

На правах рукописи



**КРОН            НАТАЛЬЯ            ВЛАДИМИРОВНА**

**ИММУНОБИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ВИРУСА  
ИНФЕКЦИОННОГО ГИДРОПЕРИКАРДИТА ПТИЦ**

**16.00.03. - ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология,  
микология с микотоксикологией и иммунология**

**АВТОРЕФЕРАТ**  
**диссертации на соискание ученой степени**  
**кандидата ветеринарных наук**

**Санкт-Петербург**

**2003**

Работа выполнена во Всероссийском научно-исследовательском ветеринарном институте птицеводства.

Научный руководитель - доктор ветеринарных наук, профессор Алиев Алаутдин Серажугдинович

**Официальные оппоненты:**

доктор ветеринарных наук, профессор Калишин Михаил Николаевич;  
доктор ветеринарных наук, главный научный сотрудник  
Бакулин Валерий Александрович

Ведущее учреждение - Казанская государственная академия ветеринарной медицины им. Н.Э.Баумана

Защита диссертации состоится 25 декабря 2003г. в 13 часов на заседании диссертационного совета Д 220.059.03. при Санкт-Петербургской государственной академии ветеринарной медицины по адресу: 196084, Санкт-Петербург, ул. Черниговская, 5.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Санкт-Петербургской государственной академии ветеринарной медицины.

Автореферат разослан 24 декабря 2003г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета,  
кандидат ветеринарных наук

Черкай З.Н.

2003-А  
19699

## 1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность темы.** Инфекционный гидроперикардит птиц (ИГП) - высококонтагиозное вирусное заболевание цыплят, основными признаками которого являются накопление трансудата в перикардиальной полости, гепатит и нефрозо-нефриты. В настоящее время инфекционный гидроперикардит (ИГП) регистрируется в Пакистане (Anjum M.A. et al., 1989), Индии (Kumar R. et al., 1997), Ираке (Abdul-Aziz T.A., Al-Attar M.A., 1991), Кувейте, Японии (Abe T. et al., 1998), Мексике (Borrego J.L., Soto E., 1995), Перу (Fernandez D.M., 1989), Эквадоре (Mazaheri A. et al., 1988), Чили (Toro H. et al., 1999) и Египте (Azab A. et al., 1992).

С момента установления болезни и до настоящего времени ведутся широкие исследования по изучению морфологии и иммунобиологических свойств возбудителя (Afzal M.R. et al., 1991; Cowen B.S., 1992), которые имеют большое научное и практическое значение, так как на основе всестороннего изучения свойств возбудителя разрабатываются эффективные методы диагностики и средства специфической профилактики болезни.

Специфическая профилактика ИГП занимает ведущее место в борьбе с этой болезнью. За рубежом создана и успешно применяется инактивированная вакцина (Chishti M.A. et al., 1989; Anjum A.D., 1990; Ahmad M.I. et al., 1990). В 90-е годы прошлого столетия вспышки инфекционного гидроперикардита с высоким уровнем смертности регистрировались на территории России (Алиев А.С. с соавт., 1996; Borisov V.V. et al., 1997; Бакулин В.А. с соавт., 1998; Виноходов В.О., 1998).

**Цель и задачи работы.** Целью настоящих исследований явилось изучение иммунобиологических свойств вируса и конструирование инактивированной вакцины против инфекционного гидроперикардита птиц.

В соответствии с поставленной целью было необходимо решить следующие задачи:

- провести эпизоотологическое обследование ряда птицеводств с целью выделения и идентификации вируса ИГП;
- изучить иммунобиологические свойства вируса ИГП;
- испытать реакцию диффузионной преципитации для диагностики ИГП;
- изучить антигенные свойства вируса ИГП;

РОС. НАЦИОНАЛЬНАЯ  
БИБЛИОТЕКА  
С.Петербург  
09 1993

- изучить физико-химические и морфологические свойства вируса ИГП;
- разработать технологию изготовления и контроля инактивированной вакцины против ИГП;
- разработать схему иммунизации;
- провести испытания вакцины в лабораторных и производственных условиях.

**Научная новизна.** Впервые в нашей стране проведено изучение морфологии, физико-химических и иммунологических свойств возбудителя ИГП; доказана инфекционная природа болезни, выделен и охарактеризован инфекционный агент.

Установлена патогенность вируса ИГП для эмбрионов кур, а также цыплят и переносит.

Изучены эпизоотологические особенности болезни (возрастная восприимчивость цыплят и некоторые пути передачи возбудителя), клинические признаки и патологоанатомические изменения у больных цыплят в экспериментальных и производственных условиях.

Определена диагностическая ценность реакции диффузионной преципитации (РДП) при ИГП.

Разработана инактивированная вакцина для специфической профилактики ИГП.

**Практическая ценность.** Разработана технология изготовления и контроля инактивированной вакцины и предложена эффективная схема профилактики болезни.

#### **Вопросы, относящиеся к защите.**

1. Инфекционная природа болезни птиц с признаками гидроперикардита.
2. Характеристика иммунологических свойств штамма "АДВ":
  - чувствительность культуры клеток к заражению вирусом;
  - патогенность для эмбрионов кур и цыплят;
  - распределение вируса в органах и тканях экспериментально зараженных эмбрионов кур и цыплят.
3. Обоснование выбора чувствительной системы для титрации штамма "АДВ".
4. Эффективность реакции диффузионной преципитации для диагностики ИГП.
5. Характеристика антигенных свойств штамма "АДВ".
6. Характеристика физико-химических свойств штамма "АДВ":
  - устойчивость к воздействию различных температур;

- устойчивость к эфиру, хлороформу, формалину и изменению рН среды.

7. Характеристика морфологических свойств вируса ИГП.

8. Технологические параметры изготовления, условия, схема применения и контроль инактивированной вакцины против ИГП из штамма "АДВ".

**Апробация работы.** Основные положения диссертации доложены на Методических и Ученых советах Всероссийского ветеринарного НИИ птицеводства (1996-2003); на научно-производственной конференции, посвященной 190-летию высшего ветеринарного образования в России и 100-летию ветеринарной науки (г. Санкт-Петербург, 1998), и на научной конференции профессорско-преподавательского состава, научных сотрудников и аспирантов Санкт-Петербургской государственной академии ветеринарной медицины (г. Санкт-Петербург, 2003).

**Публикации исследований.** По теме диссертации опубликовано 7 научных работ.

**Структура и объем работы.** Диссертация изложена на 130 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, результатов собственных исследований, обсуждения полученных результатов, выводов, практических предложений, списка использованной литературы и приложения. Работа иллюстрирована 7 фотографиями, 24 таблицами и 3 рисунками. Список литературы включает 151 источник, в том числе 121 зарубежный.

## 2. СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

### 2.1. Материалы и методы

**Вирусный материал.** Патологический материал получали из птицефабрик, в которых наблюдался повышенный отход птиц с признаками гидроперикардита: "Буранная" и "Сосновская" Челябинской области, "Красноярская" Красноярского края, "Гайская" Оренбургской области, "Владимирская" Владимирской области, "Петрозаводская" республики Карелия, "Фатежская" Курской области, "Чебоксарская" республики Чувашия, "Светлый путь" Липецкой области, "Роскар" Ленинградской области и "Лебедевская" Новосибирской области.

Изолят выделяли путем заражения бройлеров в возрасте 15 суток гомогенатом печени, полученным от павших цыплят, и дополнительно исследовали при помощи электронной микроскопии.

Для проведения опытов и изготовления инактивированной вакцины использовали штамм "АДВ" вируса ИГП, выделенный из печени цыплят, павших с явлениями гидроперикардита во время вспышки заболевания на птицефабрике "Сосновская" Челябинской области. Штамм был получен путем проведения пяти последовательных пассажей на 15-суточных цыплятах.

**Подопытные животные.** В лабораторных исследованиях было использовано 100 цыплят, выведенных из эмбрионов СПФ-кур (фирма "Ломанн" Германия), 1600 цыплят-бройлеров кроссов "Бройлер-6<sub>1</sub>", "Смена-2", "Арбор", "Барос-123", 50 цыплят породы белый леггорн и 50 перепелат.

**Культуры клеток и куриные эмбрионы.** В опытах использовали: первичную культуру фибробластов эмбриональных кур (ФЭК), а также 300 развивающихся эмбрионов СПФ-кур 5-11-суточной инкубации (фирма "Ломанн" Германия).

**Постановка реакции диффузионной преципитации при инфекционном гидроперикардите птиц.** Реакцию двойной иммунодиффузии (РДИ) в агаровом геле ставили по методу, предложенному Оухтерлони (1948).

В качестве положительного антигена использовали 10%-ный гомогенат печени павших с признаками ИГП цыплят.

Гипериммунную сыворотку получали путем введения цыплятам вначале инактивированного формалином, а затем патогенного вируса в нарастающих объемах (0,3мл, 0,5мл и 1мл). Биологическая активность вируса составляла 4,2lgID<sub>50</sub>/мл.

**Изучение устойчивости вируса ИГП к воздействию физико-химических факторов.** Устойчивость к физико-химическим факторам исследовали по следующим критериям:

- к действию различных температур (-18°C, +4°C, +37°C, +56°C);
- к действию эфира (метод Andrewes C.H., Horstmann D.M., 1949);
- к действию хлороформа (метод Feldman H.A., Wang S.S., 1961);
- к действию 10%-ного раствора формалина (по общепринятой методике);
- к действию рН среды в диапазоне от 3 до 10. Нужную концентрацию водородных ионов устанавливали с помощью 0,1N HCL и 0,1N NaOH.

О влиянии физико-химических факторов на вирус судили по результатам титрации на 6-суточных эмбрионах СПФ-кур до и после воздействия указанных веществ.

**Морфологические свойства** возбудителя ИГП изучали во Всероссийском НИИ особо чистых препаратов. Материалом для электронно-микроскопического исследования служили изоляты, выделенные из патматериала птицефабрик "Красноярская", "Сосновская", "Буранная", "Петрозаводская" и "Фатежская". Для этого гомогенаты печени обрабатывали методом негативного контрастирования по Nemut (1975).

#### **Изготовление и контроль опытных образцов инактивированной вакцины.**

В качестве антигена для изготовления инактивированной вакцины использовали 10%-ный гомогенат печени цыплят, экспериментально зараженных ИГП. Для наиболее полного выхода вируса из клеток гомогенат печени дополнительно обрабатывали ультразвуком. Инактивацию вирусосодержащего материала проводили 10%-ным водным раствором формалина. При изучении условий инактивации вируса ИГП использовали различные концентрации формалина (0,05%-0,5%), разный температурный режим и различную экспозицию с инактиватором. Полученную суспензию термостатировали при  $+37^{\circ}\text{C}$  и при  $+4^{\circ}\text{C}$  в течение 48 часов при равномерном перемешивании. В процессе инактивации, через определенные промежутки времени (12, 24, 36 и 48 часов) отбирали пробы обработанного инактиватором материала и приостанавливали процесс инактивации 20%-ным раствором тиосульфата натрия. Для изготовления сорбированной формы вакцины использовали стерильный коллоидный 2%-ный гель гидроксида алюминия (ГОА), который смешивали с инактивированным вирусом ИГП до конечной концентрации от 0,5 до 1,5%.

Контроль качества вакцины против ИГП включает определение стерильности, полноты инактивации вируса, безвредности, антигенной и иммуногенной активности.

## 2.2. РЕЗУЛЬТАТЫ

### 2.2.1. Эпизоотологическое обследование птицеводств.

Впервые инфекционный гидроперикардит (ИГП) в нашей стране был зарегистрирован в 1992г. на птицефабрике "Сосновская" Челябинской области (Алиев А.С. с соавт, 1996).

В 1998г. нами было проведено эпизоотологическое обследование п/ф "Петрозаводская" республики Карелия. В данном хозяйстве резко увеличился падеж цыплят-бройлеров в возрасте 30-40 суток от болезни невыясненной этиологии. Заболевание проявлялось отказом от корма, сонливостью, вялостью, взъерошенностью оперения и быстрой потерей массы тела. Некоторые цыплята погибали внезапно без проявления клинических признаков. Продолжительность болезни составляла 7-10 суток. Заболеваемость и смертность нарастали быстро, достигая максимума на 3-4 день, в течение последующих 6-7 суток отмечали снижение заболеваемости и гибель птиц прекращалась. Отход птицы от болезни в разных партиях составлял от 12,5 до 19,2%. При вскрытии павших цыплят обнаруживали иктеричность подкожной клетчатки и внутреннего жира, скопление в перикардиальной полости прозрачного соломенно-желтого транссудата водянистой или желеподобной консистенции, гепатиты различной степени тяжести, отечность легочной ткани, увеличенные почки с контурированными мочеточниками, увеличение селезенки, бледное окрашивание костного мозга.

В период с 1996 по 2000гг. мы наблюдали заболевание со сходной патологоанатомической картиной на бройлерных птицефабриках "Буранная" Челябинской области, "Красноярская" Красноярского края, "Чебоксарская" Чувашии, "Светлый путь" Липецкой области, "Фатежская" Курской области и на птицефабрике "Лебедевская" Новосибирской области, а также на яичных птицефабриках "Гайская" Оренбургской области, "Владимирская" Владимирской области и птицефабрике "Роскар" Ленинградской области. Во всех выше перечисленных птицеводствах от трупов цыплят были отобраны пробы печени, из которых изготавливали гомогенат. После проверки на стерильность гомогенат подкожно вводили цыплятам-бройлерам 15-суточного возраста в объеме 0,3мл. В ходе проведения экспериментов мы установили, что клиническое проявление заболевания и гибель цыплят с патологоанатомическими

изменениями, аналогичными выявленным в хозяйствах, имели место при заражении гомогенатами печени от павших цыплят из птицефабрик “Красноярская”, “Сосновская”, “Бураяная”, “Петрозаводская” и “Фатежская”.

Инкубационный период при экспериментальном заражении составлял 2-3 суток. Заболевание характеризовалось расстройством рефлекторной возбудимости, общей депрессией птицы (вялость, скученность, сонливость, угнетение, отказ от корма, группирование цыплят и адинамия). Гибель птицы иногда происходила до проявления клинических признаков. Отход в условиях эксперимента отмечался в течение короткого периода времени - с третьего по шестой день после заражения. Уровень смертности составлял от 55 до 70%.

Результаты биопробы при исследовании патматериала из остальных птицев хозяйств были отрицательными, что указывает на необходимость лабораторного подтверждения диагноза ввиду полиэтиологичности синдрома “гидроперикардит”.

Результаты исследований по установлению инфекционного гидроперикардита птиц в России вскоре были подтверждены другими исследователями (Бакулин В.А. с соавт., 1998; Виноходов В.О. с соавт., 1998; Сурнев Д.С. с соавт., 2000; Borisov V.V. et al., 1997).

Изучение клинических признаков, течения болезни, а также патологоанатомических изменений у цыплят после экспериментального заражения вирусом инфекционного гидроперикардита птиц дает ответ на вопрос о возможности применения биологической пробы для диагностики заболевания.

Данные по заражению цыплят материалом различного происхождения показали, что наиболее высокий уровень смертности (70%) вызывал изолят “Сосновская”, поэтому для дальнейших исследований использовали штамм “АДВ”, полученный из этого изолята путем пятикратного пассажирования на 15-суточных цыплятах. Для заражения цыплят использовали разведение вируса 1:10 в объеме 0,3мл. Цыплят-бройлеров в возрасте 15 суток заражали штаммом “АДВ” внутривенно, подкожно, внутримышечно, перорально, а также контактно. Контактное заражение осуществлялось путем совместного содержания интактной и зараженной птицы.

Инкубационный период был минимальным при парентеральном введении вируса (2-3 суток), а при пероральном и контактном заражении более продолжительным и составил - 5-6 суток. Отход

среди больных цыплят колебался в широких пределах, от 20% до 90%, и зависел от метода введения вируса. Так, наиболее низкие показатели отхода птиц выявлены при контактном и пероральном заражении цыплят - 20% и 30% соответственно. Парентеральное введение вируса всегда приводило к массовой гибели зараженной птицы. Отход при этом был равен 70-90%. Продолжительность заболевания обычно составляла 5-7 суток, после чего общее состояние цыплят начинало постепенно улучшаться и клинические признаки угасали, однако переболевшая птица значительно отставала в росте и развитии.

На основании результатов проведенных опытов при постановке биопробы рекомендуем парентеральный метод введения вируса.

При изучении чувствительности цыплят разного возраста и пород установили, что наиболее восприимчивыми к экспериментальному заражению являются цыплята 1-10-суточного возраста. С увеличением возраста птиц происходило снижение чувствительности к вирусу.

Цыплята яичных пород были менее восприимчивы к заражению, чем цыплята мясных кроссов. В производственных условиях вспышек этого заболевания среди цыплят яичных пород или несушек мы не наблюдали, хотя в литературе имеются отдельные сообщения (Akhtar S. et al., 1992).

Инкубационный период у перепелат составил 48 часов. Заболевшие перепелата переставали потреблять корм, становились вялыми, оперение было взъерошено. Падеж наблюдался на протяжении 3-5 суток и составил 40%. У павших птиц наблюдались очаги некроза в печени. Признаков гидрперикардита при заражении перепелат нами зарегистрировано не было.

Для определения локализации вируса в органах павших птиц использовали гомогенаты печени, почек, бурсы Фабрициуса и перикардальную жидкость, которые вводили цыплятам-бройлерам 15-суточного возраста.

В ходе выполнения эксперимента было установлено, что заболеваемость и гибель цыплят происходили при введении им гомогената печени. Это послужило основанием рекомендовать отбор печени от больной и павшей птицы для проведения лабораторной диагностики на инфекционный гидрперикардит птиц.

### 2.2.2. Культивирование штамма "АДВ" вируса ИГП.

Штамм "АДВ" вируса инфекционного гидронефрита птиц оказался патогенным для 6-суточных эмбрионов СПФ-кур, зараженных в желточный мешок. При этом наблюдали их гибель, отставание в росте и развитии, а также разлитые гемorragии на коже головы, тела и конечностей, отеки головы, подчелюстного пространства и брюшной полости.

Специфическая гибель эмбрионов при заражении в желточный мешок в первом пассаже начиналась на 5 сутки после заражения и составляла 43%. С увеличением количества проведенных пассажей вируса инкубационный период сокращался и увеличивался процент павших эмбрионов. Так, в восьмом пассаже инкубационный период был равен трем дням и отход составил 97%. Материал третьего пассажа использовали для определения инфекционной активности вируса. По итогам титрования инфекционная активность штамма "АДВ" вируса ИГП в третьем пассаже составила  $3,9 \text{lg} \text{ЭИД}_{50} / \text{мл}$ .

При вскрытии зародышей отмечали изменения в печени. Печень у погибших на 3-4 сутки была увеличена, кровенаполнена, темного цвета, а в более поздний срок (5-6 суток) - желто-коричневого цвета со множеством некротических очажков (пятнистая). ХАО в единичных случаях были отчетны и непрозрачны.

При введении вирусосодержащего материала в аллантоисную полость и на ХАО эмбрионов специфические признаки поражения исчезали во втором или в третьем пассажах, что свидетельствовало о низкой адаптационной способности возбудителя при этих методах инокуляции.

Была изучена тропность вируса к тканям печени, хориоаллантоисной оболочке и кожно-мышечной ткани эмбрионов кур. Для этого производили заражение в желточный мешок гомогенатами указанных тканей, полученных от павших эмбрионов.

В ходе проведения эксперимента было установлено, что характерные патологоанатомические изменения и гибель эмбрионов наблюдались только при заражении их гомогенатом печени.

Для исключения контаминации гемагглютинирующими вирусами материал на всех этапах культивирования на куриных эмбрионах проверяли в реакции гемагглютинации.

Исследования показали, что штамм "АДВ" вируса ИГП не вызывал агглютинации эритроцитов петуха, барана, кролика, лошади и крупного поганого скота.

Первично-трипсинизированная культура клеток фибробластов эмбриональных кур (ФЭК) оказалась непригодной для культивирования вируса ИГП, так как видимое цитопатическое действие вируса не наблюдали в течение пяти последовательных пассажей вируса в ФЭК. Отсутствие вируса в культуре было подтверждено заражением 6-суточных эмбрионов СПФ-кур в желточный мешок.

Результаты опытов по культивированию вируса ИГП в развивающихся эмбрионах СПФ-кур дают возможность использовать этот метод для титрования вируса. Однако высокая стоимость и трудность доставки не позволяет рекомендовать их для широкой практики, поэтому нами была проведена серия опытов по определению пригодности цыплят для этих целей.

В предыдущих опытах было установлено, что наиболее восприимчивыми к экспериментальному заражению являются цыплята 1-10-суточного возраста, поэтому для титрации вируса использовали цыплят-бройлеров суточного возраста.

Биологическая активность вируса при титрации его на цыплятах составила  $4,2 \lg \text{ИД}_{50}/\text{мл}$ . Таким образом установлено, что цыплята-бройлеры могут быть использованы для титрации.

### 2.2.3. Применение реакции диффузионной преципитации (РДП) для диагностики ИГП.

В исследованиях была изучена возможность применения РДП с целью ретроспективной диагностики инфекционного гидроперикардита птиц.

В предварительных опытах изучали оптимальные условия постановки РДП при инфекционном гидроперикардите птиц. В качестве антигена использовали гомогенат печени.

Установили, что оптимальными условиями для постановки РДП при инфекционном гидроперикардите птиц являются: концентрация агарового геля—1,5%, 8% концентрация хлористого натрия, толщина агаровой пластинки—3-4мм, расстояние между лунками—5-8мм и температура +37°C. Для постановки реакции антиген необходимо использовать в исходной концентрации, а иммунную сыворотку в рабочем разведении. Предварительный учет реакции производится через 12 часов, окончательный - через 24 часа. Выполнение перечисленных условий обеспечивает наиболее быстрое и четкое проявление линий преципитации.

С целью изучения распространения аденовирусов были исследованы в РДП с антигеном ИГП сыворотки крови птиц, доставленные из 11 благополучных по ИГП птицефабрик различных областей России. Всего было исследовано 623 пробы сывороток. В 105 случаях реакция была положительная, что составляет 16,9% от общего количества.

Перекрестное исследование в РДП изолятов, полученных от павших цыплят птицефабрик "Сосновская", "Буранная", "Красноярская", "Петрозаводская" и "Фатежская" показало их антигенную идентичность.

#### 2.2.4. Изучение антигенных свойств штамма "АДВ" вируса ИГП.

Сроки появления и динамика накопления вируспреципитирующих антител у цыплят, зараженных вирусом ИГП, имеют важное значение при проведении серологических исследований.

Для изучения этого вопроса был проведен следующий опыт. 70 цыплят-бройлеров кросса "Бройлер-61" 15-суточного возраста, серонегативных к штамму "АДВ", заразили подкожно вирусом с инфекционной активностью  $4,2 \lg \text{ИД}_{50}/\text{мл}$  в объеме 0,3 мл. 10 цыплят такого же возраста использовали в качестве контрольных. В результате заражения в опытной группе погибло 48 голов. У выживших цыплят опытной группы, а также у контрольных производили взятие крови на 6 и 7 сутки после заражения, а затем через каждые 7 суток в течение 77 дней исследовали сыворотки в реакции диффузионной преципитации.

В ходе проведения опыта было установлено, что у цыплят, зараженных штаммом "АДВ", преципитирующие антитела появлялись на 7 сутки после заражения, достигали максимума на 21 сутки и массово выявлялись до 42 дня после заражения.

#### 2.2.5. Изучение степени устойчивости штамма "АДВ" вируса ИГП к воздействию физико-химических факторов.

Инфекционная активность вируса ИГП не снижалась при хранении в замороженном состоянии (при  $-18^{\circ}\text{C}$ ) в течение двух лет (срок наблюдения).

Хранение вируса при температуре  $+4^{\circ}\text{C}$  вызывало снижение инфекционности в 1,9 раза через 1 месяц, а в конце 4 месяца хранения препарат становился неинфекционным.

При температуре  $+37^{\circ}\text{C}$  материал утрачивал инфекционные свойства через 7 суток.

Вирус сохранял инфекционную активность при воздействии температуры  $+56^{\circ}\text{C}$  в течение 30 минут. Резкое снижение инфекционности происходило через 2 часа, а через 4 часа вирус полностью инактивировался.

Воздействие эфира, хлороформа и изменения pH среды в диапазоне от 3 до 10 не снижали инфекционную активность вируса.

С целью подбора эффективного инактиватора нами было изучено действие раствора формалина на вирус ИГП. Установлено, что оптимальная конечная концентрация формалина для инактивации вируса ИГП - 0,1% и экспозиция 24 часа при температуре  $+37^{\circ}\text{C}$ . При таком режиме инактивации преципитирующая активность вируса соответствовала активности нативного препарата, в то время как концентрация 0,2% и выше снижала антигенную активность. Формалин в этой концентрации обеспечивал получение стерильной вирусной суспензии при посеве на твердые и жидкие питательные среды.

#### **2.2.6. Изучение морфологических свойств штамма "АДВ" вируса ИГП.**

При электронно-микроскопическом исследовании в исследуемых образцах выявляли отдельные вирионы (полные и интактные) или их скопления, имеющие форму икосаэдра. Вирионы не имели суперкапсидной оболочки, нуклеотид был покрыт одним слоем капсомеров и каждая грань содержала по 6 капсомеров.

Анализ данных, полученных в ходе исследований, показал, что выявляемые в электронном микроскопе вирусные частицы имеют одинаковую морфологическую структуру, характерную для семейства аденовирусов. Вирусов из других семейств выявлено не было.

#### **2.2.7. Технология изготовления, схема применения и контроль инактивированной вакцины.**

Для производства вакцины использовали гомогенат печени от павших цыплят с признаками ИГП. Биологическая активность

вирусодержущего материала составляла не менее 4,2 IgИД<sub>50</sub>/мл и преципитирующая активность от 1:8 и выше.

В качестве инактиватора использовали раствор формалина в конечной концентрации 0,1%.

Образцы вакцин готовили из инактивированной вирусодержущей суспензии, которую соединяли с гелем гидрата окиси алюминия (ГОА) до конечной концентрации от 0,5 до 1,5%. В качестве контроля использовали инактивированный препарат без ГОА. Антигенную активность препаратов контролировали на цыплятах 15-суточного возраста через 21 сутки после введения препаратов в РДП с антигеном вируса ИГП.

Установлено, что антигенная активность вакцины повышалась с увеличением содержания ГОА. Наименее выраженный иммунный ответ отмечали у цыплят, привитых антигеном без адьюванта (0,43±0,1 log<sub>2</sub> в РДП). Наиболее высокие титры антител были установлены при введении препаратов содержащих 1 и 1,5% ГОА, причем различия в уровне антител у цыплят, привитых этими препаратами были несутественны.

Таким образом, было установлено, что оптимальным количеством ГОА в вакцинном препарате следует считать концентрацию 1%.

Опытные серии вакцины изготавливали по трем прописям. Для этого антиген разводили фосфатным буфером в соотношениях 1:2, 1:3 и 1:4, а затем добавляли равный объем ГОА.

Вакцины вводили подкожно в объеме 0,3мл в область нижней трети шеи.

Иммуногенность вакцин оценивали по результатам контрольного заражения цыплят вирусом ИГП через 21 день после вакцинации.

На основании полученных результатов, при изготовлении инактивированной вакцины против ИГП, использовали следующую пропись: антигена - 17%, фосфатного буфера - 33% и гидроокиси алюминия - 50%.

Оптимальную дозу препарата определяли на 15-суточных цыплятах путем подкожного или внутримышечного введения вакцины в разных объемах. Иммуногенную активность оценивали через 21 сутки после вакцинации контрольным заражением патогенным штаммом возбудителя. Проведенные исследования показали, что введение вакцины в объемах 0,3мл и 0,5мл обеспечивало 100%-ную

защиту цыплят от контрольного заражения, независимо от метода введения препарата.

Для изучения продолжительности поствакцинального иммунитета и влияния кратности вакцинации на ее эффективность использовали цыплят-бройлеров 10- и 15-суточного возраста, серонегативных к вирусу ИГП.

На основании полученных результатов сделали вывод, что вакцинация цыплят в 15-суточном возрасте вызывает более продолжительный и напряженный иммунитет, чем вакцинация в 10-суточном возрасте. При вакцинации цыплят в 10-суточном возрасте необходимо проводить повторную вакцинацию через 10 суток.

Контроль вакцины осуществляли по следующей схеме:

1. на стерильность - путем посева на питательные среды (МПА, МПБ, МППБ под вазелином и бульон Сабуро) согласно ГОСТу 28085-89;

2. на полноту инактивации вируса - путем подкожного введения по 0,3мл цыплятам 15-суточного возраста;

3. на безвредность - путем введения 10-кратной дозы препарата 15-суточным цыплятам;

4. на антигенную активность - путем определения титра преципитинов через 21 день после вакцинации;

5. на иммуногенность - по уровню специфической защиты цыплят от действия патогенного вируса при контрольном заражении.

#### **2.2.8. Испытание инактивированной вакцины в экспериментальных и производственных условиях.**

В экспериментальных условиях комиссионные испытания вакцины проводились на базе ВНИВИП согласно программе утвержденной 28 апреля 2003г. директором института. Для проведения испытаний были изготовлены три опытные серии препарата.

Результаты проверки показали, что все три серии испытуемой вакцины были свободны от посторонней микрофлоры, авирулентны для цыплят 15-суточного возраста и не вызывали у привитых птиц осложнений местного или общего характера. Вакцина обладает антигенной и иммуногенной активностью и обеспечивает специфическую защиту привитого поголовья цыплят от заражения вирулентным штаммом вируса ИГП.

Производственные испытания опытных серий вакцины проводили на двух птицефабриках мясного направления, в которых наблюдали острое течение ИГП, подтвержденное вирусологическими и серологическими исследованиями.

На птицефабрике "Петрозаводская" вакцина была применена на поголовье 350 тысяч цыплят 15-суточного возраста. В качестве контроля служили 30 тысяч невакцинированных птиц из этой же партии. В ходе испытаний вакцины признаков манифестации ИГП у привитой птицы не регистрировалось на всем протяжении выращивания бройлеров, в то время как в контрольной группе имело место переболевание цыплят с характерной для ИГП клиникой и картиной патвскрытия. Общий экономический эффект от применения вакцины составил 235 тысяч рублей.

В период с 27 февраля по 10 апреля 2000г. вакцину применяли на птицефабрике "Красноярская" Красноярского края на поголовье 200 тысяч цыплят-бройлеров 15-суточного возраста кросса "Сибиряк". Вакцину вводили подкожно в область нижней трети шеи в объеме 0,3мл. В качестве контрольных использовали 20 тысяч голов цыплят такого же возраста, не вакцинированных против данной болезни.

В результате применения вакцины установлено, что вакцина обеспечивает повышение сохранности птиц на 11%, увеличение среднесуточного привеса на 3 грамма и уменьшение затрат корма на 1 центнер привеса на 0,13 ц.кг.ед. Общий экономический эффект от применения вакцины составил 75 тысяч рублей.

Таким образом, применение инактивированной вакцины позволило купировать инфекцию за короткий промежуток времени, что чрезвычайно важно в условиях высокой концентрации птиц, а также предупредить распространение болезни в другие птицеводческие хозяйства. Оздоровление данных птицефабрик от ИГП было достигнуто без смены всего птицепоголовья.

## ВЫВОДЫ

1. Проведенные комплексные исследования позволили установить инфекционную природу заболевания цыплят-бройлеров с признаками гидроперикардита.

2. Изучены эпизоотологические особенности болезни (возрастная восприимчивость цыплят и некоторые пути передачи возбудителя), клинические признаки и патологоанатомические изменения у больных цыплят в экспериментальных и производственных условиях.

3. Выделенные от больных цыплят пять изолятов возбудителя ИГП идентичны в антигенном отношении и по своим биологическим и морфологическим свойствам являются типичными представителями семейства аденовирусов.

4. Определены оптимальные условия постановки РДП для ретроспективной диагностики ИГП: концентрация агара - 1,5%, концентрация хлористого натрия - 8%, толщина агаровой пластинки - 3-4мм, расстояние между лунками - 5-8мм и температура окружающей среды + 37°C. Предварительный учет реакции проводится через 12 часов, окончательный - через 24 часа. Для постановки реакции антиген берут в исходной концентрации, а иммунную сывортку - в рабочем разведении.

5. Установлены параметры инактивации вируса ИГП под действием раствора формалина: конечная концентрация - 0,1% в течение 24 часов при температуре +37°C.

6. На основе штамма "АДВ" разработана технология изготовления и контроля инактивированной сорбированной вакцины против ИГП.

7. Испытания вакцины в лабораторных и производственных условиях показали высокую эффективность препарата и возможность его применения для специфической профилактики ИГП в неблагополучных птицеводствах.

8. В зависимости от эпизоотической ситуации и срока выращивания бройлеров в хозяйстве рекомендуется однократная вакцинация цыплят в возрасте 15 суток или двукратная в возрасте 10 и 20 суток.

## ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ.

1. На основании проведенных исследований предлагаются методические рекомендации "Инфекционный гидроперикардит у цыплят-бройлеров" по диагностике заболевания для использования в

работе научно-исследовательских учреждений и производственных ветеринарных лабораторий.

2. Разработана технология изготовления и контроля инактивированной сорбированной вакцины против ИГП птиц из штамма "АДВ".

### **СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ ПО МАТЕРИАЛАМ ДИССЕРТАЦИИ.**

1. Никитина Н.В.

Гидроперикардит – инфекционная болезнь || Всероссийская конференция молодых ученых и аспирантов по птицеводству. Тезисы докладов. Сергиев Посад. - 1996. - С.20.

2. Алиев А.С., Никитина Н.В.

Диагностика и специфическая профилактика инфекционного гидроперикардита птиц || Мат. научно-производственной конференции, посвященной 190-летию высшего вет. образования в России и 100-летию вет. науки. С-Петербург. – 1998. – Ч.1. – С. 14-15

3. Алиев А.С., Сираждинов Р.С., Никитина Н., Алиева А.К.

Клинико-анатомическая характеристика инфекционного гидроперикардита птиц || Мат. Международной научно-практической конференции, посвященной 70-летию Ставропольской НИВС. Ставрополь. – 1999. – С.34-35.

4. Алиев А.С., Сираждинов Р.С., Никитина Н.В.

Инфекционный гидроперикардит у цыплят-бройлеров || Методические рекомендации, С-Петербург. - 2000. - 20 с.

5. Алиев А.С., Крон Н.В., Кузьмян В.А.

Чувствительность цыплят-бройлеров к экспериментальному заражению вирусом инфекционного гидроперикардита || Мат. научн. конф. СПБГАВМ. С-Петербург. - 2003. - С.7-8.

6. Alijev A.S., Djavadov E.D., Nikitina N.V.

Aetiology of hydropericardium in broiler chicks || Proc. XIth Int. Congr. of the World Veterinary Poultry Ass., Hungary, Budapest. – 1997. – P.257.

7. Alijev A.S., Nikitina N.V.

Specific prophylactic of chicken infectious hydropericardium || Proc. 10th European Poultry Conf., Israel, Jerusalem. – 1998. - P.71.

2003-A

19699

№ 19699

Отпечатано копировально-множительным участком отдела обслуживания учебного процесса физического факультета СПбГУ. Приказ № 571/1 от 14.05.03.

Подписано в печать 21.11.03 с оригинал-макета заказчика.

Ф-т 30х42/4, Усл. печ. л. 1,25. Тираж 100 экз., Заказ № 056/с  
198504, СПб, Ст. Петергоф, ул. Ульяновская, д. 3, тел. 428-43-00.