

БАЛЕНДОР ЕВГЕНИЙ ВАЛЕНТИНОВИЧ

**ДИАГНОСТИКА И ПРОФИЛАКТИКА ИНФЕКЦИОННОЙ АНЕМИИ
ЦЫПЛЯТ В УСЛОВИЯХ ПРОМЫШЛЕННОГО ПТИЦЕВОДЧЕСКОГО
ПРЕДПРИЯТИЯ МЯСНОГО НАПРАВЛЕНИЯ**

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 вирусологии и опухолевых болезнях 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: **Дмитриева Маргарита Евгеньевна,**
кандидат ветеринарных наук

Официальные оппоненты: **Ирза Виктор Николаевич,** доктор ветеринарных наук, доцент, ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных» (ФГБУ ВНИИЗЖ), главный научный сотрудник информационно-аналитического центра Россельхознадзора

Афонюшкин Василий Николаевич, кандидат биологических наук, Институт экспериментальной ветеринарии Сибири и Дальнего Востока Сибирского федерального научного центра Агробиотехнологий РАН, заведующий сектором молекулярной биологии

Ведущая организация – Федеральное государственное бюджетное научное учреждение Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт биологической промышленности (ФГБНУ ВНИТИБП)

Защита диссертации состоится «___» _____ 2022 года в ___ часов на заседании диссертационного совета Д 220.059.03 при ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет ветеринарной медицины» по адресу: 196084, Санкт-Петербург, ул. Черниговская, 5, тел./факс (812) 388-10-55.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет ветеринарной медицины» и на сайте <http://spbguvvm.ru>

Автореферат разослан «___» _____ 202 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета

Н.В. Кузнецова

1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Современное промышленное птицеводство является самой наукоемкой и динамично развивающейся отраслью агропромышленного комплекса России, которая вносит существенный вклад в обеспечение продовольственной безопасности страны.

Эффективность производства и качество выпускаемой продукции определяют конечный финансовый результат и успех предприятия на продовольственном рынке (Дмитриева М.Е., 2008). Однако с развитием птицеводства расширяется и спектр актуальных инфекционных болезней, к которым относится и инфекционная анемия цыплят.

Инфекционная анемия цыплят (ИАЦ) - иммунодепрессивная болезнь, которая характеризуется отставанием в росте и развитии, апластической анемией, дерматитами, повышенной восприимчивостью к возбудителям других инфекций (вирусных, бактериальных, паразитарных), а также снижением эффективности вакцинаций против ньюкаслской болезни, инфекционного бронхита кур, инфекционной бурсальной болезни, болезни Марека и др. (Дмитриева М.Е., 2011, 2015, 2016; Имбург М., 2007; Vox P.G., 1988; Dmitrieva M. et al., 2015; Goodwin M.A., 1992; McNulty M.S., 1991; Otaki Y. et al., 1988; Yuasa N. et al., 1988). Болезнь описана под разными названиями, такими как: геморрагический синдром, гангренозный дерматит, болезнь «синего крыла», вирусная анемия цыплят, ВАЦ, ИНАН и др. (Бакулин В.А., 2006; Дмитриева М.Е. и др., 2011, Bisgaard M., 1983; Drouin P. et al., 1992; Engstrom B.E., 1984. 1988; Goodwin M.A. et al., 1989, 1992; Picault J.-P., 1992; Sandhya N. et al., 2019; Vielits E. et al., 1988; Yuasa N. et al., 1987). Инфекционная анемия цыплят широко распространена в странах с развитым промышленным птицеводством (Алиев А.С. и др., 2013; Bretano L. et al., 1991; Buscaglia C. et al., 1994; Chettle N.J. et al., 1989; Engstrom B.E. et al., 1984; Farkas T. et al., 1992; Firth G.A. et al., 1990; Goodwin M.A. et al., 1989; Hernandez-Divers S.M. et al., 2006; Oluwaelu D., 2010; Sandhya N. Et al., 2019; Simeonov K.B. et al., 2009). Экономический ущерб от ИАЦ складывается из потерь от падежа птицы (в том

числе при возникновении вторичных инфекций), снижения продуктивности, повышения конверсии корма, а также затрат на антибактериальные и витаминные препараты.

В настоящее время все чаще регистрируются проблемы с качеством мясной продукции, связанные с воздействием вируса ИАЦ (Дмитриева М.Е., 2016), что приводит к весьма ощутимым финансовым потерям.

Диагностика болезни в птицеводческих хозяйствах, в большинстве случаев, основана на результатах серологического, клинического и патологоанатомического исследований. Нередко результаты серологических исследований отрицательные, что не является свидетельством благополучия птицы по ИАЦ. Отсутствие специфических антител у бройлеров к моменту убоя при регистрации клинических и патологоанатомических признаков ИАЦ связано с тем, что антитела не успевают вырабатываться или не вырабатываются благодаря феномену иммунологической толерантности. Инфекционная анемия цыплят часто протекает как латентная или ассоциированная инфекция и характерные клинические и патологоанатомические признаки не выявляются.

В настоящее время в мире не производится ни одной коммерческой вакцины, способной обеспечить полноценную защиту птицы от вируса ИАЦ (McKenna G.F., 2003; Moeni H. et al., 2011; Noad R. et al., 2003; Sadhya N. et al., 2019; Schrier C.C., 1998; Schat K.A., 2011; Pages-Mote A. et al., 1997; Todd D., 2004; Tseng T.-Y. et al., 2019; Vaziry A. et al., 1988; Zhang S.-M. et al., 2015).

Современные зарубежные исследователи считают, что ИАЦ представляет серьезную угрозу для промышленного птицеводства и требует установления эпидемиологического статуса болезни во всем мире (Ducatez M.F., 2006, 2008; Kim H.R. et al., 2010; Nayabian H. et al., 2013; Oluwaelu D. et al., 2010).

В России не разработаны нормативные документы по профилактике и ликвидации болезни, средства серологической диагностики и специфической профилактики, недостаточно изучены биологические свойства вируса, поэтому проблема диагностики и профилактики ИАЦ, ее влияния на иммунную систему и иммунитет является актуальной.

Степень разработанности темы. С развитием молекулярно-генетических методов исследований в последние годы внесены существенные изменения в классификацию вируса ИАЦ. В результате обнаружения сходства вируса ИАЦ с вирусом Torque Teno (TTV) и мини-вирусом Torque Teno (TTMV) (Bendinelli M. et al., 2001; Hino S. et al., 2007; Prasetyo A.A., 2009; Schat K.A. et al., 2009), возбудитель в 2015 году был отнесен к семейству *Anelloviridae* (Breitbart M, 2015; Ganar K. et al., 2017; Rosario K. et al., 2017). Традиционно считалось, что вирус ИАЦ инфицирует только кур, однако в настоящее время варианты вируса выделены от домашних воробьев (Gholami-Anangaran M. et al., 2013), мышей, кошек, собак и человека. Есть сведения о выделении вируса ИАЦ от индеек (Sandhya N. et al., 2019) и антител у японских перепелов (Львов Д.К. и др., 2013; Fadly A.M. et al., 1973).

У инфицированной вирусом ИАЦ (ВАЦ) птицы нередко отмечается депрессия вакцинного иммунитета против болезни Марека (БМ), ньюкаслской болезни (НБ), герпесвируса индеек (Вох P.G. et al., 1988; Goodwin M.A. et al., 1993; McNulty M.S., 1991; Otaki Y. et al., 1987, 1988; Yuasa N. et al., 1988), инфекционного ларинготрахеита птиц (Lebdah M.A. et al., 2016), инфекционной бурсальной болезни (ИББ), инфекционного бронхита кур (ИБК), кокцидиоза (Джавадов Э.Д. и др., 2010).

При ассоциированных инфекциях ВАЦ усиливает патогенность вирусов инфекционной бурсальной болезни (Adair B.M., 2000; Smyth J.A. et al., 2013), болезни Марека (Adair B.M., 2000; De Boer G.F. et al., 1992; Hegazy A.M. et al., 2010; Miles A.M. et al., 2001; Smyth J.A. et al., 2013), ньюкаслской болезни (Adair B.M., 2000; De Boer G.F. et al., 1994; Hegazy A.M. et al., 2010; Smyth J.A. et al., 2013), реовируса (Bullock V.v. et al., 1986; Engstrom B.E. et al., 1984, 1988; McNeilly F. et al., 1995), аденовируса (Bullock V.v. et al., 1986; Hegazy A.M. et al., 2010; Toro H. et al., 2000), а также таких возбудителей как *Staphylococcus aureus* (Hegazy A.M. et al., 2010; McNamee P.T. et al., 1999; Randall C.J. et al., 1984), *Clostridium perfringens* (Goodwin M.A. et al., 1989), *Eimeria tenella* (Zbrahim A.I., 1997), *Cryptosporidium baileyi* (Hornok S. et al., 1998). Способность вируса ИАЦ разрушать целые звенья иммунной системы, усиливать, при ассоциированных инфекциях, патогенность

возбудителей инфекционных болезней различной этиологии, инфицировать другие виды животных, а также человека, требуют дальнейшего изучения, разработки средств диагностики и специфической профилактики, а также мер по профилактике болезни и снижению воздействия ВАЦ на организм птицы.

Цель и задачи исследований. Цель исследований - на примере промышленного птицеводческого хозяйства мясного направления, неблагополучного по ИАЦ, изучить эпизоологию ИАЦ, отработать методы диагностики болезни, разработать мероприятия по профилактике болезни и снижению ущерба от ИАЦ.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

- изучить эпизоотологические особенности течения инфекционной анемии цыплят у цыплят-бройлеров, клинические и патологоанатомические признаки проявления болезни в птицеводческом хозяйстве промышленного типа;

- провести серологические, гематологические, вирусологические, электронно-микроскопические и молекулярно-биологические исследования патологического материала с целью выделения и идентификации возбудителя;

- изучить влияние иммуносупрессии, обусловленной вирусом ИАЦ, на иммунный ответ у цыплят-бройлеров после вакцинации против ньюкаслской болезни, инфекционной бурсальной болезни и инфекционного бронхита кур;

- разработать систему профилактики инфекционной анемии цыплят для промышленного птицеводческого хозяйства мясного направления;

- разработать на основе проведенных исследований Методические положения по диагностике и профилактике инфекционной анемии цыплят для птицеводческих хозяйств промышленного типа.

Научная новизна. Изучены эпизоотологические особенности течения, клинические и патологоанатомические признаки ИАЦ у цыплят-бройлеров, полученных от вакцинированных и не вакцинированных родителей в условиях промышленного птицеводческого предприятия мясного направления.

Изучено влияние иммуносупрессии, обусловленной вирусом ИАЦ, на иммунный ответ у цыплят-бройлеров после вакцинации против НБ, ИББ и ИБК.

Впервые в России разработаны Методические положения по диагностике и профилактике ИАЦ для птицеводческих хозяйств промышленного типа.

Получен патент РФ «Штамм вируса инфекционной анемии цыплят «МЕ-77» для производства инактивированных сорбированных и эмульгированных вакцин и диагностикумов» № 2646116 от 01.03.2018. Бюл. № 7.

Теоретическая и практическая значимость работы. Разработана и внедрена в ООО ТПК «Балтптицепром» система профилактики ИАЦ.

На основе результатов проведенных исследований разработаны Методические положения «Диагностика и профилактика инфекционной анемии цыплят в птицеводческих хозяйствах промышленного типа» от 26.02.2021г.

Разработанные Методические положения рекомендованы для ветеринарных врачей промышленных птицеводческих предприятий, работников ветеринарных лабораторий, студентов ВУЗов ветеринарного и биологического профиля.

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 клинические, патологоанатомические, серологические, вирусологические, молекулярно-биологические, электронно-микроскопические, биохимические, физические и статистические методы исследований.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Изучение эпизоотологии болезни, клинических и патологоанатомических признаков инфекционной анемии цыплят в промышленном птицеводческом хозяйстве мясного направления;

2. Диагностика ИАЦ с использованием серологических, гематологических, вирусологических, электронно-микроскопических и молекулярно-биологических методов исследований;

3. Изучение влияния иммуносупрессии, обусловленной вирусом ИАЦ, на иммунный ответ после вакцинации цыплят-бройлеров против НБ, ИББ и ИБК;

4. Разработка системы профилактики инфекционной анемии цыплят для промышленного птицеводческого хозяйства мясного направления.

Степень достоверности и апробация результатов работы. 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.

Материалы диссертации доложены на заседаниях Методического совета отдела вирусологии и ОБП и Ученого совета ВНИВИП (2014-2021гг.), на Международной научно-практической конференции «Ветеринарная наука в промышленном птицеводстве» (Санкт-Петербург, 2014), Международном птицеводческом конгрессе ВНАП «Потенциал птицеводческого производства в развивающихся странах» (Анталья, Турция, 2015г.), XII Международной научно-практической конференции «Eurasiascience» (Москва, 2017), Международной научно-практической конференции «Проблемы и приоритеты развития науки в XXI веке» (Смоленск, 2017), Международной научно-практической конференции «Перспективы развития науки и образования» (Тамбов, 2017), Научно-практической конференции «Современные подходы и перспективы решения актуальных зооветеринарных проблем в промышленном птицеводстве» (Санкт-Петербург, 2018).

Публикации по теме диссертации. Основные положения диссертационной работы опубликованы в 11 научных статьях, из них 2 – в периодических изданиях, входящих в перечень российских научных рецензируемых журналов для опубликования основных результатов диссертаций, утвержденных ВАК при Министерстве науки и высшего образования РФ.

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 199 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, собственных исследований, обсуждения полученных результатов, заключения, практических предложений, перспектив дальнейшей разработки темы, списка использованной литературы и приложений. Работа иллюстрирована 14 таблицами и 37 рисунками. Список литературы включает 324 источника, в том числе 271 источник зарубежных авторов.

2. ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в отделе вирусологии и опухолевых болезней птиц во «Всероссийском научно-исследовательском ветеринарном институте» – филиале Федерального государственного бюджетного научного учреждения Федерального научного центра «Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт птицеводства» Российской академии наук (ВНИВИП) в 2011-2014 годах.

2.1. Материалы и методы

Животные: СПФ-цыплята суточного возраста, 4-5-суточные СПФ-куриные эмбрионы, цыплята-бройлеры кросса «Росс-308», беспородные цыплята из фермерских хозяйств.

Методы лабораторных исследований: иммуноферментный анализ (ИФА); реакция задержки гемагглютинации (РЗГА); биохимическое исследование крови; заражение куриных эмбрионов в желточный мешок; полимеразно-цепная реакция (ПЦР); геномное секвенирование; электронно-микроскопическое исследование; постановка биопробы.

Иммуноферментный анализ проводили в соответствии с наставлениями по проведению ИФА с использованием наборов и компьютерной программы «BioChek». Титры антител указывали в обратных значениях.

Реакцию задержки (торможения) гемагглютинации ставили по общепринятой методике микропланшетным методом с использованием антигена вируса ньюкаслской болезни (ВНИВИП).

Оборудование и приборы: ИФА - промывочное устройство (шланг и гребенка-дозатор на 12 лунок), полуавтоматические 1-канальные и 8-канальные пипетки различного объема, микропланшетный ридер SUNRISE (Tecan Austria GmbH, Австрия), фильтр с длиной волны 405 нм; компьютер с программой BioChek; получение ВСМ - гомогенизатор ULTRA-TURRAX® T-25 digital.

Заражение куриных эмбрионов. 4-5-сут. СПФ-куриных эмбрионов заражали в желточный мешок вирусосодержащим материалом (ВСМ). Объем инокулята составлял 0,2 см³.

Полимеразно-цепную реакцию ставили с использованием многоканального термоциклера МС2 «Терцик», детектирующего термоциклера ДТ-322, системы ПЦР с флуоресцентной детекцией в режиме реального времени CFX96 Touch™, системы анализа последовательности молекул ДНК Ion (PGM). Выделение ДНК вируса ИАЦ осуществляли по общепринятой методике с использованием лицензированных коммерческих наборов («ДНК-сорб В», ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия).

Геномное секвенирование проводили с использованием автоматического секвенатора MegaBACE1000 в соответствии с рекомендациями производителя с использованием коммерческих наборов «DYEnamic ET terminator kit».

Гематологическое исследование крови цыплят проводили по общепринятой методике в ФГБУ «Калининградская межобластная ветеринарная лаборатория» (Калининград).

Электронно-микроскопическое исследование ВСМ проводили методом негативного контрастирования в ФГБУ «Научно-исследовательский институт гриппа им. А.А. Смородинцева» Министерства здравоохранения РФ.

Постановка биопробы. Использовали беспородных цыплят, не имеющих антител к ВАЦ. Суточным цыплятам внутрибрюшинно иннокулировали вирусодержащую суспензию, полученную из печени клинически больных цыплят-бройлеров, в объеме 0,2 см³.

Статистическая обработка результатов исследований проводили общепринятыми методами оценки дисперсии, стандартного отклонения и доверительного интервала варьирующих переменных, устанавливали количественные показатели связи зависимых переменных в виде коэффициентов корреляции или коэффициентов регрессионных уравнений. Для вычислений применяли компьютерную программу Microsoft Excel.

2.2. Результаты собственных исследований

2.2.1. Общая характеристика птицеводческого хозяйства. Основные зооветеринарные аспекты выращивания цыплят-бройлеров

ООО «ТПК «Балтптицепром» с полным технологическим циклом основана в 1982 году на территории Калининградской области. Валовое производство мяса птицы составляет более 19 тыс. тонн в год в убойном весе. Выход мяса и субпродуктов составляет 82%. Предприятие инкубирует более 14,5 млн. яйца в год. Поставщиками инкубационного яйца являются крупные предприятия Европы. Процент вывода составляет 80-83%. В цехе переработки в год выпускается более 3,0 тыс. тонн готовой продукции. Хозяйство специализируется на выращивании цыплят-бройлеров кросса «РОСС-308». На откорме ежедневно содержится около 1,3 млн. голов цыплят, что составляет более 13 млн. голов в год.

Цыплята-бройлеры содержатся в соответствии с рекомендациями по выращиванию кросса и утвержденной технологией. Для обеспечения эпизоотологического благополучия на птицефабрике разработан комплекс ветеринарно-санитарных, лечебно-профилактических и противоэпизоотических мероприятий, которые проводятся в соответствии с утвержденными планами, графиками выполнения работ. Цыплят иммунизируют против НБ, ИББ, ИБК с последующим контролем уровня поствакцинальных антител с использованием серологических методов исследований.

2.2.2. Причины возникновения болезни в птицеводческом хозяйстве. История течения болезни

Впервые клинические и патологоанатомические признаки ИАЦ в хозяйстве были отмечены в 2008 году на цыплятах, завезенных из Нидерландов компанией «Хаанстра», после ввоза инкубационного яйца из Испании компанией «Мигель Авикола», полученного от невакцинированного против ИАЦ родительского поголовья. Клиническая картина болезни была представлена снижением потребления корма, живой массы, анемией видимых слизистых оболочек, дерматитами и кровоизлияниями в области крыльев и брюшной стенки, увеличением падежа цыплят начиная с 21-суточного возраста. При патологоанатомическом вскрытии выявляли атрофию тимуса, увеличение печени, мраморность почек, атрофию фабрициевой сумки.

2.2.3. Клинические признаки ИАЦ у цыплят-бройлеров

Первоначально проявление клинических признаков отмечалось в 14-29-суточном возрасте. Больные цыплята были малоподвижны, плохо поедали корм. Отмечались отставание в росте и развитии, бледность гребешка, видимых слизистых оболочек, кожных покровов, дерматиты в области крыльев и брюшной стенки. Наблюдалось резкое расслоение цыплят в течение 2-3-суток. На неблагополучных по ИАЦ партиях наблюдалось снижение сохранности, которая в среднем составляла $89,5 \pm 3,9\%$. Средняя сохранность цыплят благополучных по ИАЦ партий была выше на 7,7% и составляла $97,2 \pm 0,5\%$.

В 2011-2014гг. повышение падежа цыплят-бройлеров с признаками ИАЦ отмечалось в возрасте 17-29 суток, т.е. наблюдался 1 пик смертности с резким увеличением падежа в течение 2-4 суток. В 2015-2016гг. динамика падежа цыплят-бройлеров изменилась, а именно стали выявлять 2 пика смертности – в возрасте 14-21 суток и в возрасте 26-36 суток. Первый пик смертности обусловлен трансвариальной передачей ВАЦ, второй – горизонтальной или полевым заражением. Динамика падежа цыплят представлена на рисунке 1.



Рисунок 1 - Сравнительная характеристика динамики падежа цыплят-бройлеров в неблагополучных и благополучных по ИАЦ корпусах

На рисунке 1 показано, что динамика падежа цыплят-бройлеров в неблагополучных по ИАЦ корпусах характеризуется 2-мя пиками смертности в возрасте 14-21 и 26-36 суток. Динамика падежа цыплят-бройлеров в благополучных по ИАЦ корпусах характеризуется низким уровнем смертности на протяжении всего периода выращивания.

2.2.4. Патологоанатомические изменения

Наиболее часто выявляли следующие патологоанатомические изменения: диффузные кровоизлияния в области крыльев, гангренозные дерматиты в области крыльев (синдром «синего крыла»), наличие подкожных инфильтратов в области брюшной стенки и нижних конечностей, цвет которых варьировал от соломенно-желтого до буро-зеленоватого, некроз кожи пальцев. У некоторых цыплят наблюдалось скопление в брюшной полости студневидного инфильтрата соломенно-желтого цвета, диффузные кровоизлияния в слизистой оболочке железистого желудка. У цыплят 3-5-суточного возраста иногда выявляли геморрагии в фабрициевой сумке. У цыплят раннего возраста также обнаруживали наличие серозно-слизистого экссудата молочно-белого цвета в бурсе, обесцвечивание или нарушение структуры костного мозга.

2.2.5. Серологическая диагностика ИАЦ

Были проведены исследования проб сыворотки крови цыплят из партий, полученных от невакцинированных и из партий, полученных от вакцинированных против ИАЦ родителей. Динамика формирования антител к ВАЦ у цыплят, полученных от невакцинированных (1 пик смертности) и вакцинированных родителей (2 пика смертности) представлена на рисунке 2.

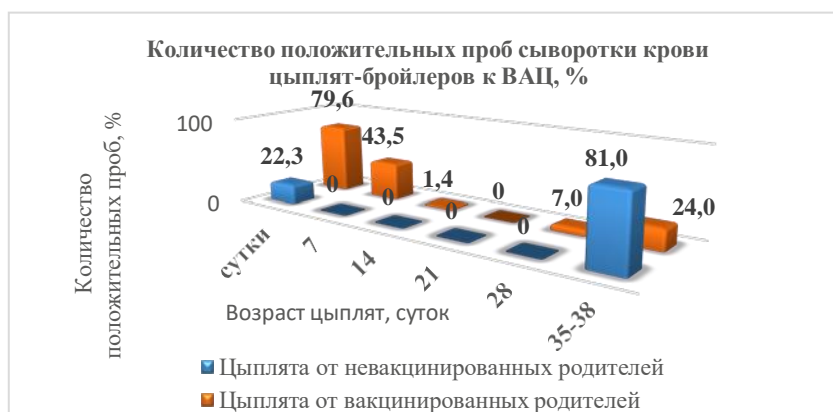


Рисунок 2 – Количество положительных проб сыворотки крови цыплят-бройлеров к ВАЦ, полученных от невакцинированных и вакцинированных родителей

На рисунке 2 видно, что количество положительных проб сыворотки крови цыплят, полученных от невакцинированных родителей, в суточном возрасте составляет 22,3%, в возрасте 35-38 суток - 81,0%. Количество положительных проб

сыворотки крови цыплят, полученных от вакцинированных родителей, в суточном возрасте составило 79,6%. Начиная с 28-суточного возраста количество положительных проб сыворотки крови увеличилось до 7,0%, а в 35-38-суточном возрасте составило 24,0%. Выявление антител в пробах сыворотки крови цыплят в условиях отсутствия вакцинации против ИАЦ в возрасте 28-38 суток свидетельствует о циркуляции ВАЦ на территории птицефабрики.

Нередко к моменту убоя (36-38 суток) антитела не успевают вырабатываться. Для выявления наличия титров антител к ВАЦ после переболевания было отобрано 25 условно больных голов цыплят с целью их передержки в течение 14 дней. Результаты исследований сыворотки крови цыплят после передержки представлены в таблице 1.

Таблица 1 - Результаты серологических исследований проб сыворотки крови цыплят-бройлеров после передержки (n=25)

Возраст, суток	Средний титр антител	Диапазон титров антител*	Коэффициент вариации, %	Количество положительных проб
38	1:209	1:34 - 1:1396	145	3
52	1:4369	1:882 – 1:7379	40	23

Примечание: *положительные значения титров антител 1:725 и выше

Данные таблицы 1 показывают, что отсутствие антител у цыплят-бройлеров в возрасте 38 суток (при убое) не является доказательством благополучия партии по ИАЦ. При наличии у птицы клинических, патологоанатомических признаков ИАЦ, признаков бактериальных инфекций (*E.coli*) следует предполагать, что цыплята находились в процессе переболевания и антитела к ВАЦ не успели сформироваться в период содержания.

2.2.6. Гематологические исследования крови цыплят-бройлеров

Для проведения гематологического исследования были отобраны пробы крови от цыплят 19-21-суточного возраста с клиническими признаками ИАЦ в период пика смертности и от цыплят, не имеющих клинических признаков ИАЦ.

Было установлено, что уровень гематокрита в пробах крови, полученных от цыплят с признаками ИАЦ на 4,0-8,6% ниже диагностического уровня (27%) и на

29,5-50,9% ниже, чем уровень гематокрита в пробах, полученных от цыплят без признаков ИАЦ. В пробах крови, полученных от цыплят с признаками ИАЦ, отмечалась лейкопения и тромбоцитопения.

2.2.7. Вирусологические исследования патологического материала

Для проведения вирусологических исследований были использованы 4-5-суточные СПФ-куриные эмбрионы. Эмбрионы заражали в желточный мешок суспензией из печени клинически больных цыплят в дозе 0,2 см³ и инкубировали в течение 14 суток при температуре 37°C. При вскрытии видимых поражений эмбрионов выявлено не было. В результате проведенных исследований методом ПЦР в образцах тканей эмбрионов и ХАО был выявлен ВАЦ.

У цыплят, выведенных из инфицированных эмбрионов, при патологоанатомическом вскрытии были выявлены анемия кожных покровов, слизистых оболочек, почек, печени, селезенки, наличие серозно-слизистого экссудата в бурсе, атрофия тимуса, обесцвечивание костного мозга.

2.2.8. Молекулярно-биологические исследования патологического материала

С целью определения штамма вируса и изучения структуры генома возбудителя ИАЦ, были исследованы 2 пробы пат. материала: проба № 1 – гомогенат печени, отобранной от бройлеров 22-суточного возраста из ООО «ТПК «Балтптицепром»; проба № 2 (сравнительный контроль) – гомогенат печени, отобранной от кур-несушек из ЗАО «Галичское по птицеводству».

Для проведения ПЦР и секвенирования был разработан набор специфических олигонуклеотидов на основании известных последовательностей генов, полученных из банков данных GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov). Олигонуклеотидные праймеры были синтезированы в ООО «Бигль».

Анализ продуктов амплификации проводили методом электрофореза с использованием раствора трисборатного буфера, концентрированного с бромидом этидия. В качестве положительного контроля использовали вакцинный штамм «Сух-1». Результаты анализа фрагментов ДНК методом электрофореза представлены на рисунке 3.

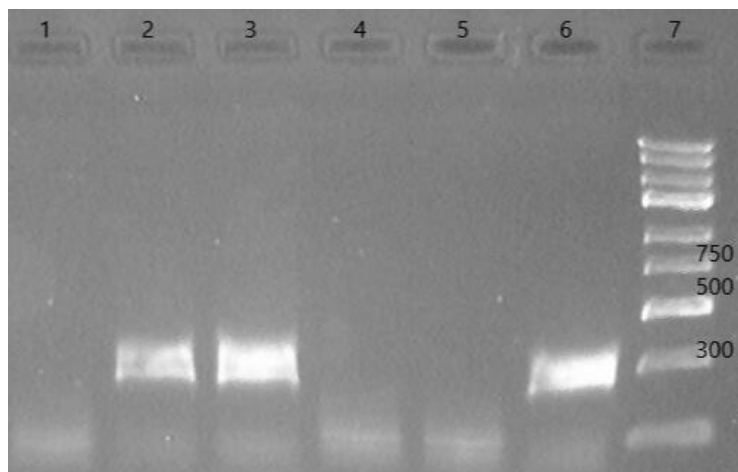


Рисунок 3 - Результаты электрофореза продуктов амплификации фрагмента генома вируса инфекционной анемии цыплят в патологическом материале: 1 - отрицательный контроль выделения; 2,3 - положительные пробы; 4,5 - отрицательные пробы; 6 - вакцинный штамм «Сух-1» ИАЦ; 7 - маркер молекулярной массы.

Секвенирование амплифицированных фрагментов генома проводили с использованием прямого и обратного праймеров, продукты секвенирования разделяли методом капиллярного электрофореза с детекцией сигнала флюоресценции. В результате сравнительного анализа полученных нуклеотидных последовательностей фрагментов гена VP1 с другими штаммами и изолятами вируса ИАЦ из базы данных PubMed было установлено, что последовательность фрагмента гена VP1 образца изолята вируса, выделенного от цыплят-бройлеров, имеет гомологию 96% с изолятом CAV/SLA12/13, а также имеет гомологию 89% с изолятом CN_BR-37 и штаммами JS-China 78, AN-China 34. При анализе последовательности фрагмента гена VP1 образца изолята, полученного от кур-несушек, была обнаружена гомология 96% с изолятом CN_BR-37 и штаммом JS-China 78 (GeneBank, www.ncbi.nlm.nih.gov).

2.2.9. Получение и очистка вируссодержащего материала

ВСМ готовили из печени вынужденно убитых цыплят 22-суточного возраста с клиническими признаками болезни или из печени свежих трупов цыплят с патологоанатомическими признаками ИАЦ. Кусочки печени гомогенизировали с добавлением фосфатно-солевого буфера (ФСБ) (рН 7,3-7,5) в соотношении 1:10. Суспензию после 3-5-кратного замораживания-оттаивания и внесения антибиотиков осветляли центрифугированием при 10 000g в течение 30 минут.

Надосадочную жидкость проверяли на стерильность посевом на питательные среды, затем супернатант помещали в морозильник и хранили при минус 70°С. Для получения очищенного вируса часть супернатанта подвергали ультрацентрифугированию при 80 000 g в течение 3 часов при 10° С, полученный осадок ресуспендировали в 1,0 см³ стерильного фосфатно-солевого буферного раствора (рН 7,3 – 7,5). Концентрацию вируса определяли методом количественной ПЦР и выражали в копиях (к) вирусных частиц в микролитре (к/мкл). ВСМ очищали методом гелехроматографии на макропористом стекле 700Å, обработанном поливинилпирролидоном.

Очищенный ВСМ повторно ультрацентрифугировали при 80 000 g в течение 3 часов при 10° С, полученный осадок ресуспендировали в 0,5 см³ стерильного ФСБ (рН 7,3 – 7,5) и в дальнейшем использовали для получения моноспецифической сыворотки и электронно-микроскопического исследования.

Моноспецифическую сыворотку получали с целью определения специфичности выделенного вируса. СПФ-цыплятам 15-суточного возраста внутрибрюшинно 1-кратно вводили ВСМ в объеме 0,2 см³. Через 21 день после введения ВСМ у цыплят отбирали сыворотку крови, которую исследовали в ИФА. Средний титр антител к вирусу ИАЦ в сыворотке крови составил 1:3451. В исследуемых пробах сыворотки крови антител к возбудителям ИББ, НБ, ИЛТ, ИБК, реовирусу и метапневмовирусу выявлено не было.

2.2.10. Электронно-микроскопическое исследование патологического материала проводили методом негативного контрастирования с использованием 2%-ного раствора фосфорно-вольфрамовой кислоты, нейтрализованного (до рН 7,0) гидроксидом натрия. При исследовании образца были обнаружены скопления вирусоподобных частиц сферической формы, размером 20,0-25,0±1,0 нм, по морфологическим характеристикам сходные с ВАЦ.

2.2.11. Постановка биопробы на СПФ-цыплятах

Для постановки биопробы использовали беспородных СПФ-цыплят суточного возраста. Цыплятам опытной группы инокулировали 10% вирусосодержащую суспензию, внутрибрюшинно в объеме 0,2 см³. Цыплятам

контрольной группы ВСМ не вводили. В ПЦР через 24 часа после инокуляции ВСМ было установлено наличие ВАЦ в крови цыплят опытной группы. На 10-12 сутки после инокуляции ВСМ у цыплят опытной группы были выявлены потеря аппетита, депрессия (малоподвижность, сонливость), бледность кожных покровов и видимых слизистых оболочек, отставание в росте. Патологоанатомические изменения (анемия, истощение, бледность кожных покровов, конъюнктивы, слизистой оболочки ротовой полости, выраженная гипоплазия и атрофия тимуса, обесцвечивание костного мозга) наблюдались у 100% экспериментально зараженных цыплят. У части цыплят выявляли подкожные и внутримышечные кровоизлияния в мышцах бедра, голени.

2.2.12. Влияние иммуносупрессии, обусловленной вирусом ИАЦ, на формирование поствакцинального иммунного ответа

2.2.12.1. Иммунный ответ после вакцинации цыплят против НБ

По результатам исследований в РЗГА, установлено, что после вакцинации количество иммунных к вирусу НБ цыплят из благополучных по ИАЦ птичников составляло от 82 до 86%, а из неблагополучных - от 28 до 68%. Средний титр антител в пробах сыворотки крови, полученных от цыплят из благополучных по ИАЦ птичников после применения живой вакцины, составил $4,4 \log_2$, а средний титр антител в пробах сыворотки крови, полученных от цыплят из неблагополучных птичников, был ниже на $2,3 \log_2$ и составил $2,1 \log_2$.

2.2.12.2. Иммунный ответ после вакцинации цыплят против ИББ

Результаты исследований проб сыворотки крови в ИФА на наличие поствакцинальных антител к вирусу ИББ представлены на рисунке 4.

Средние значения титров антител к вирусу ИББ в пробах сыворотки крови цыплят из птичников №№ 26, 27, 28, 59, 60 ($\mu=1:5837 \pm 1903$; min 1:5327 – max 1:7542) выше средних значений титров антител в пробах сыворотки крови цыплят из птичников №№ 54, 55, 61, 62, 63 ($\mu=1:1051 \pm 1629$; min 1:221 – max 1:2390, где μ – здесь и далее среднее значение) в среднем в 5,6 раза.



Рисунок 4 - Результаты исследований проб сыворотки крови цыплят-бройлеров на наличие антител к вирусу ИБВ в возрасте 37 суток

2.2.12.3. Иммунный ответ после вакцинации цыплят против ИБК

Результаты исследований проб сыворотки крови в ИФА на наличие поствакцинальных антител к вирусу ИБК представлены на рисунке 5.



Рисунок 5 - Результаты исследований проб сыворотки крови цыплят-бройлеров на наличие антител к вирусу ИБК в возрасте 37 суток

Средние значения титров антител на птичниках №№ 26, 27, 28, 59, 60 ($\mu=1:3605 \pm 1218$; min 1:3006 – max 1:4476) выше средних значений титров антител на птичниках №№ 54, 55, 61, 62, 63 ($\mu=1:1163 \pm 461$; min 1:853 – max 1:1461) в среднем в 3,1 раза.

2.2.13. Влияние ИАЦ на качество мясной продукции

При осмотре тушек цыплят выявляли следующие причины выбраковки, связанные с ИАЦ: венозную гиперемиию кожи в области крыльев, серозные и серозно-геморрагические отеки и кровоизлияния в подкожной клетчатке в области грудины, брюшной стенки, крыльев и нижних конечностей, наличие на мышцах наружных перимизий. Тушки с вышеперечисленными дефектами выбраковывали и

направляли в промышленную переработку. Тушки, имеющие признаки осложнения условно-патогенной микрофлорой, утилизировали.

2.2.14. Построение системы профилактики ИАЦ на птицефабрике

На основе результатов проведенных исследований на птицефабрике была разработана система профилактики ИАЦ, которая включала: проведение ветеринарно-санитарных мероприятий; соблюдение технологических параметров кормления и содержания; профилактику микотоксикозов; поставки инкубационного яйца/цыплят только от вакцинированных родителей; обеспечение благополучия цыплят по БМ и ИББ; использование антибактериальных средств при выявлении случаев бактериальных инфекций; использование, начиная с раннего возраста, пробиотических, пребиотических препаратов, фитобиотиков, подкислителей; для поддержания и развития иммунной системы - применение в первые 7-14 суток жизни цыпленка иммуностимуляторов. При разработке схемы специфической профилактики использовали принцип совмещения вакцинаций с целью увеличения интервалов между иммунизациями, уменьшения кратности обработок и, как следствие, снижения уровня стресса и нагрузки на иммунную систему цыпленка в раннем возрасте. Разработанная схема специфической профилактики применяется на птицефабрике с 2016 года по настоящее время.

3. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Изучены эпизоотологические особенности течения инфекционной анемии цыплят у цыплят-бройлеров, клинические и патологоанатомические признаки проявления болезни в птицеводческом хозяйстве промышленного типа. Установлено, что течение ИАЦ характеризуется иммунодепрессией, отставанием в росте и развитии, анемией, атрофией тимуса, аплазией костного мозга, наличием геморрагий и подкожных инфильтратов, гангренозным поражением крыльев и др., снижением качества мясной продукции, повышением смертности, а также возникновением вторичных инфекций.

2. Проведены серологические, гематологические, вирусологические, электронно-микроскопические и молекулярно-биологические исследования патологического материала. В результате исследований выделен изолят вируса

ИАЦ, который депонирован в Государственную коллекцию вирусов Института вирусологии им. Д.И. Ивановского ФГБУ «ФНИЦЭМ им Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России как патогенный штамм «МЕ-77», семейство *Circoviridae*, род *Gyrovirus* под регистрационным номером 2837. Установлено, что изоляты ВАЦ не имеют существенных генетических различий. Вирус ИАЦ при заражении КЭ не вызывает у них каких-либо видимых поражений, а у суточных СПФ-цыплят при заражении полевым изолятом ВАЦ наблюдается депрессия, отставание в росте, анемия и высокая смертность. Также установлено, что у цыплят с признаками ИАЦ наблюдается падение гематокрита на 4,0-8,6% по отношению к диагностическому уровню (27%) и на 29,5-50,9% по отношению к уровню гематокрита в пробах крови, полученных от цыплят без признаков ИАЦ.

3. Изучено влияние иммуносупрессии, обусловленной вирусом ИАЦ, на иммунный ответ у цыплят-бройлеров после вакцинации против НБ, ИББ и ИБК. Установлено, что вирус ИАЦ подавляет выработку антител к вакцинным вирусам НБ, ИББ, ИБК. Было выявлено снижение средних значений титров антител в сыворотках крови цыплят из неблагополучных по ИАЦ партий к вирусу НБ на 2,3 \log_2 , к вирусу ИББ в 5,6 раза, к вирусу ИБК в 3,1 раза по отношению к средним значениям титров антител в сыворотках крови цыплят из благополучных по ИАЦ партий.

4. Разработана система профилактики инфекционной анемии цыплят для промышленного птицеводческого хозяйства мясного направления, которая включает проведение ветеринарно-санитарных, лечебно-профилактических и противоэпизоотических мероприятий. Система предполагает соблюдение технологии содержания и кормления, профилактику стрессов, использование пробиотических препаратов, адсорбентов микотоксинов, фитобиотиков, иммуностимуляторов. Схема специфической профилактики построена на принципах совмещения вакцинаций с целью увеличения интервалов между вакцинациями, уменьшения кратности обработок, обеспечения эпизоотического благополучия по инфекционным болезням птиц, прежде всего по ИББ.

5. На основании проведенных исследований разработаны Методические положения «Диагностика и профилактика инфекционной анемии цыплят в птицеводческих хозяйствах промышленного типа» от 26.02.2021г.

4. ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ

Методические положения «Диагностика и профилактика инфекционной анемии цыплят в птицеводческих хозяйствах промышленного типа» от 26.02.2021г. рекомендованы для использования ветеринарными специалистами промышленных птицеводческих хозяйств и студентов ВУЗов ветеринарного и биологического профиля.

Разработанная система профилактики инфекционной анемии цыплят внедрена в промышленном птицеводческом предприятии ООО ТПК «Балтптицепром» и применяется при выращивании цыплят-бройлеров.

Материалы, изложенные в диссертационной работе, используются в учебном процессе высших учебных заведений ветеринарного направления и на курсах повышения квалификации ветеринарных врачей, работающих в промышленном птицеводстве.

5. ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

В связи с тем, что биологические свойства вируса инфекционной анемии цыплят не до конца изучены, в настоящее время в мире не удалось создать эффективных средств специфической профилактики болезни. Также не разработаны отечественные средства серологической диагностики ИАЦ.

Вирус ИАЦ имеет такие же особенности в структуре генома, как и ТТ вирусы, в связи с чем ВАЦ был выделен в отдельный род *Gyrovirus* и отнесен к семейству *Anelloviridae*. Капсид ВАЦ содержит белок апоптин, который специфически вызывает апоптоз в опухолевых клетках и процессы трансформации у человека. Установлено, что вирус ИАЦ обладает способностью инфицировать другие виды птиц, а также мышей, кошек, собак и человека.

Таким образом, изучение биологических свойств вируса ИАЦ, эпизоотологии и эпидемиологии болезни, разработка средств диагностики и

специфической профилактики являются актуальными и перспективными направлениями дальнейших исследований.

6. Список опубликованных работ по теме диссертации

Статьи в журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ:

1. Дмитриева, М.Е. Диагностика инфекционной анемии цыплят методом электронной микроскопии / М.Е. Дмитриева, М.А. Занько, **Е.В. Балендор** // Вопросы нормативно-правового регулирования в ветеринарии. – 2017. - № 4. – С. 30-32.

2. **Балендор, Е.В.** Эпизоотологические особенности и диагностика инфекционной анемии цыплят у цыплят-бройлеров / **Е.В. Балендор** // Вопросы нормативно-правового регулирования в ветеринарии. – 2020. - № 3. – С. 57-61.

Статьи, опубликованные в сборниках материалов конференций:

3. Dmitrieva, M. Immunosuppressive effect of the virus CAV to post-vaccination immune response / M. Dmitrieva, E. Djavadov, **E. Balendor** // International Congress WPSA «The Potential for Poultry Production in Developing Countries», 15-18 October 2015, Belek-Antalya-TURKEY. - P.154-156.

4. Дмитриева, М.Е. Инфекционная анемия цыплят и специфическая профилактика инфекционной бурсальной болезни / М.Е. Дмитриева, **Е.В. Балендор** // Эффективное животноводство. – 2016. – Тематический выпуск «Птицеводство», № 7. – С. 22-23.

5. Дмитриева, М.Е. Идентификация вируса инфекционной анемии цыплят методом электронной микроскопии / М.Е. Дмитриева, М.А. Занько, **Е.В. Балендор** // Материалы XII Международной научно-практической конференции «EurasiaScience», 15 декабря 2017, Москва. – Часть 1. - С. 5-6.

6. Дмитриева, М.Е. Биологические свойства вируса инфекционной анемии цыплят / М.Е. Дмитриева, М.А. Занько, **Е.В. Балендор** // Вестник научных конференций «Вопросы образования и науки» (Сборник научных трудов по материалам междунар. научн.-практич. конференции «Перспективы науки и образования», 30 декабря 2017, Тамбов). – № 12 (28). - Часть 1. - С. 54-57.

7. Дмитриева, М.Е. Вирус инфекционной анемии цыплят и иммунитет / М.Е. Дмитриева, М.А. Занько, **Е.В. Балендор** // Вестник научных конференций «Вопросы образования и науки» (Сборник научных трудов по материалам международной научно-практической конференции «Перспективы науки и образования», 30 декабря 2017, Тамбов). – № 12 (28). - Часть 1. - С. 57-59.

8. Дмитриева, М.Е. Молекулярно-биологическая диагностика инфекционной анемии цыплят / М.Е. Дмитриева, М.А. Занько, **Е.В. Балендор** // Достижения науки и образования. – 2018. - № 1(23). – С. 89-91.

9. Дмитриева, М.Е. Средства специфической профилактики инфекционной анемии цыплят / М.Е. Дмитриева, М.А. Занько, **Е.В. Балендор** // Сборник научных статей по материалам Международной научно-практической конференции «Проблемы и приоритеты развития науки в XXI веке», Смоленск, 30 декабря 2017г. – Часть 1. – 2018. – С.25-29.

10. Патент № 2646116 Российская Федерация, МПК C12N 7/00(2006.01), A61K 39/12(2006.01). Штамм вируса инфекционной анемии цыплят «МЕ-77» для производства инактивированных сорбированных и эмульгированных вакцин и диагностикумов : № 2016152775 : заявл. 30.12.2016 : опубл. 01.03.2018, Бюл. №7/ М.Е. Дмитриева, **Е.В. Балендор**. – 7 с.

11. Дмитриева М.Е. Биологические свойства возбудителя и эпизоотологические особенности инфекционной анемии цыплят / М.Е. Дмитриева, **Е.В. Балендор**, К.Ю. Дмитриев // Евразийский союз ученых (ЕСУ). – Том 2, серия: Биологические и сельскохозяйственные науки. – 2020. - № 10 (79). – С.46-55. - DOI: 10.31618/ESU.2413-9335.2020.2.79.