. № 10 (7). С. e46768.

84. Byrne K. A., Loving C. L., McGill J. L. Innate Immunomodulation in Food Animals: Evidence for Trained Immunity? // *Frontiers in Immunology*. 2020. (11). C. 1099.
85. Carballada J. M. [и др.]. Infectious Bursal Disease Virus non-structural protein VP5 is not a transmembrane protein. // *Virology*. 2015. (483). C. 312–317.
86. Carlander D., Stålberg J., Larsson A. Chicken Antibodies // *Upsala Journal of Medical Sciences*. 2010. № 3 (104).
87. Chambers M. A., Graham S. P., Ragione R. M. La Challenges in Veterinary Vaccine Development and Immunization. // *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.). 2016. (1404). C. 3–35.
88. Chettle N., Stuart J. C., Wyeth P. J. Outbreak of virulent infectious bursal disease in East Anglia. // *The Veterinary record*. 1989. № 10 (125). C. 271–272.
89. Cho Y., Edgar S. A. Characterization of infectious bursal disease. // *Poultry science*. 1972. № 1 (51). C. 60–69.
90. Chung E. L. T. [и др.]. Do different vaccination regimes affect the growth performance, immune status, carcass characteristics and meat quality of broilers? // *British poultry science*. 2021. № 1 (62). C. 32–37.
91. Corley M. M., Giambrone J. J., Dormitorio T. V Detection of infectious bursal disease vaccine viruses in lymphoid tissues after in ovo vaccination of specific-pathogen-free embryos. // *Avian diseases*. 2001. № 4 (45). C. 897–905.
92. Corley M. M., Giambrone J. J., Dormitorio T. V Evaluation of the immune response and detection of infectious bursal disease viruses by reverse transcriptase-polymerase chain reaction and enzyme-linked immunosorbent assay after in ovo vaccination of commercial broilers. // *Avian diseases*. 2002. № 4 (46). C. 803–809.
93. Cortey M. [и др.]. Phylogeographic distribution of very virulent infectious bursal disease virus isolates in the Iberian Peninsula. // *Avian pathology: journal of the W.V.P.A.* 2012. № 3 (41). C. 277–284.
94. Dar M. A. [и др.]. Gene expression and antibody response in chicken against *Salmonella Typhimurium* challenge // *Poultry Science*. 2019. № 5 (98). C. 2008–2013.

95. Davison T. F. The immunologists' debt to the chicken // *British Poultry Science*. 2003. № 1 (44). С. 6–21.
96. Dietert R. R., Golemboski K. A. Avian macrophage metabolism // *Poultry Science*. 1998. № 7 (77). С. 990–997.
97. Dobner M. [и др.]. Genotype-associated differences in bursal recovery after infectious bursal disease virus (IBDV) inoculation. // *Veterinary immunology and immunopathology*. 2020. (220). С. 109993.
98. Dohms J. E., Metz A. Stress — mechanisms of immunosuppression // *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 1991. № 1 (30). С. 89–109.
99. Dormitorio T. V [и др.]. Molecular and phenotypic characterization of infectious bursal disease virus isolates. // *Avian diseases*. 2007. № 2 (51). С. 597–600.
100. Douarin N. M. Le, Dieterlen-Lièvre F., Oliver P. D. Ontogeny of primary lymphoid organs and lymphoid stem cells. // *The American journal of anatomy*. 1984. № 3 (170). С. 261–299.
101. Drissi Touzani C. [и др.]. Molecular characterization and phylogenetic analysis of very virulent infectious bursal disease virus circulating in Morocco during 2016-2017. // *Archives of virology*. 2019. № 2 (164). С. 381–390.
102. Dulwich K. L. [и др.]. Differential gene expression in chicken primary B cells infected ex vivo with attenuated and very virulent strains of infectious bursal disease virus (IBDV). // *The Journal of general virology*. 2017. № 12 (98). С. 2918–2930.
103. Durairaj V. [и др.]. An in vivo experimental model to determine antigenic variations among infectious bursal disease viruses. // *Avian pathology : journal of the W.V.P.A.* 2013. № 4 (42). С. 309–315.
104. Edgar S. A., Cho Y. The epizootiology of infectious bursal disease and prevention of it by immunization. // *Developments in biological standardization*. 1976. (33). С. 349–356.
105. El-Aried T. A. [и др.]. Infectious Bursal Disease Virus: Molecular Epidemiologic Perspectives and Impact on Vaccine Efficacy Against Avian Influenza and Newcastle Disease Viruses. // *Avian diseases*. 2019. № 4 (63). С. 606–618.

106. Elankumaran S., Heckert R. A., Moura L. Pathogenesis and tissue distribution of a variant strain of infectious bursal disease virus in commercial broiler chickens. // *Avian diseases*. 2002. № 1 (46). С. 169–176.
107. Erf G. F. Cell-mediated immunity in poultry // *Poultry Science*. 2004. № 4 (83). С. 580–590.
108. Espeseth D. A., Lasher H. History of regulatory requirements for poultry biologics in the United States, 1970s to 1990s. // *Avian diseases*. 2013. № 2 (57). С. 167–171.
109. Fahey K. J., Crooks J. K., Fraser R. A. Assessment by ELISA of passively acquired protection against infectious bursal disease virus in chickens. // *Australian veterinary journal*. 1987. № 7 (64). С. 203–207.
110. Fan L. [и др.]. Novel variants of infectious bursal disease virus can severely damage the bursa of fabricius of immunized chickens. // *Veterinary microbiology*. 2020. (240). С. 108507.
111. Farhanah M. I. [и др.]. Bursal immunopathology responses of specific-pathogen-free chickens and red jungle fowl infected with very virulent infectious bursal disease virus. // *Archives of virology*. 2018. № 8 (163). С. 2085–2097.
112. Felice V. [и др.]. Genome sequence analysis of a distinctive Italian infectious bursal disease virus. // *Poultry science*. 2017. № 12 (96). С. 4370–4377.
113. Feng X. [и др.]. Characterization and pathogenicity of a naturally reassortant and recombinant infectious bursal disease virus in China. // *Transboundary and emerging diseases*. 2021.
114. Feng Z.-Q. [и др.]. Expression pattern of genes of RLR-mediated antiviral pathway in different-breed chicken response to Marek's disease virus infection. // *BioMed research international*. 2013. (2013). С. 419256.
115. Ferreira T. B. [и др.]. Use of adenoviral vectors as veterinary vaccines. // *Gene therapy*. 2005. № Suppl 1 (12 Suppl 1). С. S73-83.
116. Ferrero D. [и др.]. Infectious Bursal Disease Virus VP3 Upregulates VP1-Mediated RNA-Dependent RNA Replication. // *Journal of virology*. 2015. № 21 (89). С. 11165–11168.

117. Fraga A. P. de [и др.]. Phylodynamic analyses of Brazilian antigenic variants of infectious bursal disease virus. // *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*. 2019. (73). С. 159–166.
118. Funk P. E., Thompson C. B. Current concepts in chicken B cell development. // *Current topics in microbiology and immunology*. 1996. (212). С. 17–28.
119. Ganguly B., Rastogi S. K. Structural and functional modeling of viral protein 5 of Infectious Bursal Disease Virus. // *Virus research*. 2018. (247). С. 55–60.
120. García C. [и др.]. Monitoring serologic response to single in ovo vaccination with an immune complex vaccine against infectious bursal disease in broilers. // *Poultry science*. 2021. № 4 (100). С. 100999.
121. Gelb J. J. [и др.]. Characterization of infectious bursal disease viruses isolated in 2007 from Delmarva commercial broiler chickens. // *Avian diseases*. 2012. № 1 (56). С. 82–89.
122. Gonmei G. [и др.]. Studies on immune response to Newcastle disease virus in broiler chickens fed with *Lactobacillus reuteri* PIA16 isolated from the gut of indigenous chicken of Assam, India. // *Veterinary world*. 2019. № 8 (12). С. 1251–1255.
123. Haddad E. E. [и др.]. Efficacy of a novel infectious bursal disease virus immune complex vaccine in broiler chickens. // *Avian diseases*. 1997. № 4 (41). С. 882–889.
124. Hamoud M. M., Villegas P., Williams S. M. Detection of infectious bursal disease virus from formalin-fixed paraffin-embedded tissue by immunohistochemistry and real-time reverse transcription-polymerase chain reaction. // *Journal of veterinary diagnostic investigation : official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc*. 2007. № 1 (19). С. 35–42.
125. Harkness J. W. [и др.]. Infectious bursal disease agent: morphology by negative stain electron microscopy. // *Archives of virology*. 1975. № 1 (48). С. 63–73.
126. Hiraga M. [и др.]. Pathogenesis of highly virulent infectious bursal disease virus infection in intact and bursectomized chickens. // *The Journal of veterinary medical science*. 1994. № 6 (56). С. 1057–1063.
127. Hitchner S. B. History of biological control of poultry diseases in the USA. // *Avian diseases*. 2004. № 1 (48). С. 1–8.

128. Hoelzer K. [и др.]. Vaccines as alternatives to antibiotics for food producing animals. Part 2: new approaches and potential solutions. // *Veterinary research*. 2018. № 1 (49). С. 70.
129. Howie R. I., Thorsen J. Identification of a strain of infectious bursal disease virus isolated from mosquitoes. // *Canadian journal of comparative medicine : Revue canadienne de medecine comparee*. 1981. № 3 (45). С. 315–320.
130. Hu Y. C. [и др.]. Chimeric infectious bursal disease virus-like particles expressed in insect cells and purified by immobilized metal affinity chromatography. // *Biotechnology and bioengineering*. 1999. № 6 (63). С. 721–729.
131. Huang X. [и др.]. Genome-wide analysis of differentially expressed mRNAs, lncRNAs, and circRNAs in chicken bursae of Fabricius during infection with very virulent infectious bursal disease virus. // *BMC genomics*. 2020. № 1 (21). С. 724.
132. Hulten M. C. W. van [и др.]. Efficacy of a turkey herpesvirus double construct vaccine (HVT-ND-IBD) against challenge with different strains of Newcastle disease, infectious bursal disease and Marek's disease viruses. // *Avian pathology : journal of the W.V.P.A.* 2021. № 1 (50). С. 18–30.
133. Hussain A. [и др.]. Pathogenic Characterization and Full Length Genome Sequence of a Reassortant Infectious Bursal Disease Virus Newly Isolated in Pakistan. // *Virologica Sinica*. 2019. Т. 34. № 1. С. 102–105.
134. Hussein E. A. [и др.]. Infectious bursal disease virus tissue tropism and pathogenesis of the infection in chickens by application of in situ PCR, immunoperoxase and HE staining. // *Microbial pathogenesis*. 2019. (129). С. 195–205.
135. Islam M. R. [и др.]. A unified genotypic classification of infectious bursal disease virus based on both genome segments. // *Avian pathology : journal of the W.V.P.A.* 2021. № 2 (50). С. 190–206.
136. Ismail N. M., Fadly A. M., Chang T. S. Effect of bursal cell number on the pathogenesis of infectious bursal disease in chickens. // *Avian diseases*. 1987. № 3 (31). С. 546–555.
137. Iván J. [и др.]. Delayed vaccine virus replication in chickens vaccinated subcutaneously with an immune complex infectious bursal disease vaccine:

quantification of vaccine virus by real-time polymerase chain reaction. // Canadian journal of veterinary research = Revue canadienne de recherche veterinaire. 2005. № 2 (69). C. 135–142.

138. Jackwood D. J. Recent trends in the molecular diagnosis of infectious bursal disease viruses. // Animal health research reviews. 2004. № 2 (5). C. 313–316.

139. Jackwood D. J. [и др.]. A proposed nomenclature for infectious bursal disease virus isolates. // Avian pathology : journal of the W.V.P.A. 2018. № 6 (47). C. 576–584.

140. Jackwood D. J., Sommer-Wagner S. E. Molecular epidemiology of infectious bursal disease viruses: distribution and genetic analysis of newly emerging viruses in the United States. // Avian diseases. 2005. № 2 (49). C. 220–226.

141. Jackwood D. J., Spalding B. D., Sommer S. E. Real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction detection and analysis of nucleotide sequences coding for a neutralizing epitope on infectious bursal disease viruses. // Avian diseases. 2003. № 3 (47). C. 738–744.

142. Jakka P. [и др.]. Evaluation of immune responses by live infectious bursal disease vaccines to avoid vaccination failures. // European journal of microbiology & immunology. 2014. № 2 (4). C. 123–127.

143. Jeon W.-J. [и др.]. Molecular epizootiology of infectious bursal disease (IBD) in Korea. // Virus genes. 2009. № 3 (39). C. 342–351.

144. Jeurissen S. H. [и др.]. The working mechanism of an immune complex vaccine that protects chickens against infectious bursal disease. // Immunology. 1998. № 3 (95). C. 494–500.

145. Juneja S. S. [и др.]. Molecular characterization of field isolates and vaccine strains of infectious bursal disease virus. // Comparative immunology, microbiology and infectious diseases. 2008. № 1 (31). C. 11–23.

146. Kaiser P. Advances in avian immunology—prospects for disease control: a review // Avian Pathology. 2010. № 5 (39). C. 309–324.

147. Kaiser P., Stäheli P. Chapter 10 - Avian Cytokines and Chemokines под ред. K. A. Schat, B. Kaspers, P. Kaiser, Boston: Academic Press, 2014. C. 189–204.

148. Karpala A. J. [и др.]. Ontogeny of the interferon system in chickens // *Journal of Reproductive Immunology*. 2012. № 2 (94). С. 169–174.
149. Khan R. S. A. [и др.]. History of Gumboro (infectious bursal disease) in Pakistan. // *Saudi pharmaceutical journal: SPJ: the official publication of the Saudi Pharmaceutical Society*. 2017. № 4 (25). С. 453–459.
150. Khatri M. [и др.]. Infection and activation of bursal macrophages by virulent infectious bursal disease virus. // *Virus research*. 2005. № 1 (113). С. 44–50.
151. Kibenge F. S., Dhillon A. S., Russell R. G. Biochemistry and immunology of infectious bursal disease virus. // *The Journal of general virology*. 1988. (69 (Pt 8)). С. 1757–1775.
152. Kim T. H., Zhou H. Overexpression of Chicken IRF7 Increased Viral Replication and Programmed Cell Death to the Avian Influenza Virus Infection Through TGF-Beta/FoxO Signaling Axis in DF-1. // *Frontiers in genetics*. 2018. (9). С. 415.
153. Klasing K. C. Avian macrophages: regulators of local and systemic immune responses // *Poultry Science*. 1998. № 7 (77). С. 983–989.
154. Klasing K. C. Avian Leukocytic Cytokines // *Poultry Science*. 1994. № 7 (73). С. 1035–1043.
155. Koch G. [The immune system in poultry]. // *Tijdschrift voor diergeneeskunde*. 1991. № 14 (116). С. 728–734.
156. Kogut M. H. [и др.]. Inflammatory phenotypes in the intestine of poultry: not all inflammation is created equal // *Poultry Science*. 2018. № 7 (97). С. 2339–2346.
157. Kogut M. H., Lee A., Santin E. Microbiome and pathogen interaction with the immune system // *Poultry Science*. 2020. № 4 (99). С. 1906–1913.
158. 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.
159. Kumar S. DNA vaccine against infectious bursal disease virus: still more to explore. // *Veterinary microbiology*. 2015. Т. 175. № 2–4. С. 389–390.

160. Kurukulsuriya S. [и др.]. Circulating strains of variant infectious bursal disease virus may pose a challenge for antibiotic-free chicken farming in Canada. // *Research in veterinary science*. 2016. (108). С. 54–59.
161. Lasher H. N., Davis V. S. History of infectious bursal disease in the U.S.A.--the first two decades. // *Avian diseases*. 1997. № 1 (41). С. 11–19.
162. Lee H.-J. [и др.]. Efficient self-assembly and protective efficacy of infectious bursal disease virus-like particles by a recombinant baculovirus co-expressing precursor polyprotein and VP4. // *Virology journal*. 2015. (12). С. 177.
163. Lemiere S. [и др.]. Concomitant turkey herpesvirus-infectious bursal disease vector vaccine and oil-adjuvanted inactivated Newcastle disease vaccine administration: consequences for vaccine intake and protection. // *Avian diseases*. 2011. № 4 (55). С. 642–649.
164. Li J. [и др.]. Enhancement of the immunogenicity of DNA vaccine against infectious bursal disease virus by co-delivery with plasmid encoding chicken interleukin 2. // *Virology*. 2004. № 329 (1). С. 89-100.
165. Li J., Zheng S. J. Role of MicroRNAs in Host Defense against Infectious Bursal Disease Virus (IBDV) Infection: A Hidden Front Line // *Viruses*. 2020. № 5 (12).
166. Li K. [и др.]. Protective efficacy of a novel recombinant Marek's disease virus vector vaccine against infectious bursal disease in chickens with or without maternal antibodies. // *Veterinary immunology and immunopathology*. 2017. (186). С. 55–59.
167. Li Y. [и др.]. Effect of infectious bursal disease virus infection on energy metabolism in embryonic chicken livers. // *British poultry science*. 2019. № 6 (60). С. 729–735.
168. Lillehoj H. S. Lymphocytes Involved in Cell-Mediated Immune Responses and Methods to Assess Cell-Mediated Immunity // *Poultry Science*. 1991. № 5 (70). С. 1154–1164.
169. Lillehoj H. S., Trout J. M. Avian gut-associated lymphoid tissues and intestinal immune responses to *Eimeria* parasites // *Clinical Microbiology Reviews*. 1996. № 3 (9). С. 349–360.

170. Liu H. [и др.]. Comparison of the expression of cytokine genes in the bursal tissues of the chickens following challenge with infectious bursal disease viruses of varying virulence. // *Virology journal*. 2010. (7). С. 364.
171. Liu M., Vakharia V. N. VP1 protein of infectious bursal disease virus modulates the virulence in vivo. // *Virology*. 2004. № 1 (330). С. 62–73.
172. Lone N. A. [и др.]. Efficacy of live attenuated and inactivated oil emulsion infectious bursal disease virus vaccines in broiler chicks // *Pakistan Veterinary Journal*. 2012. № 4 (32). С. 539–542.
173. Lu Z. [и др.]. Naturally occurring reassortant infectious bursal disease virus in northern China. // *Virus research*. 2015. (203). С. 92–95.
174. Lukert P. D., Saif Y. M., Calnek B. W. Diseases of poultry // 1997.
175. Luo C. [и др.]. Dynamic analysis of expression of chemokine and cytokine gene responses to H5N1 and H9N2 avian influenza viruses in DF-1 cells. // *Microbiology and immunology*. 2018. № 5 (62). С. 327–340.
176. Lupini C. [и др.]. Alteration of immunological parameters in infectious bronchitis vaccinated-specific pathogen-free broilers after the use of different infectious bursal disease vaccines. // *Poultry science*. 2020. № 9 (99). С. 4351–4359.
177. Luque D. [и др.]. Infectious bursal disease virus is an icosahedral polyploid dsRNA virus. // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2009. № 7 (106). С. 2148–2152.
178. Mahgoub H. A., Bailey M., Kaiser P. An overview of infectious bursal disease. // *Archives of virology*. 2012. № 11 (157). С. 2047–2057.
179. Maity H. K. [и др.]. Protective efficacy of a DNA vaccine construct encoding the VP2 gene of infectious bursal disease and a truncated HSP70 of *Mycobacterium tuberculosis* in chickens. // *Vaccine*. 2015. № 8 (33). С. 1033–1039.
180. Mandeville W. F., Cook F. K., Jackwood D. J. Heat lability of five strains of infectious bursal disease virus. // *Poultry science*. 2000. № 6 (79). С. 838–842.
181. Martin Caballero J. [и др.]. Chimeric infectious bursal disease virus-like particles as potent vaccines for eradication of established HPV-16 E7-dependent tumors. // *PloS one*. 2012. № 12 (7). С. e52976.

182. MASTELLER E. L., THOMPSON C. B. B Cell Development in the Chicken // Poultry Science. 1994. № 7 (73). С. 998–1011.
183. Mató T. [и др.]. Occurrence and spread of a reassortant very virulent genotype of infectious bursal disease virus with altered VP2 amino acid profile and pathogenicity in some European countries. // Veterinary microbiology. 2020. (245). С. 108663.
184. Mayah I. M. D. Al, Mayah A. A. S. Al Antibody response of broiler chickens against eight commercial infectious bursal disease live vaccines tested by ELISA // Mirror of Research in Veterinary Sciences and Animals. 2013. № 2 (2). С. 1–7.
185. McCormack W. T., Thompson C. B. Special features of the development of the chicken humoral immune system // Research in Immunology. 1993. № 6 (144). С. 467–475.
186. Mekuriaw A. [и др.]. Infectious bursal disease: outbreak investigation, molecular characterization, and vaccine immunogenicity trial in Ethiopia. // Tropical animal health and production. 2017. № 6 (49). С. 1295–1302.
187. Méndez F. [и др.]. Infectious bursal disease virus VP5 polypeptide: a phosphoinositide-binding protein required for efficient cell-to-cell virus dissemination. // PloS one. 2015. № 4 (10). С. e0123470.
188. Michel L. O., Kimber M. L., Jackwood D. J. New introduction of a very virulent infectious bursal disease virus in New York, USA. // Avian pathology : journal of the W.V.P.A. 2019. № 5 (48). С. 486–491.
189. Molini U. [и др.]. Molecular characterisation of infectious bursal disease virus in Namibia, 2017. // The Onderstepoort journal of veterinary research. 2019. № 1 (86). С. e1–e6.
190. Morla S., Deka P., Kumar S. Isolation of novel variants of infectious bursal disease virus from different outbreaks in Northeast India. // Microbial pathogenesis. 2016. (93). С. 131–136.
191. Mosad S. M. [и др.]. Molecular characterization and pathogenicity of very virulent infectious bursal disease virus isolated from naturally infected turkey poults in Egypt. // Tropical animal health and production. 2020. № 6 (52). С. 3819–3831.

192. Moulin H. R. [и др.]. High interferon type I responses in the lung, plasma and spleen during highly pathogenic H5N1 infection of chicken // *Veterinary Research*. 2011. № 1 (42). С. 6.
193. Müller H. [Effect of viral structure and replication characteristics on the pathogenesis of infectious bursal disease]. // *Berliner und Munchener tierärztliche Wochenschrift*. 1991. № 4 (104). С. 113–117.
194. Müller H. [и др.]. Infectious bursal disease of poultry: antigenic structure of the virus and control. // *Veterinary microbiology*. 1992. № 1–4 (33). С. 175–183.
195. Müller H. [и др.]. Current status of vaccines against infectious bursal disease. // *Avian pathology : journal of the W.V.P.A.* 2012. № 2 (41). С. 133–139.
196. Nagarajan M. M., Kibenge F. S. Infectious bursal disease virus: a review of molecular basis for variations in antigenicity and virulence. // *Canadian journal of veterinary research = Revue canadienne de recherche veterinaire*. 1997. № 2 (61). С. 81–88.
197. Negash T., Liman M., Rautenschlein S. Mucosal application of cationic poly(D,L-lactide-co-glycolide) microparticles as carriers of DNA vaccine and adjuvants to protect chickens against infectious bursal disease. // *Vaccine*. 2013. № 36 (31). С. 3656–3662.
198. Nimmanapalli R., Gupta V. Vaccines the tugboat for prevention-based animal production. // *Genomics and Biotechnological Advances in Veterinary, Poultry, and Fisheries*. 2020. С. 469–504.
199. Ogawa M. [и др.]. Seroprevalence of infectious bursal disease virus in free-living wild birds in Japan. // *The Journal of veterinary medical science*. 1998. № 11 (60). С. 1277–1279.
200. Ojkic D. [и др.]. Genotyping of Canadian field strains of infectious bursal disease virus. // *Avian pathology : journal of the W.V.P.A.* 2007. № 5 (36). С. 427–433.
201. Okura T. [и др.]. Efficacy of a novel in ovo-attenuated live vaccine and recombinant vaccine against a very virulent infectious bursal disease virus in chickens. // *The Journal of veterinary medical science*. 2021. № 11 (83). С. 1686–1693.

202. Ou C. [и др.]. Pro-apoptosis effects of protocatechuic acid in the early stage of infectious bursal disease virus infection. // *Microbial pathogenesis*. 2018. (124). С. 216–222.
203. Pantin-Jackwood M. J., Brown T. P. Infectious bursal disease virus and proventriculitis in broiler chickens. // *Avian diseases*. 2003. № 3 (47). С. 681–690.
204. Park M. J., Park J. H., Kwon H. M. Mice as potential carriers of infectious bursal disease virus in chickens. // *Veterinary journal (London, England : 1997)*. 2010. № 3 (183). С. 352–354.
205. Pattison M. [и др.]. *Poultry diseases* / M. Pattison, P. McMullin, J. M. Bradbury, D. Alexander, Elsevier Health Sciences, 2007.
206. Phatak R. K. Vaccination failures and their solutions // *Italian Journal of Animal Science*. 2002. (2). С. 157–162.
207. Pikuła A. [и др.]. Identification and assessment of virulence of a natural reassortant of infectious bursal disease virus. // *Veterinary research*. 2018. № 1 (49). С. 89.
208. Prabhu S. N. [и др.]. A Comparative Study of Pathology and Host Immune Response Induced by Very Virulent Infectious Bursal Disease Virus in Experimentally Infected Chickens of Aseel and White Leghorn Breeds. // *Vaccines*. 2020. № 4 (8).
209. Prandini F. [и др.]. Comparison of infectious bursal disease live vaccines and a HVT-IBD vector vaccine and their effects on the immune system of commercial layer pullets. // *Avian pathology : journal of the W.V.P.A.* 2016. № 1 (45). С. 114–125.
210. Qi X., Gao L., Wang X. [Naturally occurring reassortants of infectious bursal disease virus - A review]. // *Wei sheng wu xue bao = Acta microbiologica Sinica*. 2016. № 5 (56). С. 740–746.
211. Qin Y., Zheng S. J. Infectious Bursal Disease Virus-Host Interactions: Multifunctional Viral Proteins that Perform Multiple and Differing Jobs. // *International journal of molecular sciences*. 2017. № 1 (18).
212. Qureshi M. A., Hussain I., Heggen C. L. Understanding immunology in disease development and control // *Poultry Science*. 1998. № 8 (77). С. 1126–1129.
213. Rahman M. A. [и др.]. Epidemiological assessment of clinical poultry cases through the government veterinary hospital-based passive surveillance system in

- Bangladesh: a case study. // *Tropical animal health and production*. 2019. № 4 (51). C. 967–975.
214. Raj G. D. [и др.]. Rocket immunoelectrophoresis in the diagnosis of infectious bursal disease. // *Tropical animal health and production*. 2000. № 3 (32). C. 173–178.
215. Rani S., Kumar S. Evaluation of infectious bursal disease virus stability at different conditions of temperature and pH. // *Biologicals : journal of the International Association of Biological Standardization*. 2015. № 6 (43). C. 515–518.
216. Rao A. S. [и др.]. Persistence of maternal antibodies against Newcastle disease virus in chicks from immune parents and its effect on vaccination // *Indian Journal of Comparative Microbiology and Immunology Infectious Diseases*. 1987. (8). C. 105–110.
217. Rauw F., Lambrecht B., Berg T. van den Pivotal role of ChIFN γ in the pathogenesis and immunosuppression of infectious bursal disease. // *Avian pathology : journal of the W.V.P.A.* 2007. № 5 (36). C. 367–374.
218. Ray S. M., Ashash U., Muthukumar S. A field study on the evaluation of day-of-hatch and in grow-out application of live infectious bursal disease virus vaccine in broiler chickens. // *Poultry science*. 2021. № 8 (100). C. 101252.
219. Ribatti D., Tamma R., Elieh Ali Komi D. The morphological basis of the development of the chick embryo immune system // *Experimental Cell Research*. 2019. № 2 (381). C. 323–329.
220. Rong J. [и др.]. Large-scale manufacture and use of recombinant VP2 vaccine against infectious bursal disease in chickens. // *Vaccine*. 2007. № 46 (25). C. 7900–7908.
221. Rosales A. G. [и др.]. Isolation, identification, and pathogenicity of two field strains of infectious bursal disease virus. // *Avian diseases*. 1989. № 1 (33). C. 35–41.
222. Sá e Silva M., Rissi D. R., Swayne D. E. Very Virulent Infectious Bursal Disease Virus Produces More-Severe Disease and Lesions in Specific-Pathogen-Free (SPF) Leghorns Than in SPF Broiler Chickens. // *Avian diseases*. 2016. № 1 (60). C. 63–66.
223. Sahar M. O., Ali A. S., Mahasin E. Residual pathogenic effects of infectious bursal disease vaccines containing intermediate and hot strains of the virus in broiler chickens // *International Journal of Poultry Science*. 2004. № 6 (3). C. 415–418.

224. Saif Y. M., Fletcher O. Pathotyping of IBDV. // *Avian diseases*. 2020. № 3 (64). С. 241–242.
225. Schat K. A. [и др.]. Immune complex vaccines for chicken infectious anemia virus. // *Avian diseases*. 2011. № 1 (55). С. 90–96.
226. Sedeik M. E. [и др.]. Comparative Evaluation of HVT-IBD Vector, Immune Complex, and Live IBD Vaccines against vvIBDV in Commercial Broiler Chickens with High Maternally Derived Antibodies. // *Animals : an open access journal from MDPI*. 2019. № 3 (9).
227. Sharma J. M. The structure and function of the avian immune system. // *Acta veterinaria Hungarica*. 1997. № 3 (45). С. 229–238.
228. Sharma J. M. [и др.]. Infectious bursal disease virus of chickens: pathogenesis and immunosuppression. // *Developmental and comparative immunology*. 2000. № 2–3 (24). С. 223–235.
229. Silva F. M. F. [и др.]. Tracking the molecular epidemiology of Brazilian Infectious bursal disease virus (IBDV) isolates. // *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*. 2013. (13). С. 18–26.
230. Singh J. [и др.]. Histopathological and immunohistochemical diagnosis of infectious bursal disease in poultry birds. // *Veterinary world*. 2015. № 11 (8). С. 1331–1339.
231. Soubies S. M. [и др.]. Identification of a European interserotypic reassortant strain of infectious bursal disease virus. // *Avian pathology : journal of the W.V.P.A.* 2017. № 1 (46). С. 19–27.
232. Spackman E., Stephens C. B., Pantin-Jackwood M. J. The Effect of Infectious Bursal Disease Virus-Induced Immunosuppression on Vaccination Against Highly Pathogenic Avian Influenza Virus. // *Avian diseases*. 2018. № 1 (62). С. 36–44.
233. Stoute S. T. [и др.]. Molecular epidemiology of endemic and very virulent infectious bursal disease virus genogroups in backyard chickens in California, 2009–2017. // *Journal of veterinary diagnostic investigation : official publication of the*

American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc. 2019. № 3 (31). С. 371–377.

234. Suzuki K. [и др.]. Simulation models for estimating optimal vaccination timing for infectious bursal disease in broiler chickens in Paraguay // *International Journal of Poultry Science*. 2009. (8).

235. Tammiranta N. [и др.]. Circulation of very virulent avian infectious bursal disease virus in Finland. // *Avian pathology : journal of the W.V.P.A.* 2018. № 5 (47). С. 520–525.

236. Tanaka T., Narazaki M., Kishimoto T. IL-6 in inflammation, immunity, and disease. // *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 2014. № 10 (6). С. a016295.

237. Tang X. [и др.]. Transgenic *Eimeria tenella* Expressing Profilin of *Eimeria maxima* Elicits Enhanced Protective Immunity and Alters Gut Microbiome of Chickens. // *Infection and immunity*. 2018. № 9 (86).

238. Tarabees R. [и др.]. Effects of the Probiotic Candidate *E. faecalis*-1, the Poulvac *E. coli* Vaccine, and their Combination on Growth Performance, Caecal Microbial Composition, Immune Response, and Protection against *E. coli* O78 Challenge in Broiler Chickens. // *Probiotics and antimicrobial proteins*. 2020. № 3 (12). С. 860–872.

239. Techera C. [и др.]. Development of real-time PCR assays for single and simultaneous detection of infectious bursal disease virus and chicken anemia virus. // *Molecular and cellular probes*. 2019. (43). С. 58–63.

240. Thai T. N. [и др.]. Characterization of antigenic variant infectious bursal disease virus strains identified in South Korea. // *Avian pathology : journal of the W.V.P.A.* 2021. № 2 (50). С. 174–181.

241. Thomrongsuwannakij T., Charoenvisal N., Chansiripornchai N. Comparison of two attenuated infectious bursal disease vaccine strains focused on safety and antibody response in commercial broilers. // *Veterinary world*. 2021. № 1 (14). С. 70–77.

242. Tomás G. [и др.]. Development of an RT-qPCR assay for the specific detection of a distinct genetic lineage of the infectious bursal disease virus. // *Avian pathology : journal of the W.V.P.A.* 2017. № 2 (46). С. 150–156.

243. Tomás G. [и др.]. Origin and global spreading of an ancestral lineage of the infectious bursal disease virus. // *Transboundary and emerging diseases*. 2020. № 3 (67). С. 1198–1212.
244. Toro H. [и др.]. Pathogenicity of infectious bursal disease virus variant AL2 in young chickens. // *Avian diseases*. 2009. № 1 (53). С. 78–82.
245. Vera F. [и др.]. Molecular characterization of infectious bursal disease virus (IBDV) isolated in Argentina indicates a regional lineage. // *Archives of virology*. 2015. № 8 (160). С. 1909–1921.
246. Villegas P. [и др.]. Infectious bursal disease subunit vaccination. // *Avian diseases*. 2008. № 4 (52). С. 670–674.
247. Wang H. [и др.]. Fused IgY Fc and Polysaccharide Adjuvant Enhanced the Immune Effect of the Recombinant VP2 and VP5 Subunits-A Prospect for Improvement of Infectious Bursal Disease Virus Subunit Vaccine. // *Frontiers in microbiology*. 2017. (8). С. 2258.
248. Wang Q. [и др.]. Identification and assessment of pathogenicity of a naturally reassorted infectious bursal disease virus from Henan, China. // *Poultry science*. 2019. № 12 (98). С. 6433–6444.
249. Wang X. [и др.]. Efficacy of DNA vaccines against infectious bursal disease virus in chickens enhanced by coadministration with CpG oligodeoxynucleotide. // *Avian diseases*. 2003. № 4 (47). С. 1305–1312.
250. Wang Y. [и др.]. Naturally occurring cell-adapted classic strain of infectious bursal disease virus. // *Veterinary microbiology*. 2020. (243). С. 108620.
251. Wang Y. [и др.]. Development of a Viral-Like Particle Candidate Vaccine Against Novel Variant Infectious Bursal Disease Virus. // *Vaccines*. 2021. № 2 (9).
252. Wang Y. [и др.]. Chicken interferon regulatory factor 7 (IRF7) can control ALV-J virus infection by triggering type I interferon production through affecting genes related with innate immune signaling pathway. // *Developmental and comparative immunology*. 2021. (119). С. 104026.
253. Wei Y. [и др.]. Genetic reassortment of infectious bursal disease virus in nature. // *Biochemical and biophysical research communications*. 2006. № 2 (350). С. 277–287.

254. Wei Y. [и др.]. Reassortant infectious bursal disease virus isolated in China. // *Virus research*. 2008. № 2 (131). С. 279–282.
255. Williams A. E., Davison T. F. Enhanced immunopathology induced by very virulent infectious bursal disease virus. // *Avian pathology : journal of the W.V.P.A.* 2005. № 1 (34). С. 4–14.
256. Wiśniewska J., Stosik M. Serum antibody titre and the first protective vaccination of broiler chickens against Gumboro disease // *Medycyna Weterynaryjna*. 1999. (55). С. 48–51.
257. Wit J. J. de [и др.]. In ovo application of a live infectious bursal disease vaccine to commercial broilers confers proper immunity. // *Avian pathology : journal of the W.V.P.A.* 2021. № 6 (50). С. 531–539.
258. Wu C. C., Rubinelli P., Lin T. L. Molecular detection and differentiation of infectious bursal disease virus. // *Avian diseases*. 2007. № 2 (51). С. 515–526.
259. Wyeth P. J., Chettle N. Comparison of the efficacy of four inactivated infectious bursal disease oil emulsion vaccines. // *The Veterinary record*. 1982. № 15 (110). С. 359–361.
260. Xu A. [и др.]. Phylogenetic analyses and pathogenicity of a variant infectious bursal disease virus strain isolated in China. // *Virus research*. 2020. (276). С. 197833.
261. Yamazaki K. [и др.]. Characterization of variant infectious bursal disease virus from a broiler farm in Japan using immunized sentinel chickens. // *The Journal of veterinary medical science*. 2017. № 1 (79). С. 175–183.
262. Ye C. [и др.]. Inhibition of Antiviral Innate Immunity by Birnavirus VP3 Protein via Blockage of Viral Double-Stranded RNA Binding to the Host Cytoplasmic RNA Detector MDA5 // *Journal of Virology*. 2014. № 19 (88). С. 11154–11165.
263. Yitbarek A. [и др.]. Commensal gut microbiota can modulate adaptive immune responses in chickens vaccinated with whole inactivated avian influenza virus subtype H9N2. // *Vaccine*. 2019. № 44 (37). С. 6640–6647.
264. Zhao Y. [и др.]. Airborne virus sampling: Efficiencies of samplers and their detection limits for infectious bursal disease virus (IBDV). // *Annals of agricultural and environmental medicine : AAEM*. 2014. № 3 (21). С. 464–471.

265. Zmrhal V., Slama P. Current knowledge about interactions between avian dendritic cells and poultry pathogens // *Developmental & Comparative Immunology*. 2020. (104). C. 103565.

ПРИЛОЖЕНИЕ

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(19) **RU** **2 761 566** ⁽¹¹⁾ **C1** ⁽¹³⁾

(51) МПК

[A61K 35/16 \(2015.01\)](#)

[A61K 39/12 \(2006.01\)](#)

[A61K 39/42 \(2006.01\)](#)

[A61P 31/14 \(2006.01\)](#)

(52) СПК

[A61K 35/16 \(2021.08\)](#)

[A61K 39/12 \(2021.08\)](#)

[A61K 39/39516 \(2021.08\)](#)

[A61K 39/42 \(2021.08\)](#)

[A61P 31/14 \(2021.08\)](#)

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

Статус: действует (последнее изменение статуса: 11.12.2021)
Пошлина: Установленный срок для уплаты пошлины за 3 год: с 10.11.2021 по 09.11.2022. При
уплате пошлины за 3 год в дополнительный 6-месячный срок с 10.11.2022 по 09.05.2023
размер пошлины увеличивается на 50%.

(21)(22) Заявка: [2020136884](#), 09.11.2020

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
09.11.2020

Дата регистрации:
10.12.2021

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 09.11.2020

(45) Опубликовано: [10.12.2021](#) Бюл. № 34

(56) Список документов, цитированных в отчете о
поиске: US 5397568 A, 14.03.1995. SU
1668392 A1, 07.08.1991. RU 2205021 C2,
27.05.2003. RU 2272649 C1, 27.03.2006. IVAN
J. et al. Delayed vaccine virus replication in
chickens vaccinated subcutaneously with an
immune complex infectious bursal disease
vaccine: quantification of vaccine virus by
real-time polymerase chain reaction //
Canadian journal of
veterinary research. - 2005. - Vol. 69. - No. 2. - P.
135-142.

Адрес для переписки:

196084, Санкт-Петербург, ул Черниговская,
5, ФГБОУ ВО СПбГУВМ, Сафонову Ю.К.

(72) Автор(ы):

Джавадов Эдуард Джавадович (RU),
Тарлавин Николай Владимирович (RU),
Вихрева Ирина Николаевна (RU),
Веретенников Владислав Валерьевич (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение высшего
образования Санкт-Петербургский
государственный университет
ветеринарной медицины ФГБОУ ВО
СПбГУВМ (RU)

(54) **Вакцина иммунокомплексная** против инфекционной бурсальной болезни птиц из штамма
"ВНИВИП"

(57) Реферат:

Изобретение относится к области ветеринарии и фармацевтики, а именно к иммунокомплексной вакцине против инфекционной бурсальной болезни птиц из штамма "ВНИВИП", содержащей живой вирус инфекционной бурсальной болезни птиц из штамма "ВНИВИП" с активностью $10^{6,5}$ - $10^{7,0}$ ЭИД₅₀/см³ в смеси с сывороткой крови SPF-кур, содержащей иммуноглобулины G с титром в ИФА 1:10000 – 1:30000. Технический результат заключается в упрощении работы ветеринарного врача на птицефабрике путем отмены необходимости рассчитывать дату вакцинации против инфекционной бурсальной болезни птиц по формулам Девентер. 1 табл., 1 пр.



АКТ

комиссионной апробации иммунокомплексной вакцины против инфекционной бурсальной болезни из штамма «ВНИВИП»

В соответствии с приказом № 211 от 04.09.2018 года комиссией в составе: Козыренко О.В. – заведующей кафедрой эпизоотологии им. В.П. Урбана, доктора ветеринарных наук, профессора, Джавадова Э.Д., – профессора кафедры эпизоотологии им. В.П. Урбана, доктора ветеринарных наук, профессора, Кузьмина В.А. – профессора кафедры эпизоотологии им. В.П. Урбана, доктора ветеринарных наук, профессора, Данко Ю.Ю. - доцента кафедры эпизоотологии им. В.П. Урбана, доктора ветеринарных наук, доцента, Фогеля Л.С., - доцента кафедры эпизоотологии им. В.П. Урбана, кандидата ветеринарных наук, доцента составлен настоящий акт о том, что в период с 01.06.2020 года по 01.11.2020 года проведены комиссионные испытания иммунокомплексной вакцины против инфекционной бурсальной болезни из штамма «ВНИВИП».

На комиссионные испытания были представлены две лабораторные (опытные) серии вакцины, изготовленных: серия №1 – декабрь 2019 года, серия №2 – апрель 2020 года.

В процессе комиссионных испытаний вакцины был проведен контроль внешнего вида вакцины, контроль стерильности и безвредности вакцины, определение антигенной активности вакцины.

Результаты испытаний:

Контроль внешнего вида вакцины.

Вакцина представляет собой однородную жидкость светло-розового цвета, без хлопьев и осадка. Пробные партии вакцины были расфасованы в стерильные пластиковые пробирки объемом 15 мл, по 2 мл вакцины на пробирку. Хранение расфасованной вакцины перед проведением испытаний осуществлялось в пределах температуры -20°C - -80°C . Трещин пробирок, нарушений укупорки, наличия посторонних примесей, изменений цвета либо консистенции обнаружено не было.

Контроль стерильности вакцины.

Определение стерильности 2-х лабораторных серий вакцины проводили по ГОСТ 28085-2013. Из каждого образца иммунокомплексной вакцины против инфекционной бурсальной болезни из штамма «ВНИВИП» производили посев на стерильные питательные среды: МПА, МПБ, МППБ (среда Китт-Тароцци), бульон Сабуро, агар Хейфлика – по три пробирки. Для выявления аэробных микроорганизмов высевали 0,5 см³ посевного материала на пробирку, для выявления анаэробных микроорганизмов - 1 см³. Пробирки с посевами на МПА, МПБ, выдерживали в термостате при (37,0±1)°С в течение 7 суток, на МППБ и агаре Хейфлика – при (37,0±1)°С в течение 14 суток, на среде Сабуро – при (22,5±2,5)°С в течение 7 суток. По истечении указанного срока аналогичным образом выполняли пересев на те же питательные среды, исключая МПА, и инкубировали в течение 7 суток (посевы на МППБ – в течение 14 суток). Одновременно проводили контроль стерильности питательных сред: три пробирки с каждой средой выдерживали в термостате в течение 7 суток при (37,0±0,5)°С, с МППБ в течение 14 суток при (37,0±0,5)°С, со средой Сабуро – при (22,5±2,5)°С. Установлено, что высевы 2-х лабораторных серий вакцины были свободны от контаминации аэробными и анаэробными бактериями, грибами и микоплазмами.

Контроль безвредности вакцины.

Безвредность вакцины проверяли на десяти 40-дневных SPF-курах породы Ломан Уайт введением 10-кратной прививной дозы внутримышечно в грудную мышцу. За птицей вели наблюдение в течение 14 сут. Все куры в течение указанного времени остались живыми, без видимых клинических признаков переболевания и в месте введения вакцины отсутствовали следы воспалительной реакции.

Определение антигенной активности вакцины.

Для исследования антигенной активности использовали 2 группы по 50 голов цыплят кросса Ломан Уайт (опытная и контрольная) и 2 группы по 30 голов цыплят кросса Росс-308 (опытная и контрольная). Иммунокомплексную вакцину вводили в суточном возрасте подкожно в области нижней трети шеи в объеме 0,2 см³. Сыворотку крови получали от всех кур опытной и контрольной групп на 35 сутки после иммунизации для определения специфических антител методом иммуноферментного анализа. Иммуноферментный анализ ставили согласно инструкции к набору The Infectious Bursal Disease Virus Antibody test kit производства компании BioChek на фотометре микропланшетного формата Multiskan FC. Результаты представлены в таблице 1.

Таблица 1. Результаты исследования антител в сыворотке крови цыплят, вакцинированных иммунокомплексной вакциной против инфекционной бурсальной болезни из штамма «ВНИВИП».

Группа	Уровень антител*
	35 сутки
Вакцинированные цыплята кросса Ломан Уайт	514±38
Контрольные цыплята кросса Ломан Уайт	68±11,3
Вакцинированные цыплята кросса Росс-308	47,2±8,7
Контрольные цыплята кросса Росс-308	3240,3±230,4

*- обратные значения титра антител.

Данные, представленные в таблице 1, показывают, что иммунокомплексная вакцина обладает способностью стимулировать выработку вируснейтрализующих антител в организме вакцинированных цыплят.

Предложения.

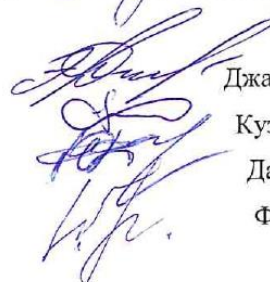
На основании данных полученных в ходе подготовки проект нормативно-технической документации для изготовления, контроля и применения иммунокомплексной вакцины против инфекционной бурсальной болезни из штамма «ВНИВИП» (Технологический регламента, Стандарт организации (СТО) по контролю иммунокомплексной вакцины, Инструкция по применению иммунокомплексной вакцины). Также подготовить документы для подачи заявки на регистрацию иммунокомплексной вакцины против инфекционной бурсальной болезни из штамма «ВНИВИП» в ФГБУ «ВГНКИ».

Председатель комиссии



Козыренко О.В.

Члены комиссии



Джавадов Э.Д.

Кузьмин В.А.

Данко Ю.Ю.

Фогель Л.С.