



Основываясь на сравнении показателей выявления признаков БМ (%), у птицы, вакцинированной моно- и бивалентной вакциной, а также по средневзвешенной величине (Е. К. Дудникова, С. Н. Норкина, Т. И. Алипер и др., 2009) шесть изолятов (5R, 12R, 6L, 7F, 16K, 13M) были отнесены к патотипу vv+. Трём изолятам (11H, 9J, 20E) был присвоен патотип vv. Исследуемые изоляты были получены из хозяйств с явным проявлением патологоанатомических признаков БМ.

Было установлено, что все охарактеризованные изоляты ВБМ-1 имели достаточную вирулентность, чтобы вызывать болезнь у вакцинированного поголовья, несмотря на то, что ни один из вышеперечисленных изолятов не превосходил по своему патогенному потенциалу референтный штамм 648A (vv+).

Данные исследования являются продолжением нашей работы, начатой в 2001 году, и объединяют сведения о патогенности штаммов ВБМ-1, циркулирующих на территории РФ в полевых условиях.

Использование представленной методики патотипирования должно помочь в изучении подобных вирулентных штаммов и стандартизации данных, что в будущем позволит обеспечить птицепоголовье адекватной защитой.

Молекулярно-биологические свойства вируса инфекционной анемии цыплят

А. С. Алиев, д.в.н., профессор; М. В. Бурлаков, аспирант – ФГБОУ ВПО Санкт-Петербургская государственная академия ветеринарной медицины;

И. Н. Громов, к.в.н., доцент; М. К. Селиханова, аспирант; Д. О. Журов, аспирант – УО «Витебская ордена «Знак Почёта» государственная академия ветеринарной медицины;

С. А. Емельянова – НПП «АВИВАК»

Введение

Возбудитель инфекционной анемия цыплят (ИАЦ) представляет собой небольшой, безоболочечный икосаэдрический вирус с диаметром 25 нм, геном которого представлен кольцевой одноцепочечной ковалентно-замкнутой молекулой ДНК. Вирус ИАЦ – единственный член рода *Cyrovirus* семейства *Girviridae*, природным хозяином для которого является только отряд куриных.

Вирус первоначально был изолирован в Японии, а в дальнейшем выделен в отдельный род, поскольку организация генома вируса ИАЦ и других цирковирусов существенно различаются.

Цирковирусная инфекция у птиц сопровождается поражением костного мозга и лимфоидной системы, подкожными и внутримышечными кровоизлияниями, нарушением кроветворения и иммуносупрессией у цыплят, а взрослая птица переболевает без клинического проявления. У молодняка инфекция протекает в клинической и субклинической формах. Она причиняет значительный экономический ущерб промышленному птицеводству за счет гибели птицы, снижения прироста живой массы, категорийности тушек, а также повышенной выбраковки, расходами на лечение вторичных инфекций и проведение соответствующих ветеринарно-санитарных мероприятий.



В отечественной литературе имеется недостаточно сведений по выделению и изучению патогенных свойств изолятов вируса ИАЦ.

В связи с вышеизложенным, целью нашей работы явилось изучение патогенных свойств трех изолятов вируса ИАЦ, выявленных с помощью ПЦР в реальном времени в патологическом материале из птицевхозов с подозрением на инфекционную анемию цыплят.

Материал и методы исследований

Материалом для исследований служили кусочки органов, отобранные от трупов павших и вынужденно убитых птиц на птицефабриках мясного направления у разных возрастных групп с подозрением на инфекционную анемию. Предварительно каждую пробу патматериала исследовали на наличие ДНК вируса ИАЦ с использованием количественной полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ПЦР РВ), чувствительность которой составляет 10 копий/мкл. Реакцию и учет результатов ПЦР РВ-анализа выполняли в соответствии с методическими положениями. Наличие ДНК вируса ИАЦ в изолятах подтверждали методом ПЦР с электрофоретической детекцией. Для амплификации фрагмента гена VP1 вируса ИАЦ на основании последовательности вакцинного штамма Cuxhaven-1 были подобраны олигонуклеотидные праймеры CAV-2F и CAV-2R. Дизайн праймеров осуществлялся с помощью программного обеспечения Primer Premier v5.0. Продукты ПЦР анализировали методом электрофореза в 1,7%-ном агарозном геле с добавлением бромистого этидия. Для визуализации использовали систему гель-документирования ChemiDoc MP (Bio-Rad, США). Ожидаемый размер фрагмента составлял около 520 п. о.

Образцы внутренних органов птиц из трех птицефабрик с высокой концентрацией гена вируса ИАЦ объединяли отдельно в общую пробу и гомогенизировали в стерильном фосфатном буфере pH-7,4 в соотношении 1:5. Гомогенаты использовали для проведения вирусологических исследований под условными названиями «Б-1», «Б-2» и «К-4». Полученные 20% суспензии после трехкратного замораживания и оттаивания смешивали с хлороформом из расчета 0,05 мл препарата на 1 мл гомогената. После интенсивного перемешивания смеси центрифугировали при 3000 об./мин. в течение 30 минут. Водную фазу центрифугатов отбирали, затем добавляли 200 ЕД/мл пенициллина и 200 мкг/мл стрептомицина, выдерживали при +4° С в течение 6–12 часов. Супернатанты очищали от сопутствующей микрофлоры путем фильтрации через фильтры с диаметром 25 нм («jet Biofil») и прогревания на водяной бане при +70° С в течение 10 мин. Одновременно исследуемые образцы проверяли на наличие других вирусных агентов методом «слепых» пассажей на эмбрионах СПФ-кур 9- и 11-суточной инкубации путем инокуляции их в дозе 0,2 мл в аллантоисную полость и нанесения на хорионаллантоисную оболочку соответственно.

Патогенные свойства изолятов вируса ИАЦ изучали на четырех группах СПФ-цыплят суточного возраста по 15 голов в каждой, сформированных по принципу аналогов. Цыплятам первых трех групп внутримышечно вводили по 0,1 мл изолята «Б-1», «Б-2» и «К-4» вируса ИАЦ в количестве 4,0 lg коп/мкл генома вируса, соответственно. Интактные цыплята четвертой группы служили контролем. Каждая группа птицы содержалась в отдельных изолированных боксах. За всей птицей установили клиническое наблюдение и, на 15 сутки после заражения, часть цыплят подвергали диагностическому убою для оценки патоморфологических изменений и выявления генома вируса в количественной ПЦР РВ в органах и тканях. С этой целью отбирали кусочки трубчатых костей, тимуса, фабрициевой бурсы, селезенки и печени птицы в опытной и контрольной группе. Предварительно в каждой группе цыплят из подкрыльцовой вены отбирали по пять проб крови в гепаринизированные шприцы для определения гематокрита. У оставшейся птицы на 30 сутки опыта отбирали кровь в контрольной и опытных группах для определения титров антител в ИФА с использованием наборов «Synbiotics». Патматериал, предназначенный для морфологических



исследований фиксировали в 10%-ном растворе формалина и заливали в парафин по общепринятой методике. Гистологические срезы кусочков органов, залитых в парафин, готовили на роторном микротоме MICROM HM 340 E. Для изучения общих структурных изменений срезы окрашивали гематоксилин-эозином, как описано ранее.

Результаты исследований и их обсуждение

Анализ эпизоотического состояния ряда птицефабрик мясного направления показал повышение заболеваемости и падежа птиц разных возрастных групп. При клиническом осмотре у больной птицы отмечали отставание в росте и развитии, взъерошенность перьевого покрова, апатию, бледность клюва, гребешка, кожи и видимых слизистых оболочек. При патологоанатомическом вскрытии наблюдали постовариальную гипотрофию, дистрофию печени и почек, атрофию тимуса и бурсы, признаки анемии.

Обращали на себя внимание низкая эффективность результатов вакцинопрофилактики ньюкаслской болезни, инфекционного бронхита и болезни Гамборо.

С целью уточнения диагноза отбирали патматериал от павшей птицы для выявления генома вируса в количественной ПЦР РВ и проведения гистологических исследований по выше изложенной схеме.

ДНК вируса чаще выявляли в образцах костного мозга (57,6%), тимуса (50,6%), печени (44,9%) с признаками анемии. Количество генома вируса ИАЦ в образцах тимуса, костного мозга и печени также было максимальным, и составило 8,5, 9,3 и 7,7 lg ДНК коп./мкл соответственно. Процент положительных проб в других паренхиматозных органах был минимальным и составил не более 36,8% с концентрацией не более 6,3 lg ДНК коп./мкл.

При гистологической экспертизе структурные изменения выявлены в 136 пробах (25,1%). При этом изменения чаще всего выявлялись в костном мозге (47,2%), тимусе (38,2%) и фабрициевой бурсе (27,4%). Значительно реже поражались селезенка (17,2%), печень (14,1%) и почки (8,4%). Следует отметить, что гистологические изменения в исследованных органах характеризовались разной специфичностью в отношении ИАЦ. Так, наиболее характерные изменения отмечены в костном мозге и тимусе цыплят. Гистологические изменения в костном мозге выявлялись только при использовании иммерсионного объектива с большим увеличением. Они характеризовались апоптозом кроветворных клеток эритроидного и гранулоцитарного рядов. В тимусе развивались процессы атрофии и делимфатизации коркового вещества, закономерно возрастало число телец Гассала (и в корковом, и в мозговом веществе). Отмечены также признаки склеротизации и ожирения долек. Гистологические изменения в фабрициевой бурсе (делимфатизация корковой и особенно мозговой зон лимфоидных узелков, явления кариорексиса, появление большого числа апоптозных телец в лимфоидных узелках, процессы организации с расширением межузелковых перегородок, появление на месте лимфоидных узелков в подэпителиальных пространствах множества микрокист и железистых структур) наблюдались только при ассоциативном течении ИАЦ и ИББ. Гистологические изменения в селезенке характеризовались делимфатизацией белой пульпы, иногда отмечался кариорексис лимфоцитов. В печени и почках выявлено 2 типа изменений: 1. компенсаторно-приспособительные и регенерационные процессы (лимфоидно-макрофагальная инфильтрация стромы и паренхимы); 2. морфологические признаки интоксикации (зернистая, вакуольная и мелкокапельная жировая дистрофия гепатоцитов печени и эпителия мочеобразующих канальцев).

Обобщенные и проанализированные данные, полученные при изучении патогенных свойств изолятов вируса ИАЦ, представлены в Таблице № 2. Результаты биопробы показали, что последствия внутримышечного введения СПФ-цыплятам одинаковой дозы исследуемых изолятов существенно отличаются. Так, в первой группе цыплят, зараженных изолятом



«Б-1» вся птица заболела с выраженными клиническими признаками, три из которых пали на 12 сутки эксперимента. Первые клинические признаки в опытных группах цыплят наблюдали на 8 сутки эксперимента и проявлялись малоподвижностью, снижением потребления корма и воды, бледностью кожи, взъерошенностью перьевого покрова, которые сохранялись до завершения опыта. Отмечено достоверное снижение показателя гематокрита во всех опытных группах в отличие от показателей в контрольной группе цыплят – $31,50 \pm 1,40\%$. При этом кровь становилась жидкой, светло-красного цвета, плохо свертывалась. Известно, что показатель гематокрита у птицы ниже $27,0\%$ является свидетельством проявления анемии. Наиболее низкий процент гематокрита установлен в первой опытной группе – $19,80 \pm 1,97\%$, во второй – $21,80 \pm 0,84\%$ и в третьей группе – $25,00 \pm 1,97$. Снижение гематокрита может приводить к гипоксии, нарушению обменных процессов организма и снижению живой массы у цыплят. Так, по данным Н. А. Селиверстовой при ИАЦ значительно снижается кислородная емкость крови птицы вследствие уменьшения содержания гемоглобина и числа эритроцитов в единице объема крови.

Следует отметить, что ведущие патоморфологические изменения наблюдаются в центральных органах кроветворения и иммуногенеза. Макроскопические изменения в костном мозге проявлялись в виде аплазии и ожирения, а в тимусе – выраженной атрофии, разрастания жировой и соединительной тканей. Однако степень этих изменений у разных изолятов отличалась. На взаимосвязь между патогенностью вируса ИАЦ и характером, вызываемых морфологических изменений в указанных органах указывали ряд зарубежных авторов, но без выделения четких критериев их оценки.

Оценку морфологических изменений в костном мозге и тимусе цыплят, зараженных разными изолятами вируса ИАЦ, осуществляли по 3-балльной системе, где:

«+» – апоптоз гемопоэтических клеток эритроидного и гранулоцитарного ростков кроветворения в костном мозге, расширение мозгового вещества долек тимуса, увеличение в нем числа телец Гассалья, а в отдельных дольках – неровная граница между корковым и мозговым веществом;

«++» – аплазия и ожирение красного костного мозга в области диафизов и осевой части эпифизов трубчатых костей, снижение плотности расположения лимфоцитов в корковом веществе долек тимуса, увеличение числа и размеров телец Гассалья как в мозговом веществе, так и появление тимических телец в корковом веществе, очаговое разрастание соединительной ткани;

«+++» – глубокая атрофия кроветворных островков, резкое увеличение объема желтого костного мозга в области диафизов и эпифизов трубчатых костей, в тимусе – выраженная делимфатизация коркового и мозгового вещества, значительное увеличение в паренхиме числа и размеров телец Гассалья (до 20–30% удельного объема), лимфоцитов, фибробластов и тучных клеток.

При макроскопическом и гистологическом исследовании костного мозга и тимуса цыплят в контрольной группе структурные изменения не выявлены.

При макроскопическом изучении клоакальной бursы и селезенки зараженных птиц всех групп изменений не выявлено. Гистологическая картина клоакальной бursы соответствовала физиологической норме. Однако, при изучении препаратов селезенки подопытных цыплят всех групп установлена выраженная делимфатизация пульпарных тяжей.

По результатам изучения патогенных свойств вируса ИАЦ на СПФ-цыплятах суточного возраста исследуемые изоляты вируса условно разделили на: высоко-, умеренно- и слабопатогенные.

Высокопатогенный изолят вызывал характерную клинику болезни с невысоким отходом. Патологоанатомическая картина вскрытия характеризовалась точечными, пятнистыми и полосчатыми кровоизлияниями в перемизии мышц грудины и шеи. При наружном и



внутреннем осмотре трупов выявляли признаки малокровия. Обращаем внимание на то, что как при спонтанном, так при экспериментальной инфекции процент макро- и микроизменений в костном мозге и тимусе был максимальный.

Введение цыплятам умеренно- и слабовирулентного изолятов не вызывал гибель подопытной птицы. При этом клиническое проявление болезни слабо выражено и проявляется лишь у 60% и 40% зараженной птицы соответственно. Изоляты различались и по антигенной активности. Так, изолят «Б-1» индуцировал наиболее высокий уровень специфических антител ($2598 \pm 1,62$), тогда как в группе цыплят, зараженных изолятом «К-4» не превышал $1164 \pm 1,19$. В контрольной группе результаты ИФА были отрицательные. Специфичность иммунной реакции экспериментально зараженных цыплят подтверждена отсутствием в сыворотке крови антител к гетерологичным возбудителям. Достоверность результатов в ИФА подтверждалось отсутствием других вирусных агентов в исследуемых образцах методом последовательных «слепых» пассажей на эмбрионах СПФ-кур.

ДНК вируса ИАЦ выявляли в количественной ПЦР РВ в пробах костного мозга, тимуса, печени, фабрициевой сумке, селезенке у цыплят во всех опытных группах. При этом максимальное количество ДНК, как у естественно больных цыплят, установлено в пробах тимуса и костного мозга. В контрольной группе цыплят результаты исследования в количественной ПЦР РВ имели отрицательные значения.

По данным амплификации фрагмента гена VP1 исследованных изолятов вируса ИАЦ, размер ПЦР-продукта составлял около 500 п. о. и соответствовал ожидаемому, что свидетельствует об отсутствии делеций или инсерций в последовательности генома данных изолятов по сравнению с вакцинным штаммом Cuxhaven-1 (Рис. 1).

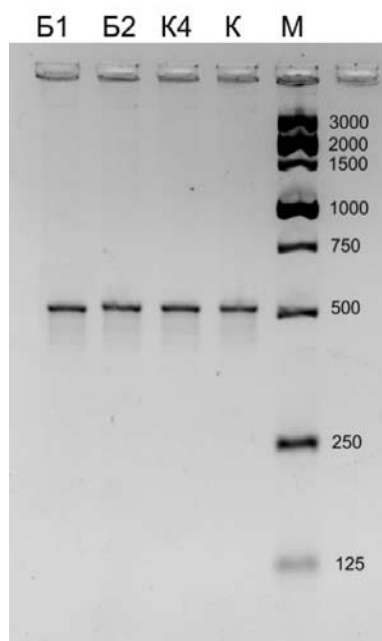


Рис. 1. Электрофореграмма продуктов амплификации фрагментов генома изолятов вируса инфекционной анемии цыплят. К-положительный контроль (вакцинный штамм Cuxhaven-1), М – маркер Low Range Marker (125–3000 bp) (Axygen, США)

Результаты наших исследований соответствуют данным зарубежных авторов, которые установили наличие вируса ИАЦ во всех внутренних органах. Наличие вируса в широком спектре органов свидетельствует о генерализованном характере инфекции.

Из результатов настоящих исследований следует, что в птицеводческих хозяйствах, где ИАЦ протекает без характерных клинических признаков, циркулируют изоляты с разной степенью патогенности, что было продемонстрировано исследованием их на СПФ-цыплятах суточного возраста.



Заключение

Изоляты, выделенные от цыплят-бройлеров с признаками анемии, обладают характерными для представителей рода *Syngovirus* антигенными, патогенными и молекулярно-биологическими свойствами, вызывая патологию у суточных СПФ-цыплят при внутримышечном введении.

По 3-балльной системе оценки макро- и гистологических изменений в костном мозге и тимусе вирус ИАЦ условно можно разделить на высоко-, умеренно- и слабопатогенный.

Для оценки патогенных свойств изолятов вируса ИАЦ предлагается 3-балльная система макро- и гистологических изменений в костном мозге и тимусе цыплят.

Специфическая профилактика метапневмовирусной инфекции птиц инактивированной вакциной «АВИВАК-ПНЕВМО»

С. А. Емельянова; В. В. Борисов, д.в.н.; И. П. Николаева, к.в.н.; С. Н. Гаврилов – НПП «АВИВАК»

Метапневмовирусная инфекция птиц (МПВИ) – острое вирусное заболевание, характеризующееся воспалительными процессами верхних дыхательных путей (носовых ходов, трахеи), инфраорбитальных синусов, и репродуктивных органов. Это общее название двух сходных по клиническим признакам болезней: у индеек – ринотрахеита (Turkey Rhinotracheitis – TRT), а у кур – синдрома опухшей головы (Swollen Head Syndrome – SHS).

Возбудитель заболевания – метапневмовирус (МПВ). Это РНК-содержащий вирус с несегментированным одноцепочечным геномом, относящийся к семейству *Paramyxoviridae*, роду *Metapneumovirus*, подсемейству *Pneumovirinae*. На данный момент известно 4 подтипа вируса – А, В, С и D, которые классифицированы по антигенной структуре и аминокислотной последовательности их генов.

МПВ активен в пределах рН 4,5–9,0, но снижает активность при рН 3,0. Термочувствителен, не устойчив к воздействию высоких температур. При хранении сухого вируссодержащего материала при комнатной температуре в течение 7 суток – сохраняет жизнеспособность и размножается в культуре клеток Vero. При температуре 20° С вирус выживает в течение 4 недель, 4° С – в течение 20 недель и от –20 до –70° С остается жизнеспособным более 58 недель. Во внешней среде на большинстве поверхностей различных предметов выживает до 72 часов, на латексе – в течение 3 суток, дереве и картонном лотке для яиц – 6 суток. Обычные дезинфицирующие растворы (NaOH, формальдегид, виркон С) в рекомендуемых концентрациях инактивируют МПВ при температуре 20° С в течение 15–20 минут.

МПВИ широко распространена в птицеводческих хозяйствах разных стран мира. В Российской Федерации она регистрируется с начала XXI века (В. Н. Ирза и др., 2003, 2005) на птицефабриках многих административно-географических регионов.

К заболеванию восприимчивы куры и индейки всех возрастов. Возбудитель выделяют также у воробьев, чаек, цесарок, диких гусей и уток. Источником инфекции являются больные и переболевшие птицы. Возбудитель передается от больных птиц воздушно-капельным путем и при непосредственном контакте с восприимчивой птицей. Не исключается вертикальный путь передачи вируса через инкубационное яйцо.