

УДК 619:616.98:578.831.3:636.5:616-073

# СРАВНЕНИЕ ИММУННОГО ОТВЕТА ЦЫПЛЯТ-БРОЙЛЕРОВ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ЗАРАЖЕНИИ ИЗОЛЯТАМИ МЕТАПНЕВМОВИРУСА ПТИЦ ПОДТИПОВ А И В

П.С. Ярославцева<sup>1</sup>, М.А. Волкова<sup>2</sup>, З.Б. Никонова<sup>3</sup>, Н.С. Мудрак<sup>4</sup>, Ир.А. Чвала<sup>5</sup>

<sup>1</sup> младший научный сотрудник, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: yaroslavtseva@arriah.ru

<sup>2</sup> ведущий научный сотрудник, кандидат биологических наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: volkovama@arriah.ru

<sup>3</sup> младший научный сотрудник, кандидат биологических наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: nikonova@arriah.ru

<sup>4</sup> главный научный сотрудник, доктор биологических наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: mudrak@arriah.ru

<sup>5</sup> старший научный сотрудник, кандидат биологических наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: chvala\_ia@arriah.ru

## РЕЗЮМЕ

При экспериментальном заражении цыплят-бройлеров изолятом метапневмовируса птиц подтипа А отмечали слабо выраженные клинические признаки с 6 по 14 сутки после заражения. У инфицированных цыплят отмечали незначительное повышение активности Т-хелперов в крови, слабо выраженный специфический гуморальный иммунный ответ, выработку специфических секреторных антител. Изолят метапневмовируса птиц подтипа В вызывал несколько более выраженные по сравнению с подтипом А клинические проявления у цыплят с 5 по 15 сутки после инфицирования, однако в обоих экспериментах клинические признаки полностью исчезали через 14–15 суток после заражения. У зараженных цыплят отмечали увеличение относительного количества цитотоксических Т-лимфоцитов в крови и селезенке, специфический гуморальный иммунный ответ у 50–70% птиц, активацию локального иммунного ответа у 50% цыплят.

Ключевые слова: метапневмовирус птиц, иммунный ответ, экспериментальное заражение.

UDC 619:616.98:578.831.3:636.5:616-073

# COMPARISON OF IMMUNE RESPONSE IN BROILER CHICKENS AFTER EXPERIMENTAL INOCULATION WITH ISOLATES OF AVIAN METAPNEUMOVIRUS SUBTYPES A AND B

P.S. Yaroslavtseva<sup>1</sup>, M.A. Volkova<sup>2</sup>, Z.B. Nikonova<sup>3</sup>, N.S. Mudrak<sup>4</sup>, Ir.A. Chvala<sup>5</sup>

<sup>1</sup> Junior Researcher, FGBI «ARRIAH», Vladimir, e-mail: yaroslavtseva@arriah.ru

<sup>2</sup> Leading Researcher, Candidate of Science (Biology), FGBI «ARRIAH», Vladimir, e-mail: volkovama@arriah.ru

<sup>3</sup> Junior Researcher, Candidate of Science (Biology), FGBI «ARRIAH», Vladimir, e-mail: nikonova@arriah.ru

<sup>4</sup> Chief Researcher, Doctor of Science (Biology), FGBI «ARRIAH», Vladimir, e-mail: mudrak@arriah.ru

<sup>5</sup> Senior Researcher, Candidate of Science (Biology), FGBI «ARRIAH», Vladimir, e-mail: chvala\_ia@arriah.ru

## SUMMARY

After experimental inoculation of broiler chickens with subtype A avian metapneumovirus isolate, mild clinical signs were observed on days 6-14 after inoculation. The infected chickens demonstrated slight increase of T-helpers activity in blood, poor specific antibody response, development of specific secretory antibodies. Subtype B avian metapneumovirus isolate caused a somewhat more obvious specific clinical signs in chickens compared with subtype A on days 5-15 after inoculation, however, in both experiments, clinical signs completely disappeared in 14-15 days after infection. The increase of relative number of cytotoxic T lymphocytes in blood and in spleen, specific antibody response in 50-70% of chickens and activation of local immune response in 50% of chickens were observed in inoculated chickens.

Key words: avian metapneumovirus, immune response, experimental inoculation.

## ВВЕДЕНИЕ

Метапневмовирус (МПВ) птиц — РНК-содержащий вирус, относящийся к семейству *Paramyxoviridae*, род *Metapneumovirus*, вид *Avian Metapneumovirus* (aMPV). Впервые он был выявлен в 1978 г. в Южной Африке. МПВ птиц является возбудителем контагиозного респираторного заболевания кур и индеек всех возрастов, которое представляет серьезную угрозу для промышленного птицеводства во всем мире и наносит значительный экономический ущерб. Поскольку исходным звеном локализации и развития инфекционного процесса при МПВ птиц являются дыхательные пути, локальный и клеточный иммунный ответ предотвращает репликацию и дальнейшее проникновение вируса в организм [2–6].

На основании антигенных и генетических различий выделяют 4 подтипа вируса: А, В, С и D. Вирусы подтипов А и В были выявлены в Африке, Азии, Южной и Северной Америке, Европе, России. Подтип С был впервые выделен от индеек с респираторными признаками болезни в США в 1996 г., а позднее во Франции, Южной Корее и Китае. Вирус подтипа D — во Франции и Корее [2, 3]. На территории Российской Федерации за последние 10 лет выявляли МПВ птиц подтипов А и В [1]. По данным исследований ФГБУ «ВНИИЗЖ» за 2015 г., геном МПВ птиц был выявлен в 15% исследованных птицефабрик страны.

Целью данной работы являлась сравнительная оценка иммунного ответа кур на заражение изолятами МПВ птиц подтипов А и В, выделенными на территории РФ.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Вирусы.** Изолят МПВ птиц подтипа А (aMPV/A/02/2014), выделенный из патологического материала от 6-месячных кур яичного направления одной из птицефабрик Костромской области РФ в 2014 г.

Изолят МПВ птиц подтипа В (aMPV/B/22/2010), выделенный из патологического материала от 29-суточных цыплят-бройлеров одной из птицефабрик Белгородской области в 2010 г.

**Эксперимент на цыплятах.** Проводили два экспериментальных заражения МПВ птиц подтипов А и В. В обоих экспериментах использовали 7-суточных цыплят-бройлеров, не имеющих антител к МПВ птиц. Цыплят делили на опытные и контрольные группы по 20 голов в каждой, которые содержали в отдельных изолированных боксах. Опытной группе вводили вирусный материал интраназально и закапыванием на конъюнктиву глаза в дозе  $6,1 \text{ Ig TCD}_{50}/0,4 \text{ мл}$  на цыплёнка. В ходе экспериментов отбирали пробы (кровь, ротоглоточные смывы, слезная жидкость, тимус, селезенка, бурса) для исследования методами ИФА и проточной цитофлуориметрии.

**Иммуноферментный анализ (ИФА).** Выявление антител к МПВ птиц проводили с использованием набора для определения антител к метапневмовирусу птиц иммуноферментным методом при тестировании сывороток в одном разведении (ФГБУ «ВНИИЗЖ») согласно инструкции производителя. Учёт реакции проводили на спектрофотометре-ридере Sunrise Basic (Tecan, Австрия) при длине волны 405 нм с использованием компьютерной программы «СИНКО-ИФА». Результат реакции считали положительным при величине титра антител 392 и выше (за титр антител принимали величину, обратную разведению сыворотки).

Определение титра антител к МПВ птиц в слезной жидкости и трахеальных смывах цыплят проводили в непрямом варианте ИФА с использованием планшетов (Nunc, MaxiSorp, Дания), сенсibilизированных антигеном МПВ птиц в 0,1 М карбонатно-бикарбонатном буфере (рН 9,5), по стандартному протоколу. Титр антител в испытуемых пробах определяли по конечной точке титрования.

**Количественный анализ субпопуляций лимфоцитов.** Выделение лимфоцитов из периферической крови и лимфоидных органов кур проводили по стандартной методике с использованием Ficoll-Paque™ PLUS (Amersham Biosciences, Швеция). Подготовку проб для выявления поверхностных маркеров лимфоцитов осуществляли с использованием меченых моноклональных антител CD45-FITC, CD4-PE, CD8α-PE, CD3-PE (Southern Biotech, США). Количественный анализ клеток проводили на проточном цитофлуориметре BD FACS Calibur (Becton, Dickinson, США). Измерение и обработку полученных результатов осуществляли с использованием программного обеспечения Cell Quest Pro 1.0.

**Определение продукции цитокинов.** Суспензию лимфоцитов селезенки в концентрации  $1 \times 10^7$  клеток/мл активировали конкавалином А (Кон А) (Sigma-Aldrich, США) (0,1 мг/мл) и инкубировали в CO<sub>2</sub>-инкубаторе при температуре 37 °С в течение 48 ч. В качестве отрицательного контроля использовали лимфоциты, инкубированные со средой RPMI 1650. Продукция интерферона-γ (IFN-γ) была оценена в ИФА с использованием набора Chicken IFN-γ CytoSet (Biosource, США).

**Статистический анализ результатов.** Для статистической обработки данных использовали программу Statistica 10.0 (Stat Soft. Inc., США). Существенность различий результатов цитофлуориметрического исследования проб от цыплят из инфицированной и контрольной групп определяли с использованием непараметрического критерия Манна-Уитни. Различия считали статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В ходе эксперимента у цыплят опытных групп наблюдали клинические признаки, характерные для респираторных заболеваний. У цыплят, зараженных изолятом подтипа А, наблюдали носовые истечения и незначительное опухание инфраорбитальных синусов с 6 по 14 сутки после инфицирования. У цыплят, зараженных изолятом подтипа В, клинические признаки, которые регистрировали с 5 по 15 сутки после инфицирования, были более выражены: наблюдали кратковременное угнетенное состояние, носовые истечения, одностороннее либо двустороннее опухание инфраорбитальных синусов. У птиц контрольных групп клинических изменений не наблюдали.

Сыворотки крови отбирали от птиц опытных и контрольных групп и исследовали в ИФА на наличие специфических антител к МПВ птиц подтипов А и В. Низкий уровень специфических антител к МПВ подтипа А был выявлен у 2 из 10 исследованных цыплят опытной группы через 7 и 14 суток после заражения (максимальное значение титра выявленных антител в ИФА составляло 690). Специфические антитела к вирусу подтипа В выявляли у 7, 5 и 6 цыплят из опытной

Таблица  
Результаты выявления антител к МПВ птиц в сыворотках крови в ИФА

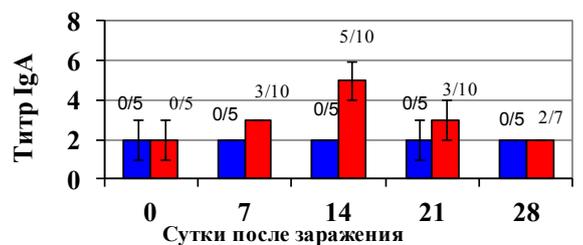
Группа	Сутки после заражения				
	0	7	14	21	28
Контроль	234±111 <sup>a</sup> 0/5 <sup>c</sup>	198±35 0/5	138±56 0/5	145±64 0/5	173±69 0/5
Опыт (МПВ птиц подтипа А)		221±83 686±4 <sup>b</sup> 2/10	187±49 457±3 2/10	129±18 0/10	106±23 0/7
Контроль	266±56 <sup>a</sup> 0/6 <sup>c</sup>	281±52 0/6	199±50 0/6	190±49 0/6	не исследовали
Опыт (МПВ птиц подтипа В)		576±174 758±215 <sup>b</sup> 7/10	1195±604 2288±1022 5/10	1732±861 2832±1272 6/10	не исследовали

<sup>a</sup> средний титр антител по группе ± стандартная ошибка среднего;

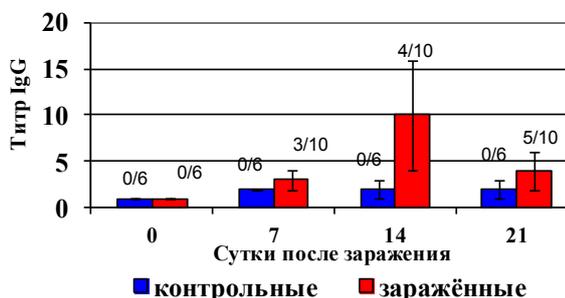
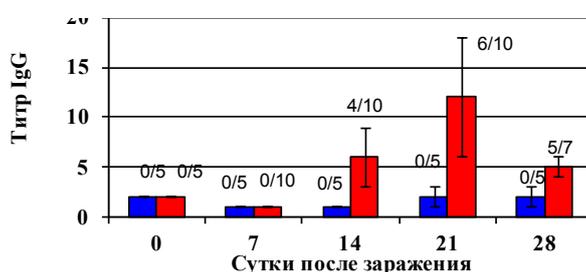
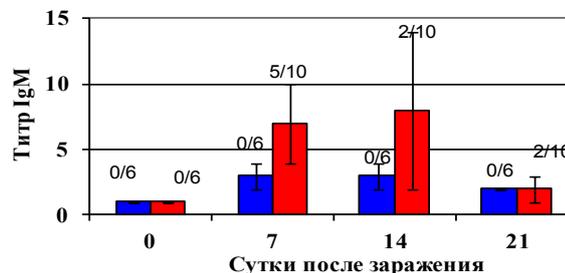
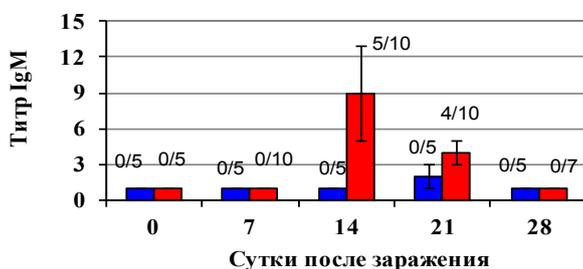
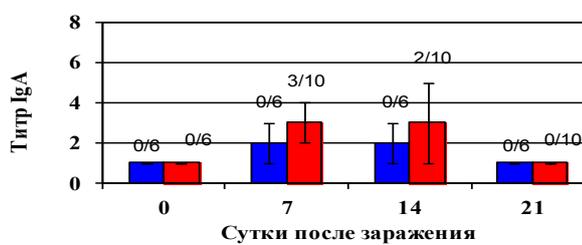
<sup>b</sup> средний положительный титр антител по группе ± стандартная ошибка среднего;

<sup>c</sup> отношение количества положительных проб к общему количеству исследованных проб.

### МПВ птиц подтипа А



### МПВ птиц подтипа В



■ контрольные ■ заражённые

Рис. 1. Результаты выявления антител к МПВ птиц подтипов А и В в ротоглоточных смывах цыплят опытных и контрольных групп

Результат реакции считали положительным при величине титра антител 1:4 и выше. Значения представлены как средний титр антител по группе ± стандартная ошибка среднего; значения над столбцами диаграммы показывают отношение количества положительных проб к общему количеству исследованных проб в группе.

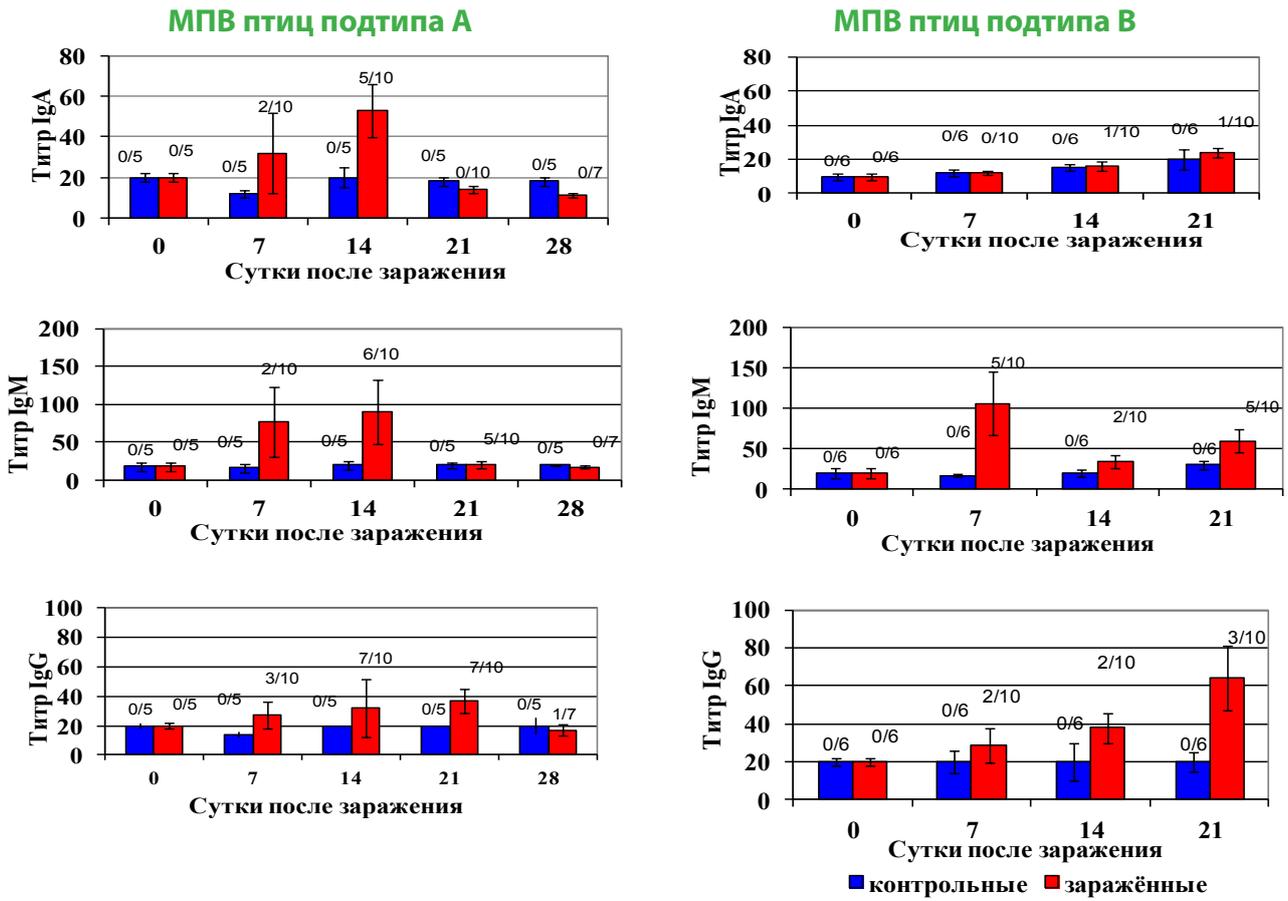


Рис. 2. Результаты выявления антител к МПВ птиц подтипов А и В в слезной жидкости инфицированных и контрольных групп цыплят

Результат реакции считали положительным при величине титра антител 1:20 и выше. Значения представлены как средний титр антител по группе ± стандартная ошибка среднего; значения над столбцами диаграммы показывают отношение количества положительных проб к общему количеству исследованных проб в группе.

группы, соответственно на 7, 14 и 21 сутки. У цыплят контрольных групп специфические антитела к МПВ птиц обоих подтипов не выявляли (таблица).

При исследовании ротоглоточных смывов у цыплят, зараженных вирусом подтипа А, пик выработки специфических антител классов А и М регистрировали на 14 сутки, а пик выработки антител класса G — на 21 сутки после заражения. У цыплят, зараженных вирусом подтипа В, пик выработки специфических антител регистрировали в более ранние сроки: антитела классов А и М выявляли уже начиная с 7 суток, антитела класса G — с 14 суток после инфицирования (рис. 1).

При исследовании слезной жидкости от цыплят, зараженных вирусом подтипа А, специфические антитела классов А и М в наиболее высоких титрах выявляли на 14 сутки после инфицирования. У цыплят, зараженных вирусом подтипа В, специфические антитела класса А выявляли в низких титрах, незначительно отличающихся от контрольной группы, антитела класса М в наиболее высоких титрах регистрировали на 7 сутки после инфицирования. Пик выработки антител

класса G отмечали одинаково для подтипов А и В на 21 сутки (рис. 2).

У цыплят контрольных групп специфические антитела к МПВ птиц в ротоглоточных смывах и слезной жидкости не обнаруживали.

Для оценки параметров клеточного иммунного ответа определяли количественное соотношение различных субпопуляций иммунокомпетентных клеток, а также оценивали функциональную активность лимфоцитов селезенки.

При экспериментальном заражении вирусом подтипа А через сутки после инфицирования регистрировали увеличенный уровень Т-хелперов (CD4) в крови и увеличенный объем цитотоксических клеток в тимусе инфицированных цыплят по сравнению с неинфицированным контролем. В бурсе инфицированных цыплят отмечали статистически значимое уменьшение относительного количества В-лимфоцитов (Bu1a), по сравнению с незараженными цыплятами через 1, 10 и 21 сутки после заражения, и увеличение относительного количества Т-лимфоцитов с 3 по 10 сутки после заражения (рис. 3).

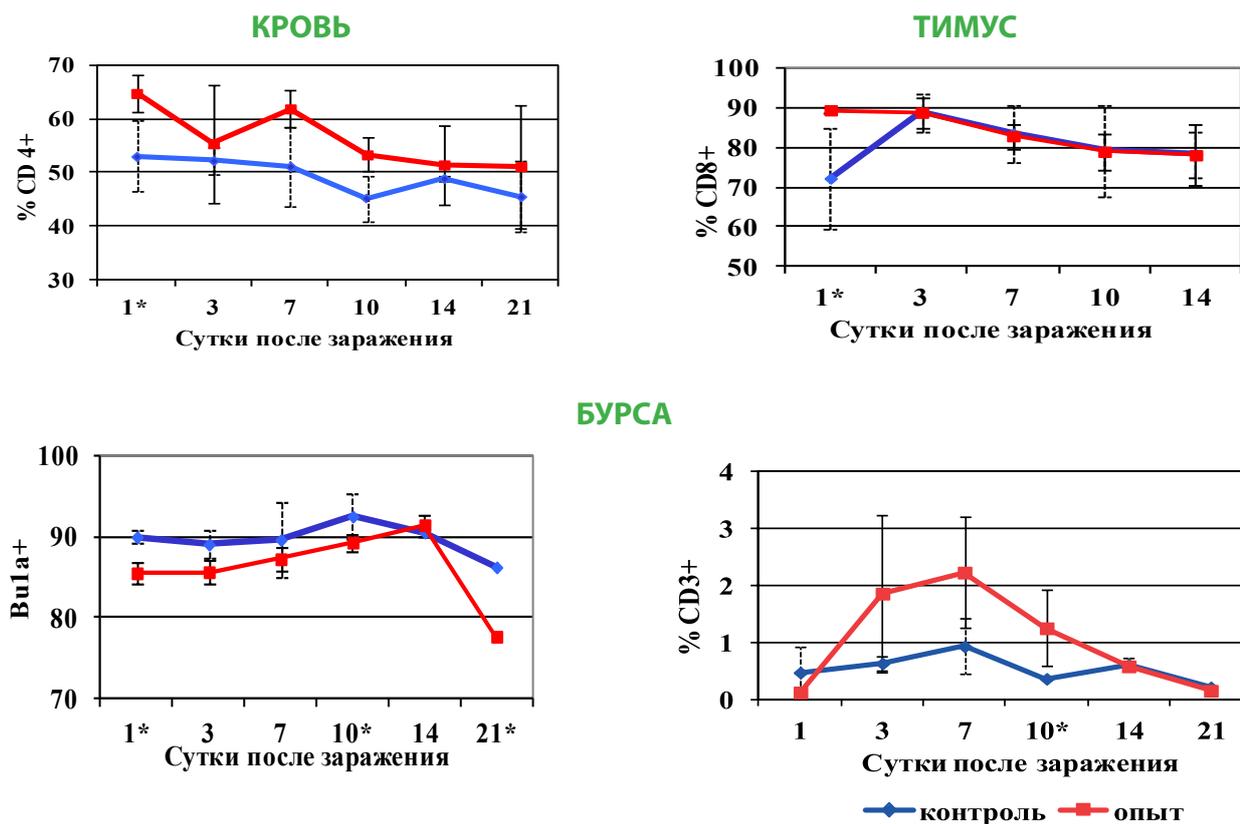


Рис. 3. Динамика относительного количества субпопуляций лимфоцитов цыплят в различные сроки после заражения изолятом МПВ птиц подтипа А

\* показывает процентное содержание субпопуляций лимфоцитов опытной группы, которые существенно отличались от таковых контрольной группы,  $p < 0,05$ ; Mann-Whitney U-test.

Вирус подтипа В вызывал увеличение относительного количества цитотоксических лимфоцитов (CD8) в крови и селезенке зараженных цыплят по сравнению с неинфицированными, в бурсе отмечали снижение общего объема лимфоцитов (CD45+) на 12 сутки после заражения (рис. 4).

При определении продукции IFN- $\gamma$  в супернатанте активированных Кон А лимфоцитов селезенки цыплят, зараженных вирусом подтипа А, регистрировали увеличение продукции IFN- $\gamma$  на 14 сутки после инфицирования и затем ее снижение на 21 сутки; у цыплят, зараженных вирусом подтипа В, увеличение уровня продукции IFN- $\gamma$  отмечали в более поздние сроки, через 20 суток после инфицирования (рис. 5).

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

При экспериментальном заражении цыплят-бройлеров изолятами МПВ птиц отмечали незначительные проявления клинических признаков, характерных для респираторных заболеваний, которые были более выражены при заражении МПВ подтипа В.

В обоих экспериментах наблюдали активацию локального иммунного ответа с 7 суток после заражения, клинические признаки регистрировали в период с 5–6 до 14–15 суток после заражения, а затем наблюдали полное выздоровление цыплят-бройлеров.

Динамика выработки гуморальных антител коррелировала со временем прекращения клинических признаков, однако изолят подтипа А вызывал незначительное увеличение титров специфических антител в крови только 20% зараженных птиц, в то время как антитела к подтипу В выявляли у 50–70% инфицированных цыплят и в более высоких титрах.

Клеточный иммунный ответ у цыплят, зараженных изолятом МПВ птиц подтипа В, характеризовался увеличением относительного количества цитотоксических Т-лимфоцитов в крови и селезенке, а также увеличением уровня продукции IFN- $\gamma$  в супернатанте активированных Кон А лимфоцитов селезенки цыплят на 20 сутки после инфицирования. При заражении вирусом подтипа А отмечали увеличение относительного количества хелперов в крови в первые сутки после заражения и снижение продукции IFN- $\gamma$  на 21 сутки. Инфицирование МПВ птиц также вызывало снижение общего количества лимфоцитов в бурсе.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Никонова З.Б., Перевозчикова Н.А., Зиняков Н.Г. Филогенетический анализ изолятов метапневмовирусов птиц, выявленных в России и странах ближнего зарубежья в 2005–2011 гг. // Ветеринария и кормление. — 2012. — № 5. — С. 34–36.

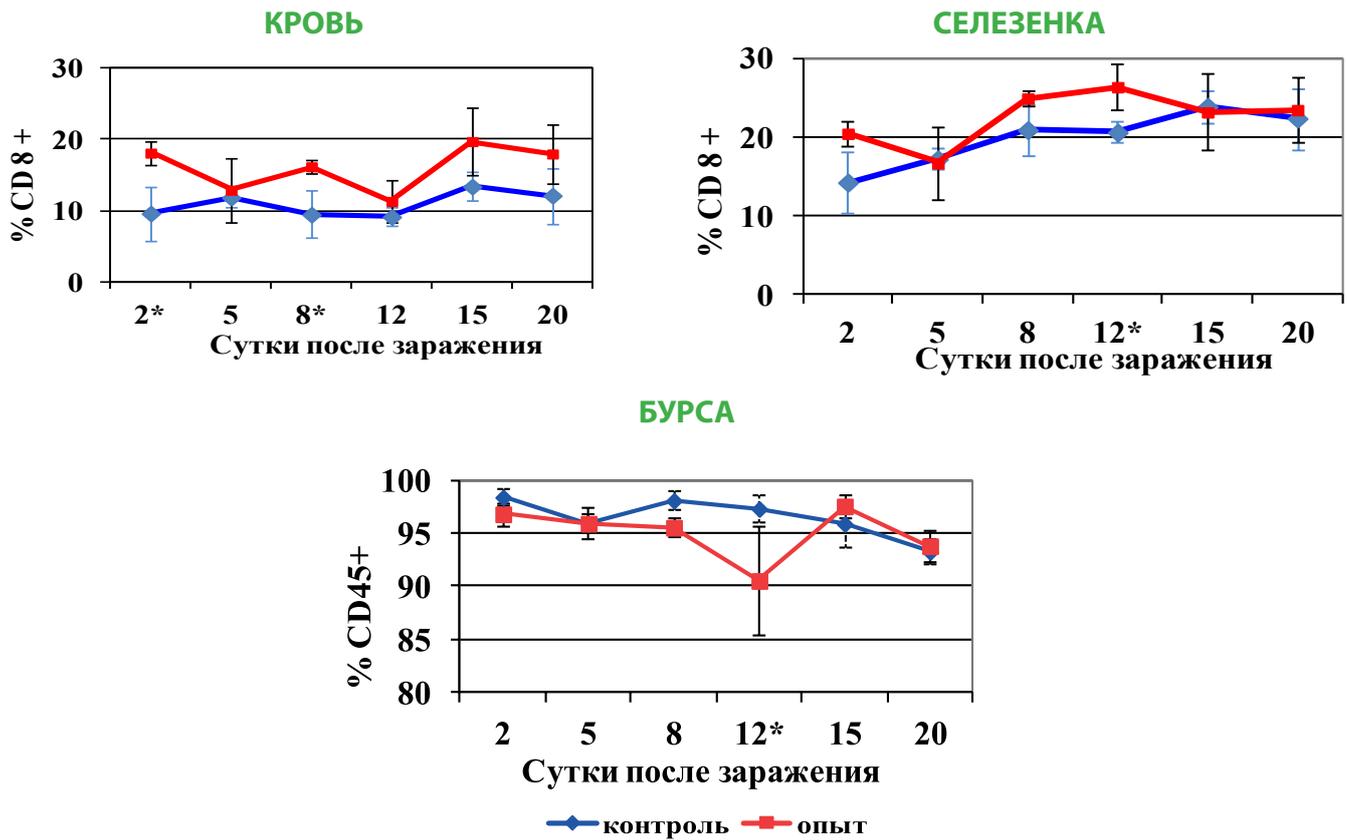


Рис. 4. Динамика относительного количества субпопуляций лимфоцитов цыплят в различные сроки после заражения изолятом МПВ птиц подтипа В

\* показывает процентное содержание субпопуляций лимфоцитов опытной группы, которые существенно отличались от таковых контрольной группы,  $p < 0,05$ ; Mann-Whitney U-test.

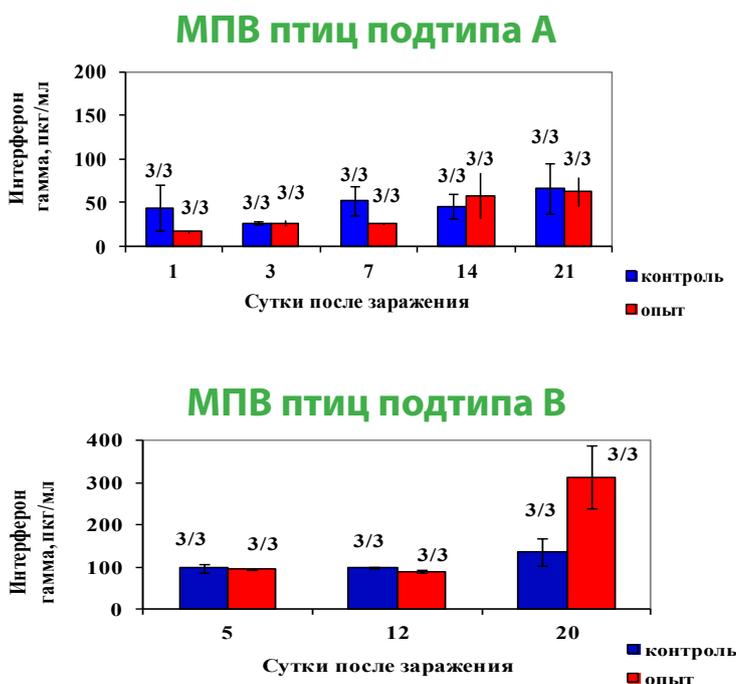


Рис. 5. Экспрессия IFN-γ спленоцитами цыплят, стимулированных Кон А, в различные сроки после заражения изолятами МПВ птиц

- Cook J.K.A. Avian rhinotracheitis // Rev. Sci. Tech. OIE. — 2000. — Vol. 19, № 2. — P. 602–613.
- Hartmann S., Sid H., Rautenklein S. Avian metapneumovirus infection of chicken and turkey tracheal organ cultures: comparison of virus-host interactions // Avian Pathol. — 2015. — Vol. 44, № 6. — P. 480–489.
- Immune responses and interactions following simultaneous application of live Newcastle disease, infectious bronchitis and avian metapneumovirus vaccines in specific-pathogen-free chicks / F. Awad, A. Forrester, M. Baylis [et al.] // Res. Vet. Sci. — 2015. — Vol. 98. — P. 127–133.
- Methyltransferase-defective avian metapneumovirus vaccines provide complete protection against challenge with the homologous Colorado strain and the heterologous Colorado strain and the heterologous Minnesota strain / J. Sun, Y. Wei, A. Rauf [et al.] // J. Virol. — 2014. — Vol. 88, № 21. — P. 12348–12363.
- Pathogenic and immunogenic responses in turkeys following in ovo exposure to avian metapneumovirus subtype C / R.M. Cha, M. Khatri, M. Mutnal, J.M. Sharma // Vet. Immunol. Immunopathol. — 2011. — Vol. 140. — P. 30–36.