

На правах рукописи

АБГАРЯН СУСАННА РАФИКОВНА

**ЭПИЗООТОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ
МЕТАПНЕВМОВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ ПТИЦ
У КУР-НЕСУШЕК**

06.02.02 – ветеринарная микробиология,
вирусология, эпизоотология, микология с
микотоксикологией и иммунология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени кандидата
ветеринарных наук

Санкт-Петербург 2021

Работа выполнена в отделе диагностики и эпизоотологического анализа и отделе вирусологии и опухолевых болезней птиц Всероссийского научно-исследовательского ветеринарного института птицеводства – филиала Федерального государственного бюджетного научного учреждения Федерального научного центра «Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт птицеводства» Российской академии наук.

Научный руководитель:

Джавадов Эдуард Джавадович
академик РАН, доктор ветеринарных наук,
профессор

Официальные оппоненты:

Смоленский Владимир Иванович, доктор биологических наук, профессор ФГБОУ ВО «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии – МВА имени К.И. Скрябина», профессор кафедры зооигиены и птицеводства им. А.К. Даниловой.

Ирза Виктор Николаевич, доктор ветеринарных наук, доцент ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных» (ФГБУ ВНИИЗЖ), главный научный сотрудник информационного аналитического центра.

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Сибирский федеральный научный центр агробiotехнологий Российской академии наук (СФНЦА РАН).

Защита состоится «__»_____2021 года в __ часов на заседании диссертационного совета Д 220.059.03 при ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет ветеринарной медицины» (ФГБОУ ВО СПбГУВМ) по адресу: 196084, Санкт-Петербург, ул. Черниговская д.5, тел./факс (812) 388-36-31.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБОУ ВО СПбГУВМ «Санкт-Петербургский государственный университет ветеринарной медицины» по адресу 196084, Санкт-Петербург, ул. Черниговская д.5 и на официальном сайте: <https://spbguvm.ru>.

Автореферат разослан «__»_____ 2021 г.

И.о. учёного секретаря
диссертационного совета

Белова Лариса Михайловна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Промышленное птицеводство характеризуется высокой степенью концентрации птицепоголовья на ограниченной территории и интенсивностью производства. В этих условиях в геометрической прогрессии увеличивается обсемененность микроорганизмами производственных помещений и территории вокруг них, многократно возрастает потенциальная опасность возникновения инфекций, вызываемых условно-патогенной микрофлорой. Создаются условия для появления новых болезней вирусной этиологии и для развития ассоциированного течения вирусных, бактериальных и инвазионных болезней, при которых изменяются динамика возрастной восприимчивости, клинические признаки и характер патологоанатомической картины (Бакулин В.А., 2006; Gough, R.E., 2004). В связи с этим, несвоевременная диагностика болезни, неправильно поставленный диагноз снижают эффективность профилактических и противоэпизоотических мероприятий и, как следствие, приводят к ощутимому экономическому ущербу. Одной из болезней, возникновение которой в птицеводческом хозяйстве приводит к значительным экономическим потерям, относится метапневмовирусная инфекция птиц.

Метапневмовирусная инфекция птиц (МПВИ) – респираторная болезнь, характеризующаяся воспалительными процессами верхних дыхательных путей (носовых ходов, трахеи), инфраорбитальных синусов, сопровождающаяся затрудненным дыханием, чиханием, хрипами, ринитами, конъюнктивитами. Болезнь зарегистрирована во многих регионах мира, как у индеек, так и у кур всех возрастов (Борисова И.А. и др., 2009; Ирза В.Н., и др., 2005; Jones R.C., 2004). Репликация метапневмовируса (МПВ) в присутствии возбудителей вторичных инфекций и в условиях нарушения технологии содержания приводит к развитию у птиц респираторных клинических признаков, поскольку этот вирус обладает тропностью к верхним дыхательным путям. Взрывная диссеминация вируса может повысить уровень заболеваемости до 100%, при этом смертность может достигать 30%. Кроме того, МПВ может воспроизводиться в половых путях, что приводит к снижению яичной

продуктивности птицы и ухудшению качества яиц (Cook, J.K.A., 2000; Cook, J.K.A.etal., 2002).

Многообразие подтипов возбудителя (А, В, С, D) и вариабельность вирулентных свойств штаммов метапневмовируса создают значительные сложности для эффективного использования вакцин, затрудняют диагностику, влияют на продолжительность и тяжесть течения болезни (Cook J.K.A., 2000).

Таким образом, изучение эпизоотологических особенностей МПВИ у кур-несушек и разработка эффективных мер профилактики, в том числе специфической, является своевременным и актуальным.

Степень разработанности темы исследования. Большинство методов, позволяющих выявить вирус в организме птицы, основано на иммуноферментном анализе (ИФА) и полимеразно-цепной реакции (ПЦР) (Лисенкова А.С., 2013; НиконоваЗ. Б., 2012; KardiV.etal., 1996).

Достаточно короткий период персистенции и ограниченный тропизм вируса в организме птицы создает определенные трудности при проведении диагностических исследований (AlkhalafA.N.etal.,2002;Jirjis, F.E.etal.,2002). Выделение возбудителя и его серотипирование позволяет правильно поставить диагноз и дает возможность разработки эффективной системы мероприятий по борьбе с болезнью.

Цель и задачи исследований. Цель работы – изучить эпизоотологические особенности метапневмовирусной инфекции у промышленных кур-несушек и разработать эффективную схему специфической профилактики для птицеводческого хозяйства яичного направления.

Для осуществления поставленной цели были определены следующие задачи:

- Изучить эпизоотологическую ситуацию по метапневмовирусной инфекции в ЗАО «Птицефабрика Синявинская»;
- изучить клинические и патоморфологические признаки МПВИ в условиях ЗАО «Птицефабрика Синявинская»;
- провести серологические исследования сывороток крови птиц методом иммуноферментного анализа;
- провести вирусологические исследования патологического материала;

- разработать праймеры для идентификации метапневмовируса и проведения серотипирования возбудителя методом электрофоретической детекции и секвенирования, основанных на полимеразно-цепной реакции;
- провести бактериологические исследования патологического материала;
- разработать схему специфической профилактики метапневмовирусной инфекции птиц и оценить ее эффективность;
- разработать схему лечебно-профилактических мероприятий при возникновении вторичных бактериальных инфекций.

Научная новизна. Впервые на территории Ленинградской области в условиях ЗАО «Птицефабрика Синявинская» установлена циркуляция метапневмовируса птиц подтипа В, который вызывал тяжелые поствакцинальные реакции у молодняка после применения живой вакцины против инфекционного ларинготрахеита птиц и снижение яйценоскости у промышленных кур-несушек.

Разработаны праймеры, позволяющие идентифицировать возбудителя МПВИ, провести его серотипирование методом электрофоретической детекции и секвенирования, основанных на полимеразно-цепной реакции.

Проведены вирусологические и молекулярно-биологические исследования патматериала, выделен и идентифицирован метапневмовирус птиц подтипа В.

Установлена высокая специфичность разработанных праймеров, которые могут быть использованы в ветеринарных лабораториях для диагностики МПВИ.

Теоретическая и практическая значимость работы.

Разработана и внедрена в ЗАО «Птицефабрика Синявинская» схема специфической профилактики МПВИ, включающая вакцинацию цыплят в возрасте 15 и 45 суток живой аттенуированной вакциной против МПВИ производства ВНИВИП с последующей ревакцинацией в возрасте 110 суток инактивированной эмульсионной вакциной производства ВНИВИП, оценена ее эффективность.

Предложена схема проведения лечебно-профилактических мероприятий при метапневмовирусной инфекции у молодняка промышленных кур-несушек,

включающая применение комплексных витаминных препаратов и антибактериальных лекарственных средств широкого спектра действия.

В результате проведенных исследований разработаны Методические положения «Выявление и серотипирование возбудителя метапневмовирусной инфекции птиц молекулярно-биологическими методами» от 15.10.2019г., протокол № 4.

Методология и методы исследования. Методология работы включала анализ научной литературы, поисковые исследования, основанные на стандартных процедурах с использованием различных материалов и животных. В работе использовали серологические, вирусологические, микробиологические, молекулярно-биологические и статистические методы исследований.

Положения, выносимые на защиту:

- эпизоотологические особенности течения МПВИ у молодняка кур и у промышленных кур-несушек в ЗАО «Птицефабрика Синявинская»;
- диагностическая ценность разработанных праймеров, которые позволяют идентифицировать МПВ и провести его серотипирование методом электрофоретической детекции и секвенирования, основанных на ПЦР;
- спектр бактериальной микрофлоры при метапневмовирусной инфекции у промышленных кур-несушек в ЗАО «Птицефабрика Синявинская»;
- разработка схемы специфической профилактики метапневмовирусной инфекции для ЗАО «Птицефабрика Синявинская»;
- разработка схемы лечебно-профилактических мероприятий при возникновении вторичных бактериальных инфекций у молодняка промышленных кур-несушек в период вспышки МПВИ.

Степень достоверности и апробация результатов.

Научные положения, выводы и практические рекомендации, сформулированные в диссертационной работе научно-обоснованы, достоверны и вытекают из результатов собственных исследований. Исследования проведены на большом фактическом материале с использованием современных

методов исследований. Результаты исследований по теме диссертации доложены и обсуждены на заседаниях Методического совета отдела вирусологии и ОБП с участием сотрудников отдела диагностики и эпизоотологического анализа и Ученого совета ВНИВИП (2017-2019), международной научно-практической конференции «Ветеринарная наука в промышленном птицеводстве», посвященной 50-летию ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский ветеринарный институт птицеводства» (Санкт-Петербург, 2014); Научно-практической конференции: «Современные подходы и перспективы решения актуальных зооветеринарных проблем в промышленном птицеводстве» (Санкт-Петербург, 2018).

Публикации. Основные положения диссертационной работы опубликованы в 4 научных статьях, из них 2 – в периодических изданиях, входящих в перечень российских научных рецензируемых журналов для опубликования основных результатов диссертаций, утвержденных ВАК Министерства образования и науки РФ.

Структура диссертации. Диссертация изложена на 131 странице компьютерного текста и состоит из следующих разделов: введение; обзор литературы; собственные исследования, включающие материалы и методы исследований, результаты исследований; обсуждение результатов исследований; выводы; практические предложения; список литературы, список сокращений и приложение. Диссертация иллюстрирована 13 таблицами и 19 рисунками. Список литературы включает 175 источников, из которых 121 зарубежный.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена за период с 2014-2017 гг. в отделе диагностики и эпизоотологического анализа и в отделе вирусологии и опухолевых болезней птиц Всероссийского научно – исследовательского ветеринарного института птицеводства (ВНИВИП) в соответствии с научно-технической программой НИР № 0599-2014-0221. Соисполнителями в работе по проведению микробиологических исследований были сотрудники отдела микробиологии.

Материалы и методы

При выполнении работы использовали: Пробы патматериала (голова и трахея, слизь из трахеи и хоан) для выделения изолята МПВ отбирали от павших и вынужденно убитых промышленных кур-несушек и от цыплят яичного направления выращивания 15-40-суточного возраста из ЗАО «Птицефабрика Синявинская». Патматериал от цыплят (мазки из трахеи и носовых ходов) отбирали с интервалом в 3 дня начиная с 15-суточного возраста. Пробы отбирали от 10 голов цыплят каждого возраста и формировали общую пробу. Всего было сформировано 7 общих проб. Патматериал хранили при температуре минус 18-22 °С до проведения вирусологических исследований и ПЦР. Суспензию из патматериала готовили по общепринятым методикам (Белоусова Р. В и др.2013г.).

Выделение вируса проводили путем перемежающихся пассажей на развивающихся СПФ-куриных эмбрионах 5-6 – суточного возраста, в культурах клеток или методом последовательных пассажей на клетках Vero и методом полимеразной цепной реакции (Сухинин А.А 2019г.).

Сыворотку крови, тестировали в непрямом варианте ИФА(наборы BioChek). Для этого отбирали по 23пробы сыворотки крови от каждой группы птиц.Исследовали образцы сыворотки крови цыплят и кур, не содержащие макроскопических признаков бактериальной и грибковой контаминации.

Для бактериологического исследования патматериал отбирали от промышленных кур-несушек 28-29 недельного возраста с клиническими признаками МПВИ. Для исследования брали соскобы с трахеи, синусов, внутренние органы (сердце, печень), пробы тонкого кишечника (двенадцатиперстной кишки).

При разработке схемы специфической профилактики МПВИ в опытной группе молодняк промышленных кур-несушек вакцинировали против МПВИ в возрасте 15 и 45 суток живой вакциной производства ВНИВИП с последующей ревакцинацией в возрасте 110 суток инактивированной эмульсионной вакциной производства ВНИВИП. Эффективность вакцинации оценивали по уровню

антител к МПВ в пробах сыворотки крови иммунизированных цыплят через 21 сутки после 2-кратной вакцинации живой вакциной, перед вакцинацией инактивированной вакциной и через 6 недель после применения инактивированной вакцины.

Инкубационные яйца, эмбрионы: яйца СПФ–кур фирмы «LohmannTierzucht» (Германия), 200 штук; цыплята, инкубированные из СПФ-яиц фирмы «LohmannTierzucht» в условиях ВНИВИП, 50 голов.

Культуры клеток: первично-трипсинизированная культура фибробластов СПФ эмбрионов кур; перевиваемая культура клеток почки зеленой африканской мартышки, клетки Vero (НИИ гриппа АМН, Санкт-Петербург).

Питательные среды, сыворотки, растворы и реактивы для вирусологических исследований: питательная среда Игла MEM и ДМЕМ, жидкая, с L-глутамином; питательная среда 199, жидкая, с L-глутамином; питательная среда ДМЕМ/F12 с Neres, жидкая сыворотка крови крупного рогатого скота, неконсервированная для культур клеток; сыворотка крови плодов коровы; трипсина раствор, 0,25% фирмы «US BIO»; версена раствор, 0,02%; Хенкса раствор фирмы «Nucclone». Питательные среды и растворы из полнокомпонентной смеси фирмы «Nucclone», производства ООО «Биолот».

Материалы, используемые в бактериологических исследованиях. Среда Эндо и XLD-агар, стафилококковый агар, среда Вильсона-Блера, мясо-пептонный агар (МПА), полимиксиновая среда, кровяной агар, агар Сабуро.

Реактивы для молекулярно-генетических исследований: набор реагентов для выделения РНК «Рибо-Сорб» и набор реагентов для выделения ДНК «ДНК-Сорб», ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии, Роспотребнадзора, Россия; набор реагентов для обратной транскрипции «Реверта-L»; растворы прямых и обратных праймеров, молярной массой по 10 пкмоль/мкл. ПЦР-смесь ScreenMix; трис-боратный буфер концентрированный с бромидом этидия, Россия; агароза для электрофореза ДНК, Россия; маркер молекулярных масс ДНК, состоящий из фрагментов двуцепочечной ДНК, длиной от 100 п.н. до

5000 п.н., производства Thermoscientific; масло вазелиновое медицинское по ГОСТ 3164 -78;реагент для секвенирования ДНК «DYEnamicETterminatorkit».

Культура клеток. Первично-трипсинизированную культуру клеток готовили из кожно-мышечной ткани 10-суточных СПФ куриных эмбрионов по методике Dulbesso R. &Vogt M. в модификации Younger J.S.(Сюрин В.Н., 1998).

Клетки Vero пересеивали с интервалом 5-6 сут. бесцентрифужным методом. Монослой клеток со стекла снимали раствором трипсина 0,25% и версена 0,02% в соотношении 1:9. Затем его сливали, клетки ресуспензировали разводили питательной ростовой средой (среда MEM/ДМЕМ, до 10% фетальной сыворотки и антибиотиков) до концентрации 150-250 тыс. кл./см³. Разливали в пробирки по 1,0 см³и культивировали в стационарных условиях при температуре (37,5±0,5)°С.

Вирус титровали в культуре клеток методом десятикратных разведений и с соответствующим контролем по общепринятой методике (Белоусова Р. В. и др., 2013).

Методы бактериологических исследований. Большинство посевов культивировали в обычных условиях 24 часа, стафилококковый агар 48 ч при температуре 37,5°С. Учёт и идентификацию выросших колоний проводили при помощи биохимических, микроскопических и серологических исследований. Чувствительность доминирующих видов микроорганизмов к антибактериальным препаратам изучали диско-диффузным методом (метод дисков) на среде Мюллер-Хинтона.

Статистическая обработка данных. Все полученные результаты обработаны статистически с использованием методов вариационной статистики (Ашмарин, И.П. и др., 1975; Троценко, Н.И. и др., 2000).

Результаты собственных исследований

Изучение эпизоотологического состояния на птицефабрике «Синявинская» по метапневмовирусной инфекции птиц. По данным серологического мониторинга на наличие поствакцинальных антител в

соответствии с планом профилактических и противоэпизоотических мероприятий, было установлено, что ЗАО «Птицефабрика Синявинская» благополучна по острым инфекционным болезням.

На птицефабрике птицу вакцинировали против ньюкаслской болезни (НБ), инфекционного бронхита кур (ИБК), инфекционной бурсальной болезни (ИББ), инфекционного энцефаломиелита птиц (ИЭП), инфекционного ларинготрахеита (ИЛТ) и синдрома снижения яйценоскости (ССЯ-76). Хозяйство было благополучно по инфекции микопlasма-галисептикум, колибактериозу, что позволяло иммунизировать птицу против ИЛТ аэрозольным методом. Для вакцинации использовали живую аттенуированную вакцину из штамма «ВНИИБП» производства ВНИВИП.

В 2015 году на одном из птичников на 3-4 сутки после проведения вакцинации против ИЛТ в возрасте 30-33-х суток у цыплят отмечались массовые конъюнктивиты с выделением серозного и серозно-фибринозного экссудата, опухание подглазничных синусов, хрипы, кашель, затрудненное дыхание. Также наблюдалось снижение поедаемости корма, угнетенное состояние и повышенный отход.

При патологоанатомическом вскрытии были выявлены конъюнктивиты, трахеиты с наличием в просвете трахеи серозного или серозно-фибринозного экссудата и фибринозных пробок, цианоз гребешка, сережек и видимых слизистых оболочек, застойные явления в легких. Через 3-5 суток у цыплят при патологоанатомическом вскрытии стали выявлять признаки бактериальных инфекций – пневмонии, перикардиты, перигепатиты. При вскрытии подглазничных синусов обнаруживали сгустки фибрина.

Для установления причины возникновения повышенной поствакцинальной реакции были отобраны образцы вакцины против ИЛТ и направлены на исследование во ВНИВИП. Были отобраны сыворотки крови от цыплят при выявлении клинических симптомов и через 21 сутки после появления клинических симптомов. Пробы сыворотки крови исследовали на

наличие антител к возбудителям НБ, ИБК, МПВИ. Результаты исследований представлены в таблице 1.

Таблица 1 - Результаты серологических исследований сыворотки крови цыплят (n=23)

Наименование болезни	Средний титр антител / обратные значения				
	Кол-во проб	При выявлении клинических симптомов(возраст 35 суток)	КВ, %	Через 21 сутки после выявления клинических симптомов(возраст 56 суток)	КВ, %
Инфекционный бронхит кур (ИФА)	23	1:2235 (1:909 – 1:3056)	54	1:2286 (1:1238 – 1:4661)	49
Метапневмовирусная инфекция (ИФА)	23	1:583 (1:252 – 1:1126)	52	1:16608(1:11073 – 1:21090)	14
Ньюкаслская болезнь, РЗГА	23	1:8 – 1:128	-	1:16 – 1:128	-

Из данных таблицы 1 видно, что значения титров антител к вирусам НБ и ИБК через 21 сутки после проявления клинических симптомов не имели диагностически значимых отличий. Средний титр антител к МПВ в момент проявления клинических симптомов составлял 1:583 (от 1:252 до 1:1126) с коэффициентом вариации (КВ) 52%. Все пробы сыворотки крови были серонегативными. Через 21 сутки после выявления клинических симптомов средний титр антител к МПВ составил 1:16608 (от 1:11073 до 1:21090) с коэффициентом вариации 14%. Все пробы были положительными, имели высокие значения титров антител к МПВ и низкий коэффициент вариации, что в отсутствие вакцинации свидетельствует о переболевании цыплят МПВИ.

В период проведения исследования отобранных образцов вакцины против ИЛТ на одном из птичников промышленного цеха у кур-несушек в возрасте 28 недель (196 суток) было отмечено снижение уровня яичной продуктивности до 90,5%, что ниже рекомендуемых показателей для кросса на 3,7%, с прогрессирующей динамикой. Максимальное снижение яичной продуктивности составило 16,8% от рекомендуемых показателей. Данные по динамике яичной продуктивности кур-несушек промышленного стада представлены на рисунке 1.

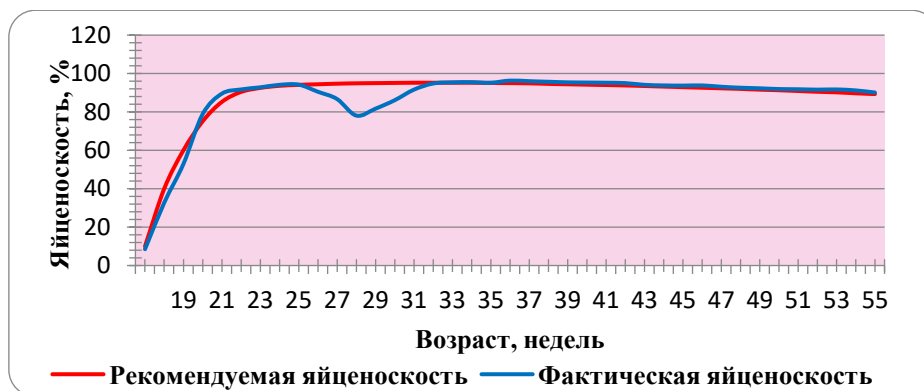


Рисунок 1 - Динамика яичной продуктивности промышленных кур-несушек, неблагополучного по метапневмовирусной инфекции стада

На рисунке видно, что в возрасте 28 недель уровень яйценоскости был ниже рекомендуемых показателей на 3,7%. В возрасте 29, 30, 31, 32 и 33 недели показатели продуктивности также были ниже рекомендуемых на 8,0, 16,8, 13,3, 9,0, и 3,6 % соответственно. В возрасте 35 недель яичная продуктивность составила 95,4%, т.е. выше рекомендуемых показателей на 0,2%, что свидетельствует о восстановлении яичной продуктивности.

В связи со снижением яйценоскости были отобраны сыворотки крови от кур неблагополучного стада в момент снижения яйценоскости в возрасте 196 суток и через 21 сутки после этого в возрасте 217 суток. От павших и от вынужденно убитых кур-несушек с клиническими симптомами были отобраны пробы патматериала для проведения вирусологических, молекулярно-биологических и гистологических исследований.

Пробы сыворотки крови промышленных кур-несушек исследовали на наличие специфических антител к МПВ, к вирусам НБ, ИБК, инфекционного энцефаломиелита птиц (ИЭП) и ССЯ, так как при возникновении данных болезней наблюдается выраженное снижение яйценоскости.

Результаты исследований проб сыворотки крови на наличие антител к вирусу ССЯ в возрасте 196 и 217 суток не имели достоверных отличий и находились в пределах 1:8 – 1:256. Результаты исследований проб сыворотки крови на наличие антител к вирусам НБ, ИБК, ИЭП представлены в таблице 2.

Таблица 2 - Результаты серологических исследований проб сыворотки крови промышленных кур-несушек (n=23)

Наименование болезни	Средний титр антител / обратные значения				
	Ко л-во проб	При выявлении клинических симптомов (возраст 196 суток)	КВ, %	Через 21 сутки после выявления клинических симптомов (возраст 217 суток)	К В, %
Ньюкаслская болезнь	23	1:19058(1:13422 – 1:21967)	43	1:18954(1:12531 - 1:22185)	45
Инфекционный бронхит кур	23	1:9516(1:4693 – 1:14742)	36	1:9085(1:4577 – 1:15549)	45
Инфекционный энцефаломиелит птиц	23	1:6648(1:3325 – 1:8960)	37	1:6081 (1:2685 – 1:8581)	41
Метапневмовирусная инфекция	23	1:1361 (1:219 – 1:5748)	129	1:21572(1:10957 – 1:28997)	19

Результаты исследований, приведенные в таблице 2, показывают, что уровни антител в возрасте 196 и 217 суток к вирусам НБ, ИБК, ИЭП не имеют достоверной разницы в отношении среднего значения титров антител. Патологические значения титров антител к вирусам НБ, ИБК и ИЭП выявлены не были. В возрасте 196 суток средний титр антител к МПВ составил 1:1361 (от 1:219 до 1:5748) с коэффициентом вариации 129%. Через 21 сутки после выявления клинических симптомов средний титр антител к метапневмовирусу составил 1:21572 (от 1:10957 до 1: 28997) с коэффициентом вариации 19%, что в отсутствие вакцинации свидетельствует о переболевании птицы.

Исследование образцов вакцины против ИЛТ, показало соответствие иммунологического препарата СТО (стандарту организации), техническим условиям, требованиям безопасности, показателям антигенной активности и безвредности. При проведении молекулярно-биологических исследований контаминации вакцины посторонними агентами установлено не было.

Выделение метапневмовируса птиц на различных биологических системах

Отбор проб и обработка патологического материала. Для проведения вирусологических исследований отбирали смывы и соскобы из инфраорбитальных синусов, слизистых оболочек неба и трахеи.

Выделение вируса на развивающихся СПФ-куриных эмбрионах.

Заражали 5-6-суточных эмбрионов в желточный мешок суспензией патматериала в объеме 0,1-0,2 см³. Эмбрионы инкубировали в течение 5-6 суток при температуре 37,5°C и относительной влажности 55-60% и ежедневно овоскопировали. Эмбрионы, погибших в течение 48 часов выбраковывали, а павших в последующие сутки наблюдения и оставшихся живыми после 6 суток инкубации охлаждали при 4-6°C и вскрывали. Изменения в зародыше были представлены слабой гиперемией зародыша и желточного мешка, отсутствием инъекции сосудов.

Выделение вируса на клеточных культурах. Культуры выращивали в стационарных условиях в течение 2-3 суток до формирования ровного плотного монослоя в ростовой среде Игла MEM и среде 199 в соотношении 2:1 с содержанием 10% сыворотки крови крупного рогатого скота. Заражали пробирочные культуры клеток суспензией из патматериала в объеме 0,2 см³ и оставляли культуру при (37,5±0,5) °C в течение 30-60 минут для адсорбции вируса. Затем в пробирки с инфицированной культурой вносили 1,0 см³ поддерживающей среды. Зараженные культуры инкубировали в течение 5-7 суток при температуре 37,5°C до появления выраженного цитопатогенного действия (ЦПД) вируса. По мере последовательных пассажей отмечали усиливающееся ЦПД в монослое культуры, что выражалось округлением клеток в ограниченных участках монослоя, появлением в них цитоплазматической зернистости на 3-4 сутки после заражения. Дегенерацию клеток на 70-80% отмечали на 6-7 сутки, затем в отдельных участках наблюдали образование синцития, как характерный признак ЦПД для МПВ.

Обнаружение метапневмовируса с помощью обратной транскрипции – полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР). Выделение РНК проводили из мазков, сделанных со слизистой оболочки трахеи и 20% суспензии из измельченных органов верхнего отделареспираторного тракта. Обратную транскрипцию проводили с помощью набора Реверта-L в амплификаторе в течение 30 мин при температуре 37°C. ПЦР проводили с использованием

видоспецифических праймеров для выявления МПВ подтипа В (APVBFи APVBR) с размером 291 п.н. и подтипа А (APVA Fi APVA R), размером 501 п.н. в реакционной смеси, содержащей 5 мкл ПЦР-смеси ScreenMix.

Анализ продуктов амплификации проводили методом электрофореза, используя комплект реагентов для электрофоретической детекции продуктов амплификации в агарозном геле. В качестве положительного контроля использовали вакцинные штаммы 8544 и VC-03 метапневмовируса птиц.

В результате ПЦР, проведенной с исследуемым вирусосодержащим материалом, был зарегистрирован фрагмент длиной 291 п.н., что свидетельствует о наличии МПВ подтипа В (рис. 2).

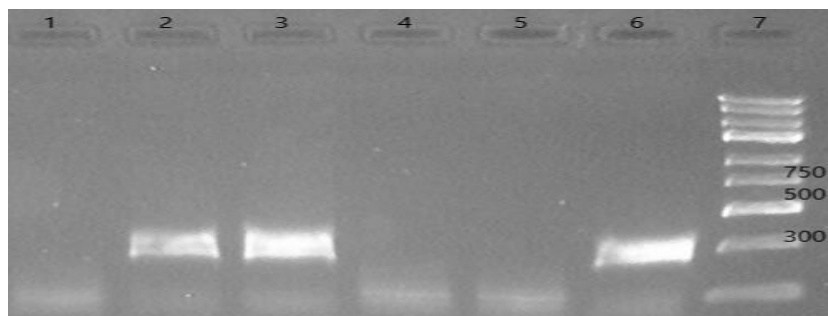


Рисунок 2 - Результаты электрофореза продуктов амплификации фрагмента генома метапневмовируса подтипа В в вирусосодержащем материале
1- отрицательный контроль выделения; 2,3 - положительные пробы; 4,5 -отрицательные пробы; 6 - вакцинный штамм VC-03 МПВ птиц; 7 - маркер молекулярной массы.

Фрагмент ДНК длиной 501 п.н., характерный для МПВ подтипа А, в конечном продукте ПЦР не регистрировался, что свидетельствует об отсутствии его в исследуемом материале (рис. 3).

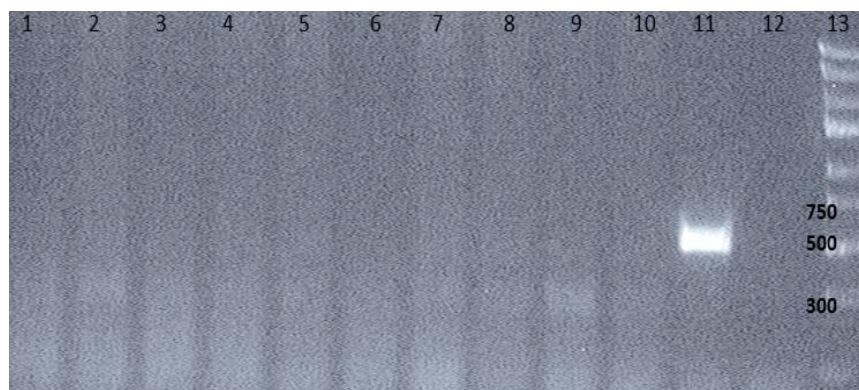


Рисунок 3 - Результаты электрофореза продуктов амплификации фрагмента генома метапневмовируса подтипа А в вирусосодержащем материале
9- отрицательный контроль выделения; 2-7 - отрицательные пробы; 8 - вакцинный штамм 8544 МПВ птиц; 1,10 - маркер молекулярной массы.

Для определения нуклеотидной последовательности, вырезанный из геля продукт ПЦР фильтровали через колонки со стекловатой. После чего ДНК осаждали 96% этанолом в присутствии 7,5 М ацетата аммония. Подготовленные анализируемые пробы, содержащие продукты секвенирования, разделяли методом капиллярного электрофореза с детекцией сигнала флюоресценции с помощью автоматического секвенатора MegaBase 1000.

При анализе последовательности фрагмента гена G образца изолята, выделенного от цыплят, была обнаружена гомология 96% со штаммом GB 1407/06 метапневмовируса подтипа В.

Бактериологические исследования патологического материала при метапневмовирусной инфекции.

Клинически больных и павших промышленных кур-несушек из неблагополучного птичника исследовали на наличие патогенной бактериальной флоры. В результате исследований были выделены: из внутренних органов кур в 60% случаев (из сердца, печени, двенадцатиперстной кишки) – культуры *Escherichia coli*; из поражённых трахей кур (30%) - культуры гемолитического и негемолитического стафилококков, *Staphylococcus epidermidis*; из одной пробы – культура *Ornithobacterium rhinotracheale*; от трёх кур (из печени, лёгких, инфраорбитальных синусов) - культуры *Salmonella Gallinarum*.

Спектр бактериальной флоры, выделенной в ЗАО «Птицефабрика Сиявинская» представлен на рисунке 4.

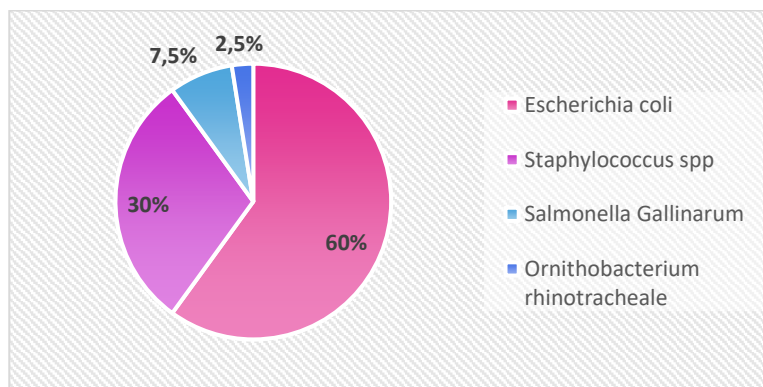


Рисунок 4 - Спектр бактериальной микрофлоры, выделенной в ЗАО «Птицефабрика Сиявинская»

Полученные данные свидетельствуют о том, что МПВИ в хозяйстве протекает в ассоциации с возбудителями бактериальных инфекций.

На основании результатов проведенных исследований было принято решение о введении в систему лечебно-профилактических мероприятий антимикробные препараты в соответствии выявленной чувствительностью.

Разработка схемы специфической профилактики метапневмовирусной инфекции птиц

Определение сроков иммунизации молодняка промышленных кур-несушек против метапневмовирусной инфекции птиц. В ходе проведения молекулярно-биологических исследований МПВ выявляли, начиная с 27-суточного возраста. В связи с установлением факта циркуляции МПВ среди цыплят промышленного стада, а также в связи со вспышкой МПВИ у промышленных кур-несушек, было принято решение о введении в схему специфической профилактики вакцинации против МПВИ.

На основании результатов исследований, с учетом проводимых в хозяйстве вакцинаций и сроков применения вакцины против МПВИ нами было рекомендовано иммунизировать цыплят живой вакциной, содержащей подтип В метапневмовируса в возрасте 15 и 45 суток с последующей ревакцинацией инактивированной вакциной, содержащей подтип В в возрасте 110 суток.

При проведении специфической профилактики МПВИ с использованием живых вакцин следует учитывать, что ведущую роль в защите молодняка от МПВ играет клеточно-опосредованный иммунитет. Поэтому в хозяйстве была применена живая культуральная вакцина производства ВНИВИП против МПВИ из штамма «Крон-2» (подтип В) спрей-методом. Для защиты птицы от МПВ в продуктивный период важно создать высокий и продолжительный иммунитет. С этой целью в схему специфической профилактики была включена инактивированная масляная вакцина против МПВИ подтипа В производства ВНИВИП методом подкожного введения в области шеи в дозе 0,5 см³. Вакцинации проводились в соответствии с инструкциями по применению.

Изучение поствакцинального иммунного ответа у молодняка промышленных кур-несушек в производственных условиях. Изучение формирования поствакцинального иммунитета у молодняка промышленных кур-несушек в производственных условиях проводили путем серологического исследования проб сыворотки крови цыплят промышленного стада, полученных из ЗАО «Птицефабрика Синявинская». Результаты исследований представлены в таблице 5.

Таблица 5 - Динамика формирования антител у вакцинированных цыплят промышленного стада живой и инактивированной вакциной против МПВИ подтипа В (n=23)

	Наименования групп	Титр антител, обратные значения			КВ, %	Число (ПР), %
		Мин.	Макс.	Средний		
1.	Сыворотки крови цыплят перед вакцинацией живой вакциной в возрасте 14 суток	1:53	1:401	1:208	55	0,0
2.	Сыворотки крови цыплят через 21 сутки после 1-й вакцинации живой вакциной	1:70	1:1558	1:375	101	34,8
3.	Сыворотки крови цыплят через 21 сутки после 2-й вакцинации живой вакциной	1:348	1:5619	1:2669	73	60,9
4.	Сыворотки крови цыплят перед вакцинацией инактивированной вакциной в возрасте 109 суток	1:483	1:6427	1:2362	69	78,3
5.	Сыворотки крови от кур-несушек через 6 недель после вакцинации инакт. вакциной	1:3709	1:17759	1:13432	48	100,0

Данные таблицы 5 показывают, что специфические антитела в сыворотке крови цыплят до вакцинации отсутствовали. Через 21 сутки после 1-й вакцинации живой вакциной средний титр антител к МПВ составил 1:375 (1:70 – 1:1558), число положительно реагирующих проб - 34,8%. Через 21 сутки после 2-ой вакцинации живой вакциной средний титр антител составил 1:2669 (1:348 – 1:5619), число положительно реагирующих проб - 60,9%. Перед вакцинацией инактивированной вакциной в возрасте 109 суток средний титр антител составлял 1:2362 (1:483 – 1:6427), количество положительных проб – 78,3%. После вакцинации инактивированной вакциной наблюдали значительное увеличение уровня специфических антител в сыворотке крови промышленных

кур-несушек. Средний титр антител составил 1:13432 (1:3709 – 1:17759), при коэффициенте вариации 48%, число положительно реагирующих проб - 100%. Патологических значений титров антител выявлено не было. Все средние значения титров антител находились в ожидаемом диапазоне.

На протяжении всего периода выращивания каких-либо клинических признаков респираторных инфекций у цыплят не наблюдались. Также не наблюдалось выраженной поствакцинальной реакции после применения вакцины против инфекционного ларинготрахеита птиц.

В период эксплуатации птиц промышленного стада, вакцинированных против МПВИ, признаков болезни и снижения яичной продуктивности не установлено. Таким образом, праймирование живой вакциной против МПВИ подтипа В и ревакцинация инактивированной эмульсионной вакциной подтипа В, защищает кур-несушек от респираторного и репродуктивного синдрома в течение всего продуктивного периода.

Разработка лечебно-профилактических мероприятий при возникновении вторичных бактериальных инфекций на фоне МПВИ

При подборе антимикробных препаратов мы учитывали чувствительность всего спектра выделенной микрофлоры к тому или иному препарату. Результаты подбора антимикробных препаратов по чувствительности к выделенной в процессе исследований бактериальной флоре представлены на рисунке 5.

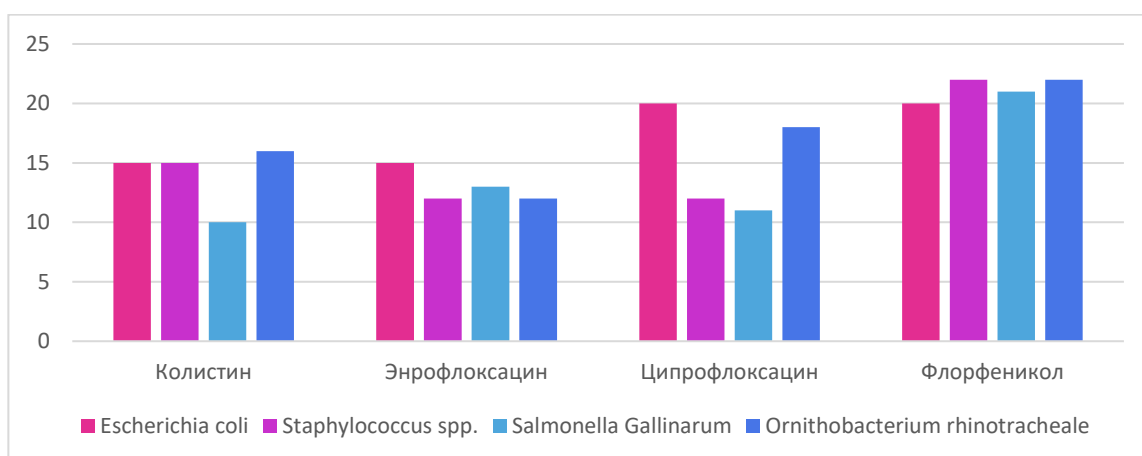


Рисунок 5 - Чувствительность выделенных культур микроорганизмов к антибактериальным препаратам (по вертикальной оси зона задержки роста, мм)

Для лечения молодняка в случае возникновения осложненного течения МПВИ рекомендовано использование препаратов Флорфеникол ВС 10, Ципровет и Энроколи. В качестве поддерживающей терапии в раннем возрасте, а также в период течения МПВИ было рекомендовано применение комплексных витаминных или витаминно-минеральных препаратов. Мы включили в схему лечебно-профилактических обработок препарат Гидрорексвитал аминокислоты (или аналоги). Применение антибактериальных препаратов и комплексного препарата Гидрорексвитал аминокислоты в период течения на молодняке промышленных кур-несушек МПВИ в отсутствие вакцинации позволили значительно снизить количество падежа и количество выбракованной птицы, а также не допустить снижения живой массы ниже рекомендуемых показателей.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Изучена эпизоотологическая ситуация по метапневмовирусной инфекции в ЗАО «Птицефабрика Синявинская» Ленинградской области. Установлена циркуляция метапневмовируса у промышленных кур-несушек и у цыплят промышленного стада.

2. Патоморфологические признаки были представлены трахеитами, желточными перитонитами, дегенерацией эпителия слизистой оболочки трахеи. Также отмечались признаки бактериальных инфекций.

3. При серологических исследованиях невакцинированной против метапневмовирусной инфекции птицы, через 21 сутки после проявления симптомов средний титр антител у молодняка составил 1:16608 (1:11073 – 1:21090), КВ 14%, у кур-несушек - 1:21572 (1:10957 – 1:28997), КВ 19%.

4. При проведении вирусологических исследований патологического материала на куриных эмбрионах изменения были слабо выражены; При заражении клеток Vero выявляли признаки ЦПД характерные для МПВ.

5. Разработаны праймеры для идентификации метапневмовируса птиц и проведения типирования возбудителя методом электрофоретической

детекции и секвенирования, основанных на полимеразной цепной реакции. Установлено, что выделенный метапневмовирус относится к подтипу В.

6. В результате проведения бактериологических исследований из патологического материала, отобранного от кур-несушек неблагополучного стада были выделены культуры *Escherichia coli* (60%), *Staphylococcus spp.* (30%), *Salmonella Gallinarum* (7,5%), *Ornithobacterium rhinotracheale* (2,5%).

7. Специфическая профилактики МПВИ с использованием живой и инактивированной вакцин ВНИВИП. способствовала формированию иммунного ответа, достаточного для защиты поголовья от полевого вируса в течение всего продуктивного периода.

8. Разработана схема лечебно-профилактических мероприятий с использованием антимикробных препаратов широкого спектра действия и комплексных витаминных препаратов для лечения вторичных бактериальных инфекций и повышения резистентности организма птиц.

ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ

В результате проведенных исследований нами предложены методические положения «Выявление и серотипирование возбудителя метапневмовирусной инфекции птиц молекулярно-биологическими методами» положения предназначены для ветврачей-вирусологов региональных, областных, зональных и специализированных лабораторий и научно-исследовательских учреждений ветеринарного и биологического профиля.

Материалы, изложенные в диссертации, используются в учебном процессе ВУЗов биологического и ветеринарного профиля и на курсах повышения квалификации ветеринарных специалистов.

Перспективы дальнейшей разработки темы

Планируется разработка мультиплексной тест-системы в режиме реального времени с целью выявления МПВ типов А и В.

Планируется разработка праймеров для обнаружения и изучения МПВ типа С, с дальнейшим культивированием на перевиваемых культурах клеток с целью получения аттенуированных штаммов вируса для изготовления вакцин.

Список опубликованных работ по теме диссертации

Статьи в журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ

1. Никитина, Н. В. Выделение метапневмовируса птиц на различных биологических системах / Н.В. Никитина, **С.Р. Абгарян** // Вопросы нормативно-правового регулирования в ветеринарии. – 2019. – № 2. – С. 34-36.
2. **Абгарян, С.Р.** Молекулярно-биологическая диагностика респираторных болезней птиц / **С.Р. Абгарян**, Н.В. Никитина, А.Н. Семина // Международный вестник ветеринарии. – 2019. – № 3. – С.11-15.

Статьи, опубликованные в сборниках материалов конференций

1. Новикова, О.Б. Микробиологический спектр возбудителей при метапневмовирусной инфекции у кур-несушек / О.Б. Новикова, **С.Р. Абгарян**, Н.В. Никитина // Национальная ассоциация ученых (НАУ). – 2019. – № 45. Часть 1. – С. 5-7.
2. Дмитриева, М.Е. Молекулярно-биологическая диагностика метапневмовируса птиц / М.Е. Дмитриева, **С.Р. Абгарян**, А.Н. Семина // Материалы XIX Международной конференции. «Мировые и российские тренды развития птицеводства: реалии и вызовы будущего», Сергеев Посад.- 2018. – С. 597-600.