

## ГЛАВА 3.3.12.

### ИНФЕКЦИОННАЯ БУРСАЛЬНАЯ БОЛЕЗНЬ (БОЛЕЗНЬ ГАМБОРО)

---

#### РЕЗЮМЕ

**Описание болезни:** Вирус инфекционной бурсальной болезни (вирус ИББ, род Avibirnavirus, семейство Birnaviridae) инфицирует кур, индеек, уток, цесарок и страусов, однако клинические признаки проявляются только у кур. Тяжелая форма болезни у 3-6-недельных птиц связана с высокой смертностью, а более легкая или бессимптомная форма болезни типична для птиц более младшего возраста. Вирус инфекционной бурсальной болезни вызывает истощение лимфоидной ткани в бурсе Фабрициуса. Все это может привести к значительному угнетению гуморального ответа антител и, следовательно, возникновению вторичных инфекций. Выделяют 2 серотипа инфекционной бурсальной болезни: серотип 1 и серотип 2. Клиническая болезнь связана только с серотипом 1, и все коммерческие вакцины производятся против этого серотипа. Некоторые антигенные варианты вируса ИББ серотипа 1 требуют использования специальных вакцин для обеспечения максимальной защиты. В настоящее время во всем мире распространены очень вирулентные штаммы серотипа 1, которые вызывают серьезную болезнь.

Клиническую болезнь по причине инфицирования вирусом ИББ, также известную как болезнь Гамборо, обычно диагностируют путем описания характерных признаков и патологоанатомических поражений. Субклиническую инфекцию вирусом ИББ можно подтвердить в лаборатории путем демонстрации ответа гуморального иммунитета не вакцинированных цыплят или путем обнаружения вирусного антигена или вирусного генома в тканях. Помимо данных тестов можно также провести гистологическое исследование бурсы.

**Идентификация агента:** Выделение вируса ИББ, как правило, не является рутинной диагностической процедурой. Для этой цели можно использовать отрицательных на специфические антитела цыплят, а также культуры клеток или яйца с эмбрионами из отрицательных на специфические антитела источников. Однако может возникнуть сложность при использовании последних двух систем, поскольку вирус неохотно к ним адаптируется. Идентичность выделенного вируса подтверждается с помощью реакции вирус нейтрализации (VN).

Вирусные антигены можно обнаружить в бурсе Фабрициуса перед выработкой антител к вирусу ИББ; это способствует диагностике на ранней стадии. В реакции иммунодиффузии в агаровом геле (AGID) гомогенат бурсы используют в качестве антигена против известной положительной антисыворотки. Еще одним способом демонстрации антигенов вируса ИББ в гомогенатах бурсы является твердофазный иммуносорбентный анализ с захватом антигена (ELISAs), который проводят на планшетах, сенсibilизированных специфическими для вируса ИББ антителами. Наличие антигенов вируса ИББ можно подтвердить путем иммунного окрашивания инфицированных тканей, используя куриную специфическую антисыворотку к вирусу ИББ.

Для обнаружения вирусной РНК можно провести полимеразную цепную реакцию с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР).

**Характеристика штаммов:** Штаммы вируса ИББ можно определить путем патотипирования в отрицательных на специфические антитела цыплятах, путем скрининга антигенов в перекрестных реакциях вирус нейтрализации, или с помощью тестов, основанных на моноклональных антителах, путем определения нуклеотидной последовательности продуктов амплификации ОТ-ПЦР, полученных из обоих сегментов генома вируса ИББ. Тестирования должны проводиться в специализированных лабораториях и должны включать набор референтных штаммов для контроля.

**Серологическое тестирование:** Можно провести реакцию иммунодиффузии в агаровом геле, реакцию вирус нейтрализации и твердофазный иммуносорбентный анализ. Инфекция, как правило, быстро распространяется в пределах стада. В связи с этим достаточно протестировать небольшой процент стада на наличие антител. Если положительные реакции обнаруживаются у невакцинированных птиц, все стадо считается инфицированным.

**Требования к вакцинам и диагностическим биологическим препаратам:** Доступны живые аттенуированные вакцины, инактивированные (убитые) вакцины, живые рекомбинантные вакцины, экспрессирующие капсидный антиген (VP2) вируса ИББ, а также иммунокомплексные вакцины (Icx). Для активной иммунизации молодых кур используют как живые аттенуированные, так и рекомбинантные или иммунокомплексные вакцины. В качестве дополнительного способа можно обеспечить цыплят пассивным иммунитетом путем вакцинации родителей сочетанием живой и инактивированной вакцин. Таким образом, вакцинация племенного поголовья является важной процедурой.

Живые аттенуированные вакцины против вируса ИББ должны быть стабильными и не иметь тенденции возврата к вирулентности. Живые вакцины называют “слабая”, “средняя” или “средняя плюс” (“сильная”) в соответствии с их возможностью (в восходящей степени): i) реплицировать и вызывать лимфоцитарное истощение в бурсе и ii) преодолевать остаточные материнские антитела (MDA). Слабые вакцины редко используют по отношению к бройлерам, но их широко используют для премирования родительского стада бройлеров до инокуляции инактивированной вакциной. Если в однодневном возрасте присутствуют материнские антитела – вакцинацию живой вакциной необходимо отложить до тех пор, пока материнские антитела не исчезнут у большинства особей в стаде. Наиболее оптимальный режим вакцинации определяется путем проведения серологического тестирования птицы для установления времени, когда материнские антитела достигли низкого уровня. Живые вакцины обычно вводят либо путем распыления, либо с питьевой водой.

Рекомбинантные и иммунокомплексные вакцины можно вводить автоматически посредством инъекции, либо *in ovo* на 18-й день инкубирования, или однодневным цыплятам даже при наличии материнских антител.

Убитые вакцины должны содержать большое количество антигена, чтобы быть эффективными. В основном их используют для стимулирования высоких универсальных уровней антител у родителей и, как следствие, у потомства. Тем не менее, иногда их можно также использовать и по отношению к молодым ценным птицам с материнскими антителами. Убитые вакцины производят в эмульсионно-масляном адьюванте и вводят путем инъекции. Данные вакцины применяют в отношении птиц, которых уже сделали более чувствительными в результате первичного подвергания либо живой вакцины, либо полевого вируса. Это можно проверить с помощью серологических методов. Высокие уровни материнских антител можно получить в материнском стаде, вводя, например, живую вакцину в возрасте приблизительно 8 недель, а затем инактивированную вакцину в возрасте 18 недель.

## А. ВВЕДЕНИЕ

Инфекционная бурсальная болезнь (ИББ), также известная как болезнь Гамборо, возникает по причине вируса, который принадлежит к роду *Avibirnavirus* (семейство *Birnaviridae*). Несмотря на то, что болезнь может инфицировать индеек, уток, цесарок, фазанов и страусов, клинические признаки проявляются только у кур. Клинические поражения обычно наблюдаются только у молодых птиц в возрасте до 10 недель. У более взрослых особей клинические признаки, как правило, отсутствуют.

Тяжелая острая форма болезни у 3-6-недельных птиц связана с высокой смертностью, а также такими признаками как прострация, диарея и внезапная смерть. В ходе патологоанатомических исследований случаев острой формы инфекционной бурсальной болезни обнаруживают комплекс признаков, включающий кровоизлияния в мышцах и преджелудке, нефрит и воспаление бурсы. При этом отек бурсы или кровоизлияния происходят в первые 4 дня, после чего в ходе развития болезни наступает атрофия бурсы (смотрите Раздел В. 1 *Идентификация возбудителя* для получения более подробной информации). Дифференциальная диагностика острой формы инфекционной бурсальной болезни должна принимать во внимание другие болезни, которые могут привести к внезапной смерти среди молодых особей и которые также характеризуются кровоизлияниями, нефритом или поражениями бурсы. Среди таких инфекционных болезней, например, болезнь Ньюкасла, анемия кур, инфекции, вызванные вирусами инфекционного бронхита с тенденцией к нефропатогенным штаммам. Поражения бурсы на ранних стадиях болезни являются критическими при дифференциальной диагностике острой формы инфекционной бурсальной болезни.

Более легкая или субклиническая форма болезни типична для 0-3-недельных птиц. Она может стать причиной вторичных проблем, так как вирус оказывает влияние на бурсу Фабрициуса. Вирус ИББ вызывает истощение лимфоидной ткани бурсы, что, в случае если это происходит в первые две недели жизни, может привести к значительному угнетению гуморального ответа антител. Единственными поражениями, которые ассоциируют с субклинической формой инфекционной бурсальной болезни, являются атрофия бурсы и поражения, связанные с вторичными инфекциями. При идентификации субклинической формы инфекционной бурсальной болезни наибольшее значение имеет характеристика гистопатологических изменений, ассоциированных с атрофией бурсы.

Известно 2 серотипа вируса инфекционной бурсальной болезни. Вирусы серотипа 1 реплицируются в бурсе Фабрициуса, а некоторые вирусы серотипа 1 вызывают у птицы клиническую болезнь. Антитела или вирус иногда обнаруживают у других видов птиц, при этом признаки инфекции отсутствуют. Вирусы серотипа 2 были обнаружены в дыхательных путях индеек, клоакальных мазках уток или в бурсе Фабрициуса кур. Антитела серотипа 2 широко распространены у индеек и иногда обнаруживаются у кур и уток. О случаях клинической болезни, вызванной инфекцией вирусом серотипа 2, не сообщалось (Etteradossi & Saif, 2013).

## В. ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

Выделение и идентификация возбудителя обеспечивает наиболее точную диагностику инфекционной бурсальной болезни, но эти методы обычно не используются в рутинных диагностических целях, поскольку вирус иногда сложно выделить. В действительности, лабораторная диагностика ИББ зависит от обнаружения специфических антител к вирусу или от обнаружения вируса в тканях с помощью иммунологических или молекулярных методов. В зависимости от целей доступно несколько методов (Таблица 1).

**Таблица 1. Методы исследования для диагностики инфекционной бурсальной болезни и их цель**

Метод	Цель					
	Свобода популяции от инфекций	Свобода отдельного животного от инфекции перед его перемещением	Вклад в политику по искоренению	Подтверждение клинических случаев	Превалентность инфекции - надзор	Иммунный статус отдельных животных или популяции и после вакцинации
<b>Патология и обнаружение вируса<sup>1</sup></b>						
<b>Гистопатологическое исследование бursы</b>	+ <sup>a</sup>	-	-	+++	+ <sup>a</sup>	+ <sup>b</sup>
<b>Выделение вируса</b>	+ <sup>a</sup>	- <sup>c</sup>	-	+ <sup>d</sup>	+ <sup>d</sup>	-
<b>Характеристика вируса (патотипирование, антигенность, нуклеотидное секвенирование)</b>	+ <sup>e</sup>	-	-	+++	+ <sup>e</sup>	+ <sup>b</sup>
<b>Обнаружение вируса в бурсе с помощью иммунологических исследований (AGID, AC-ELISA, иммунологическое окрашивание)</b>	+ <sup>a</sup>	- <sup>c</sup>	-	+++	+	-
<b>Обнаружение вируса с помощью ОТ-ПЦР</b>	+ <sup>a</sup>	- <sup>c</sup>	+ <sup>a</sup>	+++	- <sup>f</sup>	+
<b>Обнаружение иммунного ответа</b>						
<b>AGID для обнаружения антител</b>	+++ <sup>a</sup>	++	++	-	-	+
<b>ИФА для обнаружения антител</b>	+++ <sup>a</sup>	+++	+++	-	-	+++
<b>Нейтрализация вируса</b>	+ <sup>g</sup>	++ <sup>g</sup>	-	-	-	+++ <sup>g</sup>

Разъяснение: +++ = рекомендуемый метод; ++ = подходящий метод; + = может быть использован в некоторых случаях, однако стоимость, надежность или другие факторы значительно ограничивают его применение; - = не подходит для данной цели.

Несмотря на то, что не все тесты в категории +++ или ++ прошли формальную валидацию, их рутинная природа и тот факт, что их широко используют, а результаты не вызывают сомнений, делает их допустимыми.

AGID = иммунодиффузия в агаровом геле; AC-ELISA = иммуноферментный анализ с захватом антигена. ОТ ПЦР = полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией.

<sup>a</sup> При проведении в крупных масштабах и всегда с отрицательными результатами в зоне без вакцинации, а также для проверки на субклиническую форму инфекционной бурсальной болезни;

<sup>b</sup> Можно провести после вакцинации для проверки репликации живой вакцины в бурсе Фабрициуса;

<sup>c</sup> не подходит, поскольку может дать отрицательные результаты, если инфекция возникла за несколько недель до проведения исследования;

<sup>d</sup> Трудоемкий метод, который должен быть дополнен характеристикой вируса, чтобы провести дифференциацию между живыми вакцинами и полевыми изолятами;

<sup>e</sup> Могут понадобиться, если в исследуемых зонах используют живые вакцины;

<sup>f</sup> Не подходит, так как обычно не проводит дифференциацию между живыми вакцинами и полевыми изолятами;

<sup>g</sup> Трудоемкий метод, однако, является референтным для неодомашенной птицы, или для видов, отличных от птиц, или когда расследование проводится в отношении малого количества особей, или когда необходимо соотнести наличие обнаруженных антител с защитой.

<sup>1</sup> Рекомендуется использование нескольких методов идентификации возбудителя с использованием одного и того же клинического образца.

## 1. Идентификация возбудителя

У клинической ИББ четко выраженные характерные признаки и патологоанатомические поражения. В стаде наблюдается высокая заболеваемость, при этом угнетенное состояние у большинства птиц длится в течение 5-7 дней. Смертность резко увеличивается за два дня, а затем стремительно снижается в течение следующих 2-3 дней. Обычно погибает от 5 до 10% птиц, однако смертность может достигать и 30-40% и более, если речь идет о высоковирулентном вирусе инфекционной бурсальной болезни (vvИББV). Основными клиническими признаками являются водянистая диарея, взъерошенное оперение, нежелание двигаться, потеря аппетита, тремор и истощение. Патологоанатомические поражения включают дегидратацию мышц и многочисленные экхимотические кровоизлияния, увеличение и обесцвечивание почек, а также наличие уратов в канальцах. Бурса Фабрициуса демонстрирует главные диагностические поражения. У птиц, которые погибают на пике вспышки болезни, бурса увеличенная, распухшая, обесцвеченная до бледно-желтого. Может наблюдаться интрафолликулярное кровоизлияние и, в некоторых случаях, бурса может быть полностью геморрагической и похожей по внешнему виду на черную вишню. Во многих случаях наблюдается присутствие околосопочной эдемы бледно-желтого цвета в бурсе. Подтверждение клинической болезни или обнаружение скрытой болезни лучше всего проводить с помощью иммунологических методов, поскольку вирус ИББ сложно выделить. Чтобы выделить вирус, необходимо следовать методам, описанным ниже. Дифференциация между серотипами 1 и 2 или между подтипами или патотипами серотипа 1 должна проводиться в специализированной лаборатории (например, в Референтных лабораториях МЭБ по инфекционной бурсальной болезни [смотрите Таблицу, представленную в Части 4 данного *Руководства по наземным животным*]).

### 1.1. Подготовка образцов

Бурсу Фабрициуса удаляют асептическим методом примерно из пяти пораженных цыплят на ранней стадии болезни. Бурсы измельчают с помощью двух скальпелей, добавляют небольшое количество пептонного бульона, содержащего пенициллин и стрептомицин (по 1000µг/мл каждого), и гомогенизируют в блендере для измельчения ткани. Гомогенат центрифугируют при 3000 g в течение 10 минут. Надосадочную жидкость собирают для использования в исследованиях, описанных ниже. Для дальнейшего контроля бактериальной контаминации может понадобиться фильтрация через 0,22µ фильтр, хотя это может привести к снижению титра вируса.

### 1.2. Идентификация с помощью реакции иммунодиффузии в агаровом геле

Протокол для проведения реакции иммунодиффузии в агаровом геле (AGID) описан в Разделе В.2.1. Для обнаружения антигена в бурсе Фабрициуса с помощью реакции иммунодиффузии в агаровом геле необходимо асептическим методом удалить бурсу примерно у десяти цыплят во время острой стадии инфекции. Полученную бурсу измельчают с помощью двух скальпелей движениями, напоминающими работу ножниц, затем мелкие кусочки помещают в лунки планшета для реакции иммунодиффузии в агаровом геле против известной положительной сыворотки. Проведение нескольких циклов замораживания и оттаивания измельченной ткани может облегчить извлечение антигенов вируса ИББ из инфицированной ткани бурсы, а экссудат, полученный в результате замораживания и оттаивания, можно использовать для заполнения лунок.

### 1.3. Идентификация с помощью иммунофлюоресценции

Срезы бursы готовят с помощью криостата-микротомы, лиофилизируют при комнатной температуре и затем фиксируют в холодном ацетоне. В отношении срезов применяют специфические для вируса ИББ антисыворотки, маркированные флюоресцентным красителем, затем их инкубируют при температуре 37°C в течение 1 часа во влажной среде. По окончании инкубационного периода их промывают в течение 30 минут фосфатно-буферным раствором (ФБР), pH 7.2, и затем ополаскивают дистиллированной водой. Срезы монтируют с помощью забуференного глицерина, pH 7.6, и исследуют с помощью УФ микроскопа на флюоресценцию, специфичную для вируса ИББ (Meulemans *et al.*, 1977).

### 1.4. Идентификация с помощью твердофазного иммуносорбентного анализа с захватом антигена (АС-ELISA)

С момента описания Snyder *et al.* (1988) первого протокола для обнаружения вируса инфекционной бурсальной болезни серотипа 1 с помощью твердофазного иммуносорбентного анализа с захватом антигена (АС-ELISA) было разработано множество других исследований (Etteradossi & Saif, 2013). Вкратце, планшеты для ELISA сенсibilизируют специфическими для вируса ИББ антителами. В зависимости от выбранного протокола для АС-ELISA, иммобилизованным антителом может служить либо мышинное моноклональное антитело против вируса ИББ (MAb), либо сочетание таких моноклональных антител, либо куриная постинфекционная поликлональная сыворотка против вируса ИББ. Есть предположение, что чувствительность АС-ELISA с использованием поликлональных антител может быть выше. Образцы гомогенатов бursы (см. выше), разбавленные от 1/10 до 1/25 (в/о) в подходящем буфере для разведения инкубируют в сенсibilизированных лунках. Несвязанные антигены удаляют в конце инкубационного периода путем промывания подходящим отмывочным буфером (например, ФБР, pH 7.2 + 0,2% Tween 20). Затем выявляют захваченные антигены, как в непрямой ИФА, с идентифицирующим антителом (которое, скорее всего, произошло от других видов животных, чем иммобилизованное антитело), за которым следует конъюгат фермента, который связывается только с идентифицирующим антителом (в некоторых протоколах идентифицирующее антитело может быть непосредственно соединено с ферментом), за которым следует ферментный субстрат. Наконец, оптические плотности, которые сравнивают количество захваченных антигенов вируса ИББ, считают с помощью ИФА-ридера.

АС-ELISA основан на использовании образцов, которые могут содержать живой вирус, и должен проводиться только в условиях соответствующей биозащиты, таких как ламинарный бокс II класса защиты. Все жидкие вещества (отмывочные буферы) и твердые отходы считаются контаминированными вирусом ИББ и должны быть соответствующим образом обезврежены перед утилизацией.

Важными этапами при применении и оценке АС-ELISA являются: i) необходимость в проведении экстенсивной отмывки между всеми стадиями реакции, чтобы фоновые реакции были на низком уровне, ii) необходимость включения известных положительных и отрицательных образцов в каждое исследование в качестве контрольных, и iii) необходимость положительной реакции как иммобилизованных, так и идентифицирующих антитела со всеми штаммами вируса ИББ серотипа 1 (то есть ни иммобилизованные, ни идентифицирующие антитела не должны сильно зависеть от антигенной вариации вируса ИББ, которая встречается среди штаммов серотипа 1).

## 1.5. Идентификация с помощью молекулярных методов

Разработаны методы молекулярной вирусологии, которые позволяют идентифицировать вирус ИББ быстрее, чем выделение вируса. Наиболее часто используемый молекулярный метод – обнаружение генома вируса ИББ с помощью полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) (Lin *et al.*, 1993; Wu *et al.*, 1992). С помощью данного метода можно обнаружить геном вирусов, которые не реплицируют в культуре клеток, поскольку выращивание вируса перед амплификацией не обязательно.

ОТ-ПЦР проводят в три этапа: извлечение нуклеиновых кислот из исследуемых образцов, обратная транскрипция (ОТ) РНК вируса ИББ в кДНК, и амплификация полученной кДНК с помощью ПЦР. Два последних этапа предполагают, что пользователь выбирает олигонуклеотидные праймеры, которые представляют собой короткие последовательности, дополняющие вирус-специфическую нуклеотидную последовательность. В зависимости от места, откуда были выбраны праймеры амплифицируют разные участки генома. Пример, представленный ниже, иллюстрирует амплификацию средней трети гена, кодирующего внешний капсидный белок VP2 (Etteradossi *et al.*, 1998), или частичную амплификацию 5'конца гена VP1 в сегменте В вируса инфекционной бурсальной болезни. (Le Nouen *et al.*, 2006).

### 1.5.1. Экстрагирование нуклеиновых кислот

В отличие от одноцепочечной РНК, геном двухцепочечной РНК (дсРНК) вируса ИББ устойчив к деградации РНКазы. Тем не менее, инфицированные клетки также содержат разновидности одноцепочечных РНК положительного смысла, полученных из вируса ИББ, которые можно использовать в качестве модели на этапе обратной транскрипции, и которые могут усилить чувствительность исследования. Таким образом, важно, чтобы экстрагирование РНК проводилось с использованием перчаток и свободных от РНКазы реагентов, а также лабораторной посуды.

РНК вируса ИББ можно экстрагировать из инфицированных тканей с помощью наборов, которые можно приобрести у поставщиков реагентов для молекулярной биологии. В качестве альтернативы можно экстрагировать РНК вируса ИББ, добавив 1% (вес/объем конечной концентрации) натрия додецилсульфат и 1 мг/мл протеиназы К в 700μл суспензии вируса (например, гомогената бурсы) и инкубировав при температуре 37°C в течение 60 минут. Нуклеиновые кислоты получают, следуя стандартному протоколу для экстрагирования фенола/хлороформа (внимание: фенол токсичен и требует соответствующего обращения и утилизации). Нуклеиновые кислоты собирают из конечной водной фазы посредством преципитации этанолом и повторно суспендируют в свободной от РНКазы дистиллированной воде или подходящем буфере. До использования разбавленная водой РНК должна храниться в замороженном состоянии при температуре -20°C.

### 1.5.2. Обратная транскрипция

В продаже имеется большое разнообразие обратных транскриптаз. Для приготовления смеси для реакции обратной транскрипции необходимо следовать инструкциям производителя. “Нижний” праймер ПЦР (дополнительный к геному вируса ИББ, содержащему положительную РНК,

смотрите ниже) используют для обратной транскрипции, так как это позволяет провести синтез кДНК как из положительной цепи генома двухцепочечной положительной РНК вируса ИББ, так и из полученных из вируса ИББ одноцепочечных РНК положительного смысла, содержащихся ранее в инфицированных клетках. В качестве альтернативы можно использовать случайные праймеры (гексануклеотиды), чтобы направить синтез кДНК.

Перед помещением в реакционную смесь для обратной транскрипции матрикс РНК вируса ИББ необходимо денатурировать. Одну часть (по объему) диметилсульфоксида категории молекулярной биологии добавляют к четырем частям размороженного раствора РНК вируса ИББ. Нагревают при температуре 92°C в течение 3 минут и охлаждают на льду; в качестве альтернативного метода можно нагревать в течение 5 минут, а затем незамедлительно инкубировать смесь в жидком азоте. Необходимый объем денатурированного матрикса помещают в реакционную смесь. Инкубируют в соответствии с инструкциями поставщика фермента.

Раствор кДНК, полученный после этапа обратной транскрипции, хранят в замороженном виде при температуре ниже - 20°C. Если этап ПЦР отложить на несколько недель после синтеза кДНК, это может привести к ложным отрицательным результатам ПЦР.

### 1.5.3. Полимеразная цепная реакция

В продаже имеется большое разнообразие полимераз ДНК, подходящих для ПЦР. Для приготовления реакционной смеси для ПЦР необходимо следовать инструкциям производителя. Недавно провели обзор протоколов для амплификации и молекулярного типирования вируса ИББ (Wu *et al.*, 2007). В качестве примера можно предложить U3/L3 и +290/-861 пары праймеров ПЦР, которые оказались эффективными при амплификации средней трети VP2 гена в сегменте А штаммов вируса ИББ серотипа 1 (Etteradossi *et al.*, 1998) и области в 5'-конце сегмента В вируса ИББ (Le Nouen *et al.*, 2006), соответственно. Было доказано, что обе области подходят для исследований молекулярной эпизоотологии (Le Nouen *et al.*, 2006). Несмотря на то, что у значительного количества штаммов вируса ИББ есть два изменения нуклеотидов в позиции 35 (G-A) и 38 (T-C) праймера U3 (включая изоляты из Японии [ОКУМ], Гонконга [НК46], Соединенного Королевства [УК661], Нигерии [N4]), было доказано, что пара праймеров U3-L3 успешно амплифицирует некоторые из данных вирусов, которые демонстрируют обе мутации. Это происходит, возможно, потому что 3'-конец U3 является высококонсервативным. Тем не менее, как и в большинстве исследований ПЦР, штаммы вируса ИББ могут существовать с изменениями нуклеотидов в позиции отжига праймеров, требуя, таким образом, использования праймеров для оптимизации обнаружения с помощью ОТ-ПЦР.

Комбинация протоколов ОТ-ПЦР, нацеленной на сегмент А и сегмент В, увеличивает вероятность того, что серотип 1 вируса ИББ действительно будет обнаружен, если он присутствует; она также позволяет сделать подробную генетическую характеристику обнаруженных штаммов вируса ИББ.



Нуклеотидная последовательность U3 и L3 специфических для вируса ИББ праймеров ПЦР (специфическая для сегмента А гена VP2):

Верхний U3: 5'-**TGT-AAA-ACG-ACG-GCC-AGT-GCA-TGC-GGT-ATG-TGA-GGC-TTG-GTG-AC**-3'

Нижний L3: 5'-**CAG-GAA-ACA-GCT-ATG-ACC-GAA-TTC-GAT-CCT-GTT-GCC-ACT-CTT-TC**-3'

Нуклеотидная последовательность специфических для вируса ИББ праймеров ПЦР +226 и -739 (специфическая для сегмента В, гена VP1):

Верхний +290: 5'-**TGT-AAA-ACG-ACG-GCC-AGT-GAA-TTC-AGA-TTC-TGC-AGC-CAC-GGT-CTC-T**-3'

Нижний -861: 5'-**CAG-GAA-ACA-GCT-ATG-ACC-CTG-CAG-TTG-ATG-ACT-TGA-GGT-TGA-TTT-TG**-3'

Длина обоих праймеров U3 и L3 составляет 44 нуклеотида, в то время как длина праймеров +290 и -861 – 46 и 47 нуклеотидов, соответственно. Четыре праймера содержат специфический для вируса ИББ 3'-конец (в последовательности, указанной выше, он выделен курсивом), который соответствует позициям 657-676 и 1193-1212 сегмента А вируса ИББ в праймерах U3 и L3, соответственно (нумерация, как в сегменте А штамма P2, код доступа X84034), и позициям нуклеотида 290-311 и 861-883 сегмента В вируса ИББ в праймерах +290 и -861, соответственно (нумерация, как в сегменте В штамма D6948, код доступа AF240687). Специфический для вируса ИББ конец соединен 5'-концом не вируса ИББ (выделено жирным шрифтом в последовательности выше), соответствуя M13 и RM13 универсальным праймерам в верхних и нижних праймерах, соответственно. Универсальные праймеры M13 и RM13 обычно используются в качестве праймеров для секвенирования ДНК, так что очищенные продукты ПЦР, полученные в результате амплификации с помощью пар праймеров U3/L3 и +290/-861, можно легко секвенировать в обоих направлениях. Наконец, сайты рестрикции (подчеркнуты в последовательностях) включают в следующие рестрикционные эндонуклеазы: *Sph*I (в праймере U3), *Eco*R1 (в праймерах L3 и +290), *Pst* I (в праймере -861). Данные сайты рестрикции располагают таким образом, чтобы при необходимости можно было клонировать продукты ПЦР, полученные в результате амплификации пар U3/L3 и +290/-861. Пара U3/L3 генерирует продукт длиной в 604 пары оснований (п.о.), при этом 516 пар оснований являются специфическими для последовательности вируса ИББ и охватывают область, кодирующую чрезвычайно изменчивую область белка VP2. Пара +290/-861 генерирует продукт длиной 642 пары оснований, из которых 549 пар оснований являются специфическими для амплифицированной последовательности вируса ИББ. Оба продукта получают из областей генома, которые подходят для филогенетического анализа (Etteradossi *et al.*, 1998; Le Nouen *et al.*, 2006).

Следуя рекомендациям поставщика полимеразы ДНК, проводят начальный этап денатурации, затем проводят 35 циклов, каждый из которых включает этап денатурации, отжига и элонгации. В таких циклах, где денатурация проводится при температуре 95°C в течение 30 секунд и отжиг при температуре 64°C в течение 45 секунд, можно использовать обе пары

праймеров U3/L3 и +290/-861 (температуру отжига следует изменить, если используются другие праймеры). Параметры проведения элонгации устанавливаются в соответствии с рекомендациями поставщика.

Обнаружение можно проводить с помощью электрофореза с продуктами ПЦР и маркерами молекулярного веса ДНК в 1% агарозном геле, окрашенном бромидом этидия (внимание: бромид этидия является токсичным и канцерогенным. Его необходимо использовать и утилизировать соответствующим образом).

Для каждого образца кДНК необходимо провести три реакции ПЦР (чистой, 10- и 100-кратно разведенной кДНК), чтобы избежать ложно-отрицательных результатов, которые могут возникнуть по причине ингибирования ПЦР в смесях, содержащих большое количество препарата кДНК.

Каждая ПЦР должна включать отрицательную и положительную контрольные реакции. Разработаны протоколы, которые включают внутренний контроль для тестирования на присутствие ингибиторов ПЦР (Smiley *et al.*, 1999).

Отсрочка ПЦР на несколько недель после проведения этапа обратной транскрипции может привести к ложным отрицательным результатам ПЦР.

Также для диагностики инфекционной бурсальной болезни можно провести одноступенчатую ОТ-ПЦР с использованием как традиционных методов так и методов в реальном времени.

## **1.6. Выделение вируса в культуре клетки**

0,5 мл образца инокулируют в каждую из четырех свежееконтюэнтных культур фибробластов куриных эмбрионов (CEF) (из источника, свободного от специфических патогенов [СПФ]) во флаконах объемом 25 см<sup>2</sup>. Проводят адсорбцию при температуре 37°C в течение 30-60 минут, дважды промывают сбалансированным солевым раствором Игла и добавляют в каждый флакон поддерживающую среду. Культуры инкубируют при температуре 37°C, ежедневно осматривая на наличие цитопатического эффекта (CPE). Он характеризуется появлением маленьких круглых рефракционных клеток. Если в течение 6 дней цитопатический эффект не наблюдается – среду сливают, затем культуры замораживают-оттаивают и вводят полученный лизат в свежие культуры. Иногда данную процедуру необходимо провести как минимум три раза. При возникновении цитопатического эффекта вирус необходимо исследовать против моноспецифической антисыворотки к вирусу ИББ с помощью теста вирус нейтрализации в культуре ткани (VN) (смотрите Раздел В.2.2 *Реакции вирус нейтрализации*). Более патогенные штаммы вируса ИББ обычно не невозможно вырастить в фибробластах куриных эмбрионов, если только изначально вирус не подвергли экстенсивному серийному пассажу в эмбрионах (смотрите ниже).

## **1.7. Выделение вируса в эмбрионах**

0,2 мл образца вводят в желточный мешок пяти 6-8-дневным отрицательным к специфическим антителам (SAN) куриным эмбрионам и на хориоаллантаоисную мембрану (Американская Ассоциация патологов,

специализирующихся на птице, 2008) пяти 9-11-дневных SAN куриных эмбрионов. SAN эмбрионы получают из серологически отрицательных к вирусу ИББ стад. Ежедневно проводят овоскопирование и удаляют эмбрионы, которые погибли в течение 48 часов после инокуляции. Эмбрионы, которые погибли по истечении этого времени, исследуют на поражения. Вирус ИББ серотипа 1 приводит к карликовости эмбрионов, подкожному отеку, гиперемии и подкожному или внутричерепному кровоизлиянию. Печень обычно распухшая, местами с признаками гиперемии, создающая эффект мраморности. В случае более поздней гибели, печень может быть распухшей и зеленоватого цвета, с участками некроза. Селезенка увеличена, а почки распухшие с признаками гиперемии, которые создают эффект мраморности. В случае если наблюдаются поражения - необходимо исследовать вирус против моноспецифической сыворотки против вируса ИББ с помощью реакции нейтрализации вируса, извлеченного из эмбриона.

При первичном извлечении вирус ИББ серотипа 1 приводит к гибели как минимум нескольких эмбрионов.

Вирус ИББ серотипа 2 не индуцирует подкожный отек или кровоизлияние у инфицированных эмбрионов, однако, эмбрионы более маленького размера с изменением цвета на бледно-желтый.

Для приготовления посевного вируса, размножаемого в эмбрионе, или для последующего проведения пассажей асептическим методом собирают эмбрионы с поражениями или эмбрионы, которые считают инфицированными, соответственно. Голову и конечности удаляют, а тело мелко режут, как описано в Разделе В.1.1 *Приготовление образца для приготовления вирусной суспензии*.

## **1.8. Выделения вируса на цыплятах**

Раньше данный метод применялся достаточно широко, однако сейчас его больше не используют из соображений благополучия животных. Пять восприимчивых и пять иммунизированных против болезни ИББ цыплят (в возрасте 3-7 недель) инокулируют 0,05 мл образца путем закапывания в глаза. В течение 72-80 часов после инокуляции следует произвести убой цыплят гуманным способом и исследовать бурсу Фабрициуса. Бурса цыплят, инфицированных вирулентным вирусом ИББ серотипа 1, имеет желтоватый цвет (иногда с кровоизлияниями) распухшая, с явно выраженными бороздами. Иногда присутствует околосоумочная опухоль, и пробки из творожистого вещества. В фибриозной пленке наблюдается петехиальное кровоизлияние.

Наличие поражений в бурсе восприимчивых цыплят, а также отсутствие поражений у иммунизированных цыплят является признаком ИББ. Бурсу из обеих групп можно использовать в качестве антигена в ходе иммунодиффузии в агаровом геле (AGID) против известной положительной к ИББ сыворотки (смотрите Раздел В.1.2 *Идентификация с помощью иммунодиффузии в агаровом геле*).

Степень поражения бурсы может значительно варьировать в зависимости от патогенности изучаемого штамма вируса ИББ. Однако, поскольку образцы для выделения вируса могут варьировать по содержанию вируса, степень

поражения бурсы, наблюдаемая у восприимчивых цыплят на этапе выделения, дает незначительную информацию о патогенности штамма.

В бурсе цыплят, инфицированных вирусом ИББ серотипа 2, не наблюдается никаких макроскопических поражений.

## **1.9. Дифференциация штаммов**

Штаммы вируса ИББ далее можно идентифицировать, исследуя их патогенность на SAN цыплятах (путем изучения их антигенной реактивности в перекрестных реакциях вирус нейтрализации), или с помощью моноклональных антител (путем установления нуклеотидной последовательности продуктов амплификации ОТ-ПЦР, полученных из генома вируса ИББ), или изучив число и размер фрагментов рестрикции, полученных путем обработки таких продуктов ОТ-ПЦР рестрикционными эндонуклеазами. Для каждого из этих подходов описаны протоколы. Исследования проводят в специальных лабораториях; исследования должны включать набор референтных штаммов для контроля. Несмотря на то, что молекулярная основа антигенной вариабельности сейчас изучена лучше, никакие валидированные маркеры вирулентности до сих пор не описаны.

### **1.9.1. Изучение патогенности**

Исследования на сравнение штаммов вируса ИББ должны проводиться в биологически безопасных помещениях для того, чтобы избежать распространения изучаемого вируса (смотрите Главу 1.1.2 Биобезопасность ветеринарных микробиологических лабораторий и вивариев). Во избежание попадания загрязняющего вещества необходимо использовать SAN птиц с известным микробиологическим статусом (лучше всего СПФ цыплят).

При сравнении результатов испытаний на патогенность основными переменными величинами являются порода, возраст, иммунный статус зараженных цыплят, доза и способ введения вируса для контрольного заражения, а также возможное наличие контаминирующих агентов в инокулеуме. Доказано, что легкие породы яичного направления более восприимчивы, чем тяжелые породы мясного направления (Van den Berg & Meulemans, 1991). Разница в восприимчивости может также проявиться в различных линиях СПФ цыплят. Наиболее восприимчивыми к острой форме ИББ являются цыплята в возрасте от 3 до 6 недель (Etteradossi & Saif, 2013). (Влияние иммунного статуса описано в Разделе С.) Необходима большая доза вируса для контрольного заражения, как указано в Разделе С.1.3 *Живые рекомбинантные векторные вакцины: методы использования*, чтобы сразу же инфицировать всех инокулированных цыплят, избегая, таким образом, передачи инокулированного вируса от птицы к птице. Наконец, наличие в инокулеуме контаминирующих агентов, таких как аденовирус или вирус инфекционной анемии кур, может модифицировать степень тяжести ИББ и признаков, наблюдаемых после контрольного заражения (Rosenberger *et al.*, 1975).

Термины “вариант”, “классический” и “очень вирулентный” используются, чтобы описать штаммы вируса ИББ с разной

патогенностью. На основании признаков и поражений, наблюдаемых у двух линий СПФ цыплят породы белый леггорн во время экспериментальной инфекционной бурсальной болезни в тяжелой форме, после контрольного заражения  $10^5$  50% инфицирующей эмбрионы дозой ( $EID_{50}$ ), северо-американский “вариант” вирусов ИББ индуцирует небольшое количество признаков, которые могут вообще отсутствовать, как и смертность, однако отмечаются поражения бурсы. “Классические” вирусы ИББ индуцируют приблизительно 10-50% смертность с типичными признаками и поражениями, а “очень вирулентные” вирусы ИББ индуцируют примерно 50-100% смертность с типичными признаками и поражениями (Eterradossi *et al.*, личные наблюдения).

### 1.9.2 Исследование антигенности

Антигенное родство среди штаммов вируса ИББ можно в ходе перекрестных реакций вирус нейтрализации, которые лучше всего коррелирует с перекрестной защитой. Когда изучаемые вирусы не растут в фибробластах куриных эмбрионов (например, очень вирулентный вирус ИББ [vvИББV]), такие исследования необходимо проводить на SAN яйцах с эмбрионами. Различия в результатах перекрестной реакции вирус нейтрализации между штаммами вируса ИББ серотипа 1 привели к определению “подтипов” серотипа 1, некоторые из которых включают антигенный “вариант” северо-американских изолятов вируса ИББ (Jackwood & Saif, 1987).

Другой способ изучить генетическое родство – использовать мышинные моноклональные антитела, которые присоединяются к нейтрализующим эпитопам вируса ИББ. Во всем мире существует несколько панелей моноклональных антител для использования в ИФА с захватом антигена (Eterradossi *et al.*, 1999; Snyder *et al.*, 1992). Некоторые моноклональные антитела включены в коммерческие наборы, но до сих пор не было предложено универсального набора моноклональных антител. Все нейтрализующие эпитопы вируса ИББ, охарактеризованные в настоящее время, отображены в главном иммуногене домене в средней трети (позиции аминокислот с 200 по 340) внешнего капсидного белка VP2 (Eterradossi *et al.*, 1998; Schnitzler *et al.*, 1993; Vakharia *et al.*, 1994). Данная область носит название “VP2 вариабельный домен”, поскольку в ней заключено большинство изменений аминокислот, наблюдаемых среди штаммов вируса ИББ. В пределах vVP2 особую важность для антигенности имеют четыре аминокислотных фрагмента, которые называют гидрофильными пиками vVP2. Это позиции аминокислот с 210 по 225 (главный пик А), с 249 по 252 (второстепенный пик 1), с 281 по 292 (второстепенный пик 2) и с 313 по 324 (главный пик В) (Van den Berg *et al.*, 1996). Согласно кристаллической структуре белка VP2 и частиц вируса инфекционной бурсальной болезни участки аминокислоты, ранее известные как “гидрофильные пики VP2”, соответствуют наиболее выдающимся аминокислотным петлям в проекции домена белка VP2 (Coulibaly *et al.*, 2005). И северо-американский “вариант”, и “очень вирулентный” вирус ИББ демонстрирует в данных областях изменения аминокислот, которые коррелируют с вариацией эпитопов (Eterradossi *et al.*, 1998; Vakharia *et al.*, 1994). В настоящее время не

обнаружено ни одного антигенного маркера, который бы коррелировал непосредственно с патогенностью вируса ИББ.

### 1.9.3 Молекулярная идентификация

Большинство работ по молекулярной идентификации сфокусированы на описании большого сегмента вируса ИББ (сегмент А) и, в особенности, кодирующей области vVP2. Изначально были приложены усилия для того, чтобы охарактеризовать продукты ОТ-ПЦР с использованием рестрикционных эндонуклеаз (Lin *et al.*, 1993). Данные подходы известны как ОТ-ПЦР/ рестрикционных эндонуклеаз (RT-PCR/RE) или ОТ-ПЦР-полиморфизма длин фрагментов рестрикции (RT-PCR-RFLP). Польза информации, которую они обеспечивают, зависит от идентификации ферментов, которые входят в сайт рестрикции и являются фенотипически важными. Некоторые протоколы RE или RFLP могут определить большее количество профилей, что может привести к замешательству при использовании в исследованиях по молекулярной эпизоотологии и сложности корреляции с антигенностью или патогенностью. Нуклеотидное секвенирование продуктов ОТ-ПЦР представляет собой подход, позволяющий более точно определить генетическое родство между штаммами вируса инфекционной бурсальной болезни. Используя подход реверсивной генетики, было показано, что адаптация культуры клеток штаммов вируса инфекционной бурсальной болезни принципиально зависит от пар аминокислот 279 N-284 T или 253 N-284 T VP2 (Mundt, 1999). В большинстве очень вирулентных вирусов присутствуют четыре типичные аминокислоты (222 A, 256 I, 294 I и 299 S) (Brown *et al.*, 1994; Lin *et al.*, 1993). Недавние исследования показали, что несмотря на то что VP2 является значимым показателем вирулентности, сегмент В также играет очень важную роль (Boot *et al.*, 2000; Escaffre *et al.*, 2013; Jackwood *et al.*, 2011). Доказано, что сегмент А и В вируса ИББ коэволюционируют (т.е. большинство значимых кластеров вируса ИББ, такие как родственные с вирусом vvИББ штаммы, можно идентифицировать путем анализа обоих сегментов генома). Тем не менее, были идентифицированы некоторые потенциально реассортантные вирусы. Патогенность предполагаемого реассортантного вируса инфекционной бурсальной болезни часто модифицирована, если сравнить с тем, что можно было бы ожидать от характеристики только одного сегмента А (Le Nouen *et al.*, 2006; Jackwood *et al.*, 2011; Wei *et al.*, 2008). Таким образом, рекомендуется проводить молекулярную идентификацию изолятов вируса инфекционной бурсальной болезни на основании секвенирования обоих сегментов генома.

## 2. Серологические тесты

Образцы крови необходимо отбирать на ранней стадии болезни, а повторные образцы отбирают спустя три недели. Поскольку вирус распространяется быстро необходимо отобрать образцы от небольшого количества особей из стада. Как правило, достаточно 20 образцов крови.

## 2.1. Реакция иммунодиффузии в агаровом геле

Реакция иммунодиффузии в агаровом геле (AGID) является наиболее простым из серологических тестов для обнаружения специфических антител в сыворотке.

### 2.1.1. Подготовка положительного контрольного антигена

3-5-недельных цыплят инокулируют очищенным 10% (в/о) гомогенатом бursы, содержащим жизнеспособный вирус ИББ<sup>2</sup>, путем закапывания в глаза. Через 3 дня после инокуляции производят гуманный убой птицы и отбирают бурсу асептическим методом. Геморрагическую бурсу удаляют, а оставшуюся часть объединяют в пул, взвешивают и добавляют равную по объему холодную дистиллированную воду (либо подходящий буфер, такого как ФБР или триптозо-фосфатный бульон) и равный по объему неразбавленный хлористый метилен. (Внимание: хлористый метилен является токсичным и, возможно, канцерогенным. Он требует соответствующего обращения и утилизации. Во избежание причинения вреда здоровью в качестве альтернативы можно использовать трихлортрифторэтан, который, однако, представляет угрозу для окружающей среды и, таким образом, требует соответствующего обращения и утилизации). Смесь тщательно гомогенизируют в блендере для тканей и центрифугируют при 2000 g в течение 30 минут. Надосадочную жидкость собирают, делят на аликвоты и далее хранят при температуре -40°C. Антиген содержит живой вирус, поэтому работать с ним можно только в помещениях соответствующего класса защиты, таких как бокс II класса защиты. В случае необходимости, до розлива антиген можно инактивировать. Для этого нужно добавить 0,3% (о/о) β-пропиолактон в собранную надосадочную жидкость, затем инкубировать при температуре 37°C в течение 2 часов. Важно, чтобы инкубирование проходило на орбитальном встряхивателе или на механическом встряхивателе-качалке так, чтобы внутренняя сторона флакона, которая имела контакт с живым вирусом, действительно контактировала с β-пропиолактоном. Делят на аликвоты и хранят, как описано выше. Эффективность инактивации проверяют, пытаясь выделить вирус ИББ из инактивированного антигена в ходе трех серийных пассажей в SAN куриных эмбрионах (смотрите Раздел В.1.7 *Выделение вируса в эмбрионах*).

### 2.1.2. Подготовка положительной контрольной антисыворотки

4-5-недельных восприимчивых цыплят инокулируют 0,05мл очищенного 10% (в/о) гомогената бursы, который содержит живой вирус ИББ<sup>1</sup>, путем закапывания в глаза. Птицу обескровливают через 28 дней после инокуляции. Сыворотку объединяют в пулы и хранят в аликвотах при температуре -20°C.

---

<sup>2</sup> Классическим подходящим штаммом вируса инфекционной бурсальной болезни (серотип 1, классический патотип) является штамм 52/70, полученный от одной из Референтных лабораторий МЭБ (смотрите Таблицу, представленную в Части 4 данного Наземного Кодекса).

### 2.1.3. Подготовка агара

Хлорид натрия (80 г) и фенол (5 г) растворяют в дистиллированной воде (1 литре) (внимание: фенол токсичен и требует соответствующего обращения и утилизации). Добавляют агар (12,5 г) и обрабатывают паром до его полного растворения. Чтобы избежать причинения вреда здоровью и окружающей среде использованием фенола, можно использовать следующий рецепт приготовления агара: смешивают хлорид натрия (80 г), дигидрогенфосфат калия (0,45 г), натрия гидрогенфосфат дигидрат (1,19 г), агар (10 г) и дистиллированную воду до конечного объема 1 литр (конечный рН 7,1 при температуре 20-25°C). Смесь, полученную по второму рецепту, можно гомогенизировать путем нагревания до 90°C и перемешивания. Пока смесь еще горячая ее необходимо профильтровать через подушечку из целлюлозной ваты, покрытой несколькими слоями муслина и распределить в стеклянные флаконы по 20 мл. Среду без фенола можно далее стерилизовать автоклавированием при температуре (максимум) 115°C в течение 15 минут. До использования флаконы хранят при температуре 4°C.

### 2.1.4. Процедура тестирования

- i) Планшеты подготавливают за 24 часа-7 суток до использования. Растворяют агар, поместив его в паровой аппарат, или на водяной бане. Избегать попадания воды во флаконы.
- ii) Содержимое одного флакона разливают в каждую из требуемого количества 9 см пластиковых чашек Петри, расставленных на ровной поверхности. ( В некоторых лабораториях предпочитают разливать гель на предметные стекла размером 25×75 мм, глубиной 3 мм.)
- iii) Планшеты накрывают крышкой и дают агару осесть; планшеты хранят при температуре 4°C. Планшеты с содержимым можно хранить до 7 дней при температуре 4°C. (В случае если планшеты планируется использовать в тот же день, когда был розлит агар, необходимо высушить их в открытом и перевернутом виде при температуре 37°C в течение 30 мин - 1 часа.)



Рис. 1. Протокол исследования на антитело.

T = тестовые сыворотки



Рис. 2. Протокол исследования на антиген.

T = тестовые сыворотки



#### Примечания:

1. Предпочтительно использование линейной модели лунок, хотя можно использовать и модель шестигранник. Каждую исследуемую сыворотку или бурсу (Т на Рисунках 1 и 2 выше) необходимо поместить рядом с положительным контролем антитела (АВ) или антигена (АG), соответственно.
2. Используют планшет с лунками глубиной 3 мм, диаметром 6 мм, расположенные в 3 мм друг от друга (или с лунками другого размера, которые ранее показали свою эффективность).
- iv) Вырезают три вертикальных ряда лунок, диаметром 6 мм, на расстоянии 3 мм друг от друга, используя шаблон и цилиндрический резак
- v) Удаляют агар из лунок путем отсасывания или используя ручку и наконечник, стараясь не повредить стенки лунок.
- vi) С помощью пипетки распределяют 50  $\mu$ л тестируемых сывороток по лункам, как показано на Рисунке 1.

Либо для обнаружения антигенов вируса ИББ в бурсе:

С помощью щипцов с закругленными концами распределяют мелкие кусочки хорошо порезанной тестируемой бursы по лункам, как показано на Рисунке 2, чтобы заполнить лунки. В качестве альтернативы лунки можно заполнить жидкостью, полученной в ходе замораживания-оттаивания порезанных тканей.

- vii) 50  $\mu$ л положительных и отрицательных контрольных реагентов распределяют по соответствующим лункам.
- viii) Планшеты инкубируют при температуре от 22°C до 37°C в течение 48 часов во влажной камере, чтобы избежать высыхания агара.
- ix) Планшеты просматривают против темного фона под косым освещением через 24 и 48 часов.

#### **2.1.5. Количественные методы иммунодиффузии в агаровом геле**

Реакцию иммунодиффузии в агаровом геле можно также проводить для измерения уровней антител, используя разведения сыворотки в тестовых лунках и принимая за титр наивысшее разведение, необходимое для получения линии преципитации (Cullen & Wyeth, 1975). Это важно для измерения материнских и вакцинных антител, а также для установления наиболее подходящего для вакцинации времени; однако, в настоящее время данный количественный метод AGID широко заменяется ИФА.

## 2.2. Реакции вирус нейтрализации

Реакции вирус нейтрализации проводят в культуре клеток. Данный вид тестирования является более трудоемким и дорогим, по сравнению с AGID, но при этом более чувствительным для обнаружения антител. Такая чувствительность не требуется при рутинной диагностике, но может быть полезной при оценке реакции на вакцину или при дифференциации между серотипами 1 и 2 вируса ИББ. В исследовании используются либо клетки фибробластов СПФ куриных эмбрионов, либо подходящая линия перевиваемых клеток (такая как QT-35, BGM-70, MA-104 или DF1) в сочетании с адаптированным штаммом вируса инфекционной бурсальной болезни.

Сначала 0,05 мл вируса, разведенного в среде культуры тканей, содержащей 100 TCID<sub>50</sub> (50% инфекционных доз культуры тканей) на 0,05 мл, помещают в каждую лунку микротитровального планшета для культуры тканей (Смотрите Американская Ассоциация патологов, специализирующихся на птице, 2008, методы титрования вируса). Тестовые сыворотки инактивируют путем нагревания при температуре 56°C в течение 30 минут. Готовят двойные серийные разведения сывороток в разведенном вирусе. Через 30 минут при комнатной температуре 0,2 мл клеточной суспензии с плотностью клеток, которая позволяет получить конфлюэнтный слой после 24 часов инкубации, распределяют по лункам. Планшеты запечатывают и инкубируют при температуре 37°C в течение 4-5 дней, после чего проверяют под микроскопом монослой на наличие ЦПЭ. Конечная точка (титр сыворотки) выражается как величина, обратная наивысшему разведению сыворотки, при котором не наблюдалось ЦПЭ. Чтобы сократить различия от теста к тесту и от оператора к оператору в каждую серию тестов можно включить стандартизованную антисыворотку<sup>3</sup>, при этом титр вирусной суспензии нужно заново оценивать после каждого испытания; необходимо провести достаточное количество повторов (лунок) на одно разведение вируса.

## 2.3. Твердофазный иммуносорбентный анализ

Для обнаружения антител к вирусу ИББ используют ИФА. Планшеты сенсibilизируют очищенным или, как минимум, частично очищенным приготовлением вируса, что требует особых навыков и техники. Методы приготовления реагентов и проведения исследования описал Marquardt *et al.* (1980) Доступны коммерческие наборы.

Опытные сыворотки разводят согласно установленному протоколу или инструкции набора, и затем каждую сыворотку разливают в необходимое количество лунок. После инкубирования в соответствующих условиях необходимо удалить сыворотки из планшетов и тщательно промыть лунки. Антикуриные иммуноглобулины, конъюгированные с ферментом, разливают по лункам и соответствующим образом инкубируют планшеты. Перед добавлением в планшет субстрата, содержащего хромоген, который приводит к изменению цвета в случае наличия фермента, необходимо очистить планшеты от содержимого и промыть их. После последней стадии инкубирования реакцию субстрата/хромогена необходимо остановить путем

---

<sup>3</sup> Подходящую референтную сыворотку можно получить в Референтных лабораториях МЭБ (Смотрите Таблицу, представленную в Части 4 данного Руководства по наземным животным).

добавления подходящего стоп-раствора и определить количество цветных реакций, измерив оптическую плотность в каждой лунке. Необходимо рассчитать отношение Образец/ Положительный результат для каждого опытного образца.

#### 2.4. Интерпретация результатов

Реакция иммунодиффузии в агаровом геле является чрезвычайно чувствительной, хотя и не такой чувствительной, как реакция вирус нейтрализации; последняя зачастую показывает титр, когда результат реакции иммунодиффузии в агаровом геле отрицательный. Положительные реакции указывают на наличие инфекции у невакцинированных птиц без материнских антител. В качестве ориентира, положительная реакция иммунодиффузии в агаровом геле у вакцинированных птиц или молодых птиц с материнскими антителами указывает на наличие защитного уровня антител. ИФА дает результаты быстрее, чем реакция вирус нейтрализации или реакция иммунодиффузии в агаровом геле, и менее трудоемка, однако реагенты для нее более дорогие. Титры реакции вирус нейтрализации и реакции иммунодиффузии в агаровом геле хорошо коррелируют, но как только реакция вирус нейтрализации становится более чувствительной, титры реакции иммунодиффузии в агаровом геле пропорционально снижаются. Корреляция между ИФА и реакцией вирус нейтрализации, а также между ИФА и реакцией иммунодиффузии в агаровом геле более вариабельна и зависит от источника реагентов для ИФА. Тем не менее, следует помнить, что оба метода (ИФА и реакция вирус нейтрализации) являются высокочувствительными и могут варьировать как внутри одной лабораторий, так и между лабораториями. В связи с этим лабораториям, проводящим ИФА или реакцию вирус нейтрализации на вирус инфекционной бурсальной болезни на рутинной основе, рекомендуется использовать положительную индикаторную сыворотку с известным титром в каждом исследовании (De Wit *et al.*, 2007; Kreider *et al.*, 1991). Когда проводится тестирование на снижение уровня материнских антител, реакция вирус нейтрализации часто показывает остаточные антитела в том возрасте, когда ИФА уже дает отрицательные результаты. Существуют формулы, которые позволяют использовать титры, полученные в ИФА, чтобы рассчитать оптимальный возраст для вакцинации, который будет изменяться в зависимости от используемой вакцины (Block *et al.*, 2007). Неспецифические положительные реакции могут возникнуть при большинстве ИФА, потому что обычно они разработаны для мониторинга реакций на вакцину, в котором чувствительность считается более важным показателем, чем специфичность. Необходимо иметь это в виду при проведении ИФА в целях диагностики. В отношении коммерческих стад кур или экспериментально зараженных кур следует учитывать то, что ИФА с использованием антигена серотипа 1 также определит антитела, индуцированные вирусом ИББ серотипа 2 (Ashraf *et al.*, 2006). Однако еще не было выявлено случаев, когда данная возможная перекрестная реакция мешала проведению программ серологического мониторинга ИББ, основанного на ИФА.

## С. ТРЕБОВАНИЯ К ВАКЦИНАМ

### 1. Общая информация

Руководство по производству ветеринарных вакцин представлено в Главе 1.1.8 *Принципы производства ветеринарных вакцин*. Руководства, представленные здесь и в Главе 1.1.8, являются общими и могут быть дополнены государственными и региональными требованиями.

Недавно был проведен обзор вакцин против вируса инфекционной бурсальной болезни (Müller *et al.*, 2012). Имеется четыре основных типа вакцин для контроля инфекционной бурсальной болезни: i) живые аттенуированные вакцины; ii) иммунокомплексные вакцины; iii) рекомбинантные живые векторные вакцины, экспрессирующие антигены к вирусу инфекционной бурсальной болезни; iv) инактивированные масляно-импульсионные вакцины с адьювантом.

В настоящее время вакцины против ИББ делают только на основе вируса ИББ серотипа 1, хотя серотип 2 также обнаруживали у домашней птицы. Вирус серотипа 2 не связывают с болезнью, однако его присутствие будет стимулировать выработку антител. Антитела серотипа 2 не обеспечивают защиту против инфекции, вызванной серотипом 1, а также не противодействуют ответной реакции на вакцину типа 1. Существует множество описаний антигенных вариантов вируса серотипа 1 (Rosenberger & Cloud, 1986). Изучение перекрестного иммунитета показало, что для обеспечения хорошей защиты против некоторых из этих вариантов, в инактивированных вакцинах, приготовленных из “классического” вируса серотипа 1, должно содержаться достаточно большое количество антигенов. На сегодняшний день лицензированы вакцины, которые содержат как классические, так и варианты вирусы ИББ серотипа 1. С 1986 года появляются штаммы vvIBBV с небольшими антигенными изменениями, по сравнению с “классическими” вирусами серотипа 1. Активная иммунизация “классическим” вирусом серотипа 1 или вакциной обеспечивает хорошую защиту от vvIBBV, однако последние вирусы менее чувствительны к нейтрализации материнскими антителами, по сравнению с “классическими” патогенными вирусами (Van den Berg & Meulemans, 1991).

#### 1.1. Живые вакцины: способы применения

Живые вакцины против ИББ производят из полностью или частично аттенуированных штаммов вируса, которые известны как “слабый”, “средний” или “средний плюс” (“сильный”), соответственно.

Слабые или средние вакцины применяют в отношении к родительскому поголовью, чтобы, используя инактивированную вакцину, продуцировать первичный ответ до вакцинации, которая проходит незадолго до начала периода яйцекладки. Они чувствительны к материнским антителам, поэтому вводить их нужно только после того, как материнские антитела исчезнут. Вакцины используются путем внутримышечного введения, распыления или путем выпаивания, как правило, на 8 неделе жизни (Skeeles *et al.*, 1979).

Средние и средние плюс вакцины используют для защиты бройлеров и ремонтных коммерческих несушек. Некоторые из этих вакцин также используют в отношении к молодым родителям, если существует большой риск естественного заражения вирулентным вирусом ИББ. Несмотря на то, что средние вакцины чувствительны к материнским антителам, их иногда вводят однодневным птицам, путем распыления, чтобы защитить всех цыплят в стаде, у которых может не быть материнских антител или у

которых их очень мало. В этом случае в пределах стада устанавливается резервуар вакцинного вируса, который делает возможным латеральную передачу другим цыплятам, когда их материнские антитела исчезают. Вакцинация проводится второй и третий раз, когда существует большой риск подверженности вирулентным формам болезни, или когда у вакцинированных цыплят неравные уровни материнских антител. Время проведения повторных вакцинаций будет зависеть от титров антител родителей в то время, когда они несли яйца. Ориентировочно вторую дозу вводят на 10-14 день жизни, когда около 10% стада чувствительны к ИББ, а третью дозу – 7-10 дней позднее. Способ введения – распыление или выпаивание. К внутримышечному введению или закапыванию в глаза прибегают редко. Если вакцину вводят путем выпаивания, необходимо использовать чистую воду с нейтральным показателем pH, без запаха или вкуса хлора и металла. Можно добавить сухое обезжиренное молоко в соотношении 2 г на литр. Необходимо удостовериться в том, что все птицы получили свою дозу вакцины. Для этого за 2-3 часа до подачи воды с вакциной необходимо убрать всю воду (отключить), а также убедиться в том, что в поилках и водопроводных трубах не осталось воды. Можно разделить воду с вакциной на две части, и дать вторую часть через 30 минут после первой.

Живые вакцины против ИББ считаются совместимыми с другими вакцинами для птиц. Однако, вакцины против ИББ, которые вызывают повреждение бursы, могут повлиять на реакцию на другие вакцины. Вакцинируют только здоровых птиц. До использования флаконы с вакциной хранят при температуре от 2°C до 8°C.

## **1.2. Иммунокомплексные вакцины: методы применения**

Для изготовления иммунокомплексных вакцин против инфекционной бурсальной болезни живой инфекционный вирус вакцины против вируса инфекционной бурсальной болезни смешивают с специфическими против вируса ИББ антителами. Такие вакцины можно вводить в инкубаторно-птицеводческих станциях путем инъекции *in ovo* на 18-ый день инкубирования. Яйца продолжают инкубировать, а вакцинный вирус предположительно выходит, когда цыплята достигают 7-14-дневного возраста. В этом случае решается проблема материнских антител к вирусу инфекционной бурсальной болезни, и цыплята получают хороший иммунитет (Haddad *et al.*, 1997). Иммунокомплексные вакцины можно также вводить подкожно в первый день на инкубаторно-птицеводческой станции (Ivan *et al.*, 2005).

## **1.3. Живые рекомбинантные векторные вакцины: методы применения**

Живые рекомбинантные вакцины, которые используют вирусный вектор (герпесвирус индеек) для экспрессии антигена VP2 вируса инфекционной бурсальной болезни у кур была разработана для использования *in-ovo* или в отношении однодневных птиц. В настоящее время они лицензированы во многих странах по всему миру. Документально подтверждена активность на фоне материнских антител к вирусу инфекционной бурсальной болезни, а также совместимость с другими вакцинами против болезни Марека (Le Gros *et al.*, 2009; Lemiere *et al.*, 2011). Образование антител к вирусу инфекционной бурсальной болезни, в результате действия живых рекомбинантных вакцин против вируса ИББ, экспрессирующих белок VP2,

будет включать антитела, направленные только против VP2 (по сравнению с антителами ко всем белкам вируса инфекционной бурсальной болезни, в первую очередь VP2 и VP3, после инфицирования живым вирусом инфекционной бурсальной болезни). В то время как нейтрализующие антитела к белку VP2 уже можно обнаружить с помощью реакции нейтрализации вируса, для обнаружения VP2-специфического гуморального ответа с помощью ИФА может потребоваться специальный набор с повышенной чувствительностью. Поскольку антитела к VP3 отсутствуют у птиц, вакцинированных живой рекомбинантной вакциной против вируса ИББ, но присутствуют у птиц, инфицированных живым вирусом инфекционной бурсальной болезни, совместное проведение ИФА для выявления антиVP2 и антиVP3 специфичных антител позволит реализовать стратегию DIVA (обнаружение инфекции у вакцинированных животных) в отношении птиц, вакцинированных такими рекомбинантными вакцинами (Müller et al., 2012).

#### **1.4. Инактивированные вакцины: способы применения**

Инактивированные вакцины против ИББ в основном используются для продуцирования высоких, длительных и равномерных уровней антител у племенных несушек, которых первоначально вакцинировали живой вакциной или подвергли естественному влиянию полевого вируса во время выведения (Müller et al., 2012). По обычной программе живую вакцину следует вводить примерно на 8 неделе жизни. После этого проводят вакцинацию инактивированной вакциной на 16-20 неделе жизни. Иногда инактивированные вакцины можно использовать в программах, предусматривающих совмещение живых и инактивированных вакцин, в отношении молодых ценных птиц с высокими уровнями материнских антител в тех местностях, где высок риск подверженности вирулентному вирусу ИББ. Инактивированная вакцина производится в виде водно-масляной эмульсии. Ее необходимо вводить каждой птице. Предпочтительный способ введения – внутримышечно в мышцу ноги, избегая областей вблизи суставов, сухожилий или основных кровеносных сосудов, а также подкожно. Можно использовать многодозовый шприц. Необходимо очищать и стерилизовать оборудование между вакцинацией разных стад, а группы, проводящие вакцинацию, должны строго соблюдать правила гигиены при переходе от одного стада к другому. Вакцину хранят при температуре от 2°C до 8°C. Вакцину нельзя замораживать, а также подвергать воздействию яркого освещения и высокой температуры.

Вакцинировать можно только птиц, которых ранее подвергли воздействию вируса ИББ. Если следовать всем вышеизложенным требованиям, вакцина продуцирует настолько сильный гуморальный иммунный ответ, что у цыплят, выведенных от этих родителей, пассивный иммунитет к ИББ будет сохраняться примерно до 30 дня жизни (Wyeth & Cullen, 1979). Этот период покрывает то время, когда особь наиболее восприимчива к болезни, и предотвращает повреждение бурсы, когда оно может привести к подавлению иммунитета. Было доказано, что повреждение бурсы, возникшее позднее 15 дня жизни, оказывает слабое влияние на иммунокомпетентность, поскольку к этому времени иммунокомпетентные клетки перемещаются в периферические лимфоидные ткани. Однако если существует угроза подверженности инфекции очень вирулентным вирусом ИББ, необходимо использовать живую вакцину, как описано выше. Точный уровень и продолжительность иммунитета, полученного в результате

использования инактивированной вакцины против ИББ, будет зависеть в основном от концентрации антигенов в одной дозе. Основная задача производителей, таким образом, заключается в том, чтобы достичь высокой концентрации антигенов и, следовательно, высокой иммуногенности вакцины.

Описаны субъединичные вакцины, в которых инактивированный антиген вируса ИББ, используемый в инактивированных вакцинах, заменен рекомбинантным VP2, экспрессированным либо в бакуловирусной системе, либо в *Escherichia coli*, либо в дрожжах *Pichia pastoris* (Pitcovski *et al.*, 2003). Подобно инактивированным вакцинам, их вводят путем инъекций, а эффективность иммунизации будет высокой при условии i) высокого содержания антигена и ii) при условии использования такой вакцины для бустерной вакцинации птиц, которых уже вакцинировали живой вакциной (Müller *et al.*, 2012).

## **2. План производства и минимальные требования к производству вакцин**

### **2.1. Характеристика посевного материала**

Смотрите также Главу 1.1.8 *Принципы производства ветеринарных вакцин* и Главу 1.1.9 *Исследование биологических материалов на стерильность и свободу от контаминации*.

#### **2.1.1. Биологические характеристики посевного материала**

##### **i) Живые вакцины**

Штаммы вируса, используемые для производства живой вакцины против вируса инфекционной бурсальной болезни, иногда называют “слабый”, “средний” или “средний плюс”/ “инвазивный” (“сильный”), в зависимости от их способности реплицировать на фоне возрастающего количества остаточных материнских антител к вирусу инфекционной бурсальной болезни. Сообразно усилению реплицирующей способности наименее аттенуированных вакцинных штаммов данные штаммы, индуцированные вакциной, приводят к более тяжелым поражениям бursы (микроскопические поражения и уменьшенный размер) и могут продемонстрировать некоторые остаточные иммуносупрессивные характеристики (Смотрите Раздел С.2.1.3 *Валидация в качестве вакцинного штамма*).

##### **ii) Инактивированные вакцины**

Сообщается о подтипах серотипа 1 вируса ИББ, и было доказано, что для защиты с помощью инактивированного вируса от одного подтипа необходим либо гомологичный антиген, либо высокое содержание антигена. Как результат, информация, касающаяся подтипа штамма, используемого в качестве антигена в инактивированной вакцине, может оказаться полезной.

## 2.1.2 Критерии качества

### i) Чистота

В посевном вирусе не должно содержаться инородных вирусов, бактерий, микоплазм и грибков, особенно патогенов птиц. Он также должен быть свободен от контаминации другими штаммами вируса ИББ.

### ii) Отсутствие у живых вакцин возможности возврата к вирулентности

Для аттенуированных вакцинных штаммов с ограниченными иммуносупрессивными характеристиками посевной вирус должен быть стабильным, без тенденции возврата к вирулентности. Это можно подтвердить путем проведения пассажей в 5 группах СПФ-цыплят с интервалом в 3-4 дня, используя суспензию, приготовленную из бursы, в качестве инокулята на СПФ цыплятах в самом раннем рекомендуемом для вакцинации возрасте. Необходимо показать, что вирус передался: если пассируемый вирус не обнаруживается на соответствующем уровне – необходимо повторить проведение пассажа, используя группу из 10 цыплят. Затем необходимо провести гистологическое сравнение, чтобы показать, что никакой разницы между бурсой птиц, инокулированных материалом первичного и конечного пассажей, нет. Разработаны методы оценки бursы (Muskett *et al.*, 1979) и построения изображения.

## 2.1.3. Валидация в качестве вакцинного штамма

### i) Живая вакцина

Валидация штамма ИББ в качестве живой вакцины требует оценки его безвредности, иммуносупрессивного потенциала, отсутствия возможности возврата данного штамма к вирулентности, а также его иммуногенности.

Исследование на безвредность можно провести несколькими способами. Некоторые страны рекомендуют вакцинировать СПФ-цыплят в самом раннем рекомендуемом для вакцинации возрасте, используя высокую дозу (как правило, десятикратную) наименее аттенуированной вакцины, и затем, после вакцинации, проверить их на отсутствие признаков и наличие умеренных, временных поражений бursы. Сообщения, подтверждающие безвредность вакцины против вируса ИББ в отношении нецелевых видов, отсутствуют.

Важной характеристикой, подлежащей оценке, является иммуносупрессивный потенциал. Вакцинный вирус не должен продуцировать такое повреждение бursы Фабрициуса, которое бы вызвало иммуносупрессию у восприимчивых птиц. Живые вакцины типа “средний” и “средний плюс” могут быть лицензированы, даже не смотря на то, что они могут вызывать



иммуносупрессию. Возможный протокол для экспериментальной оценки иммуносупрессии выглядит следующим образом: десяти 1-дневным СПФ-цыплятам вводят по одной полевой дозе вакцины против вируса ИББ методом инъекции или закапывания в глаза. Две другие группы, состоящие из десяти птиц такого же возраста и из того же источника, содержат отдельно в качестве контролей. На второй неделе жизни каждой птице из группы, вакцинированной против ИББ, и из одной контрольной группы дают по одной полевой дозе вакцины против болезни Ньюкасла путем закапывания в глаза. В качестве альтернативы можно ввести вакцину против вируса ИББ в минимально допустимом для вакцинации возрасте и вакцину против болезни Ньюкасла в то время, когда поражения бursы, индуцированные вакциной против вируса ИББ, максимальны. Ответ каждой птицы на вакцину против болезни Ньюкасла измеряют с помощью реакции торможения гемагглютинации (НТ) через 2 недели после введения вакцины против болезни Ньюкасла, а иммунитет измеряют против контрольного заражения  $10^{5.0} - 10^{6.5}$  ELD<sub>50</sub> (50% летальная доза для эмбриона) штаммом Herts 33/56 (или подобным) вируса болезни Ньюкасла (вторую контрольную группу, которую не вакцинировали против вируса ИББ или вируса болезни Ньюкасла, используют на данном этапе для валидации степени тяжести последствий, вызванных контрольным заражением вирусом болезни Ньюкасла). Вакцина против ИББ не проходит тестирование в случае, если реакция торможения гемагглютинации и иммунитет, полученный благодаря вакцине против болезни Ньюкасла, в группе, которой ввели вакцину против ИББ, значительно ниже, чем в контрольной группе. В странах, где вирус болезни Ньюкасла является экзотическим, в качестве альтернативы можно использовать эритроциты овцы или инактивированный *Brucella abortus* антиген в качестве опытного антигена, а ответ измерять с помощью реакции гемагглютинации или реакция агглютинации сыворотки, соответственно. Однако использование другой живой вакцины является предпочтительным методом исследования, поскольку он позволяет также оценить иммунитет, опосредованный клетками.

Отсутствие у вакцинного штамма потенциала возврата к вирулентности можно оценить, как описано (смотрите Раздел С.2.1.2.ii *Отсутствие у живых вакцин возможности возврата к вирулентности*).

а) Иммуногенность

Вакцину необходимо вводить птицам тем же способом, который будет использоваться в полевых условиях. Живую вакцину можно использовать в отношении молодых птиц, а реакцию измерять с помощью серологических методов и путем исследования резистентности к экспериментальному контрольному заражению: одну вакцинную дозу, содержащую

минимальный рекомендуемый титр, вводят каждому из 20 СПФ-цыплят минимального рекомендуемого для вакцинации возраста. Разным группам вводят вакцину разными способами. 20 цыплят из того же выводка оставляют в качестве контролей. Через 14 дней проводят контрольное заражение цыплят путем закапывания в глаза вакцины, содержащей примерно 100  $CI_{D50}$  (50% инфицирующая доза для кур) вирулентного штамма вируса ИББ, как рекомендует одна из Референтных лабораторий МЭБ по ИББ<sup>4</sup>. Цыплят наблюдают в течение 10 дней. Регистрируют количество погибшей птицы, а также птиц с признаками ИББ. Проводят гистологические исследование бурсы, полученной от цыплят, выживших на 10 день. Вакцина не проходит испытание, если выживает менее 90% вакцинированных цыплят и если у них наблюдаются клинические признаки или серьезные поражения бурсы Фабрициуса в конце периода наблюдения. Тестирование считается недействительным, если более половины контролей не показывают признаков ИББ, или хотя бы один контроль не показывает серьезных повреждений бурсы Фабрициуса, или контрольные/инокулированные птицы погибают по причинам, не связанным с испытанием. Поражения считаются тяжелыми, если как минимум 90% фолликулов демонстрирует истощение лимфоцитов более, чем на 75%, либо если как минимум 51% фолликулов бурсы имеют гистопатологический балл 3 и более в соответствии с Европейской Фармакопеей (2014).

ii) Инактивированная вакцина

Валидация инактивированных вакцин против вируса ИББ требует оценки их безвредности и иммуногенности.

Безопасность инактивированной вакцины проверяется для всех рекомендуемых путей введения с помощью партии вакцины, активность которой не ниже максимальной активности будущих коммерческих партий. Одну дозу или двойную дозу (для обеспечения максимальной активности) вакцины вводят отрицательным к специфическим антителам или СПФ цыплятам. Вакцинированную птицу в течение 14 дней проверяют на наличие клинических признаков. Вакцина проходит испытание, если клинические признаки не наблюдаются, и в течение периода наблюдения не было случаев гибели, связанных с использованием вакцины. Исследование считается недействительным, если возникают случаи неспецифической гибели.

Эффективность инактивированных вакцин против ИББ оценивают на птице более старшего возраста, когда они могут откладывать яйца, следуя рекомендуемой схеме вакцинации; таким образом, их потомство можно подвергнуть контрольному заражению для установления их резистентности по причине наличия материнских антител в начале и в конце яйцекладки.

---

<sup>4</sup> Смотрите Таблицу, представленную в Части 4 данного Руководства по наземным животным.

Как минимум 20 непримированным СПФ цыплятам вводят одну дозу вакцины в рекомендуемом возрасте (ближе к началу яйцекладки) как минимум одним из способов; в качестве альтернативы можно протестировать по одной дозе вакцины каждым из рекомендуемых способов, указанных на этикетке, используя для каждого способа введения по 20 непримированных СПФ цыплят. Гуморальный ответ измеряют в промежутке между 4 и 6 неделями после вакцинации с помощью нейтрализации сыворотки по отношению к стандартной антисыворотке<sup>5</sup>.

Яйца для выведения собирают через 5-7 недель после вакцинации, и затем проводят контрольное заражение 25 цыплят из потомства на 3 неделе их жизни путем закапывания в глаза примерно 100  $CI_{D50}$  признанного вирулентного штамма вируса ИББ. Также проводят контрольное заражение десяти контрольных цыплят той же породы, но полученных от не вакцинированных родителей. Уровень иммунитета оценивают через 3-4 дня после контрольного заражения путем удаления бурсы Фабрициуса из каждой птицы; проводят гистологическое исследование каждой бурсы или исследуют их на наличие антигена ИББ с помощью реакции преципитации в агаровом геле. Признаки инфицирования ИББ должны проявиться не более, чем у трех цыплят от вакцинированных родителей, и у всех цыплят от не вакцинированных родителей.

Данные процедуры повторяют ближе к концу периода яйцекладки, когда возраст вакцинированных птиц составляет, как минимум, 60 недель, но в этом случае контрольное заражение потомства должно проходить в возрасте 15 дней.

Если планируется использовать инактивированную вакцину в качестве бустерной после примирования – испытание на эффективность необходимо повторить на примированных птицах, вакцинированных в соответствии с рекомендованной схемой. Последняя доза убитой вакцины вводится в самом раннем рекомендуемом возрасте. Цыплят, выведенных из фертильных яиц, собранных в начале и в конце периода яйцекладки, проверяют на иммунитет против контрольного заражения методом, описанным выше.

## **2.2. Методы производства**

### **2.2.1. Процедура**

Посевной вирус можно размножать в различных системах культур, таких как фибробласты эмбрионов СПФ цыплят или куриные эмбрионы. В некоторых случаях размножение можно проводить в бурсе. Массу разделяют на аликвоты и лиофилизируют в герметически закупоренных контейнерах. Существуют заявления о том, что иммуногенность вакцин, полученных с использованием

---

<sup>5</sup> Смотрите сноску 2.

бурсы, выше, чем у вакцин, полученных с помощью культуры ткани. В ходе изучения данного вопроса пришли к выводу, что оба типа вируса, при одинаковом количестве антигенов инактивированных вакцинах, вызывали одинаковые иммунные реакции; таким образом, желательнее стандартизировать количество антигенов в инактивированных вакцинах (Maas *et al.*, 2004).

Вакцину производят в подходящем чистом и безопасном помещении, отделенном от диагностических помещений или помещений, где содержится коммерческая птица.

Производство вакцины должно быть основано на серии посевного материала с использованием подходящего штамма вируса известного происхождения и с известной историей пассажей. Живые вакцины производят путем выращивания в яйцах или культурах клеток. Инактивированные вакцины против ИББ можно производить путем выращивания вирулентного вируса в бурсе молодых птиц или с помощью аттенуированных, адаптированных в лабораторных условиях штаммов вируса ИББ, выращенных в культуре клеток или в эмбриональных яйцах. Требуется высокая концентрация вируса. Инактивированные вакцины можно производить в виде эмульсий различного вида. Обычно водно-масляная эмульсия состоит из 80% минерального масла, 20% суспензии материала бурсы в воде с добавлением подходящих эмульгирующих веществ, хотя существуют также вакцины, приготовленные в виде двойных эмульсий или микроэмульсий.

## **2.2.2. Требования к ингредиентам**

### **i) Ингредиенты животного происхождения**

Все ингредиенты животного происхождения, включая сыворотку и клетки, должны пройти проверку на наличие жизнеспособных бактерий, вирусов, грибов и микоплазм. Ингредиенты животного происхождения должны быть получены из страны с незначительным риском губкообразной энцефалопатии КРС (ГЭ КРС).

Для размножения вируса и тестирования вакцины можно использовать только СПФ-яйца.

### **ii) Консерванты**

Для вакцин, фасуемых в многодозовые контейнеры, может потребоваться добавление консервантов. Необходимо провести проверку концентрации консерванта в конечной вакцине и ее эффективность до окончания срока годности. Необходимо использовать консерванты, которые разработаны специально для данной цели.

## **2.2.3. Контроль в процессе производства**

### **i) Содержание антигена**

Вирус выращивают до высокой концентрации, а его титр исследуют, используя культуры клеток, эмбрионов или цыплят, в соответствии с

используемым штаммом. Количество антигена, необходимое для производства удовлетворительных партий вакцины, должно быть основано на результатах определения тестовой вакцины, которая показала свою эффективность в лабораторных и полевых испытаниях.

#### ii) Инактивация инаktivированных вакцин

Данную процедуру часто проводят с помощью  $\beta$ -пропиолактона или формалина. Инаktivирующий агент и процедура инаktivации должны происходить таким образом, чтобы производитель вакцины мог инаktivировать вакцинный вирус и исключить возможность контаминации, например, бактериями, которые могут появиться из исходного материала.

До инаktivации необходимо убедиться в том, что гомогенная суспензия свободна от частиц, в которые не может проникнуть инаktivирующий агент. Тестирование на инаktivацию необходимо проводить для каждой партии как при сборе клеток после инаktivации, так и при получении конечного продукта. В качестве альтернативы, можно протестировать инаktivацию только при сборе клеток после инаktivации или только при получении конечного продукта. Выбранный метод тестирования должен соответствовать используемому вакцинному вирусу и должен включать как минимум два пассажа в восприимчивой культуре клеток, эмбрионах или цыплятах, с десятью повторами на один пассаж. Не должно наблюдаться наличие каких-либо живых вирусов или микроорганизмов.

#### iii) Стерильность инаktivированных вакцин

Масло, используемое в вакцине, необходимо стерилизовать нагреванием до 160°C в течение 1 часа или путем фильтрации; необходимо показать эффективность процедуры. Исследования, подходящие для масляно-эмульсионных вакцин, проводят в отношении каждой партии конечной вакцины, как описано, например, в Европейской фармакопее (2014) или в разделе 9 Кодекса нормативных актов федеральных органов исполнительной власти США (9-CFR), часть 113.26.

### 2.2.4. Тестирование партии конечного продукта

#### а) Тестирование живой вакцины на безопасность

Десять полевых доз вакцины вводят путем закапывания в глаза каждому из 15 СПФ-цыплят в минимальном рекомендуемом для вакцинации возрасте, но не старше двух недель. За цыплятами наблюдают в течение 21 дня. Если более двух цыплят погибают по причинам, не связанным с использованием вакцины, испытание необходимо повторить. Вакцина не проходит испытание, если хотя бы один цыпленок погибает или демонстрирует признаки в результате использования вакцины. Тестированию подвергается каждая партия конечной вакцины, если только контроли на более ранних стадиях производства, дополненные соблюдением принципов

GMP, не гарантируют безопасность всего процесса. В качестве альтернативы испытания на безопасность можно провести, как это описано в 9-CFR 113.212(d)(1) и 113.331(d)(2).

**b) Посторонние вещества в инактивированных вакцинах**

10-21 СПФ-птиц в возрасте 14-28 дней инокулируют рекомендованной дозой или двойной полевой дозой рекомендуемым способом. За птицами наблюдают в течение 3 недель. Не должно развиваться никаких аномальных локальных или системных реакций. Не должно быть антигенов против каких-либо других птичьих патогенов, за исключением вакцинного антигена. Тестированию подвергается каждая партия конечной вакцины, если только контроли на более ранних стадиях производства, дополненные соблюдением принципов GMP, не гарантируют безопасность всего процесса.

**iv) Остаточная живая вакцина в инактивированных вакцинах**

Процесс, описанный в Разделе *С.2.2.3 Контроли в процессе производства* можно проводить в отношении каждой партии конечного продукта.

**v) Иммуногенность**

**a) Тестирование живой вакцины на иммуногенность**

Испытание на иммуногенность (титрация вируса) в яйцах или культуре клеток следует проводить для каждой серии произведенной вакцины.

Кроме того, метод, описанный в Разделе *С. 2.1.3.i.a Иммуногенность*, должен быть использован в отношении одного образца от каждой партии, изготовленной из одного и того же посевного материала, с удовлетворительными результатами.

**b) Испытание инактивированной вакцины на иммуногенность**

Каждого из десяти СПФ-цыплят, примерно 4-недельного возраста, вакцинируют одной дозой вакцины рекомендуемым способом. Десять других контрольных птиц из того же источника и того же возраста держат вместе с вакцинированными. Реакцию антител каждой птицы определяют через 4-6 недель после вакцинации с помощью реакции вирус нейтрализации со ссылкой на стандартную антисыворотку. Средний уровень антител у вакцинированных птиц не должен быть значительно ниже уровня, зафиксированного в ходе испытания на иммуногенность (смотрите Раздел *С. 2.1.3.ii.a Иммуногенность*). У контрольных птиц не должно наблюдаться антител. Данное испытание необходимо проводить для каждой серии конечной вакцины. В качестве альтернативы можно провести тест на иммуногенную эффективность вакцины (9-CFR 113.212(d)(2)).

**2.3. Требования к авторизации/регистрации/лицензированию**

**2.3.1. Процесс производства**

Для регистрации вакцины необходимо предоставить в компетентные органы все необходимые данные, касающиеся производства вакцины и контроля качества (Смотрите Раздел С.2.1 *Характеристики посевного материала* и С.2.2 *Методы производства*). Такие данные должны быть предоставлены в отношении трех последовательных партий, объем которых должен составлять не менее 1/3 объема обычной производственной партии.

### 2.3.2. Требования к безопасности

#### i) Безопасность целевых и нецелевых видов животных

Живые аттенуированные вакцины против ИББ с высокой способностью к репликации и потенциалом индуцировать истощение лимфоидной ткани в бурсе обычно лицензируют для использования в отношении животных с высокими титрами материнских антивирусных (ИББ) антител в хозяйствах, подверженных высокому давлению инфекций высокопатогенными вирусами. Данная информация, при необходимости, должна быть отражена в инструкциях по применению вакцины.

До сих пор не задокументировано взаимодействие вакцин против ИББ с нецелевыми видами птиц. Информация об отрицательном воздействии на нецелевые виды животных должна быть представлена в инструкции по применению вакцины.

#### ii) Возврат к вирулентности аттенуированных/живых вакцин и воздействие на окружающую среду

Перед лицензированием крайне важно провести оценку потенциала живых вакцин против ИББ возвращаться к вирулентности (Смотрите Раздел С.2.1.2.ii выше).

Касательно воздействия на окружающую среду, при лицензировании следует учитывать знания о том, какие штаммы вируса ИББ циркулируют в местности, где будет использоваться лицензируемая вакцина, поскольку такие знания могут помочь при: i) выборе вакцин, подходящих для контроля данных штаммов и ii) принятии решения относительно обоснованности включения аттенуированного вакцинного штамма вируса ИББ, который может сильно отличаться от местных штаммов вируса ИББ.

#### iii) Меры предосторожности (факторы риска)

Масляно-эмульсионные вакцины могут причинить серьезный вред здоровью вакцинируемого при случайном введении в руку или другие ткани. В случае возникновения такой ситуации необходимо незамедлительно обратиться в больницу, взяв с собой упаковку от вакцины. Каждый флакон и упаковка должны содержать четкое предостережение о возникновении серьезных последствий в случае непреднамеренного причинения себе вреда. Такие раны обрабатываются врачом, который работает с несчастными случаями, как “травма от шприца для смазки”.

### **2.3.3. Требования к эффективности**

Испытания, схемы контрольного заражения и критерии оценки эффективности вакцин против ИББ описаны в Разделах С.2.1.3.ш Живые вакцины и С.2.1.3.шш Инактивированные вакцины. При оценке эффективности модели контрольного заражения вирусом ИББ рекомендуется выбрать такой вирус, который бы представлял актуальные штаммы вируса ИББ, циркулирующие в местности, где будет использоваться лицензируемая вакцина.

### **2.3.4. Вакцины, позволяющие проведение стратегии DIVA**

Среди вакцин, имеющих в настоящее время в продаже, при реализации стратегии DIVA можно использовать живые рекомбинантные векторные вакцины, экспрессирующие белок VP2 вируса ИББ, и субъединичные вакцины, содержащие белок VP2 в качестве единственного антигена вируса ИББ. У цыплят, вакцинированных такими вакцинами, будут вырабатываться только анти-VP2 антитела, в то время у птиц, зараженных вирусом ИББ будет наблюдаться более обширный ответ антител, направленный на все антигены вируса ИББ, включая белок VP3 (рибонуклеопротеин вируса ИББ). На основании наличия только анти-VP2 антител или анти-VP2 и VP3-антител теоретически можно дифференцировать птиц, которые были вакцинированы только такой вакциной и инфицированных птиц. Однако реализация стратегии DIVA требует проведения ИФА, который позволяет провести дифференциальное исследование данных двух типов гуморального иммунного ответа. Несмотря на то что коммерческие ИФА могут показывать различную чувствительность к данным двум типам антител, о валидации коммерческих исследований для данных целей в научной литературе не говорится.

### **2.3.5 Продолжительность иммунитета**

Как указано выше (смотрите Раздел С.2.1.3.ii Инактивированные вакцины), повторная оценка эффективности инактивированных вакцин в отношении племенных птиц сразу после начала и в самом конце периода яйцекладки может помочь при оценке необходимости проведения бустерной вакцинации в период яйцекладки для обеспечения потомства более длительным иммунитетом.

### **2.3.6 Стабильность**

В отношении трех партий вакцины необходимо представить доказательство того, что вакцина прошла испытание партии на иммуногенность при требуемом сроке годности или, в качестве альтернативы, спустя 3 месяца после его окончания.



## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

AMERICAN ASSOCIATION OF AVIAN PATHOLOGISTS (2008). Chapter 43. In: Laboratory Manual for the Isolation and Identification of Avian Pathogens, Fifth Edition. AAAP, University of Pennsylvania, New Bolton Center, Kenneth Square, PA 19348-1692, USA.

ASHRAF S., ABDEL-ALIM G. & SAIF Y.M. (2006). Detection of antibodies against serotypes 1 and 2 infectious bursal disease virus by commercial ELISA kits. *Avian Dis.*, 50, 104–109.

BLOCK H., MEYER-BLOCK K., REBESKI D.E., SCHARR H., DE WIT S., ROHN K. & RAUTENSCHLEIN S. (2007). 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 Pathol.*, 36, 401–409.

BROWN M.D., GREEN P. & SKINNER M.A. (1994). VP2 sequences of recent European „very virulent“ isolates of infectious bursal disease virus are closely related to each other but are distinct from those of „classical strains“. *J. Gen. Virol.*, 75, 675–680.

BOOT H.J., TER HUURNE A.A., HOEKMAN A.J., PEETERS B.P., & GIELKENS A.L. (2000). Rescue of very virulent and mosaic infectious bursal disease virus from cloned cDNA: VP2 is not the sole determinant of the very virulent phenotype. *J. Virol.*, 74, 6701–6711.

COULIBALY F., CHEVALIER C., GUTSCHE I., POUS J., NAVAZA J. BRESSANELLI S., DELMAS B. & REY F.A. (2005) The birnavirus crystal structure reveals structural relationships among icosahedral viruses. *Cell*, 120, 761–772.

CULLEN G.A. & WYETH P.J. (1975). Quantitation of antibodies to infectious bursal disease. *Vet. Rec.*, 97, 315. DE WIT J.J., VAN DE SANDE H.W., COUNOTTE G.H. & WELLENBERG G.J. (2007) Analyses of the results of different test systems in the 2005 global proficiency testing schemes for infectious bursal disease virus and Newcastle disease virus antibody detection in chicken serum. *Avian Pathol.*, 36, 177–183.

ESCAFFRE O., LE NOUËN C., AMELOT M., AMBROGGIO X., OGDEN K.M., GUIONIE O., TOQUIN D., MÜLLER H., ISLAM M.R. & ETERRADOSSI N. (2013). Both genome segments contribute to the pathogenicity of very virulent infectious bursal disease virus. *J. Virol.*, 87, 2767–2780.

ETERRADOSSI N., ARNAULD C., TEKAIA F., TOQUIN D., LE COQ H., RIVALLAN G., GUITTET M., DOMENECH J., VAN DEN BERG T.P. & SKINNER M.A. (1999). Antigenic and genetic relationships between European very virulent infectious bursal disease viruses and an early West African isolate. *Avian Pathol.*, 28, 36–46.

ETERRADOSSI N., ARNAULD C., TOQUIN D. & RIVALLAN G. (1998). Critical amino acid changes in VP2 variable domain are associated with typical and atypical antigenicity in very virulent infectious bursal disease viruses. *Arch. Virol.*, 143, 1627–1636.

ETERRADOSSI N. & SAIF Y.M. (2013). Chapter 7: Infectious bursal disease. In: Diseases of Poultry, 13th Edition, Editor in chief D.E. Swayne, John Wiley & Sons Inc., Ames, Iowa, USA, pp 219–246.

EUROPEAN PHARMACOPOEIA 8.2. (2014). European Directorate for the Quality of Medicines and Health Care (EDQM), Council of Europe, Strasbourg, France. Available online at <http://online.edqm.eu/>.

- HADDAD E.E., WHITFILL C.E., AVAKIAN A.P., RICKS C.A., ANDREWS P.D., THOMA J.A. & WAKENELL P.S. (1997). Efficacy of a novel infectious bursal disease virus immune complex vaccine in broiler chickens. *Avian Dis.*, 41, 882–889.
- IVÁN J., VELHNER M., URSU K., GERMAN P., MATÓ T., DRÉN C.N. & MÉSZÁROS J. (2005). 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. *Can. J. Vet. Res.*, 69, 135–142.
- JACKWOOD D.H. & SAIF Y.M. (1987). Antigenic diversity of infectious bursal disease viruses. *Avian Dis.*, 31, 766–770.
- JACKWOOD D.J., SOMMER-WAGNER S.E., CROSSLEY B.M., STOUTE S.T., WOOLCOCK P.R. & CHARLTON B.R. (2011). Identification and pathogenicity of a natural reassortant between a very virulent serotype 1 infectious bursal disease virus (IBDV) and a serotype 2 IBDV. *Virology*, 420, 98–105.
- KREIDER D.L., SKEELES J.K., PARSLEY M., NEWBERRY L.A. & STORY J.D. (1991). Variability in a commercially available enzyme-linked immunosorbent assay system. II Laboratory variability. *Avian Dis.*, 35, 288–293.
- LE GROS F.X., DANCER A., GIACOMINI C., PIZZONI L., BUBLLOT M., GRAZIANI M. & PRANDINI F. (2009) Field efficacy trial of a novel HVT-IBD vector vaccine for 1-day-old broilers. *Vaccine*, 27, 592–596.
- LE NOUËN C., RIVALLAN G., TOQUIN D., DARLU P., MORIN Y., BEVEN V., DE BOISSESON C., CAZABAN C., COMTE S., GARDIN Y. & ETERRADOSSI N. (2006). Very virulent infectious bursal disease virus: reduced pathogenicity in a rare natural segment B-reassorted isolate. *J. Gen. Virol.*, 87, 209–216.
- LEMIERE S., WONG S.Y., SAINT-GERAND A.L., GOUTEBROZE S. & LE GROS F.X. (2011). Compatibility of turkey herpesvirus-infectious bursal disease vector vaccine with Marek's disease respens vaccine injected into day-old pullets. *Avian Dis.*, 55, 113–118.
- LIN Z., KATO A., OTAKI Y., NAKAMURA T., SASMAZ E. & UEDA S. (1993). Sequence comparisons of a highly virulent infectious bursal disease virus prevalent in Japan. *Avian Dis.*, 37, 315–323.
- MAAS R., VENEMA S., KANT A., OEI H. & CLAASSEN I. (2004). Quantification of infectious bursal disease viral proteins 2 and 3 in inactivated vaccines as an indicator of serological response and measure of potency. *Avian Pathol.*, 33 (2), 126–132.
- MARQUARDT W.W., JOHNSON R.B., ODENWALD W.F. & SCHLOTTHOBER B.A. (1980). An indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for measuring antibodies in chickens infected with infectious bursal disease virus. *Avian Dis.*, 24, 375–385.
- MEULEMANS G., ANTOINE O. & HALEN P. (1977). Application de l'immunofluorescence au diagnostic de la Maladie de Gumboro. *OIE Bull.*, 88, 225–229.
- MÜLLER H., MUNDT E., ETERRADOSSI N. & ISLAM M.R. (2012) Review: current status of vaccines against infectious bursal disease. *Avian Pathol.*, 41, 133–139.
- MUNDT E. (1999). Tissue culture infectivity of different strains of infectious bursal disease virus is determined by distinct amino acids in VP2. *J. Gen. Virol.*, 80, 2067–2076.

MUSKETT J.C., HOPKINS I.G., EDWARDS K.R. & THORNTON D.H. (1979). Comparison of two infectious bursal disease vaccine strains: Efficacy and potential hazards in susceptible and maternally immune birds. *Vet. Rec.*, 104, 332–334.

PITCOVSKI J., GUTTER B., GALLILI G., GOLDWAY M., PERELMAN B., GROSS G., KRISPEL S., BARBAKOV M. & MICHAEL A. (2003). Development and large-scale use of recombinant VP2 vaccine for the prevention of infectious bursal disease of chickens. *Vaccine*, 21, 4736–4743.

ROSENBERGER J.K. & CLOUD S.S. (1986). Isolation and characterization of variant infectious bursal disease viruses. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 189, 357.

ROSENBERGER J.K., KLOPP S., ECKROADE R.J. & KRAUSS W.C. (1975). The role of the infectious bursal agent and several adenoviruses in the hemorrhagic-aplastic-anaemia syndrome and gangrenous dermatitis. *Avian Dis.*, 19, 717–729.

SCHNITZLER D., BERNSTEIN F., MÜLLER H. & BECHT H. (1993). The genetic basis for the antigenicity of the VP2 protein of the infectious bursal disease virus. *J. Gen. Virol.*, 74, 1563–1571.

SKEELES J.K., LUKERT P.D., FLETCHER O.J. & LEONARD J.D. (1979). Immunisation studies with a cell-culture-adapted infectious bursal virus. *Avian Dis.*, 23, 456–465.

SMILEY J.R., SOMMER S.E. & JACKWOOD D.J. (1999). Development of an ssRNA internal control reagent for an infectious bursal disease virus reverse transcription/polymerase chain reaction – restriction fragment length polymorphism diagnostic assay. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 11, 497–504.

SNYDER D.B., LANA D.P., SAVAGE P.K., YANCEY F.S., MENGEL S.A. & MARQUARDT W.W. (1988). Differentiation of infectious bursal disease viruses directly from infected tissues with neutralizing monoclonal antibodies: Evidence for a major antigenic shift in recent field isolates. *Avian Dis.*, 32, 535–539.

SNYDER D.B., VAKHARIA V.N. & SAVAGE P.K. (1992). Naturally occurring neutralizing monoclonal antibody escape variants define the epidemiology of infectious bursal disease viruses in the United States. *Arch. Virol.*, 127, 89–101.

UNITED STATES CODE OF FEDERAL REGULATIONS, TITLE 9, PART 113 (AVAILABLE ON LINE).

VAKHARIA V.N., HE J., AHAMED B. & SNYDER D.B. (1994). Molecular basis of antigenic variation in infectious bursal disease virus. *Virus Res.*, 31, 265–273.

VAN DEN BERG T.P., GONZE M., MORALES D. & MEULEMANS G. (1996). Acute infectious bursal disease in poultry: immunological and molecular basis of antigenicity of a highly virulent strain. *Avian Pathol.*, 25, 751–768.

VAN DEN BERG T.P. & MEULEMANS G. (1991). Acute infectious bursal disease in poultry: protection afforded by maternally derived antibodies and interference with live vaccination. *Avian Pathol.*, 20, 409–421.

WEI Y., YU X., ZHENG J., CHU W., XU H., YU X. & YU L. (2008). Reassortant infectious bursal disease virus isolated in China. *Virus Res.*, 131, 279–282.

WU C.C., LIN T.L., ZHANG H.G., DAVIS V.S. & BOYLE J.A. (1992). Molecular detection of infectious bursal disease virus by polymerase chain reaction. *Avian Dis.*, 36, 221–226.

WU C.C., RUBINELLI P. & LIN T.L. (2007). Molecular detection and differentiation of infectious bursal disease virus. *Avian Dis.*, 51, 515–526.

WYETH P.J. & CULLEN G.A. (1979). The use of an inactivated infectious bursal disease oil emulsion vaccine in commercial broiler parent chickens. *Vet. Rec.*, 104, 188–193.

\*

\* \*

**NB:** Существуют Референтные лаборатории МЭБ по инфекционной бурсальной болезни (болезни Гамборо)

(смотрите Таблицу в Части 4 данного *Руководства по наземным животным* или найдите наиболее актуальный список на веб-сайте МЭБ:

<http://www.oie.int/en/our-scientific-expertise/reference-laboratories/list-of-laboratories/>  
<http://www.oie.int/>).

Для получения более подробной информации о диагностических тестах, реагентах и вакцинах против инфекционной бурсальной болезни (болезни Гамборо), пожалуйста, свяжитесь с Референтной лабораторией МЭБ