

Молекулярные методы контроля болезни Гамборо (IBD)

Marcos Bentué

Laboratorios Hipra,

Европейская птицеводческая индустрия уже в течение долгого времени сталкивается лицом к лицу с вирусом IBD, который распространился по всему миру, включая большинство африканских стран. Начиная с конца 80-х острые и тяжелые вспышки IBD, с 30%-ой смертностью в бройлерных хозяйствах, были зарегистрированы в нескольких европейских странах. Высокая смертность указывала на увеличение патогенности штаммов IBD, которые были классифицированы как высоковирулентные IBDV (vvIBDV). Болезнь легко диагностируется, если во время полевой вспышки присутствуют смертность и клинические признаки. Однако существует много случаев, когда постановка диагноза является гораздо более трудной задачей: субклиническое течение IBD, позднее проявление IBD, взаимодействие нескольких иммунодепрессивных факторов.

Доступные диагностические методы IBD.

Традиционно диагноз болезни Гамборо устанавливали, используя несколько методов, разработанных для обнаружения вируса или антител, выявляемых непосредственно вирусом. Когда идет речь об обнаружении антител, выявляемых вирусом, используются три основных диагностических метода: Elisa, тест диффузионной преципитации в агаровом геле и вирусная нейтрализация. В настоящее время Elisa широко используется и обычно применяется, для оценки иммунного ответа на вакцины, с целью обнаружения возможного контакта с полевыми вирусами IBD. Два других метода (РДП и РН) обычно не используются, так как они являются недостаточно чувствительными или достаточно трудоемкими. Обнаружение вируса выполняется методом изоляции вируса, окраски и молекулярной диагностики. Изоляция вируса производится на СПФ эмбрионах. Данный метод является очень чувствительным, но дорогостоящим и трудозатратным. Методика окрашивания (иммунопероксидаза и иммунофлюоресценция) обладает низкой чувствительностью, так как для ее применения требуется высокая концентрация вируса, и она должна быть использована в острой фазе инфекции. И, наконец, последние методы - методы молекулярной диагностики, которые позволяют обнаружить генетический материал вируса.



Молекулярные методы обладают целым рядом преимуществ

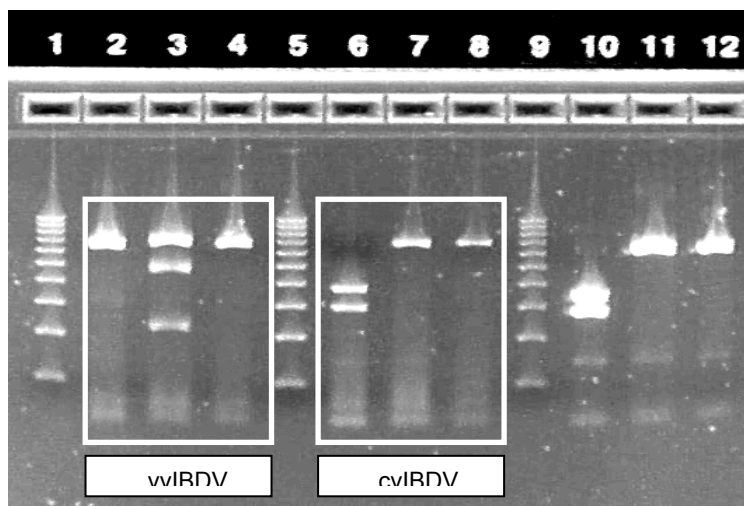
В настоящее время, мы обладаем различными молекулярными диагностическими инструментами, для определения присутствия вируса IBD и впоследствии идентификации определенных видов штаммов (типирование). Данные молекулярные методы очень чувствительны и обеспечивают получение достоверной информации, и в последнее время, становятся все более и более популярными. Большинство молекулярных методик направлено на определение порядка варибельной области гена VP2, который состоит из 345 нуклеотидов. Данный участок, как известно, кодирует антигенные детерминанты вируса, индуцирующие выработку нейтрализующих антител, которые обеспечивают иммунитет против болезни Гамборо. Кроме того, мутации нуклеотидов и аминокислот могут происходить в переменной области VP2. Это важно для изучения варибельной области VP2 с целью дифференциации антигенных свойств у разных штаммов вируса IBD. Также возможно определение патотипов, поскольку известно, что некоторые аминокислоты, находящиеся в разных положениях в варибельной области, являются индикаторами патогенности вирусов болезни Гамборо (Аланин 222, Изолейцин 256, Изолейцин 294). Они являются- маркерами патогенности вируса.

RT/PCR-REA обнаруживает и идентифицирует вирусы IBD.

Обнаружение вируса Гамборо выполняется при помощи метода RT/PCR (метод ПЦР - рестрикции с применением обратной транскрипции и определением длины полиморфного фрагмента цепочки). Используя данную методику, возможно обнаружить все штаммы IBD, независимо от их уровня патогенности и антигенной структуры. Методом фенотипирования является - REA (Рестрикционный Энзимный Анализ). Продукты PCR обрабатывают различными рестриктазами (нуклеазами - ферментами, расщепляющими нуклеиновые кислоты), которые позволяют дифференцировать vvIBD (высоковирулентные штаммы IBD) от классических патогенных вирусов IBD. Рестриктазы могут рассматриваться в качестве ножниц для генетического материала, которые разрезают ДНК в определенном порядке.



Рис. 1. Молекулярные методы, такие как RT/PCR в реальном времени с последующей рестрикцией, являются очень эффективными для обнаружения и дифференциации вирусов IBD:

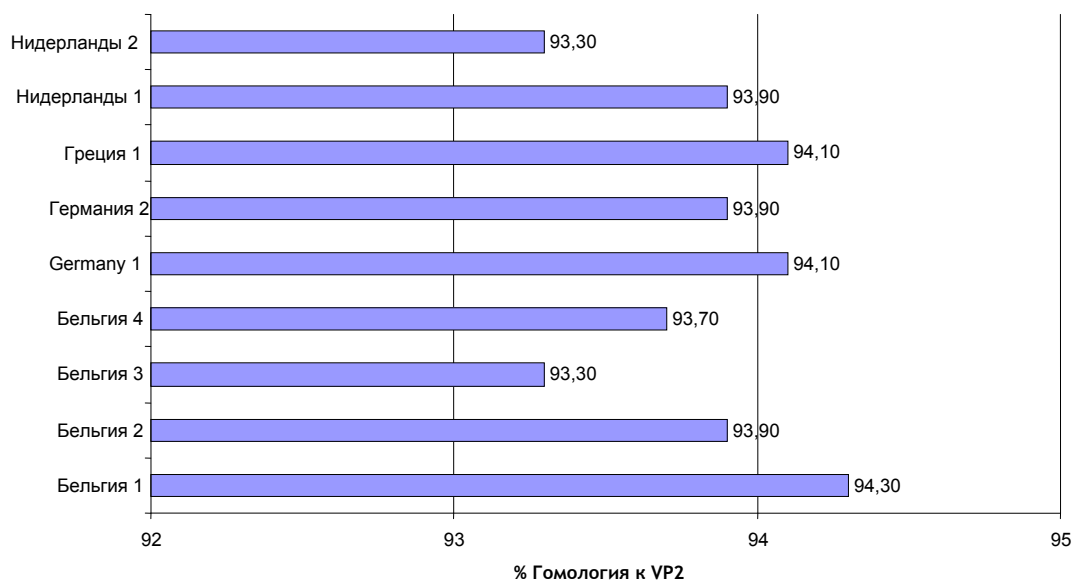


Дифференциация vvIBDV (высоковирулентного вируса IBD) от cvIBDV (классический патогенный вирус IBD). BspMI рестриктаза "разрезает" высоковирулентный штамм IBD (полоска 3) и не оказывает действия на классический патогенный штамм IBD (полоска 7). SacI рестриктаза не "разрезает" vvIBDV (полоска 2), но делает это в полоске 6 (cvIBDV). Таким образом, возможно идентифицировать оба вируса IBD.

Сиквенс дает наиболее исчерпывающую информацию.

Сиквенс определяет последовательность всех нуклеотидов в гипервариабельной области. После сиквенирования, можно получить подробную информацию о мутации и ее последствиях для аминокислот. Кроме того можно определить участки расщепления любой рестриктазы. Оценка влияния мутаций на биологическую функцию или антигенные свойства вируса IBD до сих пор являются предметами для дискуссий. После выполнения сиквенирования также возможно провести филогенетические исследования, чтобы определить уровень родства среди различных вирусов IBD. И, кроме того, возможно установить гомологию VP2 между различными вирусами IBD.

Рис. 2. Гомология Hipragumboro-GM97 со штаммами vvIBDV, полученными из разных европейских стран.



Практическое применение молекулярных методов.

Рекомендуется регулярно проводить мониторинг вируса IBD в птицеводческих хозяйствах для оценки штаммов, циркулирующих на бройлерных птицефабриках для того, чтобы иметь возможность правильно составить схему вакцинации.

В настоящее время карты FTA® дают прекрасную возможность для отправки образцов патологического материала в лаборатории, так как они сохраняют генетический материал вируса. У карт FTA® есть 4 зоны, для фиксации отпечатков образцов (круглые области на внешнем крае каждой карты). Рекомендуется использовать одну или две карты (по четыре области на карте) для одного птичника. В центре круга делают отпечаток образца бursy. После чего дают отпечаткам высохнуть на воздухе в течение от 40 минут - 1 часа. Как только карта полностью высохнет, она упаковывается в индивидуальный полиэтиленовый пакет и отправляется в лабораторию.



Рис. 3. Техника отпечатка на карте FTA®.



Рис.4 Карта FTA® после взятия образцов



- В лаборатории образцы с карт FTA® исследуют следующими методами:
 - RT-PCR (ПЦР с применением обратной транскрипции). Этот метод позволяет обнаружить вирус и дает возможность определить время инфицирования, или качество проведенной вакцинации.
 - REA (Рестрикционный анализ): идентификация вируса. Этот метод помогает отличить полевой вирус от вируса вакцины.
 - Секвенирование: позволяет изучить особенности циркулирующего вируса и сравнить его с различными IBD вирусами

Программы технической поддержки: Lymfos VAC и Lymfos BROILERS

Технические программы дают основные рекомендации по стратегии борьбы с болезнью Гамборо. Эти программы направлены на изучение и контроль болезни Гамборо. В настоящее время компания Hipra предлагает две разные программы, Lymfos VAC и Lymfos BROILERS, которые уже успешно применяются целым рядом компаний во всем мире. Эти программы предусматривают серию последовательных исследований, основанных на еженедельном отборе образцов Фабрицевых сумок.

Образцы исследуют молекулярными методами диагностики, такими как T-PCR (Обратно транскриптазная-полимеразная цепная реакция) в сочетании с рестрикционным энзимным анализом (РЭА). Проводится секвенирование VP2 и филогенетические исследования с целью определения гомологии IBD вирусов, циркулирующих в хозяйстве с другими референтными вирусами.



Lymfos VAC

Конечной целью вакцинации является обеспечение рентабельного производства птицы. К сожалению, эффективность вакцин зависит от ряда других факторов, которые не связаны непосредственно с вакцинами. Чтобы убедиться в успешности вакцинации, необходимо получить подтверждение факта проникновения вируса вакцины в бурсу и его дальнейшей репликации в ней при помощи молекулярных методов.

Программа Lymfos VAC начинает действие в момент вакцинации, которая является первой отправной точкой для взятия проб патологического материала. Как только подтверждено, что цыплята не инфицированы vvIBDV или другим циркулирующим в хозяйстве вирусом IBD, необходимо убедиться, что бурсы не инфицированы и готовы к заселению вирусом вакцины. С другой стороны, если бурсы уже инфицированы, можно сделать вывод о том, что возможности вакцины по защите против болезни Гамборо будут значительно ограничены. Следующее еженедельное взятие проб будет через 7 дней после прививки, и это исследование позволит сделать вывод о том, был ли вирус вакцины способен колонизировать бурсу в достаточной степени. Если результат будет неудовлетворительным, и вакцина не колонизировала бурсу, в хозяйстве все еще будет достаточно времени для повторной вакцинации птицы и для создания удовлетворительного уровня защиты.

Lymfos BROILERS

С программой Lymfos BROILERS, еженедельное осуществление отбора проб начинается во время прививки и может продолжаться до конца периода откорма, для того чтобы определить динамику развития инфекции и определить точное время, когда бройлеры становятся инфицированными. Эта информация будет основой для применения правильной стратегии защиты следующих туров бройлеров. Кроме того, проводят исследование бурсы на степень специфического поражения и определение патогенности полевого вируса. Опыт работы доказывает важность определения специфичности вирусов болезни Гамборо, циркулирующих на бройлерной ферме период откорма. Кроме того, крайне важно определить момент, когда птица может быть инфицирована, а



также определить источники или резервуары полевого вируса. Таким образом, технические программы Lymfos VAC и Lymfos BROILERS позволят обнаружить “скрытые угрозы”, и, тем самым, обеспечить успех в борьбе с болезнью Gumboro.



НОВОЕ СЛОВО В ПРОФИЛАКТИКЕ ИНФЕКЦИОННОЙ БУРСАЛЬНОЙ БОЛЕЗНИ: ЖИВЫЕ ВАКЦИНЫ ХИПРАГАМБОРО

Испанская компания Хипра (LABORATORIOS HIPRA, S.A.)—один из ведущих производителей ветеринарно-фармацевтической продукции в Европе.

Более полувека компания занимается серьезными научными изысканиями в области здоровья животных и предлагает своим клиентам широкий ассортимент инновационных продуктов: вакцин, ветеринарных препаратов и диагностических систем.

Продукцию компании Хипра можно встретить более чем в 100 странах мира, где она пользуется заслуженной популярностью благодаря своей высокой эффективности.

Компания в своей работе придерживается основных принципов: предложение клиентам продукции высочайшего качества, постоянная работа над инновациями, ориентирование ассортимента на потребности рынка, сервис и техническая поддержка. Недавно компания Хипра вывела на российский рынок несколько уникальных биологических продуктов. «Звездным» продуктом в этом перечне и в глобальном ассортименте компании в целом является живая вакцина **ХИПРАГАМБОРО GM97**, которая венчает группу живых вакцин компании HIPRA для профилактики инфекционной бурсальной болезни (ИББ). Продукт является уникальным, поскольку это единственная вакцина для профилактики ИББ (IBD) в Европейском союзе, которая способна индуцировать специфические антитела против *высоковирулентных* штаммов вируса ИББ (vvIBDv). Кроме того, препарат при использовании в неблагополучных хозяйствах обеспечивает лучшую защиту по сравнению с другими вакцинами, предназначенными для профилактики ИББ, которые уже имеются на рынке.

Первая информация о вспышках *высоковирулентного* штамма вируса, вызывающего ИББ появилась в конце 1980-х. И сегодня, случаи ИББ, вызванные vvIBDv, остаются серьезной проблемой птицеводческой индустрии во всем мире. *Высоковирулентный* штамм вируса ИББ может быстро приводить к гибели от 5% до 60 % поголовья птицы. Клинические и патологоанатомические признаки подобны классической форме болезни, включая беловатую диарею, воспаление и последующую атрофию фабрициевой сумки, иммунодепрессию, кровоизлияния в мышцах, истощение и кому. Однако, в случае с vvIBDv, в фабрициевой сумке появляются желеобразный экссудат, серьезные некротические и геморрагические поражения.

ХИПРАГАМБОРО GM97 являет собой воплощение новой концепции борьбы с вирусом vvIBD, основанной на двух приоритетах: **специфичность и безопасность**. Вирус вакцины в **ХИПРАГАМБОРО GM97**, являясь генетически подобным vvIBD вирусам, формирует специфичные антитела против высоковирулентной формы вируса ИББ. Это гарантирует лучшую профилактику заболевания. Вакцина была всесторонне проверена на безопасность. Как показали испытания, она была безвредна даже для суточных цыплят, в отличие от многих вакцин для профилактики ИББ из класса "промежуточных плюс" и "горячих" имеющихся на рынке, которые не рекомендуются для применения птице моложе 7 дней.

При экспериментальном заражении штаммами вируса ИББ разного происхождения вакцина показала высокую степень защиты популяции лимфоцитов, тем самым, предотвращая иммунодепрессию, вызываемую вирусом ИББ.

Другие преимущества вакцины **ХИПРАГАМБОРО GM97** состоят в том, что она предотвращает уменьшение привесов даже после инфекции, и не снижает производственные показатели.

Кроме того, вакцина не вызывает иммунодепрессию у привитых птиц, и таким образом, не влияет на иммунный ответ при вакцинации против Ньюкаслской болезни и болезни Марек. Вакцина очень безвредна, не вызывает проявления клинических признаков и патологоанатомических изменений у птиц при передозировке.

В ряде опытов, птица, привитая **ХИПРАГАМБОРО GM97**, искусственно заражалась штаммами vvIBDv, полученными с разных континентов. Результаты показали, что вакцинированная птица не заболела болезнью Гамборо. В привитых стадах не был зафиксирован падеж птицы, в отличие от невакцинированных групп, где смертность составила 100%. Поражение бursы отмечалось только в 17-23 % случаев, по сравнению с полностью поврежденной фабрициевой сумкой у невакцинированных цыплят.

Вакцина **ХИПРАГАМБОРО GM97** успешно применяется для предотвращения вспышек инфекционной бурсальной болезни в коммерческих стадах бройлеров, известных мировых производителей кроссов "Росс", "Кобб", "Гибро", "Хаббард", "Пьюрелайн" в странах Европы, Южной Америки, Азии и Африки.

Кроме того, в линейке биопродуктов компании Хипра имеется еще один интересный продукт, направленный на профилактику ИББ – вакцина **ХИПРАГАМБОРО СН/80**.

Все живые вакцины, которые предлагаются на рынке, можно разделить на несколько групп, в зависимости от их иммуногенности и их агрессивности. Вакцины, получаемые из клонированных штаммов вируса, включают одну единственную субпопуляцию вакцинного вируса и обеспечивают лучшие иммуногенные свойства, чем традиционные вакцины. **ХИПРАГАМБОРО СН/80** - это живая вакцина, полученная путем клонированного среднего штамма IBDv. Вакцина **ХИПРАГАМБОРО СН/80** способна работать при среднем уровне материнских антител.

Восприимчивость птицы к другим болезням наблюдается как следствие иммуносупрессии, вызываемой IBDv. Также повышается уровень поствакцинальных реакций и ослабление иммунного ответа на вакцинации. Некоторые вакцины могут чрезмерно поражать бурсу и вызывать временную иммуносупрессию. Вакцина **ХИПРАГАМБОРО СН/80** не вызывает иммуносупрессию у вакцинированной птицы.

ХИПРАГАМБОРО СН/80 широко используется для контроля болезни Гамборо в нескольких тысячах хозяйств по всему миру. Ее эффективность доказана не только проводимыми полевыми испытаниями, но и подтверждена производственными показателями в вакцинированных стадах в Европе, Латинской Америке, Азии и Африке.

Подробную информацию о вакцинах **ХИПРАГАМБОРО** и других продуктах для птицеводства, свиноводства и животноводства можно получить в Представительстве компании «Хипра»: 129344, Москва, ул. Енисейская, д.1, Тел./Факс: (495) 221-41-19, (916) 284-34-11; russia@hipra.com, www.hipra.com