

ГЛАВА 3. 3. 2.

ИНФЕКЦИОННЫЙ БРОНХИТ КУР

РЕЗЮМЕ

Инфекционный бронхит кур (ИБК) вызывается гаммакоронавирусом инфекционного бронхита (ВИБК). Вирус вызывает заражения главным образом у кур и является значимым патогеном коммерческой птицы мясного и яичного направления. Инфекционный бронхит – это острая контагиозная болезнь, которой свойственны, прежде всего, респираторные признаки у цыплят на выращивании. У несушек часто наблюдают снижение яйценоскости и ухудшение качества яиц. Некоторые штаммы вируса являются нефропатогенными, продуцируют интерстициальный нефрит и приводят к смертности. Тяжесть индуцируемой вирусом инфекционного бронхита респираторной болезни усугубляется присутствием других патогенов, включая бактерии, ведущих к хроническому осложненному аэросаккулиту. Диагностика инфекционного бронхита требует выделения вируса или вирусной нуклеиновой кислоты в пораженных стадах. Полезной может быть также демонстрация возрастающего ответа сывороточных антител. Широко распространенное применение живых и инактивированных вакцин может осложнить и интерпретацию результатов выделения вируса, и толкование результатов серологических исследований. Появление антигенных вариантных штаммов может ослабить индуцируемый вакцинацией иммунитет.

Диагностика требует лабораторного тестирования. Предпочтение отдается выделению вируса и идентификации. Обычно для идентификации генотипа вируса инфекционного бронхита используется полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР). Часто с целью серодиагностики и/или мониторинга для определения серотипа применяют реакции торможения гемагглютинации (РТГА) (для молодняка) и твердофазный иммуноферментный анализ (ИФА). К дополнительным тестам относятся электронная микроскопия, использование моноклональных антител, реакция вируснейтрализации, иммуногистохимические или иммунофлуоресцентные реакции и опыты на цыплятах по иммунизации-контрольному заражению.

Идентификация возбудителя: *При обычной респираторной форме вирус инфекционного бронхита наиболее успешно выделяют из слизистых трахеи и легких в период от нескольких дней до одной недели после заражения. При других формах инфекционного бронхита лучшими источниками вируса в зависимости от патогенеза болезни являются почки, яйцеводы, скопления лимфоидной ткани в расширенной части стенки слепой кишки кишечного тракта или ткани железистого желудка.*

Для выделения вируса можно использовать куриные эмбрионы, свободные от специфических патогенов, или трахеальные органнне культуры (ТОК) из эмбрионов. После прививки в аллантоисную полость вирус инфекционного бронхита кур продуцирует замедление роста эмбриона, его закручивание, сваливание пуха, или отложение соли мочевой кислоты в мезонефросе почек, обычно в течение трех серийных пассажей. Метод выделения в трахеальных органнне культурах обладает преимуществом, которое заключается в том, что вирус инфекционного бронхита продуцирует остановку роста трахеальных ресничек при первоначальной инокуляции. ОТ-ПЦР все шире используется

для идентификации генотипа гликопротеинового шипа (S) полевых штаммов вируса инфекционного бронхита. Генотипирование с использованием праймеров, специфичных для субъединицы S1 гена S, или секвенирование того же гена дает схожие, но не всегда идентичные результаты при серотипировании с применением реакции торможения гемагглютинации или реакции вируснейтрализации. Альтернативным образом для идентификации серотипа могут применяться реакции вируснейтрализации или торможения гемагглютинации с использованием специфической антисыворотки.

Серологические тесты: Для мониторинга ответов сывороточных антител можно применять коммерческие наборы ИФА. Используемые в наборах антигены являются в широком смысле перекрестно реагирующими среди серотипов и позволяют проводить общий серологический мониторинг связанных с вакцинацией ответных реакций и контрольных заражений в полевых условиях. Реакция торможения гемагглютинации используется для идентификации серотип-специфических ответов на вакцинацию и контрольные заражения в полевых условиях, особенно у молодых кур на выращивании. По причине многочисленных инфекций и вакцинаций сыворотки племенной птицы и несушек содержат перекрестно реагирующие антитела, и результаты реакции торможения гемагглютинации не могут использоваться с высокой степенью достоверности.

Требования к вакцинам: Имеются и живые аттенуированные, и эмульсионно-масляные инактивированные вакцины. Живые вакцины, аттенуированные серийным пассажем в куриных эмбрионах или путем термической обработки, обеспечивают более надежный местный иммунитет дыхательных путей по сравнению с инактивированными вакцинами. Применение живых вакцин несет риск остаточной патогенности, ассоциированной с обратным пассажем вакцины в стадах. Однако при правильном массовом применении живые вакцины не представляют опасности.

Инактивированные вакцины вводятся путем инъекции, и одна прививочная доза не обеспечивает защиту, если ей не предшествуют одна или более предварительные вакцинации с использованием живой вакцины против вируса инфекционного бронхита. Оба типа вакцин могут вводиться в комбинации с вакциной против болезни Ньюкасла; в некоторых странах имеются инактивированные мультивалентные вакцины, которые включают 2-3 антигена вируса ИБК или болезни Ньюкасла, инфекционного бурсита, реовируса и вируса синдрома снижения яйценоскости – 76.

А. ВВЕДЕНИЕ

Инфекционный бронхит кур (ИБК) был впервые описан в Соединенных Штатах Америки (США) в 1930-х годах, как острая респираторная болезнь, поражающая в основном, молодых кур. Была определена вирусная этиология, и возбудитель назвали вирусом инфекционного бронхита кур (ВИБК). Вирус инфекционного бронхита кур (ВИБК) относится к роду *Gammacoronavirus*, подсемейству *Coronavirinae*, семейству *Coronaviridae*, отряду *Nidovirales*. ВИБК и другие коронавирусы птиц (индеек и фазанов) классифицированы как гамма-коронавирусы, тогда как коронавирусы млекопитающих относят к группе альфа- и бета-коронавирусов. У диких птиц и свиней были открыты новые родственные коронавирусы, отнесенные к группе дельта-коронавирусов (Woo et al., 2012). Интересен тот факт, что дельта-коронавирусы обладают разным порядком геномов и не демонстрируют близкого родства с гамма-коронавирусами. Коронавирусы имеют несегментированный одноцепочечный РНК-геном положительного смысла.

ИБК поражает кур любого возраста. В отличие от фазанов (Britton & Cavanagh, 2007; Cavanagh et al., 2002) они являются единственным видом, который заражается

естественным путем. Болезнь передается воздушно-капельным путем от курицы курице при прямом контакте и косвенно путем механического распространения (контаминированное птицеводческое оборудование или материалы для упаковки яиц, используемый в качестве удобрения помет, посещения птицеводческих ферм, т.д.). ИБК встречается по всему миру и принимает различные клинические формы, главной из которых является респираторная болезнь, которая развивается вслед за заражением тканей дыхательных путей после вдыхания или заглатывания.

Заражение яйцевода может привести к постоянным нарушениям у молодняка, а у несушек – к прекращению кладки яиц или к производству яиц с тонкой и неправильной формы скорлупой (с потерей цвета). ИБК может быть нефропатогенным, может вызывать острый нефрит, мочекаменную болезнь и смертность (Cavanagh & Gelb, 2008). После явного выздоровления хронический нефрит может привести к внезапной смерти спустя некоторое время. Вирус ИБК может вызывать заболевание железистого желудка (Yu et al., 2001). Вакцинные и полевые штаммы вируса инфекционного бронхита могут персистировать в скоплениях лимфоидной ткани в расширенной части стенки слепой кишки кишечника и могут выделяться с пометом в течение недель или дольше у клинически здоровых кур (Alexander et al., 1978). Для получения более подробной информации об инфекционном бронхите обратитесь к работам Cavanagh & Gelb, 2008. Далее идет подробное описание антигена вируса инфекционного бронхита, генома и методов обнаружения антител, подготовленное De Witt (2000).

Сообщений о заражении людей вирусом инфекционного бронхита не было.

В. ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

Подтверждение диагноза базируется на выделении вируса и часто поддерживается серологическими методами. Широкое применение вакцинаций с использованием живых и инактивированных вакцин может затруднять диагностику серологическими методами, так как не всегда можно различить антитела, выработанные в результате вакцинации и полевых инфекций. Продолжительность действия живых вакцин также может мешать попыткам выделить причинный полевой штамм ВИБК.

Таблица 1. Методы тестирования, доступные для идентификации вируса инфекционного бронхита кур (ВИБК), и цели их использования

Метод	Цель					
	Свобода популяции от болезни	Свобода отдельных особей от болезни	Вклад в стратегии искоренения	Подтверждение клинических случаев	Превалентность инфекции - надзор	Иммунный статус у отдельных животных или популяций после вакцинации
Идентификация возбудителя¹						
Выделение вируса (эмбрионы)	+ ^a	++ ^c	-	+++	+	+ ^b

¹ Рекомендуется сочетать методы идентификации возбудителя для одного клинического образца.

или ТОК)						
Метод иммуногистохимического окрашивания	-	-	-	++	+	+ ^h
Выявление генома вируса (ОТ-ПЦР)	+ ^a	++	++	++	+	+ ^h
Идентификация вируса (реакция гемагглютинации)	-	-	-	-	+	=
Идентификация вируса (реакция вируснейтрализации)	-	-	-	-	+	-
Идентификация вируса (секвенирование гена)	-	-	-	-	++ ^f	-
Выявление иммунного ответа						
Выявление антител (РИД)	+ ^b	+	-	+ ^e	+	-
Выявление антител (РВН)	=	- ^g	-	+ ^e	-	++ ^e
Выявление антител (РТГА)	-	- ^d	+	+ ^e	+	++ ^e
Выявление антител (ИФА)	++ ^b	++	++	++ ^e	++ ^g	++ ^e

Пояснения: +++= рекомендуемый метод; ++=подходящий метод; +=может применяться в некоторых ситуациях, но траты, связанные с технологией, ее надежность и иные факторы значительно ограничивают применение; - =не подходит для этой цели; Хотя не все тесты категорий +++ или ++ подвергались формальной валидации, их суть и факт того, что они широко применялись без сомнительных результатов, делает их приемлемыми.

^a Подходит для гарантии отсутствия заражения в течение последних 10 дней; ^b Подходит для гарантии отсутствия заражения в период, предшествующий последним 10 дням; ^c Подходит на уровне отдельных особей и только в период выделения вируса в окружающую среду; ^d Ограниченно подходит для данной цели, поскольку может быть весьма специфичным для серотипа, используемого в качестве антигена; ^e Подходит при условии возможности анализа парных образцов, собранных с промежутком времени в несколько недель; ^f Особенно подходит для надзора за уже существующим или эмерджентным генотипом; ^g Особенно подходит в случае, если надзор за ИБК не сфокусирован на одном существующем генотипе; ^h Иногда используется для защиты, которую вызывают вакцины от выделения вируса во внешнюю среду, но может быть положительным, даже если удалось достичь хорошей клинической защиты. ТОК = трахеальные органические культуры; ОТ-ПЦР - метод полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией; РВН – реакция вируснейтрализации; РИД – реакция иммунодиффузии в агаровом геле; РТГА - реакция торможения гемагглютинации; ИФА - твердофазный иммуноферментный анализ.

1. Идентификация возбудителя

1.1. Отбор образцов

Образцы, соответствующие наблюдаемой форме инфекционного бронхита, должны отбираться сразу же, как станут очевидными признаки клинической болезни. Образцы должны помещаться в холодную транспортную среду и как можно скорее замораживаться. Следует поддерживать условия холодовой цепи от птицы до лаборатории. При острой респираторной болезни следует отбирать смывы из верхних дыхательных путей живых птиц или трахеальные и легочные ткани от заболевших птиц, помещать их в транспортную среду, содержащую пенициллин (10 000 международных единиц [IU] / мл) и стрептомицин (10 мг / мл), и хранить на льду, а затем в замороженном виде. Что касается птиц с нефритом или проблемами с кладкой яиц, в дополнение к респираторным образцам можно отбирать образцы из почек или яйцевода. В некоторых случаях может быть желательна идентификация вируса инфекционного бронхита с помощью полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) без выделения вируса. В этом случае смывы из дыхательных путей или клоаки можно подавать отдельно без помещения в жидкую транспортную среду (Cavanagh et al., 1999). В ситуациях, когда есть подозрение на индуцированный инфекционным бронхитом нефрит, следует также отбирать от свежих туш образцы почек для гистопатологического исследования или выделения вируса. Для серологического исследования следует подавать образцы крови от птиц с острой формой поражения, а также от переболевших кур. Был зарегистрирован высокий уровень выделения вируса из скоплений лимфоидной ткани в расширенной части стенки слепой кишки или фекалий (Alexander et al., 1978). Тем не менее, изоляты из кишечника могут не иметь отношения к последней инфекции или клинической болезни. Выделению вируса инфекционного бронхита может способствовать использование индикаторных СПФ - кур, имеющих один или более контактов с коммерческой домашней птицей (Gelb et al., 1989).

1.2. Культивирование

Суспензии тканей (10-20% в/о) готовятся в стерильном фосфатно-солевом буферном растворе (ФБР) или питательном бульоне для инокулирования в яйца, или в тканевой культуральной среде для инокулирования в трахеальные органнне культуры (ТОК) (Cook et al., 1976). Суспензии очищаются низкоскоростным центрифугированием и фильтрацией через бактериологические фильтры (0,2 мкм) до инокулирования в СГА-яйца или ТОК.

СПФ-куриные яйца с развивающимися эмбрионами и/или ТОК используются для первичного выделения вируса инфекционного бронхита. Клеточные культуры для первичного выделения не рекомендуются, так как обычно необходимо адаптировать изоляты вируса ИБ к росту в куриных эмбрионах до того, как в клетках почки куриных эмбрионов будет продуцироваться цитопатогенное действие (ЦПД).

Яйца с развивающимися эмбрионами, используемые для выделения вируса, должны быть получены от СПФ-кур или от племенных источников, которые никогда не инфицировались и не вакцинировались вирусом инфекционного бронхита. Обычно 0,1-0,2 мл образца надосадочной жидкости инокулируют в аллантоисную полость 9-11-дневных эмбрионов. Яйца овоскопируют ежедневно в течение 7 дней; причем смертность в течение первых 24 часов считается неспецифической. Первоначальная инокуляция обычно оказывает ограниченные макроскопические воздействия на эмбрионы, если только штамм не получен из вакцины и уже не адаптирован к яйцам. Обычно, аллантоисные жидкости всех яиц собираются в пул через 3-6 дней после заражения; этот пул разводится в

соотношении 1/5 или 1/10 в бульоне с антибиотиком, а затем пассируется на другой партии яиц с использованием трех-четырех пассажей. Как правило, полевой штамм должен индуцировать заметные изменения в эмбрионах, включающие остановку в развитии или скручивание эмбрионов с дистрофией перьев (сваливание пуха) и отложение солей мочевой кислоты в мезонефросе при втором-четвертом пассаже. Может иметь место гибель эмбрионов при более поздних пассажах, так как штамм становится более адаптированным к яйцам. Другие вирусы, чаще всего аденовирусы, которые обычно поражают дыхательные пути, могут также продуцировать поражения эмбрионов, которые невозможно отличить от поражений, вызываемых вирусом инфекционного бронхита. Содержащая вирус инфекционного бронхита аллантоисная жидкость не должна агглютинировать эритроциты, а выделение вируса ИБ должно подтверждаться серотипированием или генотипированием. Инфицированные аллантоисные жидкости должны храниться при минус -20°C или ниже в течение короткого периода времени, при -60°C в течение длительного периода времени или при 4°C после лиофилизации.

ТОК, приготовленные из 19-20-дневных эмбрионов, могут использоваться для выделения вируса инфекционного бронхита непосредственно из полевого материала (Cook et al., 1976). При использовании этого метода для широкомасштабного производства соответствующих поперечных срезов или трахеальных колец желательно иметь автоматический измельчитель тканей (Darbyshire et al., 1978). Кольца должны быть толщиной 0,5-1,0 мм и должны храниться в среде, состоящей из среды Игла и N-2-гидроэтилпиперазин N'-2-этансульфониевой кислоты (HEPES) в роллерных барабанах (15 оборотов/час) при 37°C . Инфицирование трахеальных органов культур обычно вызывает задержку роста ресничек в течение 24-48 часов. Цилиостаз может быть вызван другими вирусами, и поэтому случаи, когда есть подозрение на инфекционный бронхит, должны подтверждаться методами серотипирования или генотипирования.

1.3. Методы идентификации

Первоначальные тесты, проводимые на изолятах вируса инфекционного бронхита, направлены на исключение других вирусов из списка вирусов, представляющих диагностическое значение. Из инфицированных яиц собирают хориоаллантоисные мембраны, гомогенизируют и проверяют с использованием иммунодиффузии или ПЦР на наличие аденовируса птиц группы 1. Заражение коммерческих кур аденовирусом птиц группы 1 является распространенным явлением, и вирус часто продуцирует недоразвитые эмбрионы, которые невозможно отличить от эмбрионов, инфицированных вирусом инфекционного бронхита. Более того, собранные аллантоисные жидкости не гемагглютинируют эритроциты кур. Для идентификации изолятов вируса инфекционного бронхита обычно используют тесты на основе генетических исследований (ОТ-ПЦР или ОТ-ПЦР-ПДРФ [полиморфизм длин рестрикционных фрагментов]). Могут применяться и другие методы, например, клетки в аллантоисных жидкостях инфицированных яиц можно тестировать на наличие антигена вируса инфекционного бронхита с использованием реакций флуоресцирующих антител (Clarke et al., 1972) и прямой негативно-контрастной электронной микроскопии, которые выявляют частицы с типичной коронавирусной морфологией в аллантоисной жидкости или жидких концентратах трахеальных органов культур. Наличие вируса инфекционного бронхита в инфицированной аллантоисной жидкости можно обнаружить с помощью ОТ-ПЦР амплификации и ДНК-зонда в реакции дот-гибридизации (Jackwood et al., 1992). Было описано прямое иммунофлуоресцентное окрашивание инфицированных ТОК для быстрого обнаружения присутствия вируса инфекционного бронхита (Bhattacharjee et al., 1994). Иммуногистохимия с группоспецифическими моноклональными антителами может использоваться для

идентификации вируса инфекционного бронхита в инфицированных хориоаллантаоисных мембранах (Naqi, 1990).

1.4. Идентификация серотипа

Антигенное разнообразие штаммов вируса инфекционного бронхита хорошо известно (Cavanagh & Gelb, 2008; Cook, 1984; Dawson & Gough, 1971; Hofstad, 1958; Ignjatovic & Sarats, 2000), но в настоящее время не существует общепринятой системы классификации. Несмотря на это, антигенное родство и различия между штаммами очень важны, поскольку вакцины на основе одного определенного серотипа могут обеспечивать слабую защиту или могут совсем не обеспечивать защиту против вирусов другой антигенной группы. В результате регулярного возникновения антигенных вариантов вирусы, а, следовательно, и ситуация по болезни и используемые вакцины, могут совершенно отличаться в разных географических условиях. Постоянная оценка присутствующих в полевых условиях вирусов необходима для производства вакцин, которые могут стать эффективными при возникновении антигенных вариантов. Серотипирование изолятов вируса инфекционного бронхита и штаммов было проведено с использованием реакции торможения гемагглютинации (РТГА) (Alexander et al., 1983; King & Hopkins, 1984) и реакции вируснейтрализации (РН) на куриных эмбрионах (Dawson & Gough, 1971), в трахеальных органных культурах (Darbyshire et al., 1979) и клеточных культурах (Hopkins, 1974). Для дифференциации штаммов также применялась реакция нейтрализации флуоресцентных очагов (Csermelyi et al., 1988).

Моноклональные антитела, обычно используемые при проведении твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА), оказались полезными при группировании и дифференциации штаммов вируса инфекционного бронхита (Ignjatovic et al., 1991; Koch et al., 1986). Ограниченность анализа с моноклональными антителами для идентификации серотипа вируса инфекционного бронхита состоит в нехватке моноклональных антител или гибридом и необходимости вырабатывать новые моноклональные антитела с соответствующей специфичностью, чтобы «идти в ногу» с растущим количеством вновь возникающих вариантов серотипов вируса инфекционного бронхита (Karaca et al., 1992).

1.5. Идентификация генотипа

Методы генотипирования с использованием ОТ-ПЦР в основном заменили серотипирование с помощью реакции торможения гемагглютинации и вируснейтрализации при определении идентичности полевого штамма. Была исследована молекулярная основа антигенных вариаций, как правило, с помощью нуклеотидного секвенирования кодировки гена для спайкового белка (S) или, что более специфично, с помощью нуклеотидного секвенирования гена, кодирующего субъединицу S1 белка S (Cavanagh, 1991; Kusters et al., 1989), где найдено большинство эпитопов, к которым прикрепляются нейтрализующие антитела (Koch et al., 1992). Не наблюдалось точного соотношения с результатами реакций торможения гемагглютинации и вируснейтрализации в том, что пока различные серотипы обычно имеют большие различия (20-50%) в расшифрованных аминокислотных последовательностях субъединицы S1 (Kusters et al., 1989), другие вирусы, которые четко дифференцируются с помощью реакций нейтрализации, показывают только 2-3% различий в аминокислотных последовательностях (Cavanagh, 1991). Однако, в общем, есть согласованность между данными, представленными последовательностью S1 и серотипом реакции вируснейтрализации, и в конечном итоге может появляться возможность выбора вакцинных штаммов на основе данных о последовательностях.

Первичные преимущества методов генотипирования включают короткий период полного оборота и способность обнаруживать разнообразие генотипов в зависимости от применяемых тестов. ОТ-ПЦР с полиморфизмом длин рестрикционных фрагментов дифференцирует серотипы вируса инфекционного бронхита на основе уникальной электрофорезной исчерченности рестрикционных, переваренных ферментом фрагментов S1 после амплификации гена с помощью ОТ-ПЦР (Jackwood et al., 1997; Kwon et al., 1993). Процедура ОТ-ПЦР с полиморфизмом длин рестрикционных фрагментов может использоваться в сочетании с меченым биотином ДНК-зондом для первичного обнаружения вируса инфекционного бронхита в яичных жидкостях, собранных после инокуляции яиц клиническими образцами (Jackwood et al., 1992). ОТ-ПЦР с полиморфизмом длин рестрикционных фрагментов может идентифицировать все известные серотипы вируса инфекционного бронхита, а также варианты вирусы. Хотя сейчас предпочтительней нуклеотидное секвенирование (см. ниже).

Специфическая для генотипа S1 ОТ-ПЦР может использоваться для идентификации специфических серотипов вируса инфекционного бронхита (Keeler et al., 1998). Специфические для серотипов Массачусетс (Mass), Коннектикут, Арканзас и JMK праймеры гена S1 используются в сочетании с набором универсальных праймеров, амплифицирующих все серотипы вируса инфекционного бронхита. Были также разработаны праймеры для серотипов DE/072/92 и Калифорния, можно использовать и другие наборы праймеров, исходя из современных серотипов вируса инфекционного бронхита, циркулирующих в регионе. Другие варианты серотипов могут быть определены как вирус инфекционного бронхита с использованием обычных праймеров, но специфический серотип не может быть идентифицирован. Могут идентифицироваться инфекции, вызываемые многочисленными серотипами вируса инфекционного бронхита.

Нуклеотидное секвенирование диагностически релевантного фрагмента гена S1 – это наиболее полезный метод для дифференциации штаммов вируса инфекционного бронхита, который стал во многих лабораториях методом генотипирования. Нуклеотидное секвенирование представляет также доказательства того, что часто происходит рекомбинация между штаммами вируса ИБ (Cavanagh et al., 1992; Zwaagstra et al., 1992). Циклическое секвенирование гипервариабельной аминоконцевой области S1 продуктов ОТ-ПЦР может использоваться в диагностических целях для идентификации ранее распознанных полевых изолятов и вариантов (Kingham et al., 2000). Существенными преимуществами секвенирования являются сравнение и анализ последовательностей неизвестных полевых изолятов и вариантов с референтными штаммами в целях установления потенциального родства.

Недавно было доказано, что коронавирусы, выделенные от индеек и фазанов, генетически схожи с вирусом инфекционного бронхита кур и имеют приблизительно 90% нуклеотидную идентичность в высококонсервативной области 3' нетранслированной области (UTR) генома вируса инфекционного бронхита (Cavanagh et al., 2001; 2002). Потенциальная роль этих коронавирусов в инфекциях вирусом инфекционного бронхита кур не установлена.

Основными применениями ОТ-ПЦР являются идентификация вируса и его использование для понимания эпизоотологии вспышек инфекционного бронхита. ОТ-ПЦР тесты в том виде, в котором они существуют в настоящее время, не дают информацию по патогенности вируса.

1.5.1. Процедура ОТ-ПЦР

i) *Экстракция вирусной РНК*

Может применяться любой метод экстракции РНК. Большое количество регламентированных процедур можно найти в научных журналах, книгах и в интернете. Все экстрагированные РНК до тестирования следует хранить при -20°C и -80°C , а для длительного хранения рекомендуется температура -80°C .

ii) *Изготовленные на заказ олигонуклеотиды*

Изготовленные на заказ олигонуклеотиды можно купить через любого коммерческого поставщика. Ген-мишень для характеристики вируса инфекционного бронхита представлен субъединицей S1 гена спайкового гликопротеина. Повсеместно используемой парой праймеров для амплификации генотипически разнообразных штаммов вируса инфекционного бронхита является олиго S15'mod (направленный вперед): 5'-TGA-AAA-CTG-AAC-AAA-AGA-3' и СК2 (обратный): 5'-CNG-TRT-TRT-AYT-GRC-A-3' (Gelb et al., 2005). Олиго S15'mod/СК2 ампликон имеет длину в 700 пар оснований, начиная с гена S1, перекрывающего две используемые для генотипирования гипервариабельные области.

iii) *Полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией*

Большое число наборов для одно- и двухэтапной ОТ-ПЦР можно купить у изготовителей, заявляющих об исключительной чувствительности и достоверности. Обратная транскрипция проводится в соответствии с инструкциями изготовителя. ОТ-праймирование осуществляется с использованием выбранных наугад гексамеров (поставляемых с набором) или праймера обратной ПЦР, в данном случае СК2 (Keeler et al., 1998). Один цикл ОТ проводится при соблюдении следующих параметров: 25°C в течение 10 минут, 42°C в течение 25 минут, 95°C в течение 5 минут, держать при 4°C . Полный объем реакционной смеси для ОТ добавляют к исходной смеси ПЦР образца. ПЦР проводят при соблюдении следующих параметров: 95°C в течение 2 минут, 45 циклов при 95°C в течение 30 секунд, 52°C в течение 30 секунд, 68°C в течение 30 секунд, заключительное удлинение при 68°C в течение 12 минут, держать при 4°C . Образцы ресуспендируют в 6 мкл загрузочного буфера перед электрофорезом на 1,8% агарозном геле, содержащем полинуклеотидный краситель. Гели просматривают в камере с ультрафиолетовым излучением. Полоски сравнивают с имеющимся в продаже лэддером в 100 пар оснований и с положительным контролем вируса инфекционного бронхита.

iv) *Секвенирование гена S1*

Полоски, различимые в агарозном геле, которые имеют тот же размер, что и положительный контроль, вырезают из геля. ПЦР-продукт отделяют от агарозного геля с помощью коммерческого набора для экстрагирования геля. Очищенные ПЦР-продукты наносят на второй 1,8% гель агарозы-полинуклеотидного красителя с целью определения количества присутствующего продукта. Для секвенирования необходимо иметь приблизительно 20 мкл (10 нг/мкл) ПЦР-продукта. Секвенирование можно проводить в любом университете или на коммерческом предприятии, занимающемся секвенированием. Хроматограммы последовательностей

обрабатываются с использованием подходящего программного обеспечения. Обработанные последовательности изолятов вируса инфекционного бронхита характеризуют с использованием анализа BLASTn для нуклеотида или анализа BLASTp для белка (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

2. Серологические тесты

В настоящее время есть описание нескольких тестов. К тем, которые рассматриваются здесь, относятся реакция вируснейтрализации (Dawson & Gough, 1971), иммунодиффузия в агаровом геле (Witter, 1962), реакция торможения гемагглютинации (Alexander et al., 1983) и ИФА (Mockett & Darbyshire, 1981). Каждый тест имеет преимущества и недостатки с точки зрения практичности, специфичности, чувствительности и стоимости. В общем, для текущего серологического тестирования реакции вируснейтрализации слишком дороги и непрактичны, а реакции иммунодиффузии в агаровом геле не хватает чувствительности.

ИФА и реакции торможения гемагглютинации подходят для рутинного серологического тестирования. ИФА подходит для общего мониторинга заражения вирусом инфекционного бронхита и может обнаруживать ответы антител на все серотипы. Реакция торможения гемагглютинации при использовании на сыворотках от молодых цыплят на выращивании, таких как несушки и бройлеры, может дать информацию о статусе стада по серотипспецифическим антителам. Регулярный мониторинг сывороток из стад с целью определения титров антител к вирусу инфекционного бронхита может оказывать помощь в установлении уровня ответов на контрольное заражение вакцинными или полевыми штаммами. Так как сыворотки кур от птиц старшего возраста содержат антитела, демонстрирующие высокий уровень перекрестной реактивности с антигенно неродственными штаммами, серодиагностика вспышек с подозрением на инфекционный бронхит не может использоваться с высокой степенью достоверности.

2.1. Реакция вируснейтрализации

При проведении реакций вируснейтрализации все сыворотки сначала следует подогреть до 56°C в течение 30 минут. Вирус смешивают с сывороткой и инкубируют в течение 30-60 минут при температуре 37°C или комнатной температуре. Чаще всего используются куриные эмбрионы, но уровень антител можно измерять с использованием трахеальных органных культур или систем культуры клеток. Два метода применялись для обнаружения нейтрализующих антител. В одном использовали постоянную концентрацию сыворотки, которая вступала в реакцию с различными разведениями вируса (метод альфа), а в другом использовали постоянное количество вируса и различные разведения сыворотки (метод бета).

При использовании метода альфа 10-кратные разведения вируса, адаптированного к яйцам, вступают в реакцию с фиксированным разведением (обычно 1/5) антисыворотки, и смеси инокулируют в группы из 5 – 10 яиц. Параллельно титруется отдельный вирус. Конечные точки рассчитываются при помощи методов Kärber или Reed и Muench. Результаты выражаются в виде индекса нейтрализации (ИН), который представляет различие между титрами отдельного вируса и титром смесей вирус/антисыворотка, выраженное в \log_{10} . Показатели ИН могут достигать 4,5-7,0 в случае со смесями гомологичного вируса/сыворотки; показатели < 1,5 считаются неспецифичными, но гетерологичный вирус может давать такой низкий показатель как 1,5.

Метод бета – это наиболее широко используемая реакция нейтрализации для анализа антител с куриными эмбрионами. Двух- или четырехкратные разведения антисыворотки вступают в реакцию в равных объемах с разведением вируса, обычно фиксированного на 100 или 200 ЭИД₅₀ (средние инфицирующие эмбрионы дозы); 0,05 мл и 0,1 мл каждой смеси инокулируют в аллантоисную полость каждого из 5-10 яиц с развивающимися эмбрионами. Одновременно проводится контрольное титрование вируса для подтверждения того, что фиксированное разведение вируса в смесях вирус/сыворотка колеблется между $10^{1.5}$ и $10^{2.5}$ ЭИД₅₀. Конечные точки сывороточных титров рассчитываются с помощью методов Kärber или Reed и Muench, как описано ранее, но здесь они выражаются как обратные значения \log_2 разведений. Этот метод использования фиксированного вируса/различных сывороток также применяется в реакции нейтрализации на трахеальных органных культурах с использованием пяти пробирок на одно разведение сыворотки и является традиционным по отношению к другим вирусам (Darbyshire et al., 1979). Результаты рассчитываются в соответствии с методом Reed и Muench, а титры вируса выражаются как средние цилиостатические дозы на единицу объема (\log_{10} ЦД₅₀). Титры сыворотки снова выражаются как обратные значения \log_2 разведения. Этот тест более чувствителен по сравнению с другими, но материально-технические особенности организации процедуры мешают его более широкому применению.

2.2. Реакция торможения гемагглютинации

Стандартный протокол для реакции торможения гемагглютинации в отношении вируса инфекционного бронхита был описан (Alexander et al., 1983), и процедура тестирования, подробно описанная ниже, базируется на данном стандарте. Штаммы и изоляты вируса ИБ агглютинируют куриные эритроциты после обработки нейраминидазой (Ruano et al., 2000; Schultze et al., 1992). Штамм вируса, выбранный для производства антигена, можно варьировать в зависимости от требований к диагностике. Антиген для реакции торможения гемагглютинации готовится из нагруженных вирусом инфекционного бронхита аллантоисных жидкостей.

Процедуры реакций гемагглютинации и торможения гемагглютинации проводятся при 4°C.

2.2.1. Реакция гемагглютинации

- i) Внести 0,025 мл ФБР, pH 7,0-7,4, в каждую лунку пластикового титрационного микропланшета с U- или V-образным дном.
- ii) Внести 0,025 мл вирусного антигена в первую лунку. Для точного определения содержания гемагглютинина это должно осуществляться с близким диапазоном исходных серий разведений, а именно, с разведениями 1/3, 1/4, 1/5, 1/6, и т.д.
- iii) Приготовить двукратные разведения 0,025 мл объемов вирусного антигена на всем планшете.
- iv) Добавить 0,025 мл ФБР в каждую лунку.
- v) Добавить в каждую лунку 0,025 мл 1% (об/об) куриных эритроцитов.
- vi) Смешать путем легкого постукивания и оставить для осаждения куриных эритроцитов в течение 40-60 минут при 4°C, пока контрольные куриные эритроциты не осядут до четкой точки.

- vii) Гемагглютинацию определяют путем наклона планшета и наблюдения наличия или отсутствия стекания каплеобразных куриных эритроцитов. Титрование должно считываться до наивысшего разведения, при котором имеет место полная гемагглютинация при отсутствии стекания; это 100% гемагглютинация и представляет 1 ГАЕ (гемагглютинирующая единица), которую можно точно высчитать из первоначального диапазона разведений.

2.2.2. Реакция торможения гемагглютинации

Реакция торможения гемагглютинации используется для диагностики и текущего мониторинга стад на предмет обнаружения реакций на вакцину.

- i) Внести 0,025 мл ФБР в каждую лунку пластикового титрационного микропланшета с U- или V-образным дном.
- ii) Добавить 0,025 мл сыворотки в первую лунку планшета.
- iii) Приготовить двукратные разведения 0,025 мл объемов сыворотки на всем планшете.
- iv) Добавить 4 ГАЕ вирусного антигена в 0,025 мл в каждую лунку и оставить на 30 минут.
- v) Добавить 0,025 мл 1% (об/об) куриных эритроцитов в каждую лунку и после легкого перемешивания оставить для осаждения в течение 40-60 минут, пока контрольные эритроциты не осядут до четкой точки.
- vi) Титр в реакции торможения гемагглютинации - это наивысшее разведение сыворотки, вызывающее полное торможение 4 гемагглютинирующих единиц антигена. Агглютинация оценивается более точно путем наклона планшета. Только те лунки, в которых эритроциты «стекают» с такой же скоростью что и в контрольных лунках (содержащих только 0,025 мл эритроцитов и 0,05 мл ФБР), должны рассматриваться как показывающие торможение.
- vii) Достоверность результатов должна оцениваться по отношению к отрицательной контрольной сыворотке, которая не должна давать титр $>2^2$, и по отношению к положительной контрольной сыворотке, для которой титр должен быть в пределах одного разведения с известным титром.
- viii) Сыворотки обычно считаются положительными, если они имеют титр 2^4 или выше. Однако следует заметить, что даже в СПФ стадах очень небольшой процент птиц может демонстрировать неспецифический титр 2^4 , но обычно это случается у птиц в возрасте старше 1 года.

2.3. Твердофазный иммуноферментный анализ

ИФА – это чувствительный серологический метод, который дает более ранние реакции и более высокие титры антител по сравнению с другими тестами (Mockett & Darbyshire, 1981). Он не обладает специфичностью по типу или штамму, но подходит для мониторинга ответов на вакцину в полевых условиях. Имеются коммерческие наборы ИФА – они базируются на нескольких различных стратегиях обнаружения антител к

вирусу инфекционного бронхита. Как правило, такие тесты оцениваются и валидируются изготовителем, и, следовательно, очень важно четко следовать инструкции по их использованию. ИФА широко применяется для идентификации инфицированных вирусом инфекционного бронхита стад (бройлеров) на основе высоких титров антител. Если вирус инфекционного бронхита повторно возникает в следующем стаде на ферме, делаются попытки выделения вируса, и проводится его генотипирование с помощью полиморфизма длин рестрикционных фрагментов или секвенирования S1.

2.4. Иммунодиффузия в агаровом геле

В диагностике может применяться иммунодиффузия в агаровом геле (Witter, 1962). Антиген готовят из гомогената хориоаллантоисных мембран инфицированных куриных эмбрионов. Смертельный для эмбриона штамм *Beaudette* часто используется для получения антигена. Тесту не хватает чувствительности, и он может давать непостоянные результаты, поскольку присутствие и длительность преципитирующих антител могут варьировать у отдельных птиц.

С. ТРЕБОВАНИЯ К ВАКЦИНАМ

1. Общая информация

Все живые и инактивированные коммерческие вакцины должны быть лицензированы. Штаммы, используемые в живых вирусных вакцинах, обычно требуют аттенуации. В настоящее время многие страны разрешают применять только живые вакцины на основе Массачусетского типа, такого как Н 120. Некоторые страны могут также иметь лицензированные вакцины к другим живым штаммам, таким как Коннектикут, Арканзас или Делавэр 072 (США) или 4/91 (Соединенное Королевство). Живые вакцины могут вводиться в виде аэрозолей, с питьевой водой или окулярным способом (закапыванием в глаз).

Эффективность инактивированных вакцин в значительной степени зависит от соответствующего примирения живой вакциной(ами). Инактивированные вакцины должны вводиться птицам индивидуально путем внутримышечной или подкожной инъекции. Для борьбы с инфекционным бронхитом у несушек и племенной птицы могут использоваться при изготовлении инактивированных аутогенных вакцин варианты штаммы в соответствии с требованиями законодательства.

Живые вакцины обеспечивают более значительный местный иммунитет в дыхательных путях и также могут защищать более против широкого антигенного спектра полевых штаммов (Cook et al., 1999). Тем не менее, вакцинация живыми вакцинами может не защитить стада несушек от контрольного заражения вариантами серотипами, особенно присущими фермам со стадами птицы разных возрастов, где нередко наблюдается снижение производства яиц в возрасте 40 недель (Gelb et al., 1991). Живые вакцины несут опасность остаточной патогенности, ассоциированной с обратным пассажем вакцин в стадах. Однако надлежащим массовым применением приемов (например, разбрызгивание или с питьевой водой) можно добиться равномерного распределения вакцины в стаде и избежать обратного пассажа. Более того, применение вакцин в указанных изготовителем дозах поможет также избежать обратного пассажа, который может вызываться применением дробных доз.

Имеются перспективы применения генно-инженерных вакцин (Armesto et al., 2011; Casais et al., 2003) и вакцинации *in-ovo* (Tarpey et al., 2006; Wakenell et al., 1995).

Указания по производству ветеринарных вакцин приведены в Главе 1.1.8. «*Принципы производства ветеринарных вакцин*». Указания, данные здесь и в Главе 1.1.8. предназначены в качестве общих руководств. Должны соблюдаться национальные и международные стандарты, которые применяются в стране, где производятся вакцины против инфекционного бронхита. Лицензирующий орган должен предоставлять информацию и справочники с требованиями. В настоящее время они часто представляются в общих терминах относительно всех вакцин – для птиц и млекопитающих, живых и инактивированных, вирусных и бактериальных. Могут быть также специфические требования к вакцинам против инфекционного бронхита, живым и инактивированным. В качестве примера даны ссылки на постановления европейских стран и США (Комиссия Европейских Сообществ [временное издание, ноябрь, 1993]; Европейская фармакопея [2010a, 2010 b]); Свод федеральных регламентов МСХ США 11.3.327).

Список чужеродных агентов, отсутствие которых должно быть доказано, постоянно растет. Изготовители должны быть ознакомлены с теми агентами, которые используются в стране. Последние дополнения – это вирус нефрита птиц и пневмовирус птиц.

Что касается вакцин против инфекционного бронхита, могут возникнуть важные различия между странами в отношении вируса для контрольного заражения, который должен использоваться при проведении тестов на иммуногенность и валидации. Традиционно для контрольного заражения как живыми, так и инактивированными вакцинами, использовали штамм М-41 (Mass 41) Массачусетского типа. Хотя этот тип все еще распространен, он часто не является единственным или доминантным типом во многих странах, и поэтому рекомендуется готовить вакцины из других типов. Для контрольного заражения логично использовать тот же тип, который присутствует в вакцине. Установление критериев для валидации вируса контрольного заражения может вызывать больше трудностей в отношении не-Массачусетских типов по причине их более низкой вирулентности. Считается, что инактивированные вакцины обычно защищают от снижения яйценоскости. Традиционный контрольный штамм М-41, как указано в этой главе, должен вызывать снижение яйценоскости у невакцинированной контрольной птицы, как минимум, на 67%, что признано некоторыми специалистами по инфекционному бронхиту чрезмерным, поскольку слишком зависит от генетической линии кур и от конкретных параметров контрольного заражения. При использовании других типов более высокие показатели снижения яйценоскости могут считаться удовлетворительными, в зависимости от опубликованных свидетельств воздействия этих штаммов в полевых условиях. Также существует тенденция к ослаблению критериев для контрольного заражения Массачусетским типом, и Европейская фармакопея сейчас определяет удовлетворительный уровень снижения яйценоскости для Массачусетского типа, как минимум, 35%, а для других не-Массачусетских типов, как минимум, 15%, при условии, что снижение «соизмеримо с задокументированными доказательствами» (Европейская фармакопея).

2. Общие сведения о производстве и минимальные требования к вакцинам

2.1. Характеристика посевного материала

Руководства по производству ветеринарных вакцин даны в Главе 1.1.8. *Принципы производства ветеринарных вакцин* и Главе 1.1.9. *Тестирование биологического материала на стерильность и свободу от свободу от контаминации.*

Для производства любого типа вакцины следует использовать систему посевной серии (исходный вакцинный вирус). Каждый вирус должен быть обозначен в соответствии со штаммом и происхождением и должен быть свободен от контаминации другими штаммами вируса инфекционного бронхита и чужеродными агентами. Для хранения разных штаммов вируса, предназначенных для вакцин или для контрольного заражения, должны обеспечиваться отдельные помещения.

Для живых вирусных вакцин многие страны разрешают использовать только штаммы Массачусетского типа. Некоторые страны позволяют использовать другие штаммы, как правило, на основе того, что эти штаммы уже присутствуют в национальных стадах. Включение антигенного типа, как в живую вакцину, так и в инактивированную вакцину, требует подтверждения, если есть сомнения по поводу его присутствия в стране.

2.1.1. Биологические характеристики исходного вакцинного вируса

i) Живые вакцины

В настоящее время живые вакцины против вируса инфекционного бронхита обычно аттенуируют в ходе многоэтапного повторного пассажа вирулентного вируса в СПФ - куриных яйцах с развивающимися эмбрионами (Cavanagh, 2003). По всему геному вируса инфекционного бронхита проявляются спонтанные мутации, которые могут привести к аттенуированию вируса. Однако одним из результатов применения данного метода является то, что аттенуированные вирусы, произведённые таким способом, обладают немногими мутациями, способными вызвать потерю вирулентности и эти мутации отличаются у разных вакцинных штаммов. Двумя ключевыми недостатками этой методики является то, что как только вирус используют для прививания кур, то мутации внутри аттенуированных вакцинных вирусов могут вернуться к первоначальному виду, сделав вирус вновь вирулентным (нежелательное последствие), и в результате многоэтапного пассажа иммуногенность аттенуированного вируса не вызовет надлежащую защиту. Учитывая особенности данных живых аттенуированных вакцин, следует свести к минимуму дальнейшие пассажи исходного вакцинного вируса, чтобы не допустить потенциальную потерю иммуногенности. Посевные материалы следует выращивать на СПФ - куриных яйцах для недопущения заноса других потенциальных патогенов.

ii) Инактивированные вакцины

Инактивированные вакцины против вируса инфекционного бронхита также используются для борьбы с инфекционным бронхитом у кур-несушек и при проведении бустерной иммунизации или для индуцирования защиты против некоторых штаммов вируса инфекционного бронхита. Инактивированные вакцины против вируса инфекционного бронхита обладают сниженной эффективностью, если куры ранее не были примированы живой вирусной вакциной. Вирусы инфекционного бронхита для инактивированных вакцин выращивают на СПФ - куриных яйцах и инактивируют химическим способом, обычно за счет разрушения геномной РНК. Партии инактивированных вакцин следует тестировать на остаточную инфекционность с использованием яиц с развивающимися эмбрионами.

Каждая посевная серия должна быть свободна от контаминации бактериями, грибами, микоплазмами и вирусами.

Для выявления чужеродных вирусов посевной материал сперва обрабатывают высокотитрированной моноспецифической антисывороткой, приготовленной против исследуемого штамма или против штамма идентичного типа. Эту смесь культивируют различными способами, разработанными для подтверждения отсутствия вирусов, которые на основании наработанных данных, считаются потенциальными контаминантами. Антисыворотка не должна содержать антител к аденовирусу, вирусу энцефаломиелита птиц, ротавирусу птиц, вирусу анемии кур, вирусу оспы птиц, вирусу инфекционного ларинготрахеита, вирусу гриппа А, вирусу болезни Ньюкасла, вирусу инфекционной бурсальной болезни, вирусу лейкоза, реовирусу, вирусу болезни Марека, герпесвирусу индеек, аденоассоциированному вирусу, вирусу синдрома снижения яйценоскости 76, вирусу нефрита птиц, пневмовирусу птиц, вирусу ретикулоэндотелиоза. Инокулят, вводимый в каждую единицу используемой системы культивирования, должен содержать такое количество тестируемого нейтрализованного компонента вируса инфекционного бронхита, которое имеет начальную инфекционность, как минимум, в 10 раз превышающую минимальную полевую дозу. Эти системы должны включать:

1. СПФ куриные эмбрионы, инкубированные в течение 9-11 дней, привитые в аллантоисный мешочек и хорионаллантоисную оболочку (два пассажа);
2. Культуры клеток фибробластов куриных эмбрионов для обнаружения вируса лейкоза подгрупп А и В. Тест COFAL (тест для обнаружения лейкоза птиц с использованием реакции связывания комплемента) или иммуноферментный сэндвич анализ с двойными антителами для обнаружения группоспецифических антигенов лейкоза проводятся на клеточных экстрактах, собранных через 14 дней. Реакция иммунофлуоресценции для обнаружения вируса ретикулоэндотелиоза проводится на культурах на покровных стеклах после двух пассажей.
3. Почечные культуры СПФ кур, которые исследуются на ЦПД, клеточные включения и гемадсорбирующие агенты, пассированные с интервалом не менее 5 дней в течение 20 дней общей инкубации.
4. СПФ цыплята в минимальном возрасте вакцинации, привитые внутримышечно 100 полевыми дозами, и через конъюнктиву 10 полевыми дозами; процедуру повторяли 3 недели спустя, когда цыплят также прививали в подушечку лап и интраназально 10 полевыми дозами. Наблюдение проводили в течение 6 недель, затем собирали сыворотку для тестирования на энцефаломиелит птиц, инфекционную бурсальной болезни, болезнь Марека, болезнь Ньюкасла и инфекцию *Salmonella pullorum*.

Вакцины, предназначенные для защиты против снижения яйценоскости должны тестироваться на продолжительность ответа антител. Средний титр в реакции торможения гемагглютинации должен быть $>6 \log_2$, как минимум, до 60-недельного возраста. Серологические тесты должны проводиться с интервалами, достаточно частыми для того, чтобы продемонстрировать, что титры не были усилены внешней инфекцией вирусом инфекционного бронхита.

Вакцины, предназначенные для защиты бройлерных цыплят или цыплят на выращивании против респираторной формы болезни, должны тестироваться на продолжительность ответов антител; в случае с бройлерами это должно

осуществляться до нормального возраста убоя, а в случае с цыплятами на выращивании - до возраста проведения бустер-вакцинации (часто в возрасте 16-18 недель).

2.1.2. Валидация вакцинного штамма

Тестирование посевного вируса должно включать проверку его способности восстанавливать прежнюю вирулентность. Посевной вирус живых и инактивированных вакцин следует проверять на безопасность, как описано в Разделе С 2.2.4.

Для определения эффективности необходимо изготовить экспериментальную вакцину из исходного посевного вируса и рабочего посевного вируса с использованием 5 пассажей от исходного вируса и протестировать, чтобы определить их защитный эффект.

Для 5 живых вакцин минимум 10 СПФ цыплят в возрасте 3-4 недель вакцинируют интраназально или методом закапывания в глаз рекомендованной дозой. Десять невакцинированных контрольных птиц того же возраста и из того же источника содержат отдельно. Контрольное заражение всех птиц из обеих групп проводят с использованием интраназального способа или путем закапывания в глаз через 3-4 недели, каждую птицу прививают $10^{3.0}$ - $10^{3.5}$ ЭИД₅₀ референтного штамма контрольного заражения, представляющего антигенную группу вакцинного вируса. У каждой птицы через 4-5 дней после контрольного заражения берут трахеальный смыв и помещают в 3 мл бульона с антибиотиками. Каждую жидкость тестируют на ВИБ путем введения 0,2 мл в пять яиц с развивающимися эмбрионами через 9-11 дней. Альтернатива данному методу с использованием трахеальных смывов – убить птиц через 4-6 дней после контрольного заражения и исследовать под микроскопом трахеальные кольца на активность ресничек (Darbyshire, 1986). Отсутствие сопротивления контрольному заражению демонстрируется экстенсивными потерями подвижности ресничек. Живая вакцина подходит для использования, если как минимум 90% вакцинированных птиц, подвергнутых контрольному заражению, не демонстрируют признаков вируса инфекционного бронхита в трахее, в то время как у 90% или более контрольных птиц присутствие вируса должно наблюдаться.

Чтобы оценить инактивированную вакцину, предназначенную для защиты несушек, рекомендуется вакцинировать 30 или более СПФ цыплят в самом раннем возрасте, в котором разрешена вакцинация. Если сначала проводят первичную вакцинацию живой вакциной, дополнительная группа птиц получает только первичную вакцинацию. В обоих случаях первичную вакцинацию следует проводить не позднее 3-недельного возраста. Инактивированную вакцину вводят через 4-6 недель после первичной иммунизации живой вакциной. Еще одну группу из 30 контрольных птиц не вакцинируют совсем. Все группы содержат отдельно до 4 недель до пика яйценоскости, а затем их помещают вместе. Проводят мониторинг индивидуальной яйценоскости, и как только она становится регулярной, проводят контрольное заражение всех птиц и регистрируют яйценоскость в течение последующих 4 недель. Контрольное заражение должно быть достаточным, чтобы обеспечить снижение яйценоскости в течение 3 недель после контрольного заражения. Снижение в контрольной группе должно быть, как минимум, 35%; в группе, в которой проводилось контрольное заражение штаммом типа Массачусетс. Если необходимо провести контрольное заражение штаммом другого серотипа, о котором достоверно известно, что он не приведет к 35% снижению яйценоскости, то контрольное

заражение должно вызвать такое снижение яйценоскости, которое соотносится с имеющимися данными, в любом случае не меньше 15%; группа, которая получила изначально вакцину из живого вируса, а затем инактивированную вакцину, должна оставаться на предыдущем уровне, а группа, которая прошла только первичную вакцинацию, должна продемонстрировать промежуточное снижение производительности. Вакцина соответствует тесту, если яйценоскость или качество значительно лучше в группе, получившей инактивированную вакцину, чем в какой-либо контрольной группе. От всех вакцинированных птиц берут образцы сывороток через 4 недели и при контрольном заражении; У контрольных птиц ответной реакции быть не должно.

Для оценки инактивированной вакцины, предназначенной для защиты птиц от респираторного заболевания, проводят вакцинацию 20 СПФ цыплят в возрасте 4 недель согласно рекомендациям. 20 контрольных птиц того же возраста и происхождения помещают вместе с первой группой. Гуморальные иммунные ответы определяют 4 недели спустя; у контрольных птиц не должно наблюдаться гуморального иммунного ответа. Затем проводят контрольное заражение всех птиц 103 CID50 (50% инфекционных доз для птенцов) вирулентного вируса, через 4-7 дней птиц убивают и исследуют трахеальные срезы на активность ресничек. Как минимум у 80% невакцинированных контрольных птиц должен наблюдаться полный стаз ресничек, в то время как активность ресничек трахеи у такого же процента вакцинированных птиц должна остаться такой же.

В некоторых странах существуют как живые, так и инактивированные вакцины, содержащие вирусы болезни Ньюкасла, инфекционной бурсальной болезни, реовируса и синдрома снижения яйценоскости 76. Эффективность различных компонентов этих вакцин следует определять отдельно, а затем в сочетании в случае, если существует интерференция между различными антигенами.

2.2.Метод производства

2.2.1. Процедура

Все штаммы вируса, предназначенные для живых вакцин, культивируют в аллантоисном мешочке СПФ куриных эмбрионов или в подходящих клеточных культурах. Для инактивированных вакцин можно использовать куриные яйца от здоровых не СПФ стад. Пул жидкостей очищают, а затем титрируют на инфекционность. Для живых вакцин эту жидкость лиофилизируют в пробирках, а для инактивированных вакцин ее смешивают с высококачественным минеральным маслом до консистенции эмульсии, к которой добавляют консервант.

2.2.2. Требования к компонентам

См. Главу 1.1.8, где особое внимание уделяется продуктам биологического происхождения (ПБП), полученным из стран с незначительной степенью риска различных трансмиссивных губкообразных энцефалопатий (ТГЭ).

2.2.3. Контроль в процессе производства

Необходимое содержание антигена основано на первоначальных тестовых партиях вакцин с подтвержденной эффективностью в лабораторных и полевых испытаниях. Титрование на инфекционность проводится на куриных эмбрионах.

В течение указанного срока годности живая вакцина должна содержать не менее $10^{3.5}$ ЭИД₅₀ на дозу на одну птицу, и не менее $10^{2.5}$ ЭИД₅₀ на дозу на одну птицу после инкубирования при 37°C в течение 7 дней на день выпуска. Для инактивированных вакцин инактивирующий агент и процедура инактивации должны показать свою эффективность как против ВИБ, так и против потенциальных контаминантов. С помощью бета-пропиолактона или формалина любые живые вирусы лейкоза и различных видов *Salmonella* должны быть уничтожены; а с помощью других инактивирующих агентов должен быть обезврежен весь спектр потенциальных контаминантов. До процедур по инактивации важно убедиться в однородности суспензий, и каждая партия как нефасованного материала после инактивации, так и готового продукта должна быть протестирована на инактивацию.

Тестирование на инактивацию должно соответствовать данной вакцине и состоять из двух пассажей в культурах клеток, эмбрионах или цыплятах с инокуляциями по 0,2 мл и 10 повторами на пассаж.

2.2.4. Тестирований партий готовой продукции

i) Стерильность

Каждую партию живой вакцины нужно тестировать на отсутствие посторонних агентов для посевного вируса (см. Главу 1.1.9).

ii) Безопасность

а) Для живых аттенуированных вакцин

Используйте не менее 10 цыплят из СПФ стада, возраст которых соответствует минимальному возрасту для вакцинации, указанному на этикетке. Закапайте в глаза каждому цыпленку 10 доз вакцины, восстановленной таким образом, чтобы получить концентрацию, подходящую для тестирования. Наблюдайте цыплят в течение 21 дня. Для вакцин, предназначенных для цыплят двухнедельного возраста или старше, используйте цыплят, которым были сделаны прививки в «тестировании на внешних агентов с использованием цыплят» (смотри Раздел С.2.1.1., пункт 4). Если в течение периода наблюдения, более двух цыплят умирают по причинам, не связанным с вакцинацией, повторите тест. Вакцина соответствует тесту, если ни у одной птицы не наблюдается серьезных клинических признаков, особенно респираторных, и ни одна из птиц не умирает по причинам, связанным с вакцинацией.

б) Для инактивированных вакцин

Введите двойную дозу вакцины рекомендованным способом каждому из десяти 14-28-дневных цыплят из СПФ стада. Наблюдайте за цыплятами в течение 21 дня. Убедитесь, что не наблюдается ненормальных местных или общих реакций.

iii) Иммуногенность партии

Тест на иммуногенность разработан по результатам теста на эффективность на исходном посевном вирусе. Живые вакцины тестируют на иммуногенность путем титрования инфекционности, а инактивированные вакцины - путем измерения выработки антител. Для теста на иммуногенность для партии инактивированных вакцин необходимо вакцинировать 20 СПФ цыплят 4-недельного возраста, и убедиться, что их средний титр в РТГА через 4 недели не менее $6 \log_2$.

Вакцина должна показать требуемую иммуногенность для достижения необходимой продолжительности иммунитета на конец указанного срока годности.

Необходимо протестировать не менее трех партий на стабильность, и результаты должны быть удовлетворительными в течение 3 месяцев после установленного срока хранения. Стабильность живой вакцины следует измерять путем поддержания соответствующего инфекционного титра. Стабильность инактивированной вакцины измеряют через определенные промежутки времени с помощью тестирования партии на иммуногенность. Необходимо оценивать концентрацию консервантов и их персистенцию в течение срока хранения. В вакцине не должно быть никаких физических изменений, и она должна сохранять состояние эмульсии после одного быстрого встряхивания.

Существуют требования в отношении максимального уровня антибиотиков, консервантов и остаточных инактивирующих агентов.

2.3. Требования для получения разрешения\регистрации\лицензии

2.3.1. Процесс производства

Для регистрации вакцины необходимо подать на рассмотрение в уполномоченные органы всю подробную информацию о производстве и контроле качества препарата (см. Раздел С.2.1. и 2). Данная информация должна быть предоставлена по трем последовательно произведенным партиям вакцины в объеме, не менее $1/3$ от обычного промышленного объема партии.

2.3.2. Требования к безопасности

В отношении каждой партии готового продукта необходимо проводить тест на безопасность, как указано в Разделе С. 2.2.4. Каждую партию готового продукта необходимо тестировать на иммуногенность, как указано в Разделе С.2.2.4 при производстве и в конце установленного срока хранения.

- i) Безопасность для целевых и нецелевых животных (зависит от различного статуса животных: молодняк, беременные животные и пр.).
- ii) Возврат к вирулентности для аттенуированных\живых вакцин и условия внешней среды (масштабы применения и распространения живых вакцин и их способность вызывать проблемы у невакцинированных животных).
- iii) Меры предосторожности (опасности)

Сам по себе ВИБК не представляет опасности для персонала, занятого в производстве или тестировании вакцин. Посторонние агенты, однако, могут быть опасны, и первоначальную стадию обработки нового посевного вируса следует проводить в ламинарном шкафу. При производстве всех вакцин следует обязательно принимать меры, чтобы минимизировать воздействие на персонал аэрозолей чужеродных белков. Люди, у которых есть аллергия к яичным материалам, не должны ни при каких обстоятельствах участвовать в этой работе. Все вакцины следует классифицировать, как безвредные или патогенные для вакцинируемых. Производитель должен надлежащим образом предупредить о необходимости обратиться к врачу в случае самоинъекции (включая ситуации введения адъювантов, вакцин на основе масляной эмульсии, консервантов и пр.). Предупреждение должно быть указано на этикетке препарата, на вкладыше с инструкцией по применению, чтобы вакцинируемый был осведомлён о любой возможной опасности.

2.3.4. Требования к эффективности

Для регистрации коммерческой вакцины необходимо, чтобы партия или партии, произведённые по стандартным методикам и содержащие минимальное количество антигена или показатель иммуногенности, продемонстрировали свою эффективность (способность вызывать защиту). Каждую будущую коммерческую партию необходимо тестировать до выпуска в обращение, чтобы гарантировать, что показатель иммуногенности этой партии совпадает с показателем, продемонстрированным партией (партиями), использованными для тестов на эффективность.

Обычно эффективность вакцины (способность вызывать защиту) рассчитывается на вакцинированных животных, когда непосредственно оценивается их резистентность к живому патогену в ходе контрольного заражения.

В случае с патогенами нескольких серотипов эффективность вакцины необходимо устанавливать для каждого серотипа.

Схемы проведения контрольного заражения для определения эффективности даны в Разделе С. 2.2.2.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- ALEXANDER D.J., ALLAN W.H., BIGGS P.M., BRACEWELL C.D., DARBYSHIRE J.H., DAWSON P.S., HARRIS A.H., JORDAN F.T., MACPHERSON I., MCFERRAN J.B., RANDALL C.J., STUART J.C., SWARBRICK O. & WILDING G.P. (1983). A standard technique for haemagglutination inhibition tests for antibodies to avian infectious bronchitis virus. *Vet. Rec.*, 113, 64.
- ALEXANDER D.J., GOUGH R.E. & PATTISON M. (1978). A long-term study of the pathogenesis of infection of fowls with three strains of avian infectious bronchitis virus. *Res. Vet. Sci.*, 24, 228–233.
- ARMESTO M., EVANS S., CAVANAGH D., ABU-MEDIAN A.B., KEEP S. & BRITTON P. (2011). A recombinant avian infectious bronchitis virus expressing a heterologous spike gene belonging to the 4/91 serotype. *PLoS ONE*, 6, e24352.
- BRITTON P. & CAVANAGH D. (2007). Avian coronavirus diseases and infectious bronchitis vaccine development. In: *Coronaviruses: Molecular and Cellular Biology*. Thiel V., ed. Caister Academic Press, Norfolk, UK, 161–181.
- BHATTACHARJEE P.S., NAYLOR C.J. & JONES R.C. (1994). A simple method for immunofluorescence staining of tracheal organ cultures for the rapid identification of infectious bronchitis virus. *Avian Pathol.*, 23, 471–480.
- CASAIIS R., DOVE B., CAVANAGH D. & BRITTON P. (2003). A recombinant avian infectious bronchitis virus expressing a heterologous spike gene demonstrates that the spike protein is a determinant of cell tropism. *J. Virol.*, 77, 9084–9089.
- CAVANAGH D. (1991). Sequencing approach to IBV antigenicity and epizootiology. In: *Proceedings of the Second International Symposium on Infectious Bronchitis*. Rauschholzhausen, Germany, June 1991, 147–160.
- CAVANAGH D. (2003). Severe acute respiratory syndrome vaccine development: experiences of vaccination against avian infectious bronchitis coronavirus. *Avian Pathol.*, 32, 567–582.
- CAVANAGH D., DAVIS, P.J. & COOK J.K.A. (1992). Infectious bronchitis virus: evidence for recombination within the Massachusetts serotype. *Avian Pathol.*, 21, 401–408.
- CAVANAGH D. & GELB J., Jr. (2008). Infectious bronchitis. In: *Diseases of Poultry*, Twelfth Edition. Saif Y.M., Fadly A.M., Glisson, J.R., McDougald L.R., Nolan L.K. & Swayne D.E., Eds. Wiley-Blackwell, Ames, Iowa, USA, 117–135.
- CAVANAGH D., MAWDITT K., BRITTON P. & NAYLOR C.J. (1999). Longitudinal field studies of infectious bronchitis virus and avian pneumovirus in broilers using type-specific polymerase chain reactions. *Avian Pathol.*, 28, 593–605.

CAVANAGH. D., MAWDITT K., SHARMA. M., DRURY S.E., AINSWORTH H.L., BRITTON P. & GOUGH R.E. (2001). Detection of a coronavirus from turkey poults in Europe genetically related to infectious bronchitis virus of chickens. *Avian Pathol.*, 30, 355-368.

CAVANAGH D., MAWDITT K., WELCHMAN D. DE B., BRITTON P. & GOUGH R.E. (2002). Coronaviruses from pheasants (*Phasianus colchicus*) are genetically closely related to coronaviruses of domestic fowl (infectious bronchitis virus) and turkeys. *Avian Pathol.*, 31, 81–93.

CLARKE J.K., MCFERRAN J.B. & GAY F.W. (1972). Use of allantoic cells for the detection of avian infectious bronchitis virus. *Arch. Gesamte Virusforsch.*, 36, 62–70.

COMMISSION OF THE EUROPEAN COMMUNITIES (1999). The Rules Governing Medicinal Products in the European Community. EudraLex - Volume 7: Scientific Guidelines for Medicinal Products for Veterinary Use.

COOK J.K.A. (1984). The classification of new serotypes of infectious bronchitis virus isolated from poultry flocks in Britain between 1981 and 1983. *Avian Pathol.*, 13, 733–741.

COOK J.K.A., DARBYSHIRE J.H. & PETERS R.W. (1976). The use of chicken tracheal organ cultures for the isolation and assay of avian infectious bronchitis virus. *Arch. Virol.*, 50, 109–118.

COOK J.K.A., ORBELL S.J., WOODS M.A. & HUGGINS M.B. (1999). Breadth of protection of the respiratory tract provided by different live-attenuated infectious bronchitis vaccines against challenge with infectious bronchitis viruses of heterologous serotypes. *Avian Pathol.*, 28, 477–485.

CSERMELYI M., THIJSSSEN R., ORTHEL F., BURGER A.G., KOUWENHOVEN B. & LUTTICKEN D. (1988). Serological classification of recent infectious bronchitis virus isolates by the neutralisation of immunofluorescent foci. *Avian Pathol.*, 17, 139–148.

DARBYSHIRE J.H. (1985). A clearance test to assess protection in chickens vaccinated against avian infectious bronchitis virus. *Avian Pathol.*, 14, 497–508.

DARBYSHIRE J.H., COOK J.K.A. & PETERS R.W. (1978). Growth comparisons of avian infectious bronchitis virus strains in organ cultures of chicken tissues. *Arch. Virol.*, 56, 317–325.

DARBYSHIRE J.H., ROWELL R.G., COOK J.K.A. & PETERS R.W. (1979). Taxonomic studies on strains of avian infectious bronchitis virus using neutralisation tests in tracheal organ cultures. *Arch. Virol.*, 61, 227–238.

DAWSON P.S. & GOUGH R.E. (1971). Antigenic variation in strains of avian infectious bronchitis virus. *Arch. Gesamte Virusforsch.*, 34, 32–39.

DE WITT J.J. (2000). Technical review. Detection of infectious bronchitis virus. *Avian Pathol.*, 29, 71–93.

EUROPEAN PHARMACOPOEIA 6.1 (2010a). Avian infectious bronchitis vaccine (live). European Directorate for the Quality of Medicines and HealthCare (EDQM), Council of Europe, Strasbourg, France, 3371–3373.

EUROPEAN PHARMACOPOEIA 6.0 (2010b). Avian infectious bronchitis vaccine (inactivated). European Directorate for the Quality of Medicines and HealthCare (EDQM), Council of Europe, Strasbourg, France, 864–865.

GELB J., JR., ROSENBERGER J.K., FRIES P.A., CLOUD S.S., ODOR E.M., DOHMS J.D. & JAEGER J.S. (1989). Protection afforded infectious bronchitis virus-vaccinated sentinel chickens raised in a commercial environment. *Avian Dis.*, 33, 764–769.

GELB J., JR., WEISMAN Y., LADMAN B.S. & MEIR R. (2005). S1 gene characteristics and efficacy of Vaccination against infectious bronchitis virus field isolates from the United States and Israel (1996–2000). *Avian Pathol.*, 34, 194–203.

GELB J., JR., WOLFF J.B. & MORAN C.A. (1991). Variant serotypes of infectious bronchitis virus isolated from commercial layer and broiler chickens. *Avian Dis.*, 35, 82–87.

HOFSTAD M.S. (1958). Antigenic differences among isolates of avian infectious bronchitis virus. *Am. J. Vet. Res.*, 19, 740–743.

HOPKINS S.R. (1974). Serological comparisons of strains of infectious bronchitis virus using plaque purified isolates. *Avian Dis.*, 18, 231–239.

IGNJATOVIC J., MCWATERS P. & GALLI L. (1991). Antigenic relationship of Australian infectious bronchitis viruses: analysis using polyclonal and monoclonal antibodies. In: *Proceedings of the Second International Symposium on Infectious Bronchitis*. Rauschholzhausen, Germany, June 1991, 161–167.

IGNJATOVIC J. & SAPATS S. (2000). Avian infectious bronchitis virus. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, 19 (2), 493–508.

JACKWOOD M.W., KWON H.M. & HILT D.A. (1992). Infectious bronchitis virus detection in allantoic fluid using the polymerase chain reaction and a DNA probe. *Avian Dis.*, 36, 403–409.

JACKWOOD M.W., YOUSEF N.M. & HILT D.A. (1997). Further development and use of a molecular serotype identification test for infectious bronchitis virus. *Avian Dis.*, 41, 105–110.

KARACA K., NAQI S.A. & GELB J. JR (1992). Production and characterisation of monoclonal antibodies to three infectious bronchitis virus serotypes. *Avian Dis.*, 36, 903–915.

KEELER C.L., REED K.L., NIX W.A. & GELB J. (1998). Serotype identification of avian infectious bronchitis virus (IBV) by RT-PCR of the peplomer (S-1) gene. *Avian Dis.*, 42, 275–284.

KING D.J. & HOPKINS S.R. (1984). Rapid serotyping of infectious bronchitis virus isolates with the haemagglutination inhibition test. *Avian Dis.*, 28, 727–733.

- KINGHAM B.F., KEELER C.L. JR, NIX W.A., LADMAN B.S. & GELB J. JR (2000). Identification of avian infectious bronchitis virus by direct automated cycle sequencing of the S-1 gene. *Avian Dis.*, 44, 325–335.
- KOCH G., HARTOG L., KANT A., VAN ROOZELAAR D. & DE BOER G.F. (1986). Antigenic differentiation of avian bronchitis virus variant strains employing monoclonal antibodies. *Israel J. Vet. Med.*, 42, 80–97.
- KOCH G., KANT A., COOK J.K.A. & CAVANAGH D. (1992). Location of antigenic sites defined by neutralising monoclonal antibodies on the S1 avian infectious bronchitis virus glycopolyptide. *J. Gen. Virol.*, 73, 591–596.
- KUSTERS J.G., NIESTERS H.G.M., LENSTRA J.A., HORZINEK M.C. & VAN DER ZEIJST B.A.M. (1989). Phylogeny of antigenic variants of avian coronavirus IBV. *Virology*, 169, 217–221.
- KWON H.M., JACKWOOD M.W., & GELB J., JR. (1993). Differentiation of infectious bronchitis virus serotypes using polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism analysis. *Avian Dis.*, 37, 194–202.
- MOCKETT A.P.A. & DARBYSHIRE J.H. (1981). Comparative studies with an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for antibodies to avian infectious bronchitis virus. *Avian Pathol.*, 10, 1–10.
- NAQI S.A. (1990). A monoclonal antibody-based immunoperoxidase procedure for rapid detection of infectious bronchitis virus in infected tissues. *Avian Dis.*, 34, 893–898.
- RUANO M., EL-ATTRACHE J. & VILLEGAS P. (2000). A rapid-plate hemagglutination assay for the detection of infectious bronchitis virus. *Avian Dis.*, 44, 99–104.
- SCHULTZE B., CAVANAGH D. & HERRLER G. (1992). Neuraminidase treatment of avian infectious bronchitis coronavirus reveals a haemagglutinating activity that is dependent on sialic acid-containing receptors on erythrocytes. *Virology*, 189, 792–794.
- TARPEY I., ORBELL S.J., BRITTON P., CASAIS R., HODGSON T., LIN F., HOGAN E. & CAVANAGH D. (2006). Safety and efficacy of an infectious bronchitis virus used for chicken embryo vaccination. *Vaccine*, 24, 6830–6838.
- UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE (USDA), Animal and Plant Health Inspection Service (APHIS) (1 January, 1994). Code of Federal Regulations. § 113. 327 Bronchitis Vaccine. US Government Printing Office, Washington, D.C., USA. <http://cfr.vlex.com/vid/327-bronchitis-vaccine-19609153>
- WAKENELL P.S., SHARMA J.M. & SLOCOMBE R.F. (1995). Embryo vaccination of chickens with infectious bronchitis virus: histologic and ultrastructural lesion response and immunologic response to vaccination. *Avian Dis.*, 39, 752–765.

WITTER R.L. (1962). The diagnosis of infectious bronchitis of chickens by the agar gel precipitin test. *Avian Dis.*, 6, 478–492.

WOO P.C.Y., LAU S.K.P., LAM C.S.F., LAU C.C.Y., TSANG A.K.L., LAU J.H.N., BAI R., TENG J.L.L., TSANG C.C.C., WANG M., ZENG B.-J., CHAN K.-H. & YUEN K.-Y. (2012). Discovery of seven novel mammalian and avian coronaviruses in the genus Deltacoronavirus supports Bat coronaviruses as the gene source of Alphacoronavirus and Betacoronavirus and avian coronaviruses as the gene source of Gammacoronavirus and Deltacoronavirus. *J. Virol.*, 86, 3995–4008.

YU L., JIANG Y., LOW S., WANG Z., NAM S.J., LIU W. & KWANG J. (2001). Characterization of three infectious bronchitis virus isolates from China associated with proventriculus in vaccinated chickens. *Avian Dis.*, 45, 416–424.

ZWAAGSTRA K.A., VAN DER ZEIJST B.A.M. & KUSTERS J.G. (1992). Rapid detection and identification of avian bronchitis virus. *J. Clin. Microbiol.*, 30, 79–84.

* * *