

УДК 636.5.034:615.371

DOI: 10.52419/issn2072-2419.2022.2.22

ВЛИЯНИЕ ВАКЦИНАЦИИ ИММУНОКОМПЛЕКСНОЙ ВАКЦИНОЙ ИЗ ШТАММА “ВНИВИП” НА ЭКСПРЕССИЮ ГЕНА IL-6 И ПРЕДСТАВЛЕННОСТЬ УСЛОВНО-ПАТОГЕННЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ В КИШЕЧНИКЕ КУР-НЕСУШЕК.

Тарлавин Н.В. – ассистент кафедры эпизоотологии им. В.П. Урбана ФГБОУ ВО СПбГУВМ. Веретенников В.В. – ассистент кафедры эпизоотологии им. В.П. Урбана ФГБОУ ВО СПбГУВМ. Джавадов Э.Д. – д.в.н., профессор кафедры эпизоотологии им. В.П. Урбана ФГБОУ ВО СПбГУВМ. Козыренко О.В. – д.в.н., профессор кафедры эпизоотологии им. В.П. Урбана ФГБОУ ВО СПбГУВМ. Красков Д.А. – студент 4 курса факультета ветеринарной медицины ФГБОУ ВО СПбГУВМ.

Ключевые слова: птицеводство, эпизоотология, экспрессия генов, вакцины нового поколения, микробиом под влиянием вакцинации. **Key words:** poultry farming, epizootology, gene expression, new generation vaccines, microbiome influenced by vaccination.

РЕФЕРАТ

Иммунокомплексная вакцина против инфекционной бурсальной болезни из штамма «ВНИВИП» обладает сильными иммуногенными свойствами, в том числе вызывает активную экспрессию генов синтеза цитокина IL-6 в тканях фабрициевой сумки и слепых отростков кишечника. Данное явление стимулирует местный неспецифический иммунный ответ, в результате чего происходит сокращение представленности патогенных и условно-патогенных микроорганизмов в кишечнике цыплят. В результате проведенных исследований было установлено, что относительная экспрессия в тканях слепых отростков кишечника цыплят кросса Ломан Уайт достигала 2,7-кратного превышения над уровнем контроля, а относительная экспрессия в тканях фабрициевой сумки – 15,6-кратного превышения над уровнем контроля. Относительное содержание бактерий группы кишечной палочки, как санитарно-показательных микроорганизмов под влиянием вакцины сократилось в 4 раза (с 0,253% в контрольной группе до 0,064% в вакцинированной группе). Разнообразие стафилококков под влиянием вакцины также сокращалось, и в вакцинированной группе обнаруживались исключительно неидентифицируемые представители рода *Staphylococcus*.

ВВЕДЕНИЕ

Птицеводство на территории Российской Федерации является одной из наиболее высокоразвитых и социально-значимых отраслей сельского хозяйства, так как обеспечивает население большим количеством дешевой и питательной животноводческой продукции. Специфика российского птицеводства состоит в одновременном содержании на территории птицефабрик большого птицепоголовья, что превращает птицефабрики в потенци-

альные эпизоотические очаги вирусных и бактериальных болезней. Наиболее опасными из них являются иммунодепрессивные болезни (болезнь Марека, инфекционная бурсальная болезнь и инфекционная анемия цыплят). Наибольший ущерб вызывает именно инфекционная бурсальная болезнь (болезнь Гамборо, ИББ).

Вакцинация является наиболее эффективным способом предотвращения ИББ в условиях промышленной птицефабрики. На территории Российской Федерации

болезнь Гамборо профилактируется главным образом за счет использования вакцинации живыми вакцинами, причем цыплята, полученные от вакцинированных матерей, через желточный мешок получают материнские антитела, которые обеспечивают защиту в течение первых двух недель после вылупления. При этом у потомства различных вакцинированных популяций могут быть разные титры антител к вирусу ИББ. При совместном выращивании это может привести к различному уровню материнских антител в потомстве и разделить стадо на особей с низкой или высокой восприимчивостью к полевым штаммам вируса ИББ.

Иммунокомплексная вакцина нового поколения обеспечивает доступный и простой метод защиты птицы от инфекционной бурсальной болезни. Иммунокомплексные вакцины считается возможным применять *in ovo* на 18 день инкубации, либо подкожно в возрасте 1 дня. Механизм работы иммунокомплексной вакцины заключается в отложенной репликации вакцинного вируса в клетках фабрициевой сумки цыпленка, что позволяет дожидаться снижения уровня материнских антител и успеть колонизировать клетки фабрициевой сумки раньше, чем это успеет сделать высоковирулентный полевой штамм болезни Гамборо. Отложенная репликация вакцинного вируса достигается за счет взаимодействия иммунного комплекса с фолликулярными дендритными клетками. Когда связь между вируснейтрализующим иммуноглобулином и вакцинным вирусом ослабевает, вирус высвобождается в кровяное русло и получает возможность колонизировать клетки фабрициевой сумки, тем самым формируя иммунный ответ. Также вакцинный вирус распространяется по прочим органам птицы, участвующим в формировании иммунного ответа: селезенке, тимусу, миндалевидной железе. По такому принципу на базе Научного консультативно-диагностического центра по птицеводству ФГБОУ ВО «СПбГУВМ» была разработана иммунокомплексная вакцина против инфекционной бурсальной болез-

ни из штамма «ВНИВИП», пригодная к введению 1-суточному цыпленку [1].

В настоящее время известно, что организм реагирует на воздействия внешней среды посредством активации процессов экспрессии генов в клетках и тканях различных органов, в ходе чего образуется матричная РНК, комплементарная ДНК экспрессирующихся генов. Регулирование экспрессии генов позволяет клеткам контролировать свою собственную структуру и функцию и является основой клеточной дифференцировки, морфогенеза и адаптации. Изучение экспрессии генов иммунитета сельскохозяйственных птиц позволяет в реальном времени отслеживать процесс формирования белков, которым организм отвечает на воздействия со стороны окружающей среды [2].

Цитокины, выработка которых кодируется геном IL-6, являются важными медиаторами процессов воспаления и регуляторами иммунных процессов, протекающих в инфицированном вирусом организме. Их основная функция – управление функциональной активностью клеток иммунной системы. Однако мало что известно о роли данных цитокинов в патогенезе и иммунных реакциях, вызванных вирусом инфекционной бурсальной болезни. Исследования на схожую тематику проводились Liu H с соавторами [4], которые пришли к выводу, что инфицирование организма белых леггорнов вирусом инфекционной бурсальной болезни приводит к 30-кратному увеличению экспрессии интерлейкинов в опытной группе по отношению к контролю. Активнее всего экспрессировался IL-10, поскольку данный цитокин является мощным стимулятором эффективности работы НК-клеток (естественных киллеров) и его активность сравнима по интенсивности с экспрессией гена IFN- γ , отвечающего за синтез интерферона.

Среди микроорганизмов, населяющих слепые отростки кишечника птицы, традиционно выявляются бактерии, обладающие патогенным и условно-патогенным действием на организм птицы. К таким бактериям относятся микроорганизмы

семейств *Campylobacteraceae*, *Helicobacteraceae*, *Pasteurellaceae*, *Staphylococcaceae*, *Streptococcaceae*, *Fusobacteriaceae*. Микроорганизмы данных семейств вызывают снижение продуктивности птицы, а также при падении общей резистентности организма птицы способны накапливаться и вызывать на предприятии вспышку инфекции бактериальной этиологии, ведущей к большим экономическим потерям [3].

Данная работа позволяет изучить характер экспрессии гена IL-6, возникающей в ответ на введение в организм кур-несушек вируса инфекционной бурсальной болезни штамма «ВНИВИП», входящего в состав экспериментальной иммунокомплексной вакцины, а также влияние данной экспрессии и вакцинации на содержание и представленность в кишечнике бактерий группы кишечной палочки и стафилококков.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Анализ уровня относительной экспрессии генов иммунитета проводили методом ПЦР в реальном времени (qPCR) на базе молекулярно-генетической лаборатории ООО «БИОТРОФ». Материалом служили куры-несушки породы Ломан Уайт. Содержание и вакцинация птиц проводились на базе вивариев ФГБОУ ВО «СПбГУВМ». Образцы тканей фабричной сумки были получены на 35 сутки жизни несушек. Общая РНК из образцов была выделена с использованием набора AurumTM Total RNA Mini Kit (Bio-Rad) в соответствии с инструкциями производителя. Ткань разрезали на мелкие кусочки (<5 мм длиной) и измельчали до тонкого порошка с помощью пестика и ступки, содержащей жидкий азот. Ткани измель-

чались и гомогенизировались с добавлением раствора PureZOLTM.

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

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

Расчет относительной экспрессии был произведен при помощи метода $2^{-\Delta\Delta Ct}$. В качестве референсного гена был выбран ген белка b-Actin. Список праймеров приведен в таблице 1.

Метагеномные исследования выполняли методом NGS-секвенирования, путём анализа гена прокариотической 16S-рибосомальной РНК (16S рРНК). Тотальную ДНК из исследуемых образцов выделяли с использованием набора «Genomic DNA Purification Kit» («Fermentas, Inc.», Литва) следуя рекомендациям производителя. Концентрацию полученной ДНК определяли с помощью флуориметра Qubit («Invitrogen, Inc.», США) с использованием наборов «Quant-iT dsDNA Broad-Range Assay Kit» («Invitrogen, Inc.», США), согласно рекомендациям производителя. Амплификацию для последующего проведения NGS-секвенирования проводили с использованием ДНК-амплификатора Verity («Life Technologies, Inc.», США) с помощью зубактериальных праймеров (IDT), 343F (5'-CTCCTACGGRRSGCAGCAG-3') и 806R

Таблица 1

Список праймеров для исследования генов

Ген	Наименование белка	Нуклеотидная последовательность праймера
<i>IL-6</i>	Цитокин	F: AGGACGAGATGTGCAAGAAGTTC R: TTGGGCAGGTTGAGGTTGTT
<i>b-Actin</i>	Бета-актин	F: ATTGTCCACCGCAAATGCTTC R: AAATAAAGCCATGCCAATCTCGTC

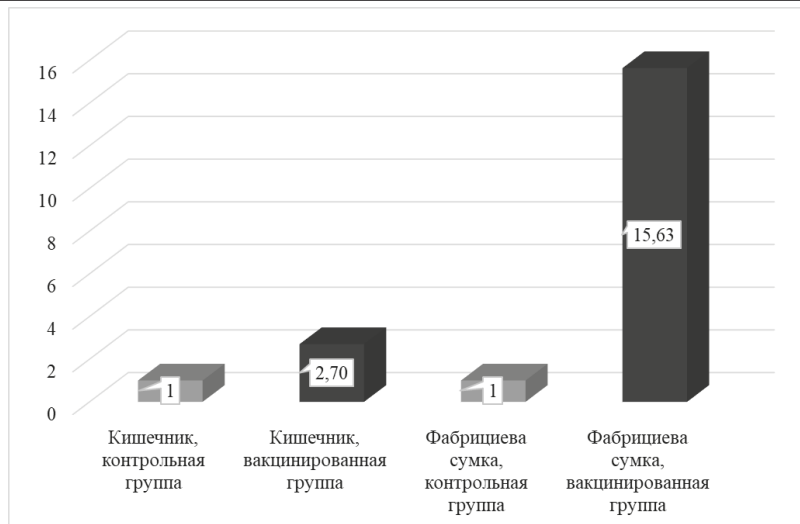


Рис. 1. Экспрессия гена IL-6 в тканях фабрициевой сумки и слепых отростков кишечника цыплят кросса Ломан Уайт ($p=0,3$) на 35 сутки после введения иммунокомплексной вакцины.

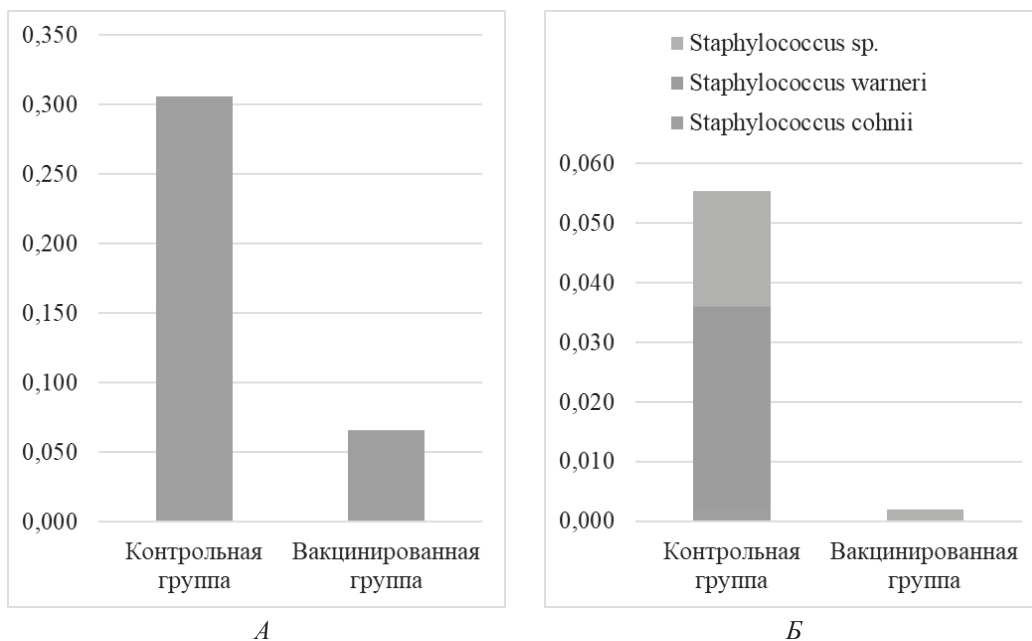


Рис. 2. Относительное содержание бактерий группы кишечной палочки (А) и различных видов стафилококков (Б) в слепых отростках желудочно-кишечного тракта цыплят кросса Ломан Уайт, ($p=0,3$) на 35 сутки после введения иммунокомплексной вакцины.

(5'- GGACTACNVGGGTWTCTAAT-3'), фланкирующих участок V1V3 гена 16S рРНК [36]. Метагеномное секвенирование осуществляли на геномном секвенаторе MiSeq («Illumina, Inc.», США) с набором MiSeq Reagent Kit v3 («Illumina, Inc.», США). Максимальная длина полученных последовательностей составила 2 x 300 нт. Химерные последовательности были исключены из анализа с помощью программы «USEARCH 7.0» (<http://drive5.com/usearch/>). Обработка полученных ридов 2 x 300 нт происходила с помощью биоинформатической платформы «CLC Bio GW 7.0» («Qiagen», Нидерланды) и включала в себя перекрывание, фильтрацию по качеству (QV>15), триммирование праймеров. Определение таксономической принадлежности микроорганизмов до рода проводили с применением программы «16S Metagenomics» («Illumina, Inc.», США). Классификация основана на базе данных Greengenes (<http://greengenes.lbl.gov/>). Результатом этого рабочего процесса является классификация операций чтения на нескольких таксономических уровнях: царство, тип, класс, порядок, семейство, род и виды.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ОБСУЖДЕНИЕ

Полученные результаты свидетельствуют о различиях в уровнях экспрессии гена IL-6 в тканях фабрицевой сумки и слепых отростков кишечника кур-несушек под влиянием вакцинации иммунокомплексной вакциной (рисунок 1).

Из рисунка №1 видно, что экспрессия гена IL-6 в клетках фабрицевой сумки вакцинированной группы существенно превышает данный показатель в клетках стенки кишечника. Данное явление связывается в первую очередь с тем, что клетки фабрицевой бursы являются таргетными для живого вируса инфекционной бурсальной болезни.

Данные изменения говорят об интенсивных иммунных процессах, протекающих в иммунных клетках. Ген IL-6 продуцируется временно в ответ на инфицирование тканей организма и строго контро-

лируется транскрипционными и пост-транскрипционными механизмами, во избежание возникновения нерегулируемого непрерывного синтеза IL-6. Также данный интерлейкин является пирогенным цитокином и свидетельствует о повышении температуры, которое сопровождается инфекционный процесс [6]. Повышение экспрессии данного гена в вакцинированной группе по сравнению с контрольной свидетельствует о действии вакцины на клетки и ткани фабрицевой сумки и кишечника цыплят.

Экспрессия гена синтеза IL-6 превышает данный показатель в контрольной группе цыплят кросса Ломан Уайт в 2,7 раза, что говорит об интенсивной работе данного цитокина в тканях кишечника. Данная работа сказывается на содержании условно-патогенных микроорганизмов, таких как бактерии группы кишечной палочки (рис. 2) и представители рода *Staphylococcus* (рис. 3).

Из рисунка 2А видно, что под влиянием вакцинации иммунокомплексной вакциной из штамма «ВНИВИП» произошло существенное снижение содержания бактерий группы кишечной палочки. Так, под влиянием вакцинации данной вакциной количество вышеупомянутых бактерий в кишечнике цыплят кросса Ломан Уайт сократилось с 0,3 до 0,06%.

Представленность обнаруженных методом NGS-секвенирования видов стафилококков также резко сокращалась. Так, в кишечнике птиц контрольной группы обнаруживались такие представители рода *Staphylococcus*, как *Staphylococcus warneri* и *Staphylococcus cohnii*, а также прочими неидентифицируемыми стафилококками, обозначенными на рисунке 2Б как *Staphylococcus sp.* Бактерии *Staphylococcus warneri* и *Staphylococcus cohnii*, выявляются при процессах снижения иммунитета и являются участниками патогенных процессов в организме птицы. Также есть данные о способности *Staphylococcus cohnii* к развитию антибиотикорезистентности.

ВЫВОДЫ

Был проведен опыт по исследованию влияния вакцинации на экспрессию гена

IL-6 в тканях слепых отростков кишечника и тканях Фабрициевой сумки цыплят кросса Ломан-Уайт, а также на содержание и представленность условно-патогенных микроорганизмов в кишечнике цыплят. Был сделан вывод, что вакцина обладает способностью вызывать сильный иммунный ответ со стороны организма кур-несушек, который проявляется в том числе в сильной экспрессии иммунных генов и ведет к сокращению представленности условно-патогенной микрофлоры в кишечнике птиц.

INFLUENCE OF VACCINATION WITH THE IMMUNOCOMPLEX VACCINE FROM THE VNIVIP STRAIN ON IL-6 GENE EXPRESSION AND REPRESENTATION OF OPPORTUNITICAL MICROORGANISMS IN THE INTESTINE OF LAYING HEN.

Tarlavina N.V. - Assistant of the Department of Epizootology named after. V.P. Urbana FGBOU VO SPbGUV. Veretennikov V.V. - Assistant of the Department of Epizootology named after. V.P. Urbana FGBOU VO SPbGUV. Javadov E.D. - Doctor of Veterinary Sciences, Professor of the Department of Epizootology named after. V.P. Urbana FGBOU VO SPbGUV. Kozyrenko O.V. - Doctor of Veterinary Sciences, Professor of the Department of Epizootology named after. V.P. Urbana FGBOU VO SPbGUV. Kraskov D.A. - 4th year student of the Faculty of Veterinary Medicine, St. Petersburg State University of Medicine.

ABSTRACT

The immunocomplex vaccine against infectious bursal disease from the VNIVIP strain has strong immunogenic properties, including active expression of the IL-6 cytokine synthesis genes in the tissues of the bursa of Fabricius and cecum. This phenomenon stimulates a local non-specific immune response, resulting in a reduction in the representation of pathogenic and opportunistic microorganisms in the intestines of chickens. As a result of the studies, it was found that the relative expression in the tissues of the caecum of the intestines of chickens of the Loman White cross reached a 2.7-fold ex-

cess over the control level, and the relative expression in the tissues of the Fabricius bag - 15.6-fold excess over the control level. The relative content of bacteria of the Escherichia coli group, as sanitary indicative microorganisms, decreased by 4 times under the influence of the vaccine (from 0.253% in the control group to 0.064% in the vaccinated group). The variety of staphylococci under the influence of the vaccine was also reduced, and only unidentifiable representatives of the genus Staphylococcus were found in the vaccinated group.

Исследование проведено в рамках гранта №МД-2579.2021.5 при поддержке Совета по грантам Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых и по государственной поддержке ведущих научных школ Российской Федерации

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Джавадов, Э. Д. Особенности применения иммунокомплексной вакцины против инфекционной бурсальной болезни / Э. Д. Джавадов, Н. В. Тарлавина, В. В. Веретенников // Мировое и российское птицеводство: состояние, динамика развития, инновационные перспективы: Материалы XX Международной конференции, Сергиев Посад, 08–10 октября 2020 года / Российское отделение Всемирной научной ассоциации по птицеводству, НП "Научный центр по птицеводству". – Сергиев Посад: Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт птицеводства, 2020. – С. 607-608.
2. Методические рекомендации по использованию современных биотехнологий для оценки экспрессии генов, связанных с продуктивностью и устойчивостью птицы к неблагоприятным факторам / И. И. Кочиш, М. Н. Романов, Г. Ю. Лаптев [и др.]. – Москва : Сельскохозяйственные технологии, 2019. – 112 с. – ISBN 9785604364277.
3. Эпизоотологический мониторинг микробного содержимого кишечника птицы в условиях промышленной птицефабрики / Г. Ю. Лаптев, Л. А. Ильина, Н. В. Тарла-

- вин [и др.] // Гастроэнтерология Санкт-Петербурга. – 2020. – № 1-2. – С. 90-91. – EDN KCBJYZ.
4. Farhanah MI, Yasmin AR, Khanh NP, Yeap SK, Hair-Bejo M, Omar AR. Bursal immunopathology responses of specific-pathogen-free chickens and red jungle fowl infected with very virulent infectious bursal disease virus. *Arch Virol.* 2018 Aug;163(8):2085-2097. doi: 10.1007/s00705-018-3841-7. Epub 2018 Apr 6. PMID: 29626271.
5. Liu H, Zhang M, Han H, Yuan J, Li Z. Comparison of the expression of cytokine genes in the bursal tissues of the chickens following challenge with infectious bursal disease viruses of varying virulence. *Viol J.* 2010;7:364. Published 2010 Dec 8. doi:10.1186/1743-422X-7-364
6. Luo C, Liu J, Qi W, Ren X, Lu R, Liao M, Ning Z. Dynamic analysis of expression of chemokine and cytokine gene responses to H5N1 and H9N2 avian influenza viruses in DF-1 cells. *Microbiol Immunol.* 2018 May;62(5):327-340. doi: 10.1111/1348-0421.12588. Epub 2018 May 4. PMID: 29577370.
7. Tanaka T, Narazaki M, Kishimoto T. IL-6 in inflammation, immunity, and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2014 Sep 4;6(10):a016295. doi: 10.1101/cshperspect.a016295. PMID: 25190079; PMCID: PMC4176007.