

ЕЛЬНИКОВА Елена Владимировна



003054487

**ИММУНОБИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ПОЛЕВЫХ
ИЗОЛЯТОВ АДЕНОВИРУСОВ КУР, ВЫДЕЛЕННЫХ НА ТЕРРИТОРИИ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

16.00.03. "Ветеринарная микробиология,
вирусология, эпизоотология, микология
с микотоксикологией и иммунология"

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата ветеринарных наук

Работа выполнена в Федеральном государственном учреждении
«Федеральный центр охраны здоровья животных», г. Владимир.

Научный руководитель кандидат ветеринарных наук,
старший научный сотрудник
БОРИСОВ Владимир Владимирович

Официальные оппоненты: доктор ветеринарных наук, профессор
Андрей Иванович Дудников
(ФГУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир);
доктор биологических наук, профессор
Наталья Васильевна Фомина
(МГАВМиБ, г. Москва).

Ведущая организация: ФГУ «Всероссийский государственный Центр
качества и стандартизации лекарственных средств
для животных и кормов» (ФГУ «ВГНКИ», г. Москва).

Защита состоится «23» января 2007 года в 10 часов на заседании
диссертационного совета Д 220.015.01 при ФГУ «Федеральный центр охраны
здоровья животных» по адресу: 600901, г. Владимир, мрн Юрьевец, ФГУ
«Федеральный центр охраны здоровья животных».

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГУ «Федеральный центр
охраны здоровья животных»

Автореферат разослан «22» декабря 2006 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат биологических наук,
старший научный сотрудник



Г.М. Семенова

1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Аденовирусы кур - многочисленная, но сравнительно мало изученная группа вирусов. Сообщения об их выделении поступают из многих стран всех континентов. В настоящее время представители этой группы вирусов объединены в 12 серологических вариантов (FAV 1-12) (R.L. Reese et al., 1986). Патогенность и этиологическая роль многих серотипов аденовирусов кур ещё не выяснена окончательно, однако известно, что отдельные серотипы являются возбудителями таких остропротекающих инфекционных болезней, как СЕЛО-инфекция, гепатит с тельцами-включениями (ГТВ) и синдром гидроперикардита кур (СГПК) (В.А. Бакулин и соавт., 1998; Н.В. Фомина, 1995).

СЕЛО-инфекция характеризуется гибелью развивающихся эмбрионов кур во время инкубации и цыплят в первые дни жизни. Заболевание вызывают аденовирусы кур серотипа FAV 1 (V.J. Yates et al., 1957).

Гепатит с тельцами-включениями – инфекционное заболевание молодняка кур, характеризующееся поражением печени, почек и высокой смертностью до 30% и более. Возбудителем ГТВ в естественных условиях чаще являются аденовирусы серотипов FAV 5 и FAV 8 (B.S. Vains et al., 1977; A.F. Green et al., 1976; B. Hussain et al., 1981; R.J.H. Wells et al., 1977).

Синдром гидроперикардита кур - вирусное заболевание кур всех возрастов, которое характеризуется скоплением жидкости соломенного цвета в околосердечной сумке, отёком лёгких, поражениями печени и почек, а в некоторых случаях анемией и гангренозным дерматитом и высокой летальностью среди молодняка кур (70-80%) (M.S. Jaffery et al., 1988).

С начала 90-х годов вспышки СГПК с высоким уровнем смертности (30-80%) регистрируются на территории Российской Федерации. Согласно данным сотрудников ФГУ «ВНИИЗЖ», поражения цыплят синдромом гидроперикардита преобладают в регионах Урала и Сибири, а также зарегистрировано несколько вспышек заболевания в птицеводствах Северного Кавказа, в республиках Карелия, Марий Эл, Кабардино-Балкария и Ингушетия (В.В. Борисов и соавт., 2003).

Ведущее место в борьбе с аденовирусной инфекцией птиц занимает вакцинопрофилактика (M. Afzal et al., 1990; I. Ahmad et al., 1991; V. Borisov et al., 2005; R. Kumar et al., 1997). Однако проводить специфическую профилактику

аденовирусной инфекции птиц очень трудно потому, что даже при моноинфекции возможно выделение нескольких различных серотипов аденовирусов, которые способны осложнять патологический процесс (R.W. Winterfield et al., 1977; J.B. McFerran, 1991). Поэтому перед проведением специфической профилактики необходимо установить, аденовирусы каких именно серотипов FAV, циркулирующих в хозяйстве, являются возбудителями инфекции.

В связи с этим изучение иммунобиологических свойств полевых изолятов аденовирусов птиц I группы, выделенных на территории РФ, является актуальным, так как дает возможность совершенствовать диагностику и дифференциацию различных серотипов, селекционировать производственные штаммы и создавать эффективные вакцины для специфической профилактики аденовирусной инфекции птиц.

Цель и задачи исследований. Основная цель данных исследований заключалась в изучении иммунобиологических свойств полевых изолятов аденовирусов птиц I группы, циркулирующих на территории РФ, и выборе изолята для депонирования в качестве производственного штамма при изготовлении инактивированной эмульгированной культуральной вакцины против аденовирусной инфекции птиц. Для достижения этих целей необходимо было решить следующие задачи:

- отработать метод получения первичной культуры клеток печени и почек эмбрионов кур;
- разработать методику выделения и культивирования полевых изолятов аденовирусов кур;
- изучить культуральные свойства полевых изолятов аденовирусов кур, циркулирующих на территории РФ;
- изучить патогенные свойства полученных изолятов аденовирусов кур для эмбрионов СПФ-кур, СПФ-цыплят и коммерческих цыплят;
- изучить стабильность инфекционных и антигенных свойств полученных изолятов аденовирусов кур при хранении;
- изготовить лабораторные образцы вакцин из изолятов, относящихся к различным серотипам аденовирусов кур, и изучить их антигенные свойства;
- изучить перекрёстную защиту между изолятами, относящимися к различным серотипам аденовирусов кур;

- обосновать выбор изолята для депонирования в качестве производственного штамма при изготовлении инактивированной культуральной вакцины против аденовирусной инфекции птиц;

- изучить иммунобиологические и физические свойства экспериментальных образцов инактивированной культуральной вакцины против аденовирусной инфекции птиц в лабораторных условиях.

Научная новизна. Научная новизна работы состоит в том, что в результате проведённых исследований:

- впервые выделены и адаптированы к первичной культуре клеток печени эмбрионов кур шесть полевых изолятов аденовирусов птиц I группы, относящихся к серотипам FAV 1, FAV 2, FAV 4, FAV 6 и циркулирующих на территории РФ;

- изучены иммунобиологические свойства полученных изолятов аденовирусов птиц I группы;

- изучена перекрёстная защита между изолятами, относящимися к серотипам FAV 1, FAV 2, FAV 4 и FAV 6 аденовирусов кур;

- обоснован выбор изолята «ПА-01» для депонирования в качестве производственного штамма при изготовлении инактивированной эмульгированной культуральной вакцины против СГПК;

- изготовлены экспериментальные образцы вакцины против СГПК инактивированной эмульгированной из культурального вируса «ПА-01» и изучены их иммунобиологические и физические свойства в лабораторных условиях.

Практическая значимость работы. В результате проведенных исследований разработаны, одобрены ученым советом, утверждены директором ФГУ «Федеральный центр охраны здоровья животных» и рекомендованы для использования в практике следующие методики:

- «Методика получения первично-трипсинизированных культур клеток печени и почек куриного эмбриона и использования их для выделения и титрования аденовирусов птиц» (2001 г.);

- «Методические указания по выделению, титрованию и идентификации аденовирусов птиц I группы» (2002 г.);

- «Методические указания по выявлению антигена аденовируса птиц 2 серотипа в непрямом жидкофазном блокирующем варианте ИФА» (2005 г.);

- «Методические указания по выявлению антигена аденовируса 1 серотипа в непрямом жидкофазном блокирующем варианте ИФА» (2005 г.).

С использованием данных методик выделены, адаптированы к первичной культуре клеток печени эмбрионов кур и охарактеризованы шесть полевых изолятов аденовирусов птиц I группы, циркулирующих на территории РФ: «Башкирский», «Равис-Сосновский», «ПА-01», «Тбилисский», «Кировоградский» и «ВД-20».

Штамм «ПА-01» депонирован во Всероссийской государственной коллекции культур микроорганизмов ФГУ «Всероссийский государственный Центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов» в качестве основного компонента инактивированной культуральной вакцины против СГПК и для получения специфического антигена при комплектовании диагностических иммуоферментных наборов (ноябрь 2006 г.).

Результаты научных исследований по изучению иммунобиологических свойств изолятов аденовирусов кур и испытанию опытных образцов вакцины против СГПК рекомендовано использовать при составлении НД на инактивированную культуральную вакцину против СГПК.

Основные положения, выносимые на защиту:

- оптимальные условия выделения и культивирования полевых изолятов аденовирусов птиц I группы;
- культуральные свойства полевых изолятов аденовирусов птиц I группы;
- патогенные свойства полевых изолятов аденовирусов птиц I группы;
- стабильность инфекционных и антигенных свойств изолятов аденовирусов кур при хранении;
- антигенные свойства изолятов аденовирусов кур в составе инактивированных вакцин;
- перекрестная защита между изолятами различных серотипов аденовирусов птиц I группы;
- обоснование выбора изолята «ПА-01» для депонирования в качестве производственного штамма при изготовлении инактивированной эмульгированной культуральной вакцины против аденовирусной инфекции птиц;

- результаты комиссионных испытаний экспериментальных образцов вакцины против синдрома гидроперикардита кур инактивированной эмульгированной из культурального вируса «ПА-01».

Апробация работы. Основные материалы диссертации были доложены и опубликованы в материалах Международной научной конференции молодых ученых «Проблемы мониторинга и генодиагностики инфекционных болезней животных», г. Владимир (2004), на 1-ом Международном ветеринарном конгрессе по птицеводству, г. Москва (2005), и на заседаниях учёного совета ФГУ «Федеральный центр охраны здоровья животных» в 2003 – 2005 гг.

Публикации научных исследований. По материалам диссертации опубликовано 9 научных работ.

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 159 листах компьютерного текста и включает следующие разделы: введение, обзор литературы, собственные исследования, результаты собственных исследований, обсуждение результатов, выводы, практические предложения и приложения. Список литературы включает 232 источника, в том числе 33 работы на русском языке. Работа иллюстрирована 20 таблицами и 13 рисунками.

2. СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Материалы и методы

Вирусный материал. В исследованиях использовали изоляты аденовирусов кур, выделенные сотрудниками ФГУ «ВНИИЗЖ» из патологического материала в течение 2000-2003 гг.: «Башкирский», «Равис-Сосновский», «ПА-01», «Кировоградский», «Тбилисский» и «ВД-20», а также производственный штамм вируса СГПК «КР 95» и референтные штаммы FAV (1-12) аденовирусов птиц I группы фирмы «Spafas» (США).

Культура клеток. В работе использовали первичную культуру клеток печени 15-суточных эмбрионов СПФ-кур фирмы «Lohman Tierzucht» (Германия).

Подопытные животные. Экспериментальную работу проводили на клинически здоровых цыплятах кросса «Хайсекс коричневый», неиммунных к аденовирусам птиц I группы, полученных из хозяйств, благополучных по острым инфекционным заболеваниям, а также на СПФ-цыплятах 1-5-суточного возраста.

Определение инфекционной активности вируса. Инфекционную активность вируса в исследуемом материале определяли титрованием на первичной культуре клеток печени эмбрионов кур с использованием 48-луночных пластиковых планшетов для культивирования клеток фирмы «Corning» (Германия). Расчет титра проводили по методу Кербера и выражали в $\text{IgTCID}_{50}/\text{см}^3$.

Определение морфологического соответствия видовой принадлежности вируса. Морфологию выделенных изолятов изучали электронномикроскопическим методом после негативного контрастирования с использованием 4% раствора фосфорно-вольфрамовой кислоты (ФВК), pH 6,8. Анализ препаратов проводили под электронным микроскопом JEM-100B (Япония) при инструментальном увеличении в 150000 раз. Исследования проводили совместно с д.б.н. А. П. Пономарёвым.

Молекулярно-биологические и серологические исследования. Для идентификации вируса, выделенного из патологического материала, использовали ПЦР и секвенирование амплифицированных фрагментов консервативной области гена гексона (В.А. Лобанов и соавт., 2000). Наличие специфических антител в сыворотках крови к серотипам FAV 1, FAV 2, FAV 4, FAV 6 аденовирусов птиц I группы определяли в непрямом варианте ИФА с использованием диагностических наборов производства ФГУ «ВНИИЗЖ». Определение активности и специфичности антигенов аденовирусов птиц I группы проводили в непрямом жидкофазном блокирующем варианте ИФА с набором гипериммунных сывороток кур, кролика или морской свинки к серотипам FAV 1, FAV 2, FAV 4, FAV 6 аденовирусов птиц I группы по методикам, утвержденным директором ФГУ «ВНИИЗЖ» (М.А. Волкова и соавт. 2001-2005 гг.).

Реакцию нейтрализации проводили микрометодом на первичной культуре клеток печени ЭК по стандартной методике с разведением вируса и постоянной дозой сыворотки. Для постановки реакции использовали гипериммунные сыворотки кроликов, полученные на каждый из изучаемых изолятов. Индекс нейтрализации (ИН) рассчитывали по формуле 1:

$$\text{ИН} = T_{\text{AS+SN}} / T_{\text{AS+SS}}, \text{ где} \quad (1)$$

$T_{\text{AS+SN}}$ – титр вируса в присутствии нормальной сыворотки,

$T_{\text{AS+SS}}$ - титр вируса в присутствии специфической сыворотки.

Данные этапы работы были выполнены совместно с сотрудниками лаборатории диагностики болезней птиц ФГУ «ВНИИЗЖ», за что им выражаем искреннюю благодарность.

Инактивация аденовируса. Инактивацию вирусной суспензии проводили 1,2-аминоэтилазиридином. В подогретую до 35 °С вирусную суспензию вносили 1,2-аминоэтилазиридином до конечной концентрации 0,3% и выдерживали при температуре 37 °С в течение 24 часов (Д.С. Сурнев, 2000).

Изготовление вакцин. Для приготовления опытных образцов инактивированной эмульгированной вакцины против аденовирусной инфекции птиц использовали очищенную культуральную вирусосодержащую суспензию, а также масляный адъювант - Монтанид ИЗА 70 фирмы «Сеппик» (Франция). Вакцину с типом эмульсии вода-масло составляли в соотношении 30 частей антигена и 70 частей адъюванта (по весу). Эмульгирование проводили на лабораторном эмульсоре «Сильверсон» (Англия) в течение 6 мин при 6000 об/мин.

Изучение иммунобиологических свойств экспериментальной вакцины.

Проверку вакцины на стерильность проводили в соответствии с ГОСТом 28085-89 «Препараты биологические. Методы бактериологического контроля стерильности».

Полноту инактивации вируса и безвредность вакцины определяли методом введения средней пробы вакцины цыплятам. В течение 21 суток все цыплята должны оставаться живыми, без клинических признаков заболевания. При вскрытии вынужденно убитой птицы на месте введения вакцины не должно быть морфологических изменений в виде воспаления, очагов некроза и гранулём.

Антигенную активность вакцины оценивали по уровню прироста антител в сыворотках крови вакцинированных против СГПК птиц через 28 суток после иммунизации. Антитела к аденовирусу кур серотипа FAV 4 определяли в соответствии с наставлением по применению диагностического набора (производства ФГУ «ВНИИЗЖ») для выявления антител к аденовирусу птиц 4 серотипа I группы иммуноферментным методом.

Иммуногенная активность вакцины была оценена по результатам контрольного заражения птиц, привитых вакциной против синдрома гидроперикардита кур инактивированной эмульгированной из культурального

вируса через 28 суток после вакцинации вирулентным штаммом «КР 95» методом внутримышечной инъекции в область голени.

Статистическая обработка результатов. При анализе и обобщении результатов исследований использовали методы, описанные в руководстве по биометрии И.П. Ашмарина и А.А. Воробьева (1962 г.), а также компьютерную программу Statistica: Basic Statistic and Tables.

3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Подбор оптимальных условий выделения и культивирования полевых изолятов аденовирусов птиц. По данным литературы (Р.Н. Коровин и соавт., 1990; Р.В. Фомина, 1995; С.Н. Burke et al., 1965), для выделения и адаптации полевых изолятов аденовирусов птиц I группы предлагается использовать клеточные культуры, наиболее продуктивной и чувствительной из которых является первичная культура клеток печени эмбрионов СПФ-кур. В связи с этим на первом этапе исследований необходимо было отработать оптимальные условия выделения, адаптации и культивирования аденовирусов кур в первичной культуре клеток печени ЭК. Было изучено влияние на репродукцию референтных штаммов FAV аденовирусов кур таких параметров, как вид поддерживающей среды, рН поддерживающей среды, посевная концентрация клеток, множественность заражения и время культивирования вируса.

В результате проведенных исследований были получены следующие результаты:

- для культивирования аденовирусов птиц I группы в качестве поддерживающей среды можно использовать среду 199 или ПСП с 2% фетальной сыворотки теленка и с рН 7,6-7,8;

- наиболее оптимальная посевная концентрация клеток для репродукции аденовирусов птиц I группы 800-900 тыс./см³, а оптимальная доза заражения 0,1 ТЦД₅₀/кл.

- оптимальный срок культивирования аденовирусов птиц I группы 72-96 часов.

С использованием данных параметров выделены, адаптированы к первичной культуре клеток печени ЭК и охарактеризованы шесть полевых изолятов аденовирусов птиц I группы, циркулирующих на территории РФ.

Культуральные свойства полевых изолятов аденовирусов птиц I группы. Матрасы с хорошо сформированным монослоем клеток инфицировали 10% очищенной вирусосодержащей суспензией печени, полученной от птиц, павших с признаками аденовирусной инфекции, в объёме 0,2 см³. Размножение вируса в культуре клеток определяли по характерному для аденовирусов птиц цитопатическому действию, проявляющемуся в виде дегенерации монослоя (75-80%), округления, увеличения и склеивания клеток. Для освобождения вируса из клеток вирусосодержащую культуральную жидкость подвергали многократному замораживанию-оттаиванию (2-3 раза). В случае отсутствия цитопатических изменений при выделении вируса из патологического материала проводили 2-3 «слепых» пассажа. Активность выделенных изолятов определяли методом титрования на культуре клеток печени ЭК.

Культуральные свойства выделенных изолятов изучали в сравнении с референтными штаммами аденовирусов кур аналогичных серотипов FAV 1, FAV 2, FAV 4 и FAV 6.

Культуральные свойства выделенных изолятов представлены в таблице 1.

Таблица 1

Свойства полевых изолятов аденовирусов птиц I группы при культивировании в культуре клеток печени ЭК

(n = 3)

Пассаж вируса	Титр вируса, lgТЦД ₅₀ /см ³					
	«Башкирский»	«ПА-01»	«Кировоградский»	«Тбилисский»	«Равис-Сосновский»	«ВД-20»
1	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-
3	-	2,33±0,18	2,12±0,22	2,15±0,22	-	3,32±0,14
4	3,03±0,14	3,61±0,22	3,04±0,28	3,62±0,22	2,30±0,08	4,13±0,22
5	4,52±0,28	6,55±0,70	6,12±0,14	5,61±0,32	4,02±0,22	6,15±0,14
6	6,63±0,52	8,52±0,13	7,53±0,43	7,25±0,41	6,14±0,16	6,75±0,22
7	6,61±0,31	9,00±0,38	8,51±0,13	8,74±0,31	5,90±0,22	8,62±0,36
8	6,04±0,16	8,75±0,31	8,08±0,31	7,81±0,08	4,51±0,28	7,53±0,43
9	5,80±0,08	9,02±0,25	7,90±0,08	8,63±0,36	3,58±0,31	7,25±0,43
10	6,02±0,14	9,33±0,25	8,72±0,31	8,54±0,13	3,03±0,28	6,81±0,32

Примечание: «-» слепой пассаж

Из данных, представленных в табл. 1, видно, что все изоляты аденовирусов адаптировались к первичной культуре клеток печени ЭК за 2-3 пассажа и к 6-7

пассажу достигали максимальных титров. Однако изоляты «Башкирский», «ПА-01», «Кировоградский» и «Тбилисский» стабильно сохраняли свойственный им уровень репродуктивной активности в течение 10 пассажей, тогда как активность изолятов «ВД-20» и «Равис-Сосновский» после 7 пассажа при дальнейшем пассировании снижалась от 2 до 3 lg.

Референтные штаммы ранее были адаптированы к культуре клеток, поэтому все они репродуцировались в первичной культуре клеток печени ЭК с первого пассажа, достигая максимальных титров к 6 пассажу и сохраняя свойственный им уровень репродуктивной активности при дальнейшем пассировании.

Оценка морфологического соответствия и видовой принадлежности выделенных изолятов. Очищенную и концентрированную культуральную жидкость, содержащую один из выделенных изолятов, исследовали под электронным микроскопом JEM-100B (Япония). При инструментальном увеличении в 150000 раз в поле зрения микроскопа наблюдали хорошо различимые вирусные частицы, которые состояли из сферического нуклеокапсида с икосаэдрической симметрией без суперкапсидной оболочки. Диаметр нуклеокапсида имел размер 60 - 75 нм. Структура этих частиц оказалась аналогична структуре вирионов аденовирусов птиц I группы.

Видовая принадлежность выделенных изолятов аденовируса была подтверждена с помощью ПЦР и секвенирования амплифицированных участков гена гексона. В результате сравнения нуклеотидной последовательности амплифицированных фрагментов гена гексона выделенных изолятов с последовательностями аналогичной области гена гексона двенадцати референтных штаммов аденовирусов птиц I группы «Spafas» (США) установили, что изолят «Башкирский» наиболее генетически близок к референтному штамму серотипа FAV 1; изоляты «ПА-01», «Тбилисский» и «Кировоградский» – к штамму серотипа FAV 4; изолят «Равис-Сосновский» - к штамму серотипа FAV 2, а изолят «ВД-20» – к штамму серотипа FAV 6.

Контроль выделенных изолятов аденовирусов птиц I группы на наличие контаминации. После каждой расплодки выделенных изолятов в первичной культуре клеток печени ЭК производили их контроль на отсутствие чужеродных вирусов, бактериальной, грибковой и микоплазменной контаминации. В результате установлено, что препараты изолятов «Башкирский», «Равис-

Сосновский», «ПА-01», «Кировоградский», «Тбилисский» и «ВД-20» не контаминированы вирусами ньюкаслской болезни птиц, инфекционного бронхита кур, инфекционной бурсальной болезни птиц, инфекционного ларинготрахеита, инфекционного энцефаломиеелита птиц, лейкоза птиц, вируса гриппа А, пневмовирусом птиц, вирусом Болезни Марека, микоплазмами синовия и галлисептикум, а также бактериальной микрофлорой.

Патогенные свойства полевых изолятов аденовирусов птиц I группы. Целью наших дальнейших исследований было изучение патогенных свойств полученных изолятов аденовирусов кур в отношении эмбрионов СПФ-кур, СПФ-цыплят и коммерческих цыплят.

Патогенность для эмбрионов СПФ-кур. В опыте использовали 70 эмбрионов СПФ-кур 5-суточной инкубации и 70 эмбрионов после 10 суток инкубации, которые разделили на 12 опытных и две контрольных группы по 10 эмбрионов в каждой. Эмбрионы каждой опытной группы заражали одним из выделенных изолятов аденовируса кур двумя способами (в аллантаисную полость и в желточный мешок) в объёме $0,2 \text{ см}^3$ с титром инфекционной активности $4,5 \pm 0,1 \text{ IgTCID}_{50}/\text{см}^3$.

Проведенные исследования показали, что заражение СПФ-эмбрионов в аллантаисную полость изолятами «ПА-01», «Тбилисский», «Кировоградский» и «Равис-Сосновский» в течение трех последовательных пассажей привело к отсутствию накопления этих вирусов в аллантаисной жидкости. Изоляты «Башкирский» и «ВД-20» не вызывали видимых изменений у эмбрионов, но накапливались в аллантаисной жидкости в титрах, которые составили в Б-ИФА 1:1024 и 1:32, соответственно.

Однако все изучаемые изоляты хорошо репродуцировались в органах СПФ-эмбрионов (печень, почки, селезёнка) при заражении в желточный мешок, вызывая поражения внутренних органов и гибель эмбрионов от 80 до 100%. Полученные результаты представлены в таблице 2.

Действие аденовирусной инфекции проявлялось отставанием в росте и кровоизлияниями под кожей. У всех павших эмбрионов печень была увеличена, гиперемирована и имела мозаичный рисунок, почки увеличены в размере, светлокоричневого цвета. У эмбрионов, зараженных изолятами «ПА-01», «Тбилисский», «Кировоградский», были отмечены поражения сердца (гидроперикардит).

Таблица 2

Патологоанатомические изменения СПФ-эмбрионов кур при инфицировании в желточный мешок изолятами аденовирусов птиц I группы

Изолят	Патологоанатомические изменения					Гибель
	Отставание в росте	Кровоизлияния	Гидроперикардит	Гепатит	Нефрит	
«Башкирский»	10/10*	7/10	0/10	10/10	10/10	10/10
«Равис-Сосновский»	8/10	8/10	0/10	8/10	8/10	8/10
«ПА-01»	10/10	10/10	3/10	10/10	10/10	10/10
«Тбилисский»	10/10	10/10	2/10	10/10	10/10	10/10
«Кировоградский»	9/10	9/10	3/10	9/10	9/10	9/10
«ВД-20»	9/10	9/10	0/10	9/10	9/10	9/10
Контрольная группа	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10

Примечание: «*» знаменатель - количество исследованных КЭ, числитель - КЭ с патологией.

Патогенность для СПФ-цыплят. Для изучения патогенных свойств полученных изолятов было проведено три последовательных пассажа на СПФ-цыплятах. СПФ-цыплят 3-суточного возраста инфицировали внутримышечно в область бедра в объеме 0,2 см³ одним из полученных изолятов аденовирусов кур с титром инфекционной активности 4,5±0,1 lg ТЦД₅₀/см³. За птицей вели наблюдение в течение 10 суток. Все изучаемые изоляты аденовирусов кур имели различную степень патогенности. Результаты опыта представлены в таблице 3.

В группе цыплят, зараженных изолятом «Башкирский», через 72 часа после инфицирования отмечали снижение аппетита, затруднённое дыхание, птица сидела скудно, нахохлившись. После переболевания, на 7 сутки, состояние цыплят улучшалось. При вскрытии вынуждено убитых птиц видимых патологических изменений не выявлено, однако при дальнейшем исследовании гомогенатов органов аденовирус кур серотипа FAV 1 был выделен из кишечника всех инфицированных цыплят, титр которого в Б-ИФА составил 1:1024. Дальнейшее пассирование изолята «Башкирский» на СПФ-цыплятах не привело к усилению его патогенных свойств.

В группах цыплят, инфицированных изолятами «Равис-Сосновский» и «ВД-20», наблюдали отказ от корма, снижение подвижности, взъерошенность перьевого покрова, выделение жидких каловых масс и гибель 80%, 90%,

соответственно. При патологоанатомическом вскрытии павших цыплят каждой группы наблюдали увеличение печени, которая была дряблой консистенции с точечными кровоизлияниями. Почки также были увеличены и гиперемированы, темно-коричневого цвета. У цыплят, зараженных изолятом «ВД-20», каналцы почек и мочеточники были заполнены уратами. В сердце видимых изменений не отмечено.

Таблица 3

Клинические признаки и патологоанатомические изменения в органах СПФ-цыплят, инфицированных изолятами аденовирусов птиц I группы

Изолят	Пас саж	Клинические признаки		Патологоанатомические изменения			Гибель
		Общее угнетение	Отставание в росте	Гидроперикардит	Гепатит	Нефрит	
«Башкирский»	1	10/10*	10/10	0/10	0/10	0/10	0/10
	2	10/10	10/10	0/10	0/10	0/10	0/10
	3	10/10	10/10	0/10	0/10	0/10	0/10
«Равис-Сосновский»	1	10/10	2/10	0/10	8/10	8/10	8/10
	2	10/10	9/10	0/10	1/10	1/10	1/10
	3	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
«ВД-20»	1	10/10	1/10	0/10	9/10	9/10	9/10
	2	10/10	7/10	0/10	3/10	3/10	3/10
	3	10/10	8/10	0/10	2/10	2/10	2/10
«ПА-01»	1	10/10	1/10	5/10	9/10	9/10	9/10
	2	0/10	0/10	7/10	10/10	10/10	10/10
	3	0/10	0/10	8/10	10/10	10/10	10/10
«Тбилисский»	1	10/10	2/10	4/10	8/10	8/10	8/10
	2	0/10	1/10	6/10	9/10	9/10	9/10
	3	0/10	0/10	6/10	10/10	10/10	10/10
«Кировоградский»	1	10/10	1/10	6/10	9/10	9/10	9/10
	2	0/10	0/10	6/10	10/10	10/10	10/10
	3	0/10	0/10	7/10	10/10	10/10	10/10
Контрольная группа	-	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10

Примечание: «*» знаменатель – количество исследованных СПФ-цыплят, числитель – СПФ-цыплята с клиническими признаками или с патологией

Наиболее вирулентными в отношении СПФ-цыплят оказались изоляты, относящиеся к серотипу FAV 4. Так, каждый последующий пассаж изолятов «ПА-01», «Тбилисский» и «Кировоградский» на СПФ-цыплятах приводил к повышению их вирулентности и смертности птиц до 100%. Аденовирусная инфекция

проявлялась в виде внезапного падежа цыплят в течение 5 суток после заражения. При патологоанатомическом вскрытии павших цыплят из каждой группы было отмечено, что печень увеличена в объеме, неравномерно окрашена с участками светло-жёлтого цвета и кровоизлияниями, у 50% трупов сердце было деформировано, сердечная сорочка увеличена и содержала прозрачную жидкость соломенно-жёлтого цвета вязкой консистенции. Почки увеличены, желто-коричневого цвета.

Патогенность для коммерческих цыплят. Патогенные свойства полученных изолятов изучали на 10-суточных цыплятах кросса «Хайсекс коричневый», не имеющих антител к аденовирусам кур серотипов FAV 1, FAV 2, FAV 4 и FAV 6. В опыте использовали 70 цыплят, которых разделили на 1 контрольную и 6 опытных групп, по 10 птиц в каждой. Цыплят каждой опытной группы инфицировали внутримышечно в область бедра в объеме $0,2 \text{ см}^3$ одним из выделенных изолятов аденовируса кур с титром инфекционной активности $4,5 \pm 0,1 \text{ лгТЦД}_{50}/\text{см}^3$. За птицей вели наблюдение в течение 10 суток.

Инфицирование коммерческих цыплят изолятами «ПА-01», «Тбилисский» и «Кировоградский» через 48 часов после заражения привело к проявлению клинических признаков аденовирусной инфекции и смертности от 70 до 100%. При патологоанатомическом вскрытии павших цыплят каждой группы был отмечен гепатит, нефрит, а также в 30% случаев - гидроперикардит.

В группах коммерческих цыплят, инфицированных изолятами «Башкирский», «Равис-Сосновский» и «ВД-20», клинических проявлений аденовирусной инфекции не наблюдали в течение 14 суток (срок наблюдения), птица была подвижной, охотно поедала корм.

Стабильность инфекционных и антигенных свойств изолятов аденовирусов птиц I группы при хранении. Стабильность инфекционных и антигенных свойств полученных изолятов оценивали в процессе хранения во временном интервале. До начала хранения и в различные сроки после хранения во всех образцах определяли инфекционную активность вируса титрованием на первичной культуре клеток печени ЭК и антигенную активность в непрямом жидкофазном блокирующем варианте ИФА. Результаты опытов представлены в таблице 4.

Таблица 4

**Инфекционная и антигенная активность изолятов аденовирусов птиц
I группы после хранения**

(n=3)

Изолят	Титр вируса	До хранения	Длительность хранения, месяцы				
			При 4 ⁰ С			При минус 40 ⁰ С	
			1	2	3	6	12
«Башкирский»	IgТЦД ₅₀ /см ³	5,8±0,7	6,0±0,2	6,0±0,1	4,5±0,3	6,6±0,3	6,0±0,1
	Б-ИФА	1:32	1:32	1:32	1:8	1:32	1:32
«Равис- Соновский»	IgТЦД ₅₀ /см ³	4,0±0,2	4,2±0,3	4,0±0,2	2,6±0,3	4,0±0,2	3,8±0,2
	Б-ИФА	1:16	1:16	1:8	1:4	1:16	1:16
«ВД-20»	IgТЦД ₅₀ /см ³	6,7±0,4	6,5±0,1	6,0±0,2	4,9±0,2	6,8±0,3	6,7±0,2
	Б-ИФА	1:128	1:128	1:64	1:32	1:128	1:64
«ПА-01»	IgТЦД ₅₀ /см ³	8,7±0,2	8,5±0,1	7,8±0,1	6,5±0,7	9,0±0,2	8,7±0,3
	Б-ИФА	1:128	1:128	1:64	1:64	1:128	1:128
«Тбилисский»	IgТЦД ₅₀ /см ³	8,5±0,1	8,7±0,3	6,1±0,3	5,3±0,2	8,7±0,3	8,0±0,4
	Б-ИФА	1:128	1:128	1:32	1:16	1:128	1:64
«Кировоград- ский»	IgТЦД ₅₀ /см ³	8,0±0,4	7,9±0,1	5,2±0,1	4,1±0,1	8,1±0,3	7,9±0,1
	Б-ИФА	1:64	1:64	1:16	1:8	1:64	1:64

Из данных, представленных в табл. 4, видно, что хранение изолятов «Башкирский», «Равис-Сосновский», «ПА-01», «Тбилисский», «Кировоградский» и «ВД-20» в течение 12 месяцев при температуре минус 40⁰С не снижает их антигенную и инфекционную активность. Они также оказались устойчивыми к многократному повторению циклов замораживания - оттаивания. Однако все изоляты постепенно теряли свою инфекционность и антигенную активность после 3 месяцев хранения при 4⁰С, титры которых снижались от 2 до 4 IgТЦД₅₀/см³ и от 1 до 3 log₂, соответственно.

Антигенные свойства изолятов аденовирусов птиц I группы. В своих дальнейших исследованиях изучали антигенные свойства изолятов «Башкирский», «Равис-Сосновский», «ПА-01», «Тбилисский», «Кировоградский» и «ВД-20» в составе инактивированных вакцин. Экспериментальные образцы инактивированных эмульгированных вакцин готовили на основе каждого из изучаемых изолятов. Для приготовления вакцин использовали культуральную вирусную суспензию с инфекционной активностью не менее 6,0 IgТЦД₅₀/см³.

В опыте использовали 60 цыплят кросса «Хайсекс коричневый» 10-суточного возраста, которых разделили на 6 опытных групп. Цыплятам каждой опытной группы вводили вакцину в прививном объеме 0,5 см³ однократно внутримышечно в область груди. Сыворотки крови получали от всех цыплят опытных групп до

вакцинации и через 28 суток после прививки для выявления специфических антител к серотипам FAV 1, FAV 2, FAV 4, FAV 6 аденовирусов птиц I группы в непрямом варианте ИФА с помощью диагностических наборов производства ФГУ «ВНИИЗЖ». Результаты, полученные в ходе проведенных исследований, представлены в таблице 5.

Таблица 5

Антигенная активность лабораторных образцов инактивированной эмульгированной вакцины против аденовирусной инфекции птиц, изготовленных на основе различных изолятов возбудителя

(n=3)

Изолят, использованный в качестве антигена	Серотип	Средний титр антител к серотипам FAV 1, FAV 2, FAV 4, FAV 6 в непрямом варианте ИФА	
		До вакцинации	Через 28 суток после вакцинации
«Башкирский»	FAV 1	1:160±22	1:840±72
«Равис-Сосновский»	FAV 2	1:113±14	1:880±184
«ПА-01»	FAV 4	1:343±43	1:3203±487
«Тбилисский»	FAV 4	1:223±22	1:3074±392
«Кировоградский»	FAV 4	1:168±31	1:2962±156
«ВД-20»	FAV 6	1:100±00	1:940±80

Как следует из данных табл. 5, на 28 сутки после иммунизации во всех группах цыплят, привитых опытными образцами вакцин против аденовирусной инфекции птиц, средний титр антител превысил минимальный положительный уровень 1:800. Однако образцы вакцин на основе изолятов, относящихся к серотипу FAV 4 («ПА-01», «Тбилисский», «Кировоградский»), обладали наиболее выраженной антигенной активностью и индуцировали в организме привитой птицы образование более высокого уровня специфических антител, средний уровень которых составил 1:3203±487, 1:3074±392 и 1:2962±156, соответственно.

Перекрестная защита между изолятами различных серотипов аденовирусов птиц I группы. Для изучения перекрестной защиты между изолятами «Башкирский» (FAV 1), «Равис-Сосновский» (FAV 2), «ПА-01» (FAV 4) и «ВД-20» (FAV 6) аденовирусов кур проводили реакцию перекрестной нейтрализации по общепринятой методике.

Для постановки реакции использовали гипериммунные сыворотки кроликов, полученные путем трехкратной иммунизации вакцинными препаратами из

вышеуказанных изолятов. Полученные сыворотки имели уровень вируснейтрализующих антител в ИФА не ниже 1:25000.

Реакцию нейтрализации проводили с разведением вируса и постоянной дозой сыворотки. В качестве тест-системы использовали культуру клеток печени ЭК, выращенную в 96-луночных пластиковых планшетах для культивирования клеток фирмы «Corning» (Германия). Изоляты «Башкирский», «Равис-Сосновский», «ПА-01» и «ВД-20», имеющие титры инфекционной активности $5,0 \text{ IgTCID}_{50}/\text{cm}^3$, разводили десятикратным шагом. К каждому разведению добавляли равный объем гомо- и гетерологичных сывороток, разведенных 1:100 и инактивированных при 60°C в течение 30 мин. Смеси инкубировали при 37°C в течение 1 часа. В качестве контроля использовали смесь разведений вируса с нормальной сывороткой (не содержащей антител к вышеуказанным изолятам аденовируса). Затем проводили заражение культуры клеток печени ЭК полученными смесями в объеме $0,1 \text{ cm}^3$. Планшеты инкубировали в CO_2 -инкубаторе в течение 7 суток при температуре 37°C . РН считали положительной, если не наблюдалось ЦПД в виде дегенерации монослоя (75-80%), округления, увеличения и склеивания клеток. Индекс нейтрализации (ИН) рассчитывали по формуле, описанной в разделе 2. При индексе нейтрализации, равном 1 Ig и ниже, РН считали отрицательной, от 1 Ig до 2 Ig – сомнительной, выше 2 Ig – положительной.

Таблица 6

Результаты перекрёстной нейтрализации между различными изолятами аденовирусов птиц I группы

Сыворотка к изоляту Изолят	(n=3)			
	«Башкирский»	«Равис- Сосновский»	«ПА-01»	«ВД-20»
	Индекс нейтрализации, $\text{IgTCID}_{50}/\text{cm}^3$			
«Башкирский»	2,63±0,08	1,75±0,25	1,92±0,08	1,50±0,25
«Равис-Сос.»	1,50±0,14	4,75±0,14	1,27±0,25	0,95±0,22
«ПА-01»	1,58±0,16	1,58±0,22	5,33±0,08	1,83±0,22
«ВД-20»	1,33±0,08	1,73±0,08	1,25±0,15	5,50±0,14

Как видно из данных табл. 6, изоляты «Башкирский», «Равис-Сосновский», «ПА-01» и «ВД-20» при исследовании с гомологичными сыворотками имели значения ИН выше 2 Ig, которые составили $2,63\pm 0,08$; $4,75\pm 0,14$; $5,33\pm 0,08$; $5,50\pm 0,14 \text{ IgTCID}_{50}/\text{cm}^3$, соответственно, тогда как при исследовании с гетерологичными сыворотками ИН были меньше 2 Ig, что говорит об отсутствии

перекрёстной защиты между серотипами FAV 1, FAV 2, FAV 4 и FAV 6 аденовирусов птиц I группы.

При выборе изолята для депонирования в качестве производственного штамма при изготовлении инактивированной эмульгированной вакцины против аденовирусной инфекции птиц было учтено то обстоятельство, что большинство изолятов аденовирусов птиц, выделенных на территории Российской Федерации, относятся к серотипу FAV 4 и в эпизоотическом плане представляют наибольшую опасность, так как являются патогенными для коммерческой птицы (А.С. Алиев и соавт., 1998; В.А. Бакулин и соавт., 1998; В.В. Борисов и соавт., 1996-2003; Н.А. Лагуткин и соавт., 1992).

Из результатов проведенных исследований можно сделать вывод, что изоляты «ПА-01», «Тбилисский» и «Кировоградский» не имеют существенных различий по своим культуральным, патогенным и антигенным свойствам. Изолят «ПА-01» изучался более длительное время, так как одним из первых был выделен и адаптирован к первичной культуре клеток печени ЭК.

Учитывая вышеизложенные факты, для депонирования в качестве производственного штамма при изготовлении инактивированной культуральной вакцины против аденовирусной инфекции кур был выбран изолят «ПА-01».

С целью изучения иммунобиологических свойств изолята «ПА-01» были изготовлены экспериментальные образцы инактивированной вакцины против синдрома гидроперикардита кур, для составления которых использовали культуральный изолят «ПА-01» (FAV 4) с инфекционной активностью $8,5 \text{ IgTC}_{50}/\text{cm}^3$, а также масляный адъювант Монтанид ИЗА 70 «Сеппик» (Франция). Инактивацию вирусной суспензии проводили 1,2 аминоэтилазиридином в конечной концентрации 0,3% в течение 24 часов при 37 °С. Вакцину составляли в соотношении 30 частей антигена и 70 частей адъюванта Монтанид ИЗА 70 (по весу). Эмульгирование проводили на лабораторном эмульсоре «Сильверсон» (Англия) в течение 6 мин при 6000 об/мин.

Для испытания изготовленных образцов вакцины был проведен комиссионный опыт в условиях ФГУ «ВНИИЗЖ».

В опыте использовали 85 цыплят кросса «Хайсекс коричневый» 15-суточного возраста, не имеющих антител к вирусу СГПК.

Проверку вакцины на стерильность проводили в соответствии с ГОСТом 28085-89 «Препараты биологические. Методы бактериологического контроля стерильности». В результате во всех посевах на питательные среды роста микрофлоры не обнаружено (заключение ОБТК от 1.06.05). Вакцина стерильна.

Полноту инаktivации вируса и безвредность вакцины определяли методом введения средней пробы вакцины в объеме 0,6 см³ 10 цыплятам внутримышечно в область груди.

В течение 21 суток наблюдения все цыплята оставались живыми, без клинических признаков заболевания. При вскрытии вынуждено убитой птицы на месте введения вакцины морфологических изменений в виде воспаления, очагов некроза и гранулём выявлено не было, что характеризует инаktivированную культуральную вакцину против СГПК, как безвредный препарат.

Антигенную активность вакцины оценивали по наличию в сыворотках крови птиц специфических антител к аденовирусу кур серотипа FAV 4 через 21 и 28 суток после вакцинации, используя диагностические наборы производства ФГУ «ВНИИЗЖ».

Результаты опыта представлены в таблице 7.

Таблица 7

Антигенная активность вакцины против СГПК инаktivированной эмульгированной из культурального вируса «ПА-01» в различные сроки после иммунизации

№ пп	Группа цыплят	Прививной объём вакцины, см ³	Титр антител в непрямом варианте ИФА после вакцинации	
			21 сутки	28 суток
1	Вакцини- рованная	0,3	1:557 ± 72	1:1786 ± 283
		0,5	1:885 ± 114	1:3074 ± 487
2	Контрольная	-	1:140 ± 22	1:170 ± 43

Через 28 суток после вакцинации у цыплят, иммунизированных в прививном объеме 0,3 см³, в исследованных образцах сывороток крови присутствовали специфические антитела к аденовирусу кур серотипа FAV 4, средний титр которых значительно превысил минимальный положительный уровень 1:800 и составил 1:1786. В группе цыплят, иммунизированных в прививном объеме 0,5 см³, средний титр антител к вирусу синдрома гидроперикардита составил 1:3074. При этом у цыплят контрольной группы антитела к вирусу СГПК не выявлены.

Иммуногенная активность вакцины была оценена через 28 суток после вакцинации по результатам контрольного заражения птиц вирулентным штаммом «КР 95» методом внутримышечной инъекции в область голени в дозе 5,25 IgЛД₅₀/гол.

В течение 10 суток наблюдения цыплята, привитые вакциной в прививном объёме 0,3 см³ и 0,5 см³, оставались живыми и клинически здоровыми. В контрольной группе 80% зараженных птиц заболело и пало с патологическими признаками СГПК (угнетение, диарея, поражения печени, почек и сердца).

Результаты проведенных исследований показали, что экспериментальная инактивированная вакцина против СГПК из культурального вируса обладает высокой антигенной и иммуногенной активностью. А изолят «ПА-01» депонирован во Всероссийской государственной коллекции микроорганизмов ФГУ «Всероссийский государственный Центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов» в качестве производственного штамма для изготовления инактивированной культуральной вакцины против СГПК.

5. ВЫВОДЫ

1. Выделены и адаптированы к первичной культуре клеток печени эмбрионов кур шесть полевых изолятов аденовирусов птиц I группы, циркулирующих на территории РФ. Изолят «Башкирский» наиболее генетически близок к референтному штамму серотипа FAV 1; изоляты «ПА-01», «Тбилисский» и «Кировоградский» – к референтному штамму серотипа FAV 4; изолят «Равис-Сосновский» - к референтному штамму серотипа FAV 2, а изолят «ВД-20» – к референтному штамму серотипа FAV 6.

2. Оптимальными условиями выделения и культивирования аденовирусов птиц I группы являются использование первичной культуры клеток печени эмбрионов кур, поддерживающей среды ПСП или 199 с 2% фетальной сыворотки телёнка, величины рН 7,6-7,8, посевной концентрации клеток 800-900 тыс./см³, множественности заражения 0,1 ТЦД₅₀/кл и времени культивирования 72-96 часов.

3. Все выделенные изоляты, после адаптации к первичной культуре клеток печени эмбрионов кур, достигают максимальных титров к 6-7 пассажу. Изоляты «Башкирский», «ПА-01», «Кировоградский» и «Тбилисский» стабильно сохраняют свою репродуктивную активность до 10 пассажа, а изоляты «ВД-20» и «Равис-

Сосновский» после 7 пассажа снижают свою активность на 2-3 lg при дальнейшем пассировании.

4. Все изученные изоляты являются патогенными для развивающихся эмбрионов СПФ-кур при заражении в желточный мешок. Изоляты «ПА-01», «Кировоградский» и «Тбилисский» патогенны для коммерческих и СПФ-цыплят. Изолят «Башкирский» реплицируется в организме СПФ-цыплят, не вызывая их гибели. А изоляты «Равис-Сосновский» и «ВД-20» являются патогенными для СПФ-цыплят и апатогенными для коммерческой птицы.

5. Хранение всех изолятов при температуре минус 40°C не изменяет их инфекционных и антигенных свойств в течение 12 месяцев наблюдения, а при 4°C их инфекционность и антигенность утрачивается в течение 3-х месяцев. Все изоляты устойчивы при многократном замораживании - оттаивании.

6. Изготовленные опытные образцы культуральных эмульгированных вакцин на основе изолятов «ПА-01», «Тбилисский», «Кировоградский» обладают наиболее выраженной антигенной активностью и индуцируют в организме привитой птицы образование высокого уровня специфических антител.

7. Установлено отсутствие перекрёстной защиты между аденовирусами кур серотипов FAV 1, FAV 2, FAV 4 и FAV 6, представителями которых являются изоляты «Башкирский», «Равис-Сосновский», «ПА-01» и «ВД-20».

8. Экспериментальная вакцина против синдрома гидроперикардита кур инактивированная эмульгированная из культурального штамма «ПА-01» обладает высокой антигенной и иммуногенной активностью и может быть использована в ветеринарной практике для специфической профилактики СГПК.

6. ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ

Для практического использования предлагаются следующие методики и методические указания, разработанные в результате проведенных научных исследований, которые одобрены ученым советом и утверждены директором ФГУ «Федеральный центр охраны здоровья животных»:

«Методика получения первично-трипсинизированных культур клеток печени и почек куриного эмбриона и использования их для выделения и титрования аденовирусов птиц» (2001 г.);

«Методические указания по выделению, титрованию и идентификации аденовирусов птиц I группы» (2002 г.);

«Методические указания по выявлению антигена аденовируса птиц 2 серотипа в непрямом жидкофазном блокирующем варианте ИФА» (2005 г.);

«Методические указания по выявлению антигена аденовируса 1 серотипа в непрямом жидкофазном блокирующем варианте ИФА» (2005 г.).

Штамм «ПА-01» депонирован во Всероссийской государственной коллекции культур микроорганизмов ФГУ «Всероссийский государственный Центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов» в качестве основного компонента инактивированной культуральной вакцины против СГПК и для получения специфического антигена при комплектовании диагностических иммуноферментных наборов (ноябрь 2006 г.).

Результаты научных исследований по изучению иммунобиологических свойств изолятов аденовирусов кур и испытанию опытных образцов вакцины против СГПК рекомендовано использовать при составлении НД на инактивированную культуральную вакцину против СГПК.

6. СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Борисов, В.В. Культивирование вируса синдрома гидроперикардита кур на куриных эмбрионах / В.В. Борисов, Д.С. Сурнев, Е.В. Ельникова // Материалы 5-го зїзду паразитологів України. – Харків, 2001. – С. 296 - 298.

2. Борисов, В.В. Синдром гидроперикардита кур: Протективная эффективность эмульсионной вакцины из вируса, полученного в культуре клеток / В.В. Борисов, Д.С. Сурнев, Е.В. Ельникова // Современ. вопр. вет. медицины и биологии: сб. науч. тр. – Уфа, 2000. – С. 44 – 46.

3. Ельникова, Е.В. Изучение патогенных свойств полевых изолятов аденовирусов кур, выделенных на территории Российской Федерации / Е.В. Ельникова, В.В. Борисов // Вет. патология. - 2006. № 4. – С. 117 – 123.

4. Жидкофазный блокирующий вариант иммуноферментного анализа для выявления и количественного определения аденовирусов птиц 1 серотипа / М.А. Волкова, Г.В. Батченко, М.Е. Качалова, М.С. Мудрак, В.В. Дрыгин, З.Б. Хлебовец, Е.В. Ельникова, А.В. Борисов // Тр. Федерального центра охраны здоровья животных. – Владимир, 2006. – Т. 4. - С. 381 - 395.

5. Изучение патогенных свойств полевого изолята аденовируса кур шестого серотипа, выделенного от цыплят-бройлеров / Д.С. Сурнев, В.А. Лобанов, В.В.

Борисов, Е.В. Ельникова, М.А. Волкова, Г.В. Батченко // Вет. медицина: міжвид. тем. наук. зб. – Харків, 2003. – Т. 82. – С. 595 – 597.

6. Иммунный ответ у кур, привитых культуральной и тканевой эмульсионными вакцинами против синдрома гидроперикардита / Д.С. Сурнев, В.В. Борисов, Е.В. Ельникова, М.А. Волкова // 1-й Междунар. вет. конгр. по птицеводству: материалы – М., 2005. – С. 97 – 101.

7. Иммуногенная активность инактивированной культуральной вакцины против синдрома гидроперикардита кур / Д.С. Сурнев, Е.В. Ельникова, Р.И. Назаров, В.В. Борисов // Вет. медицина: міжвид. тем. наук. зб. – Харків, 2003. – Т. 82. – С. 592 - 594.

8. Культуральные свойства полевого изолята аденовируса кур четвёртого серотипа / Е.В. Ельникова, Г.В. Батченко, М.А. Волкова, В.А. Лобанов, Д.С. Сурнев, В.В. Борисов, Ю.В. Зуев // Проблемы мониторинга и генодиагностики инфекционных болезней животных: материалы конф. молодых учёных. – Владимир, 2004. – С. 129 - 133.

9. Laboratory study of Hydropericardium Syndrome inactivated cell culture emulsion vaccine / V. Borisov, D. Surnev, E. Elnikova, A. Borisov // 14th World Veterinary Poultry Congress. – Istanbul, Turkey, 2005 - P. 530.