

На правах рукописи

ДЖАВАДОВ
Эдуард Джавадович

**ВИРУС-ИНДУЦИРОВАННЫЕ ИММУНОСУПРЕССИИ И СПОСОБЫ ИХ
ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ В ПРОМЫШЛЕННОМ ПТИЦЕВОДСТВЕ**

16.00.03 -«Ветеринарная микробиология, вирусология,
эпизоотология, микология с микотоксикологией и
иммунология»

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени
доктора ветеринарных наук

Москва - 2004

Работа выполнена в ООО «Кронвет» (г. Санкт-Петербург) и в лаборатории контроля препаратов, применяемых в птицеводстве Федерального Государственного Учреждения «Всероссийский государственный Центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов»

Научные консультанты:

Доктор биологических наук, профессор Смоленский В.И.

Доктор медицинских наук Полежаев Ф.И.

Официальные оппоненты:

Доктор биологических наук, профессор Гуненков Виктор Всеволодович

Доктор ветеринарных наук, профессор Чекмарев Александр Дмитриевич

Доктор биологических наук Соловьев Борис Васильевич

Ведущее учреждение - Федеральное Государственное Учреждение «Федеральный Центр охраны здоровья животных (ФГУ ВНИИЗЖ)»

Защита диссертации состоится «21» октября 2004 года в 13 часов на заседании диссертационного совета Д - 220.011.01 при Федеральном Государственном Учреждении «Всероссийский государственный Центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов» по адресу: Россия, 123022, Москва, Звенигородское ш., д.5, ФГУ ВГНКИ

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГУ ВГНКИ

Автореферат разослан «17» сентября 2004 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат ветеринарных наук, доцент,
заслуженный ветеринарный врач РФ

Козырев Ю.А.

1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

1.1. Актуальность темы. Мировая тенденция второй половины XX века в птицеводстве - это эпоха превращения домашних мелкотоварных хозяйств в крупномасштабное высокопродуктивное производство. Такая ситуация породила уникальные изменения биоэкологической ниши, окружающей выращиваемое поголовье и, в частности, привела к чрезвычайно спрессованной во времени трансформации всего спектра вирусных инфекций, повсеместно поражающих домашнюю птицу. За этот период появились вновь, антигенно обновились или существенно усилили вирулентность более десяти возбудителей, став причиной весьма опасных инфекционных болезней птиц. Среди хорошо известных, превратившихся по сути в убиквитарные, вирусов ньюкаслской болезни (НБ) или болезни Марека (БМ) особое место заняли возбудители ряда малоизученных инфекций: инфекционного бронхита кур (ИБК); инфекционной бурсальной болезни (ИББ); реовирусного теносиновита (РВТ); синдрома снижения яйценоскости (ССЯ-76); парамиксовирусной инфекции 2-го серотипа (ПМВ-2); инфекционной анемии цыплят (ИАЦ), респираторного микоплазмоза птиц (РМП) и др. Именно эти этиологические агенты, действуя порознь или, как правило, сочетано наносят катастрофический с экономической точки зрения ущерб промышленному птицеводству (Р.Н.Коровин, 1989; V.N.Vakharia et al., 1994; D.Lbtticken, 1997; N.Bumstead, 1998; Y.M.Saif, 1998; B.A.Cepreev и др., 2001; B.W.Calnek et al., 2003; R.Muller et al., 2003; World Animal Health, 1996-2003).

Эффективность предупреждения указанных заболеваний во всем мире связывают главным образом с применением живых и инактивированных вакцин. При этом вакцинопрофилактика до последнего времени остается единственным, фундаментально проработанным методическим приемом для эффективного противостояния инфекционным болезням при крупномасштабном выращивании птицы (В.И.Смоленский, 1999; А.В.Борисов, 2000; H.Muller et al., 2003; D.V.Zander et al., 2003).

Изменившийся вектор генетической эволюции многих вирусов в сторону увеличения контагиозности и патогенности, лишил возможности практических специалистов проводить полноценную иммунопрофилактику болезней только с помощью живых вакцин. В самый уязвимый период жизни (до 30-40 дней) цыпленку приходится выдерживать до 10 циклов вакцинаций.. При этом живые вакцины, благодаря конструктивным особенностям, плохо объединяются в один препарат. Они надежно эффективны только при не менее чем двукратном последовательном применении с временным разрывом в 10-14 дней.

Эффективность иммунизации живыми вакцинами, как правило, предполагает соблюдение ряда обязательных требований, предусматривающих обеспечение максимальной однородности титров материнских антител и необходимость определения оптимальных сроков иммунизации по их уровню, исключение интерференции с другими полевыми и вакцинными вирусами, преодоление трудностей, связанных с соблюдением точной дозировки при массовой выпойке



препарата и др., что нередко нивелирует явные преимущества в материальных и трудовых затратах на проведение иммунопрофилактики традиционными приемами.

Но самым главным является то, что живые вакцины обуславливают отчетливо регистрируемые или скрытые иммуносупрессии, направленному изучению которых посвящено очень незначительное количество работ и роль которых в полиэтиотропных эпизоотических ситуациях, характерных для современных промышленных птицеводств практически не известна.

Наиболее убедительным примером являются живые вакцины против ИББ, которые обеспечивают иммунную защиту в результате репродукции вакцинного вируса в клетках фолликул фабрициевой бурсы, тотально разрушая их и, тем самым, индуцируют невосполнимую иммунодефектность у привитых цыплят (J.C.Muskett et al., 1979; C.D.Ezeokoli et al., 1990; V.N.Vakharia et al., 1994; M.K.Hassan et al., 1996; T.Yamaguchi et al., 1996; Yao Kun et al., 1998; N.Tanimura, J.M.Sharma, 1998; A.Thangavelu et al., 1998; A.F.Abdel Fattah et al., 1999; I.J.Kim et al., 1999; M.Coletti et al., 2001; M.M.Corley et al., 2001; J.J.Giambrone. et al., 2001; E.Mundt et al., 2003).

Напротив, парэнтеральное введение неинфекционных вирусных антигенов лишено перечисленных недостатков. Поэтому, одним из направлений работы явилось изучение факторов и механизма иммуносупрессии, обусловленных некоторыми вакцинными и полевыми вирусами.

Мы сочли также актуальным сосредоточить усилия на разработке и обосновании целесообразности применения инактивированных вакцин для гарантированного предупреждения заболеваемости ИББ у домашней птицы всех возрастов, начиная с первого дня жизни, поскольку к середине прошлого десятилетия эта болезнь приобрела угрожающий характер. В 1996 г. вспышки ИББ были зарегистрированы в большинстве административных регионов РФ и практически на всей территории СНГ. Известные в тот период живые вакцины из гиператтенуированных штаммов ВНИВИП, Бюр-706, Д-78 в сложившихся эпизоотических условиях не предотвращали болезнь (В.И.Смоленский, 1999; А.В.Борисов, 2000), а инактивированные вакцины для этих целей вообще не применялись.

Формируя целевое направление исследований по конструированию инактивированных вакцин против ИББ, лишенных иммуноразрушающих и других отрицательных последствий, мы не имели сведений об аналогичных разработках в доступной литературе. Довольно широко рекламируемые генноинженерные субъединичные вакцины против ИББ, до последнего времени оставались в рамках опытных образцов, а научные публикации, как правило, не давали всесторонней информации о воздействии препаратов на организм домашней птицы (С.Butter et al., 2003; X.Wang et al., 2004; Y.Dieye et al., 2004).

Мировой опыт создания и применения средств иммунопрофилактики свидетельствует, что проблемы одномоментной защиты от нескольких инфекций в промышленном птицеводстве можно решить только с помощью ассоции-

рованных неинфекционных вакцинных препаратов, как оказалось, полностью лишенных конструктивных недостатков живых вакцин.

К началу наших исследований поливалентные инактивированные вакцины для птицеводства в стране не производились, что и стало одним из направлений исследований в настоящей работе.

При этом основное внимание уделяли разработке безопасных вакцин, применение которых обеспечивало бы не только снижение традиционного показателя - заболеваемость птиц, но и способствовало сохранению на высоком уровне их продуктивности, как конечного результата хозяйственной деятельности в промышленном птицеводстве.

Помимо ставшей хрестоматийной ИББ, описан также ряд заболеваний, возбудители которых обладают выраженными иммуносупрессивными свойствами, к каким относится инфекционная анемия цыплят (ИАЦ) и болезнь Марека (V.Bulow, K.A.Schat, 2003; B.W.Calnek, R.L.Witter, 2003; F.Sommer, C.Cardona, 2004).

В последнее десятилетие в ведущих экономически развитых странах Европы, США, Австралии, Новой Зеландии, Японии и др. получила широкое распространение инфекционная анемия цыплят (B.W.Calnek et al., 2003). Учитывая, нарастающую экономическую и эпизоотическую значимость этой инфекции во всем мире, а также то, что возбудитель ИАЦ, как и вирус ИББ избирательно поражает клетки иммунной системы, вызывая иммунодепрессию, мы поставили задачу - проведение эпизоотологического обследования ряда птицеводств в РФ с целью выявления циркуляции вируса ИАЦ и разработки методологических подходов для организации профилактики этого заболевания.

Спустя несколько десятилетий применения живых вакцин против болезни Марека случаи их периодической неэффективности переросли в одну из основных проблем промышленного птицеводства. Феномен снижения защитных свойств коммерческих вакцин против БМ оставался непонятым и требовал расшифровки для конструирования позитивной стратегии предупреждения этой болезни. Таким же малоизученным аспектом была и взаимозависимость патогенетических основ процесса иммунизации против БМ с другими широко применяемыми вакцинами, вызывающими сходные иммунодепрессивные состояния у птицы. Исследование этих вопросов с последующей отработкой практических мероприятий, устраняющих технологические изъяны в специфической профилактике БМ, способствует существенной стабилизации всего эпизоотического фона с повышением экономической эффективности птицеводческой отрасли.

1.2. Цель и задачи исследования. Основываясь на исследованиях иммунопатологии и этиологического спектра наиболее распространенных инфекционных болезней в птицеводствах Российской Федерации, разработать, обосновать и внедрить в практику промышленного птицеводства средства и методы эффективной специфической профилактики, способствующие существенному снижению общей заболеваемости и обеспечивающие получение высокой продуктивности.

Для реализации поставленной цели были определены следующие задачи:

1. Изучить различные методические подходы для оценки иммунного статуса поголовья птицы в условиях промышленного птицеводства и отобрать наиболее информативные способы тестирования функционального состояния иммунной системы цыплят.

2. Используя комплекс наиболее перспективных методов оценки иммунного статуса, определить уровень негативного воздействия на иммунную систему птицы живых патогенных и вакцинных штаммов вируса ИББ различной степени аттенуации в сравнении с инактивированными антигенами.

3. Разработать инактивированную вакцину для эффективной профилактики ИББ у цыплят, независимо от исходного уровня материнских антител и эпизоотической ситуации в хозяйстве, совместимой с живыми вакцинами. Определить оптимальные схемы ее применения, антигенную активность, иммуногенность и продолжительность иммунитета в условиях крупномасштабного промышленного птицеводства.

4. Определить экономический эффект от применения инактивированной вакцины против ИББ в сравнении с результатами, полученными в хозяйствах, где используют коммерческие живые аттенуированные вакцины.

5. Обосновать целесообразность применения в широкой практике модифицированной реакции диффузионной преципитации (РДП) для диагностики ИББ.

6. Разработать технологию производства инактивированной, ассоциированной вакцины, защищающей цыплят и взрослую птицу от ньюкаслской болезни, инфекционного бронхита кур, инфекционной бурсальной болезни, реовирусного теносиновита, синдрома снижения яйценоскости, парамиксовирусной инфекции 2-го серотипа и респираторного микоплазмоза. Аргументировать целесообразность ее комплектации и применения в зависимости от конкретной эпизоотической ситуации.

7. Обосновать принципиально новый подход к профилактике инфекционных заболеваний в современном промышленном птицеводстве.

8. Доказать факт циркуляции в птицеводствах РФ вируса ИАЦ и разработать мероприятия по снижению потерь, обусловленных этим возбудителем.

9. Обосновать целесообразность применения в широкой практике схему ротации вакцинных штаммов вируса БМ для повышения эффективности профилактики одноименной болезни.

1.3. Научная новизна. В результате проведенных исследований было сформулировано принципиально новое направление комплексной специфической профилактики инфекционных болезней птиц, направленное на кардинальное улучшение эпизоотической ситуации и организацию высокопродуктивного производства..

В качестве базовой модели, для обоснования нового методологического подхода комплексной профилактики актуальных инфекционных болезней в ветеринарии, было выбрано промышленное птицеводство, в связи с экстремаль-

ными рисками возникновения инфекционных болезней, благодаря исключительной плотности содержания и быстрой сменяемости поголовья. В этих условиях, перманентно провоцирующих динамичные эпизоотические эксцессы, был проведен поиск способов гарантированной профилактики основных, наиболее распространенных, инфекционных болезней (НБ, ИБК, ИББ, РВТ, ССЯ-76, ПМВ-2 и РМП).

Была выявлена тесная взаимозависимость полноценного иммуногенеза при естественном (полевые штаммы) или искусственном (живые вакцинные вирусы) воздействии инфекционными вирусами на иммунную систему. Наиболее демонстративно этот феномен проявлялся при инфицировании фабрициевой сумки вирулентными и аттенуированными штаммами вируса ИББ.

Используя принципы комплексного подхода к специфической профилактике и моделированию условий, обеспечивающих структурную и функциональную полноценность органов иммуногенеза, удалось решить проблему предотвращения иммунодепрессивных инфекций, играющих ключевую роль в этиологии эпизоотии в птицеводстве и успешно устранять другие инфекционные болезни, в том числе относящиеся к вторичным инфекциям.

Впервые описан феномен «скрытой» вирус-индуцированной иммуносупрессии у домашней птицы, до сих пор не выявляемый традиционными методами, но достоверно регистрируемый по показателям повышенной заболеваемости птиц вирусными и микробными инфекциями и иммунологическим тестам.

Впервые был внедрен методический подход - иммунометаболического мониторинга за состоянием иммунного ответа птицы в условиях нормы и при инфекционных болезнях.

1.4. Практическая значимость. На основании полученных результатов в ветеринарную практику промышленного птицеводства Российской Федерации и Украины были внедрены две инактивированные вакцины, предназначенные для иммунизации поголовья с первых дней жизни: моновалентная против ИББ и ассоциированная для профилактики комплекса актуальных инфекций (НБ, ИБК, ИББ, РВТ, ССЯ-76 и РМП), также диагностический набор, базирующийся на РДП, для определения антител и полевых вирусов ИББ. Указанные препараты производятся и применяются в двух странах в соответствии перечисленными техническими документациями:

1. «Вакцина против инфекционной бурсальной болезни жидкая инактивированная» (ТУ 9384-004-23074685-02, утверждены 06.02.03 г., Наставление по применению вакцины, Регламент производства);

2. «БУРСИТ» Вакцина шактивована проти шфекцшноТ бурсальной хвороби (ТУ У 24.4.20078518-562-2001, утверждены 28.04.01 г., Наставление по применению вакцины, Регламент производства);

3. «Вакцина инактивированная АВИКРОН» (ТУ 9389-002-23074685-2001, утверждены 02.09.01 г. Наставление по применению вакцины, Регламент производства);

4. «Эмульсин» (моновалентш та асоційовани форми) проти шфекцішно-го бронхіту курей, ньюкаслсксм хвороби, шфекцішжм бурсально! хвороби, ре-ОВірусНого теносиновпу, синдрому зниження яйценоскосп-76, респіраТорНого мшоплазмозу птиц (ТУ У 24.4.24792862-598-2001, утверждены 01.10.01 г., Наставление по применению вакцины, Регламент производства);

5. «Набор антигенов и сывороток для выявления специфических антител и антигена вируса инфекционной бурсальной болезни в реакции диффузионной преципитации "Биотест-РДП» (ТУ 9384-05-23074685-01, утверждены 27.12.01 г., Наставление по применению набора, Регламент производства);

6. Набір антигенов та сироваток для діагностики хвороби Гамборо в реакци дифузно преципитаци (ТУ України 46.15:407-99, утверждён 12.02.99 г., Наставление по применению набора, Регламент производства).

1.5. Апробация. Материалы диссертации доложены на: *Ученых Советах, координационных совещаниях и на курсах повышения квалификации ветеринарных врачей во ВНИВИП и СПБГАВМ (1992-2004 г.), совещаниях треста «Ленптицепром», на научно-практических конференциях и семинарах (Г.С.Петербург, 24.11.2000г., Карелия 19-20.11.2000 г, система «Большевик», 1994-1995 гг., г.СПетербург-Ломоносов, 27.02-2.03.1995 г., г. С.Петербург, 9-12.10.2001 г., Г.Владимир, 2001г.); на Всесоюзных симпозиумах, семинарах и региональных конференциях (г. Харьков, 13-16.05.1996 г., г.Зеленоград, 17-18.04.2003 г., Г.С.Петербург, 24-28.11.2003 г., г.Ярославль, 27.05.2003 г.); международных конгрессах Всемирной ветеринарной ассоциации птицеводов и Международных конференциях (г. Будапешт, 1997 г., Г.С.Петербург, 23-25.06.1997г., г.Уфа, 21-22.11.2000 г., г. Каир, 2002 г., г.Харьков, 15-19.10.2002 г., г.Бремен, 2002 г., г.Москва, 17-19.04.2003 г., Г.С.Петербург, 22-23.10.2003 г.; на курсах и факультетах повышения квалификации (Г.С.Петербург, 2001-2003 гг., С.-Петербург, 2002-2003 гг.) и др..*

1.6. Публикации. По теме диссертации опубликовано 31 научная работа, в том числе 2 авторских свидетельства и 1 патент, утверждено 6 комплектов нормативных документов на разработанные вакцины и диагностический препарат, три из которых за рубежом (Украина).

1.7. Основные положения, выносимые на защиту.

1. Предложен новый научный подход комплексной профилактики инфекционной патологии в ветеринарии, базирующийся не только на традиционном устранении отдельных инфекционных болезней, но и на целесообразности специального подбора вакцин, полностью исключающих взаимное подавление и поствакцинальные осложнения, включая иммунодефицитные состояния. Используя, как модель промышленное птицеводство, характеризующееся исключительно высокими рисками эпизоотического неблагополучия, удалось в результате многолетнего наблюдения доказать, что птица, выращенная с использованием предлагаемых принципов иммунопрофилактики невосприимчива к

убиквитарным инфекциям, отличается стабильно высокой продуктивностью, при максимальной сохранности поголовья.

2. Обоснована целесообразность приоритетного использования для профилактики наиболее распространенных болезней птиц инактивированных вакцинных препаратов. Этот прием позволяет избежать разрушения убиквитарными иммуотропными вирусами ИББ, лимфоидных клеток фабрициевой сумки и тем самым сохранить функциональную активность всей поликомпонентности иммунной системы цыплят раннего возраста и, в конечном итоге, обеспечить стабильное эпизоотическое благополучие и быстрое оздоровление хозяйства.

3. Новый способ профилактики ИББ и ряда других болезней птиц с помощью разработанных моно- и ассоциированной инактивированных вакцин, существенно повышает защищенность цыплят от возбудителей повсеместно распространенных иммуносупрессивных вирусных инфекций (БМ, ИАЦ) и реализуется в полном объеме с высокой эффективностью вне зависимости от антигенной вариабельности местных полевых штаммов, инфицированности птицы на момент вакцинации, уровня интерферона и разнородности материнских антител.

1.8. Объем и структура диссертации. Диссертационная работа изложена на 345 страницах и состоит из введения, обзора литературы, собственных исследований, обсуждения результатов исследований, выводов и практических предложений, содержит 84 таблицы, 12 рисунков. Список цитируемой литературы включает 530 публикаций из них 116 отечественных и 414 зарубежных.

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Работа выполнена в 1992-2003 гг. в ООО «Кронвет» (г.С.Петербург) и в лаборатории контроля препаратов, применяемых в птицеводстве Федерального Государственного Учреждения «Всероссийский государственный Центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов».

В исследовании использовали:

патогенные штаммы вируса ИББ: «52/70», изолят «Синявинский», изолят «Заводской»; вакцинные штаммы вируса ИББ: «Д-78», «Винтерфилд 2512», «Бюр-706», «228Е», «МВ»; вирус ньюкаслской болезни (штаммы «Ласота» и «Н»); вирус инфекционного бронхита (штамм «Чапаевский»); возбудитель реовирусного теносиновита (штаммы «Calnek 1133» и «Calnek 1733»); вирус синдрома снижения яйценоскости (ССЯ-76) (штамм «В 8/78»); возбудитель респираторного микоплазмоза птиц (штамм S6),

патогенные штаммы вируса БМ: «ЗК», «Rb 1», «Конкур», «Изолят Тверской»; вакцинные штаммы вируса БМ : «ВНИВИП», «FC -126», «SB 1»; вакцинный штамм вируса ИАЦ: «СAV P4»;

а также: 6-10 дневные развивающиеся куриные и утиные эмбрионы; клеточные культуры куриных фибробластов, цыплят из птицеводств яичного направления кросса «Хайсекс белый» и «Ломанн коричневый»; СПФ-цыплят;

беспородных цыплят из фермерских хозяйств, в которых не проводились плановые вакцинации;

культуру фибробластов куриного эмбриона;

методы серологической диагностики: реакция торможения гемагглютинации (РТГА), реакция диффузионной преципитации (РДП); реакция нейтрализации (РН); встречный иммуноэлектрофорез (ВИЭФ); реакция агглютинации латекса (РАЛ); иммуноферментный анализ (ИФА).

Титры антител указывали в обратных значениях.

Электронномикроскопические исследования проводили общепринятым методом.

Предварительно материал осветляли низкоскоростным центрифугированием при 5000 об/мин в течение 20 мин. Затем вирус концентрировали и очищали, используя раствор сульфата аммония и хлороформ. После этого вирус осаждали ультрацентрифугированием при 45000 об/мин в течение 4 час. Центрифугат обрабатывали методом негативного контрастирования и изучали в электронном микроскопе Jem 100S (Япония) при ускоряющем напряжении 100 кВ.

Иммунный статус цыплят оценивали с помощью:

- реакции торможения миграции лейкоцитов с конканавалином А (J.E.Clausen, 1975);

- определения уровня циркулирующих иммунных комплексов в сыворотке крови (M.Digeon et al, 1977);

- лизосомально-катионного теста (В.Е.Пигаревский и др., 1980);

- теста восстановления нитросинего тетразолия (НСТ) по методу А.С.Cool (1983) в модификации В.Л.Пастушенкова, Ю.А.Митина (1994)

- лимфоциты из периферической крови выделяли путем градиентного центрифугирования(фиколверографин) (И.А.Болотников, 1982);

- количество В-лимфоцитов определяли в реакции бляшкообразования (И.А.Болотников, 1982);

- количество Т-лимфоцитов устанавливали методом спонтанного розеткообразования (В.Г.Морозов, В.Х.Хавинсон, 1980);

- количественное определение иммуноглобулинов IgG, IgM, IgA в сыворотках крови птиц проводили по методу Манчини в модификации иммунодиффузионного микротеста (Л.С.Колабская, Л.Л.Шорникова, 1984)

Изучение метаболизма лимфоцитов было осуществлено с помощью цитохимической жидкофазной методики. В лимфоцитах определяли активность сукцинатдегидрогеназы (СДГ), лактатдегидрогеназы (ЛДГ), альфа-глицерофосфатдегидрогеназы (α-ГФДГ), глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г-6-ФДГ) (В.Л.Пастушенков, Ю.А.Митин, 1993).

Изучение иммуносупрессивных свойств вируса ИБВ устанавливали по уровню поствакцинальных антител к вирусу НВ согласно " Manual of standards for diagnostic test and Vaccines/Office International des Epizooties. World organization for animal health, 1996".

Морфологически выраженность иммунодепрессии оценивали по бурсальному индексу (БИ) по формуле: $БИ = Мс / Мт * 1000$, где Мс - масса фабрицевой сумки в г; Мт - масса тела в г.

Комплексную иммунную реакцию организма зараженных и вакцинированных цыплят определяли по коли-клиренсу (В.О.Виноходов, 2000).

Иммуногенность вакцин в экспериментальных условиях определяли по формуле:

$$И = \frac{А - В}{А}, \text{ где}$$

И - иммуногенность в %;

А - процент птицы с клиническими и патологоанатомическими признаками болезни в контрольной (невакцинированной) группе;

В - процент птицы с признаками болезни в опытной (вакцинированной) группе.

При оценке профилактической эффективности вакцины учитывали весь комплекс общепринятых производственных показателей и на их основе рассчитывали индекс продуктивности (ИП) по формуле:

$$ИП = \frac{А \times В}{С \times D \times 10}, \text{ где}$$

А - сохранность (в %)

В - масса одной головы перед забоем (в граммах)

С - количество дней содержания

D - конверсия корма

Результаты опытов обрабатывали статистически методом Стьюдента с учетом рекомендаций Г.Ф.Лакина (1990).

3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1. ОЦЕНКА ИММУИНОГО СТАТУСА ПТИЦЫ, СОДЕРЖАЩЕЙСЯ В ПРОМЫШЛЕННЫХ УСЛОВИЯХ.

Для диагностики иммунного статуса птицы в промышленном птицеводстве на первом этапе был апробирован ряд методик, которые можно подразделить на: клеточные - определение количества и функциональной активности иммунокомпетентных клеток (лейкоцитов, фагоцитов); серологические - по активности взаимодействия специфических антител с гомологичными антигенами и уровню формирования антител к вирусным вакцинам; определение количества разных классов иммуноглобулинов; патоморфологические - сопоставление весовых характеристик органов иммунитета, в частности фабрицевой сумки и веса тела; бактериологические - по скорости очистки кровяного русла от патогенных бактерий.

Цель настоящего раздела работы можно обозначить и как поиск наиболее информативных методов для оперативной оценки функционального состояния иммунитета домашней птицы, выращиваемой в промышленных условиях. В качестве модели были использованы вакцинные и полевые штаммы вирусов ИББ и БМ.

3.1.1. Определение функциональной активности иммунокомпетентных клеток. Иммунодефицитное состояние является ведущим звеном в патогенезе ИББ в связи с тем, что размножение возбудителя осуществляется в В-лимфоцитах фабрициевой сумки с феноменом их полного разрушения. Поэтому выбор для инфицирования восприимчивой птицы штаммов вируса ИББ, различающихся по степени патогенности, с последующим изучением иммунного ответа является адекватной моделью для оценки иммунологической реактивности организма птиц.

На первом этапе состояние иммунитета у цыплят, инфицированных вирулентными (изолированными от больной ИББ птицы) и аттенуированными (используемыми в составе живых вакцин) штаммами ИББ исследовали в реакции торможения миграции лейкоцитов с конканавалином А (РТМЛ с КоА). В качестве двойного контроля наблюдали, как группы интактных цыплят, так и цыплят, которым вводили парэнтерально неинфекционные белки вируса ИББ. В качестве последнего препарата применили разработанную инактивированную вакцину.

Полученные результаты представлены в табл. 1. Показатели РТМЛ с КоА у цыплят, инфицированных высоковирулентными и аттенуированными вирусами ИББ достоверно ($p < 0,05$) отличались между собой (от $86,812 \pm 2,3\%$ до $93,587 \pm 5,4\%$) и от данных зарегистрированных в контрольных группах (от $72,982 \pm 2,1\%$ до $80,265 \pm 3,6\%$), что свидетельствовало о функциональных нарушениях иммунитета при введении живых вирусов.

При этом показатели РТМЛ с КоА были заметно выше у высоковирулентных (от $91,000 \pm 2,8\%$ до $93,587 \pm 5,4\%$) штаммов, по сравнению с аттенуированными ($86,812 \pm 2,3\%$ до $89,874 \pm 2,1\%$). Оптимальный уровень торможения миграции лейкоцитов был отмечен в контрольной группе при введении инактивированного вируса ИББ ($72,982 \pm 2,1\%$). Последний даже был ниже фоновых показателей у интактной птицы ($80,265 \pm 3,6\%$), что возможно обусловлено присутствием в инактивированной вакцине большого спектра медиаторов иммунитета (интерлейкины, фактор некроза опухоли, трансфер-фактор, интерфероны и др.)-

Далее у подопытной птицы была изучена активность функционирования фагоцитов. Для этого использовали лизосомально-катионный тест (ЛКТ) и тест восстановления нитросинего тетразолия (НСТ).

В результате установлено, что заражение цыплят вирулентными ($1,410 \pm 0,08$ сцк - $1,438 \pm 0,02$ сцк) и аттенуированными ($1,419 \pm 0,02$ сцк - $1,490 \pm 0,11$ сцк) штаммами вируса ИББ приводило к снижению ($p < 0,05$) показателей ЛКТ (контроль $1,528 \pm 0,03$ сцк - $1,534 \pm 0,13$ сцк). Эти данные указывают на

угнетение кислороднезависимой биоцидности фагоцитов и могут рассматриваться, как негативные последствия инфекционного процесса.

Другим подтверждением изменения биоцидности, возникающей при заражении ИББ, может служить факт сближения базальных и стимулированных показателей НСТ-теста, характеризующих кислородзависимую микробиоцидность.

Таблица 1

Показатели РТМЛ с КоА и фагоцитоза (ЛКТ и НСТ) у цыплят, инфицированных патогенными и аттенуированными штаммами вируса ИББ (n=50)

Группы цыплят, инфицированных вирусами ИББ с различным уровнем вирулентности	РТМЛ с КоА, (%)	Показатели фагоцитоза по тестам		
		ЛКТ (снк)**	НСТ (ye)***	
			Базальный	Стимулированный
Высоковирулентные вирусы				
штамм 52/70	91,000±2,8*	1,438±0,02*	0,182±0,01	0,269±0,03
изолят Заводской	93,450±4,7*	1,433±0,07*	0,174±0,01	0,258±0,02*
изолят Синявинский	93,587±5,4*	1,410±0,08*	0,179±0,02	0,267±0,02*
Аттенуированные (вакцинные) штаммы				
Д-78	86,812±2,3*	1,487±0,15	0,190±0,02	0,329±0,01
Винтерфилд 2512	87,240±2,8*	1,490±0,11	0,208±0,02*	0,320±0,01
Бюр-706	87,787±3,2*	1,482±0,16	0,240±0,02*	0,336±0,03
228Е	89,240±2,7*	1,442±0,04*	0,212±0,01*	0,300±0,03
МВ	89,874±2,1*	1,419±0,02*	0,198±0,02*	0,330±0,02
Контроль				
Интактные цыплята	80,265±3,6	1,528±0,03	0,172±0,01	0,328±0,03
Неинфекционные белки вируса ИББ (инактивированная вакцина)	72,982±2,1	1,534±0,13	0,131±0,01	0,347±0,03

Примечание: * - $p < 0,05$ - достоверные отличия от показателей контрольных групп;

** - еще - средний цитохимический коэффициент;

*** - ye - условная единица.

Таким образом, инфицирование цыплят как патогенными, так и аттенуированными штаммами вируса ИББ, приводит к формированию вторичного иммунодефицитного состояния, связанного с нарушением биоцидности фагоцитоза.

Для количественной оценки способности иммунокомпетентных клеток выполнять основную функцию - поддержание антигенно-структурного гомеостаза нами впервые была исследована активность комплекса дегидрогеназ, участвующих в основных энергообразующих обменных циклах (гликолизе, пен-

тозном цикле, цикле трикарбоновых кислот, альфа-глицерофосфатном цикле и др.) а именно: лактатдегидрогеназы (ЛДГ), сукцинатдегидрогеназы (СДГ), глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г-6ФДГ), альфа-лицерофосфатдегидрогеназы (α-ГФДГ) с целью выяснения их роли в патогенезе ИББ (табл. 2).

Таблица 2

Показатели активности дегидрогеназ в лимфоцитах цыплят, инфицированных патогенными и аттенуированными штаммами вируса ИББ (n=50)

Группы цыплят, инфицированных вирусами ИББ с различным уровнем виру-	Показатели активности дегидрогеназ:			
	ЛДГ (ye)**	СДГ (ye)**	Г-6ФДГ (ye)**	α-ГФДГ (ye)**
<u>Высоковирулентные вирусы</u>				
штамм 52/70	0,173±0,01*	0,158±0,04*	0,177±0,07*	0,129±0,03*
изолят Заводской	0,178±0,03*	0,160±0,06*	0,150±0,05*	0,118±0,02*
изолят Сиявиевский	0,182±0,05*	0,114±0,03*	0,132±0,03*	0,112±0,04*
<u>Аттенуированные (вакцинные) штаммы</u>				
Д-78	0,141±0,07	0,230±0,07	0,202±0,04*	0,202±0,07
Винтерфилд 2512	0,140±0,07	0,234±0,05	0,280±0,05	0,220±0,05
Бюр-706	0,149±0,03*	0,220±0,05	0,213±0,02*	0,213±0,03
228Е	0,147±0,01*	0,218±0,07	0,219±0,03*	0,200±0,06
МВ	0,158±0,02*	0,196±0,02*	0,197±0,05*	0,198±0,05
<u>Контроль</u>				
Интактные цыплята	0,113±0,02	0,268±0,05	0,306±0,03	0,210±0,04
Неинфекционные белки вируса ИББ (инактивированная вакцина)	0,110±0,05	0,281±0,04	0,302±0,06	0,204±0,05

Примечание: * - $p < 0,05$ - достоверные отличия от показателей контрольных групп;
** - ye - условная единица.

При моделировании иммунодепрессии с помощью высоковирулентных вирусов ИББ отмечалось значительное повышение ($p < 0,05$) активности ЛДГ ($0,173 \pm 0,01 ye - 0,182 \pm 0,05 ye$) и снижение ($p < 0,05$) уровня СДГ ($0,114 \pm 0,03 ye - 0,160 \pm 0,06 ye$). Бессимптомная инфекция, обусловленная аттенуированными штаммами вируса ИББ, также сопровождалась сходными изменениями ферментативной активности ЛДГ ($0,140 \pm 0,07 ye - 0,158 \pm 0,02 ye$) и СДГ ($0,196 \pm 0,02 ye - 0,234 \pm 0,05 ye$), хотя эти отклонения от нормы были менее выражены, чем при инфицировании птицы патогенными вирусами. Напротив, и это следует подчеркнуть, контрольное введение инактивированной вакцины, по сути неинфекционных белков вируса ИББ, не изменяло показатели ЛДГ ($0,110 \pm 0,05 ye$), СДГ ($0,281 \pm 0,04 ye$), которые оставались на уровне фоновых значений (ЛДГ - $0,113 \pm 0,02 ye$ и СДГ - $0,268 \pm 0,05 ye$).

Известно, что одним из основных вариантов перераспределения и утилизации фосфорилированной глюкозы является пентозный путь ее окисления. В качестве ключевого фермента пентозного цикла при этом выделяют Г-6ФДГ. В наших наблюдениях было отмечено, что регистрируемый уровень этого фермента у цыплят, инфицированных вирулентными вирусами снижался ($p < 0,05$) примерно в 2 раза (с $0,306 \pm 0,03$ уе в контроле до $0,132 \pm 0,03$ уе в опытной группе), на фоне, как уже указывалось, всплеска ($p < 0,05$) активности ЛДГ (с $0,113 \pm 0,02$ уе в контроле до $0,182 \pm 0,05$ уе в опыте), что можно рассматривать, как факт усиления переработки Сахаров за счет анаэробного гликолиза.

Основным механизмом, по которому можно оценить функциональное состояние лимфоцитов является альфа-глицерофосфатный цикл. Активность этого цикла оценивали по а-ГФДГ.

При ИББ, вызванной патогенными штаммами, наблюдали достоверное падение ($p < 0,05$) активности а-ГФДГ (с $0,210 \pm 0,04$ уе в контроле до $0,112 \pm 0,04$ уе в опытной группе), что свидетельствовало о снижении интенсивности обменных процессов между цитоплазмой и митохондриями в лимфоцитах зараженных цыплят. В то же время у цыплят, иммунизированных живыми вакцинами уровень а-ГФДГ в лимфоцитах ($0,198 \pm 0,05$ уе - $0,220 \pm 0,05$ уе) не отличался от контроля ($0,210 \pm 0,04$ уе). Аналогичный показатель был зарегистрирован и в группе с инактивированной вакциной ($0,204 \pm 0,05$ уе).

При сопоставлении уровня а-ГФДГ с функциональным состоянием; иммунной системы, по данным РТМЛ с КоА, отмечали обратную корреляционную связь, которая выражалась в поэтапном снижении а-ГФДГ в течение двух недель у цыплят, после заражения патогенными штаммами ИББ и синхронном росте активности РТМЛ КоА.

3.1.2. Изучение иммунного статуса птицы серологическими методами.

Известно, что иммунодепрессивные состояния могут проявляться в снижении уровня специфических антител в сыворотке крови цыплят к ряду возбудителей вакцинальных или полевых вирусных инфекций (K.Hirai et al., 1974; P.D.Lukert et al., 2003). Наиболее известным тестом оценки состояния иммунной системы птицы является мониторинг титров поствакцинальных антител к вирусу НБ (W.H.Allan et al., 1972; J.T.Faragher et al., 1974; C.D.Ezeokoli et al., 1990;).

Мы также обратились к этому тесту и проконтролировали с его помощью последствия инфицирования цыплят патогенными и вакцинными штаммами вируса ИББ. В опытах использовали цыплят, предварительно инфицированных (за две недели до основного опыта) вирулентными и аттенуированными вирусами ИББ, которым затем вводили вакцину против НБ из штамма «Ла-Сота». Через две недели у цыплят отбирали сыворотки крови, в которых определяли методом ИФА титры антител к вирусу НБ.

Установлено, что инфицирование цыплят вирулентными вирусами ИББ обусловило наиболее резкое падение ($p < 0,05$) уровня антител к вирусу НБ (до 2060 ± 318 - 2212 ± 453), что можно было расценить, как показатель наиболее выраженной иммунодепрессии. Все аттенуированные штаммы, используемые в

составе живых вакцин также отчетливо ($p < 0,05$) угнетали у подопытной птицы гуморальный иммунный ответ к НБ (снижение титров антител до $6194 \pm 612 - 8791 \pm 300$). Те же показатели в обеих контрольных группах оставались на одинаково высоком уровне: у птицы, получившей только вакцину против НБ - 14698 ± 1032 или иммунизированной предварительно инактивированной вакциной против ИББ - 14743 ± 828 .

На следующем этапе исследовали циркулирующие иммунные комплексы (тест ЦИК), которые обычно обнаруживают в определенном количестве в здоровом организме в результате взаимодействия специфических антител с гомологичными антигенами.

Установлено, что введение здоровым цыплятам патогенных штаммов вируса ИББ приводило к снижению ($p < 0,05$) показателей ЦИК ($84,108 \pm 2,4\% - 84,220 \pm 3,8\%$). В то же время, три другие группы цыплят, получившие, соответственно, аттенуированные штаммы вируса ИББ ($90,627 \pm 2,4\% - 91,324 \pm 2,2\%$), инактивированную вакцину ($90,781 \pm 3,1\%$) и контрольная с интактной птицей ($92,322 \pm 1,8\%$), существенно не различались между собой по содержанию циркулирующих иммунных комплексов в периферической крови.

3.1.3. Патоморфологические характеристики состояния иммунной системы. Основной мишенью не только для патогенных, но и аттенуированных (вакцинных) вирусов ИББ является лимфоидная ткань бursы (Кип Yao et al, 1998). В результате репликации вирусов ИББ в фабрициевой сумке происходят тотальные разрушения иммунокомпетентных клеток. Макроскопически это диагностируется по ярко выраженным признакам воспаления бursы в первые дни болезни, с последующей атрофией органа-мишени, что регистрируется, в частности, и по снижению его весовых характеристик.

При инфицировании цыплят полярными по патогенности штаммами, включая и введение неинфекционных белков вируса ИББ, нам удалось установить, что степень атрофии фабрициевых сумок определяется вирулентными свойствами возбудителя. Так, репродукция высоковирулентных штаммов вируса ИББ в организме восприимчивых цыплят завершалась полной деструкцией бурс, что документировалось рекордно низкими ($p < 0,05$) показателями БИ ($0,80 \pm 0,3 - 0,88 \pm 0,3$ в опыте и $5,44 \pm 0,2$ в контроле).

Все аттенуированные вакцинные штаммы (всего было изучено пять живых вакцин) также обладали способностью вызывать выраженную ($p < 0,05$) атрофию фабрициевых сумок (БИ $1,25 \pm 0,3 - 2,58 \pm 0,2$). Однако степень поражения бурс существенно зависела от степени аттенуации штамма. Например, инфицирование птицы высокоаттенуированным штаммом вируса ИББ (Д-78) сопровождалось меньшими потерями массы бурс (БИ $2,58 \pm 0,2$), в то время как БИ в случае использования низкоаттенуированных вирусов ИББ (228Е и МВ) приближался к показателям штаммов ИББ, изолированных от естественно заболевшей птицы (БИ $1,25 \pm 0,3 - 1,31 \pm 0,2$).

Следует особо выделить, что в группе цыплят, которым вводили инактивированную вакцину против ИББ (второй контроль) бурсальный индекс прак-

тически не отличался от БИ первой контрольной группы, которая объединяла интактную птицу (соответственно $5,35 \pm 0,4$ и $5,44 \pm 0,2$).

3.1.4. Бактериологический метод оценки состояния иммунитета. Комплексную иммунную реактивность птицы оценивали и по тесту коли-клиренс. Суть метода состоит в способности (скорости) иммунной системы птицы освобождаться от референс-патогенного штамма *E.coli*, введенного парэнтерально (В.О.Виноходов, 2000). При этом, если кровь становится стерильной за 24 часа, цыплят или взрослые особи считают здоровыми. У птицы, находящейся в иммунодепрессивном состоянии *E.coli* обнаруживается в течение нескольких (3-7) суток.

Наиболее высокие показатели коли-клиренса отмечали у цыплят, заражённых вирулентными штаммами вируса ИББ ($119,74 \pm 5,4$ час - $138,26 \pm 7,3$ час). Последнее следует рассматривать, как кумулятивный синдром подавления функционального состояния иммунной системы у инфицированной птицы. В меньшей степени иммунодепрессия была установлена при использовании аттенуированных штаммов живых вакцин. В этом случае показатели коли-клиренса напрямую зависели от уровня аттенуации вирусов ИББ. В частности, наиболее ослабленный штамм (Д-78) по коли-клиренсу ($29,97 \pm 4,8$ час) приближался к контрольным цифрам ($29,70 \pm 3,2$ час). Напротив, вакцинные штаммы 228Е и МВ, которые справедливо относят к "горячим", оказывали выраженное деструктивное действие на функционирование иммунитета у привитой птицы, что документировалось длительным, до $78,06 \pm 8,2$ час - $84,76 \pm 7,3$ часов, сепсисом. Показатели коли-клиренса у цыплят, которые получили инактивированную вакцину ($26,64 \pm 1,3$ час), были ниже таковых у интактной птицы ($29,70 \pm 3,2$ час).. Это обстоятельство можно объяснить стимулированием неспецифической резистентности медиаторами иммунитета и цитаминами, присутствующими в составе инактивированной бурсальной вакцины против ИББ (Е.К.Varbour et al., 1998).

3.1.5. Изучение показателей иммунодепрессии у СПФ-цыплят различного возраста на введение живых и инактивированных антигенов вируса ИББ.

Иммуномоделирующее действие патогенных вирусов (штамм 52/70 и изолят Синявинский), аттенуированных штаммов (Винтерфилд 2512 и 228Е) и неинфекционных белков ИББ (инактивированная вакцина) изучали на СПФ-цыплятах 1-21 дня жизни. Одновременно сопоставляли три методики: наличие уровня антител к вирусу НБ, бурсальный индекс (БИ), коли-клиренс с помощью которых отслеживали реакцию иммунной системы у цыплят на инфицирование патогенными и аттенуированными вирусами и на инактивированную вакцину.

Все обследованные инфекционные вирусы отчетливо травмировали иммунную систему СПФ-цыплят всех возрастов, что выражалось в снижении титров антител к НБ на 2-7 \log_2 или в существенном уменьшении массы фабрициевой сумки в 2-9 раз и/или в увеличении ($p < 0,05$) сроков циркуляции па-

тогенной микробной флоры в крови инфицированной птицы (коли-клиренс удлинялся до 146,0 часов).

В тоже время перечисленные показатели оставались на уровне контрольных цифр в группе, где цыплят прививали инактивированной эмульгированной вакциной, что свидетельствовало об отсутствии иммуносупрессивного действия разработанного препарата. Более того, не было отмечено достоверных различий в подгруппе наиболее чувствительных к внешнему воздействию суточных цыплят как по патоморфологическим показателям (БИ), так и по иммунореактивности (коли-клиренс) с группой чистого контроля.

Рассматривая полученные результаты с методических позиций, следует отметить, что наиболее информативным для оценки иммунного статуса птицы оказалось тестирование по БИ и коли-клиренсу.

Таким образом, на основании проведенных исследований с полным основанием можно утверждать, что абсолютно все вакцины против ИББ, содержащие инфекционный материал, пусть даже в виде полностью ослабленных (аттенуированных) штаммов, обуславливают в той или иной степени иммунодефицит. Подтверждение этого положения можно найти и в работах J.C.Muskett et al., 1979; C.D.Ezeokoli et al., 1990; V.N.Vakharia et al., 1994; M.K.Hassan et al., 1996; T.Yamaguchi et al., 1996; Kun Yao et al, 1998; N.Tanimura, J.M.Sharma, 1998; A.Thangavelu et al., 1998; A.F.Abdel Fattah et al., 1999; I.J.Kim et al., 1999; M.Coletti et al., 2001; M.M.Corley et al., 2001; J.J.Giambrone et al., 2001; E.Mundt et al., 2003.

Сравнительное изучение ряда методов тестирования иммунитета показало, что наиболее информативными и вполне воспроизводимыми в лабораторных и даже производственных условиях оказались патоморфологический и бактериологический тесты. С помощью этих взаимодополняющих методов удавалось не только достоверно поставить диагноз иммуносупрессии, но и адекватно определить глубину поражения иммунной системы, т.е. установить качественные характеристики патологического процесса.

Именно эти методы мы рекомендуем для широкой практики, с условием их добротного, профессионального освоения.

Таким образом, результаты проведенных опытов убедительно доказывают, что профилактика ИББ живыми вирусными вакцинами также, как и заражение патогенными вирусами приводит к снижению эффективности иммунного ответа. При этом вторичные иммунодефициты, обусловленные действием иммунотропных вирусов, имели свои особенности. Так заражение цыплят вирусом ИББ приводило как к разрушению лимфоцитов фабрициевой сумки, так и к изменению активности основных обменных циклов в лимфоцитах, обуславливающих нарушение функционального состояния иммунной системы в целом.

Снижение антительного ответа на другие вакцины увеличивало и частоту проявления вторичных инфекций.

В тоже время профилактика ИББ неинфекционными вирусными белками (инактивированные вакцины) препятствовала развитию такого рода побочных

эффектов, что было подтверждено в дальнейшем многолетними наблюдениями в полевых условиях.

3.1.6. Иммунодефицит птиц при ИББ и БМ. Степень иммунодепрессии, вызываемой патогенными штаммами вирусов ИББ («штамм 52/70») и БМ (штамм «Rbj») изучали при заражении СПФ-цыплят в условиях вивария. При этом определяли общее количество лимфоцитов, соотношение Т- и В-лимфоцитов, а также содержание сывороточных иммуноглобулинов.

Из данных, представленных в табл. 3, видно, что после заражения цыплят патогенным вирусом ИББ общее количество лимфоцитов в периферической крови оставалось в пределах физиологических колебаний. Однако, при инфицировании цыплят вирулентным вирусом БМ, а тем более при одновременном введении двух патогенных вирусов БМ и ИББ количество лимфоцитов значительно увеличивалось ($p < 0,05$).

Таблица 3
Содержание лимфоцитов в крови цыплят, зараженных вирусами ИББ и БМ.

Цыплята заражены патогенными вирусами	Содержание лимфоцитов в крови цыплят (%)		
	Общий пул	Т-лимфоциты	В-лимфоциты
ИББ (штамм 52/70)	59,7±3,4	46,2±3,3	21,3±1,9*
БМ (штамм Rb ₁)	76,8±4,2*	59,6±4,8*	28,2±2,6
ИББ (штамм 52/70) + БМ (штамм Rb ₁)	78,4±5,9*	58,3±5,6*	17,6±2,1*
Контроль	62,3±3,8	44,8±3,9	29,6±2,1

Примечание: * - $p < 0,05$ - достоверные отличия от показателей контрольной группы.

Сходные результаты были получены и по Т-лимфоцитарной фракции крови, что, вероятно, объясняется трансформацией Т-лимфоцитов. В то же время количество В-лимфоцитов оставалось в пределах нормы при заражении вирусом БМ (28,2±2,6%), но отчетливо снижалось ($p < 0,05$) при моноинфекции вирусом ИББ (21,3±1,9%) и было еще более выражено при двойном инфицировании вирусами ИББ и БМ. Необходимо отметить, что эти изменения наблюдали при заражении вирусом ИББ суточных СПФ-цыплят. При инфицировании вирусом ИББ цыплят 30-дневного возраста, изменений в содержании В-лимфоцитов не регистрировали.

Количественные показатели Ig А, как при ИББ, так и при БМ инфицировании не изменялись, оставаясь в пределах физиологической нормы (табл. 4). Однако уровень Ig М при ИББ был статистически достоверно ($p < 0,05$) ниже (более чем в 2,5 раза). Следует отметить, что показатели Ig М у птицы при БМ не отличались от контрольной группы. Напротив, при сочетанном заражении вирусами БМ и ИББ наблюдали наиболее значительное ($p < 0,05$) снижение

Ig M (почти в 3 раза). Что же касается иммуноглобулинов класса G, то их содержание в сыворотке крови цыплят, больных БМ ($4,1 \pm 0,32$ г/л) значительно снижалось ($p < 0,05$), а при ИББ инфицировании ($9,8 \pm 1,23$ г/л) повышалось ($p < 0,05$) относительно контрольного ординара. Более высокие показатели Ig G ($10,3 \pm 0,8$ г/л) ($p < 0,05$) были и в группе цыплят, инфицированных вирусами ИББ и БМ.

Таблица 4

Содержание иммуноглобулинов в периферической крови цыплят зараженных вирусами БМ и ИББ.

Цыплята заражены патогенными вирусами	Содержание иммуноглобулинов в периферической крови цыплят (в г/л)		
	Ig A	Ig M	Ig G
ИББ (штамм 52/70)	$0,40 \pm 0,08$	$1,03 \pm 0,22^*$	$9,8 \pm 1,23^*$
БМ (штамм Rb ₁)	$0,43 \pm 0,09$	$2,64 \pm 0,41$	$4,1 \pm 0,32^*$
ИББ (штамм 52/70) + БМ (штамм Rb ₁)	$0,46 \pm 0,04$	$0,87 \pm 0,18^*$	$10,3 \pm 0,81^*$
Контроль	$0,42 \pm 0,12$	$2,58 \pm 0,31$	$6,8 \pm 0,53$

Примечание: * - $p < 0,05$ - достоверные отличия от показателей контрольной группы.

Таким образом, об иммунодефиците состояния птицы, зараженной иммунотропными вирусами (БМ и ИББ) свидетельствовали изменения в лимфоцитарной фракции крови и содержании иммуноглобулинов класса Ig M и Ig G.

3.2.. РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ ПРОИЗВОДСТВА ИНАКТИВИРОВАННОЙ ВАКЦИНЫ ПРОТИВ ИББ ДЛЯ ИММУНИЗАЦИИ ЦЫПЛЯТ И ВЗРОСЛОЙ ПТИЦЫ

В целом разработка технологии изготовления инактивированных вакцин предусматривает поиск и отбор вирусов, наиболее полно отражающих антигенные признаки актуальных эпизоотических штаммов, (1); отработку условий получения наиболее высоких показателей вирусной репродукции при минимальных экономических затратах (2); выбор методов очистки вирусной биомассы (3); выбор инактивантов и условий их применения, гарантировано обеспечивающих полную инактивацию инфекционной активности вирусной биомассы, при наиболее полном сохранении её антигенности и безвредности (4); подбор адьювантов, способных усиливать и многократно продлевать действие вакцины (5). На завершающем этапе необходимо проведение клинико-иммунологических испытаний для определения безвредности и профилактической эффективности вакцины и условий её применения (6) и гарантийные сроки хранения препарата (7).

3.2.1. Отбор штаммов для конструирования инактивированной вакцины.

На роль производственного штамма для наработки инактивированной вакцины против ИББ апробировали вакцинные вирусы, адаптированные к культуре фибробластов куриного эмбриона (штаммы Винтерфилд 2512 и Бюр-706), лабо-

ракторный вирулентный референс-штамм 52/70, активно репродуцирующийся в 9-10-дневных развивающихся СПФ-куриных эмбрионах и в фолликулах фабрициевых сумок цыплят, а также оригинальный авторский штамм - изолят Сиявинский (изолят С), выделенный в 1996 г. из бурс, естественно инфицированных цыплят на птицефабрике Сиявинская (Ленинградская область), где на фоне двукратного применения живой вакцины из штамма ВНИВИП за одну неделю в двух птичниках пало 24,54% молодняка птицы.

Изолят С в дальнейшем сохраняли в виде двух самостоятельных линий: бурсальной и эмбриональной (обозначены соответственно методу культивирования).

Иммунные сыворотки цыплят, полученные через 21-30 дней, после однократного инфицирования их изолятом С, нейтрализовали в РН все доступные нам патогенные и вакцинные штаммы вируса ИББ (52/70, изолят Заводской, Винтерфилд 2512, БГ, 228Е и др.), что свидетельствовало о специфичности выделенного изолята С и отсутствии существенных антигенных различий с известными штаммами вируса ИББ;

3.2.2 Репродукционные характеристики вакцинных штаммов. Выбор наиболее подходящего штамма и определение условий его культивирования для получения производственной биомассы при изготовлении инактивированной вакцины против ИББ базировался на суммарной оценке показателей — инфекционной активности (1); иммунизирующей дозы (2); способности вызывать выработку антител (3); эффективности иммунизации (4).

Из табл. 5 видно, что наиболее высокими производственными показателями и антигенной активностью обладал изолят С. Его производственные и профилактические показатели (инфекционная активность 6,3 lg ИД₅₀, иммунизирующая доза- 4,5 lg ИД₅₀, средний уровень антител 6340 в ИФА и 100% в РДП, эффективность иммунизации- 100%) оказались суммарно выше, чем у ближайшего конкурента - штамма 52/70. Показатели у эмбриональных и культуральных вариантов штаммов 52/70, Винтерфилд 2512 и Бюр-706 были существенно ниже не только по экономическим (производственным) параметрам, но и, что особенно важно, по эффективности иммунизации.

Для определения условий культивирования, позволяющих получать наиболее высокий выход вируса, изолятом С заражали цыплят различного возраста двух кроссов (Хайсекс белый, Ломанн коричневый) и беспородную птицу. При этом были определены оптимальные сроки инкубации вируса и метод инфицирования.

Наиболее высокие титры бурсального антигена удавалось получать только на породистой птице в возрасте 35-40 дней.

Наилучшими способами инфицирования оказались окулярный и интраназальный, при которых удавалось регулярно получать максимальное количество вирусного антигена в бурсальной биомассе (титр антигена в РДП 16).

Оптимальный срок содержания подопытных цыплят от момента заражения до экстракции у них фабрициевых сумок составил четверо суток.

Таблица 5

Характеристика производственных и иммунологических показателей различных штаммов для использования в технологии производства инактивированной вакцины против ИББ.

Оцепочные показатели	Штаммы для накопления производственной биомассы					
	Бурсальный		Эмбриональный		Культуральный	
	52/70	Изолят С	52/70	Винтеф-илд 2512	Винтеф-илд 2512	Бюр-706
Инфекционная активность, Ig	6,0	6,3	6,7	6,8	7,3	7,5
Иммунизирующая доза	4,5	4,5	6,0	6,5	7,0	7,0
Антигенная активность (ИФА)	6180	6340	3340	2864	1186	1228
Антигенная активность (% «+» в РДП)	100,0	100,0	88,7	72,0	58,4	61,2
Эффективность иммунизации (%)	100,0	100,0	99,0	92,0	89,0	91,0

Примечание: Инфекционная активность, иммунизирующие дозы бурсального материала дана в lg ИД50; эмбрионального- в lg ЭИД50; культурального — в lg ТЦД50.

Таким образом, получение бурсального антигена вируса ИББ в технологически необходимых количествах оказалось возможным при соблюдении следующих условий: использование изолята С с минимальным числом пассажей после выделения; заражение цыплят элитных кроссов в возрасте 35-40 дней; двойная инокуляция (окулярно-интраназальная) вирусосодержащим материалом; срок содержания инфицированной птицы после заражения 4 суток.

В дальнейшем при организации и расширении производства инактивированной вакцины против ИББ было подтверждено, что именно эти технологические условия оказались наиболее выгодными и воспроизводимыми при наработке кондиционного препарата.

3.2.3. Методы очистки вирусной биомассы от балластных веществ. Для очистки эмбрионального и бурсального вирусов использовали фреон, хлороформ, сульфат аммония, ПЭГ-6000 и смесь хлороформа с ПЭГ-6000.

Качество очистки контролировали по концентрации белка, изменению инфекционной и антигенной активности вируса, а также эффективности иммунизации.

В итоге наиболее приемлемым оказался ПЭГ-6000, который снижал в эмбриональной жидкости концентрацию невирусных белковых компонентов с 746,8 мг/% до 432,1 мг/% (на 42,14%), а в бурсальном материале с 1442,2 мг/% до 831,9 мг/% (на 42,31%). Ещё более высокие показатели очистки от балластных белков наблюдали при одновременной обработке ПЭГ-6000 и хлороформа. Особенно отчетливо это проявлялось при очистке бурсального материала (снижение белка до 774,1 мг/% или на 46,32%).

В процессе обработки вирусосодержащих материалов существенно повышались их основные функциональные показатели: инфекционная активность (эмбриональная жидкость - с 6,2 до 6,7 lg ЭИД50; бурсальный материал - с 5,8 до 6,3 lg ЭИД50), антигенная активность (эмбриональная жидкость - титр антител с 2198 до 3340 в ИФА и с 82,1% до 88,7% в РДП; бурсальный материал - титр антител с 4008 до 6386 в ИФА) и эффективность иммунизации (эмбриональная жидкость - с 92 до 99%).

При всех методах очистки максимальные показатели были получены с вирусом на бурсальной основе, что послужило дополнительным основанием для их приоритетного использования в дальнейших исследованиях.

3.2.4. Оработка методов инактивации вируса ИББ. Выбор препаратов и условий их применения, гарантировано обеспечивающих полную инактивацию инфекционности вирусной биомассы, при сохранении её антигенной активности и безвредности ограничили тремя известными веществами: формальдегид, димерэтиленимин, теотропин. Инактивацию осуществляли при температуре 37°C. Оптимальные концентрации препаратов и время инактивации изучали следуя принципу «необходимо и достаточно» т.е. последовательно увеличивали дозу и время воздействия инактиванта, начиная с уровня, когда остаточная инфекционная активность вируса ещё определялась, до полной инактивации.

В результате проведенных исследований из трех обследованных препаратов, наиболее пригодными оказались димерэтиленимин и теотропин. При их использовании регулярно удавалось получать неинфекционную вирусную биомассу с наиболее высокими показателями антигенной активности (титр в ИФА 11567-11768).

Оптимальная конечная концентрация для димерэтиленимина была равна 0,2%, а для теотропина 0,1%, при длительности инактивации 24 часа в обоих случаях. Эти условия гарантировали полное устранение инфекционной активности вируса ИББ в тканевых структурах фабрициевых сумок. Инфекционность вируса ИББ, обработанного по такой схеме, не удавалось восстановить ни в одном из многократных повторных наблюдений после пяти последовательных пассажей в СПФ-эмбрионах.

3.2.5. Адьюванты для инактивированной вакцины. Известно, что повышение антигенной активности инактивированных вакцин и, как следствие, пропорциональное усиление их профилактической эффективности возможно с помощью адьювантов, предназначенных для существенного пролонгирования времени рассасывания антигенных белков в месте введения и определенного иммуностимулирующего эффекта.

В нашем случае были апробированы гидроокись алюминия (с добавкой сапонина), аэросил (группа сорбентов) и в различном сочетании Маркол-52, ланолин, орлацел, монтанид ISA 70, вазелин (масла или их производные).

На предварительном этапе считали целесообразным изучить действие различных концентраций сапонина (от 0,5 до 4,0 мг/мл) на антигенную активность инактивированной вакцины против ИББ.

Присутствие сапонина в препарате существенно увеличивало титр специфических антител (с 4469 до 6511) уже через 28 дней после иммунизации. Более того, стимулирующее действие сапонина наиболее выгодно проявлялось в отдаленные сроки после иммунизации. Так при применении препарата без сапонина антитела через 5, 10 месяцев после прививки практически не определялись (592 и <400, соответственно). В то время, как, в группе наблюдения, где вводили вирусный антиген с сапонином титры антител в те же сроки сохранялись на достаточно высоком уровне (5097-5198 и 1823-1874, соответственно).

В результате дальнейших испытаний нескольких экспериментальных серий инактивированной вакцины против ИББ, сорбированной на различных концентрациях гидроокиси алюминия и аэросила, оказалось, что оба сорбента в присутствии 2,0 мг/мл сапонина существенно (в два раза, на 201,57 и 200,75%, соответственно) повышали антигенную активность инактивированной вакцины против ИББ при максимально высоких показателях эффективности иммунизации (100,0%). В то же время положительный эффект сорбентов проявлялся не во всех обследованных концентрациях. Наиболее перспективными оказалось введение в препарат 0,2% гидроокиси алюминия и 1,5% аэросила.

Однако, в сравнительных опытах масляные препараты проявили отчетливо более высокие адьювантные потенции, что документировалось усилением антигенной активности экспериментальных серий инактивированной вакцины, изготовленных с их участием более чем в три раза (302,17 - 305,15%).

В то же время не все испытанные адьюванты оказались безвредными. Так маркол-52 + додецилсульфат натрия, маркол-52.+ ланолин, вазелин + ланолин, вазелин + орлацел вызвали развитие поствакцинальных осложнений, которые выражались, как в местных симптомах (воспаление в месте введения вакцины с покраснением, отеком и, нередко, появлением абсцессов), так и общих нарушениях жизнедеятельности цыплят (повышение температуры тела, снижение двигательной активности, уменьшение потребления кормов, падение прироста массы). Указанные клинические симптомы регистрировали в течение 3-7 дней с момента вакцинации.

Негативные поствакцинальные реакции отсутствовали при использовании маркола-52+орлацел и монтанида ISA 70. Эти адьюванты были введены в состав вакцин при дальнейших исследованиях по доработке их композиционного состава.

3.2.6. Поиск оптимальных условий применения инактивированной вакцины. Учитывая, что цыплята раннего возраста являются наиболее чувствительными к факторам внешнего воздействия, именно на этих возрастных группах были отработаны оптимальные условия применения сорбированных и эмульсионных вариантов инактивированной вакцины.

Использовали несколько групп цыплят в возрасте 1, 3, 5, 7, 10, 13, 15, 17, 20, 25, 30, 35 и 40 дней. Варианты вакцины вводили в объеме 0,3 мл: внутримышечно - грудные и бедренные мышцы, подкожно - в область нижней или верхней части шеи.

В результате было показано, что ни сорбированный, ни эмульсионный препараты, даже если их вводили в первые дни жизни, не нарушали естественное физиологическое развитие цыплят. Более того, при длительном сроке наблюдения (в течение нескольких месяцев) не отмечали каких-либо местных и общих клинических симптомов, которые можно было бы расценить, как поствакцинальные осложнения.

На общем фоне полной безвредности испытуемых вакцин ощутимые различия в равных условиях были получены в отношении антигенной активности и иммуногенности. А именно, антигенные свойства эмульсионной вакцины оказались выше, чем сорбированной и сравнительно более высокими, если эмульсионный препарат вводили подкожно в верхнюю часть шеи цыпленка (титр антител в ИФА после иммунизации 6386). В остальных случаях (апликация в грудную или бедренную мышцы, подкожно в нижнюю часть шеи) титры антител не превышали 5218-5408. Поэтому для птицы всех возрастов рекомендовали вводить эмульсионную вакцину подкожно в верхнюю часть шеи.

Безвредность и реактогенность инактивированной вакцины (использовали эмульсионный бурсальный препарат) дополнительно определяли на СПФ-цыплятах 1, 5, 10 и 20-дневного возраста путем введения им пятикратной дозы вакцины (1,5 см³) подкожно в верхнюю часть шеи или внутримышечно в грудную мышцу. Наблюдения вели в течение 10 суток. За весь период наблюдения на месте инъекции отсутствовали признаки воспаления, и все цыплята оставались живыми, без каких либо клинических признаков заболеваний.

В литературе отсутствуют данные об эффективности инактивированных вакцин для птицы первых недель жизни, обладающих, как правило, в той или иной степени, материнским иммунитетом к вирусу ИББ. В связи с тем, что учет показателей уровня материнских антител в крови цыплят в момент вакцинации живыми вакцинами является ключевым фактором для успешной профилактики ИББ, этому вопросу уделили особое внимание.

Исследовали антигенную активность инактивированной вакцины против ИББ для групп цыплят от 1 до 20 дней жизни, различающихся остаточным уровнем материнских антител к вирусу ИББ в диапазоне от 8986 до 1030.

Полученные результаты доказывали эффективность разрабатываемой нами инактивированной вакцины при применении в любой день, наиболее уязвимого к ИББ периода (1-20 дни) цыпленка, независимо от исходного уровня специфических материнских антител. Об этом свидетельствовали одинаково высокие титры поствакцинальных антител (в ИФА 6124-6408; в РДП 100%), полученные после иммунизации цыплят всех возрастных групп.

Ещё более демонстративными оказались показатели антигенной активности инактивированной вакцины в полярных группах цыплят как по возрасту (цыплята 1-20-сут. возраста), так и по содержанию материнских антител к вирусу ИББ (8864 и 1030, соответственно). У цыплят этих групп через 28 дней после введения инактивированной вакцины антитела к вирусу ИББ были на одинаково высоком уровне (6394 и 6408 соответственно).

Опираясь на представленные результаты можно сделать крайне важное и принципиальное для практики современного птицеводства заключение: молодняк домашней птицы, существенно различающийся по возрастным показателям и колебаниям материнского иммунитета может быть гарантировано защищен от ИББ инактивированной вакциной, так как в ответ на её введение цыплята, независимо от перечисленных условий, способны индуцировать полноценный иммунный ответ.

В пользу выбора бурсального антигена, как наиболее перспективного варианта для конструирования инактивированной вакцины против ИББ свидетельствовали острые опыты, в которых были изучены иммуногенность вакцин, полученных на основе клеток фабрициевых бурс, эмбрионов и клеток монослоя культуры куриных фибробластов.

В результате, максимальная эффективность иммунизации были получена в подгруппах, где использовали образцы инактивированных вакцин с бурсальным антигеном вируса ИББ. Наиболее демонстративной оказалась подгруппа из суточных серонегативных к возбудителю ИББ цыплят. Именно представители этой подгруппы формировали к 15 дню жизни полноценную резистентность к высоковирулентному изоляту Синявинский. Особо следует выделить подгруппу серопозитивных цыплят, которые благодаря материнским антителам к ИББ, и иммунизации в первый день жизни препаратом с бурсальным компонентом, оказались неуязвимыми для патогенного штамма ИББ во время всего периода наблюдения (45 дней).

В другой подгруппе, где применяли инактивированную вакцину на основе вирусной биомассы из куриных зародышей, резистентность цыплят к полевому вирусу ИББ была существенно ниже. Ещё хуже были результаты с вакциной из культурального антигена.

Таким образом, в результате сравнительного исследования трех модификаций вакцин, полученных из бурсального антигена, куриных зародышей и культуры куриных фибробластов, только первый вариант позволял получать надежную защиту серопозитивных цыплят, привитых против ИББ в первые дни жизни.

Важным также представлялся обнаруженный нами и подтвержденный в многочисленных повторных опытах феномен общебиологического свойства - отсрочка снижения уровня материнских антител к вирусу ИББ у цыплят первых пяти дней жизни. Вопреки принятым в мировой практике формулам, для определения даты иммунизации поголовья вакцинами против ИББ с учетом константного периода полураспада материнских антител в это время (с 1 по 5 сутки), мы не только не отмечали двух или более кратного снижения титров антител, но регистрировали даже некоторое их увеличение. И лишь после пятого дня начинался процесс последовательного снижения гуморального иммунитета в соответствии с устоявшимися общепризнанными представлениями.

3.2.7. Определение продолжительности поствакцинального иммунитета.

В опыт по изучению продолжительности сохранения гуморальных антител к вирусу ИББ у птицы, иммунизированной в раннем возрасте (7-10 дней жизни) вместе с разрабатываемыми вариантами инактивированных вакцин (эмульсионный и ГОА препараты на основе эмбрионального и бурсального антигенов) включили также ряд коммерческих импортных и отечественных живых вакцин (Бюр-706, Винтерфилд 2512, Д-78, ВНИВИП) и одну инактивированную вакцину (Гумбориффа, фирмы Мериал).

Результаты отдаленного (16 месяцев) тестирования специфических антител к вирусу ИББ в сыворотке крови привитых цыплят убедительно продемонстрировало преимущество инактивированных вакцин перед живыми. Так, уже через 6-9 месяцев после прививки птиц живыми вакцинами антитела к вирусу ИББ отсутствовали. В группах, иммунизированных инактивированными препаратами гуморальный иммунитет сохранялся на достаточно высоком уровне (до 4878) до конца срока наблюдения (до 16 месяцев). При этом по сравнению с сорбированным препаратом наиболее пролонгировано иммуногенными оказались вакцины, сконструированные на основе эмульсии (титры антител через 12 месяцев- 4218-7288; через 16 месяцев- 2014-4878 и 526 и 400, соответственно).

Среди эмульсионных вакцин выделялся своей стабильно высокой активностью препарат, содержащий бурсальный антиген. Титры антител у цыплят, привитых эмульсионной бурсальной вакциной через 12 месяцев, составляли 7288, через 16 месяцев - 4878. Для сравнения, те же показатели в группе цыплят, привитых эмульсионной вакциной, изготовленной на основе эмбрионального антигена, были 4218 и 2014, соответственно. Сходные данные были получены в группе цыплят, привитых импортной вакциной Гумбориффа (5118 и 2976, соответственно).

Таким образом, наиболее антигенно активной среди всех вакцин взятых в наблюдение (всего испытали 8 препаратов) оказалась инактивированная эмульсионная вакцина, изготовленная на основе бурсального антигена.

3.2.8. Гарантийный срок хранения вакцины. Заключительным этапом разработки технологии изготовления биопрепаратов является определение гарантийных сроков их хранения. Вакцину хранили при +4°C в течение 18 месяцев. Через 1, 6, 12 и 18 месяцев отбирали образцы, - которыми однократно иммунизировали 7-суточных СПФ цыплят. Через 28 день пробы сывороток крови исследовали в ИФА и РДП. Контролировали также устойчивость привитых цыплят к заражению патогенным штаммом вируса ИББ.

При реализации указанной схемы наблюдения были получены следующие результаты: иммуногенные свойства эмульсионной бурсальной вакцины оставались стабильно высокими, как через месяц после изготовления, так и на всем протяжении хранения, в течение 18 месяцев (срок наблюдения). Титры антител у вакцинированных цыплят были 12000 и выше в ИФА, 4,12-4,2 log₂ в РДП, защищенность привитой птицы составляла 100%.

Таким образом, гарантийный период хранения инактивированной вакцины, без снижения её потребительских характеристик составил не менее 12 месяцев.

3.3. КОНТРОЛИРУЕМЫЙ ОПЫТ МНОГОЛЕТНЕГО ПРИМЕНЕНИЯ ИНАКТИВИРОВАННОЙ ВАКЦИНЫ ПРОТИВ ИББ В УСЛОВИЯХ КРУПНОМАСШТАБНОГО ПТИЦЕВОДСТВА

3.3.1. Совместимость прививок инактивированной вакцины против ИББ с другими вакцинами для цыплят. Взаимодействие между живыми и инактивированными вакцинами при иммунизации цыплят, как вариант оптимизации комплексной специфической профилактики молодняка птицы, изучено явно недостаточно.

Для исследования взаимозависимости (в частности, интерференции или иммунодепрессии) между живыми аттенуированными вакцинными вирусами традиционно эксплуатируют модельную пару вакцин против ИББ и НБ. Так как, именно у этих вакцин удачно отработаны информативные методы диагностики протективного ответа, совпадают сроки иммунизации и даже, нередко, методы инокуляции. В нашем исследовании была использована та же пара вакцин.

, На первом этапе провели поиск оптимального сочетания сроков вакцинаций при последовательной иммунизации двумя живыми вакцинами против НБ и ИББ (вариант 1) и ИББ плюс НБ (вариант 2). Наиболее высокий иммунный ответ был получен при одновременном введении цыплятам вакцин против ИББ и НБ (титры антител 9604-9706). В тех случаях, когда иммунизацию против ИББ и НБ проводили в разные дни (интервал между прививками составлял от 0 до 8 дней), наблюдали снижение уровня прироста антител, которое было наиболее выражено в 1-5 дни. Следует отметить, что весьма слабый ответ на вакцину против ИББ регистрировали после предварительного введения препарата против НБ. Напротив, в меньшей степени препараты интерферировали между собой, когда первой использовали вакцину против ИББ. Этот феномен, по видимому, можно объяснить тем, что вирус НБ при репликации в организме цыплят вызывает выработку большего количества интерферона.

На следующем этапе сопоставили результаты одновременной иммунизации инактивированной вакциной против ИББ и живой против НБ или иммунизации этими же вакцинами в разные дни. Разрывы между введениями препаратов также составили 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 и 8 дней. Причем, сходным образом использовали два варианта: в первом случае сначала применяли живую вакцину против НБ, а затем в указанные дни вводили инактивированную против ИББ; во втором случае, наоборот - на фоне первичной иммунизации против ИББ в последующие дни вводили живую вакцину НБ.

Совмещение двух вакцин, одна из которых инактивированная (против ИББ) другая живая (против НБ) не приводило к снижению иммунного ответа.

Титры антител оставались высокими (сопоставимо равными у цыплят в контроле), как к вирусу ИББ, так и НБ во всех группах наблюдения. Такую ситуацию регистрировали, во всех возможных сочетаниях: если вакцину ИББ и НБ вводили одновременно (1), если вакцину ИББ в начале, а затем с интервалом от 1 до 8 дней цыплят той же группы иммунизировали против НБ (2) или, наоборот, когда сначала прививали цыплят живым препаратом против НБ, а потом - иммунизировали инактивированной вакциной против ИББ (3).

Таким образом, полученные результаты свидетельствовали о том, что включение инактивированных вакцин в переуплотненные схемы иммунизации в птицеводческих хозяйствах не приводит к отрицательным последствиям и не имеет противопоказаний, и, более того, является более предпочтительным, поскольку открывает возможность маневра и уменьшает количество обязательных прививок.

Этот вывод документировался тем, что инактивированные вакцины при сочетании с живыми не конкурировали между собой за иммунные клетки-мишени, так как, по видимому, не индуцировали интерферона и, что не менее важно, по механизму реализации не являлись чувствительными к последнему. Это подтверждалось наличием высоких титров специфических антител в крови у цыплят, сравнимых с контрольными цифрами, как у привитых одновременно двумя вакцинами, так и ими же с интервалом 1-8 дней. Важно, что такая тенденция сохранялась независимо от того какой препарат использовали первым. -

3.3.2. Эффективность инактивированной вакцины против ИББ в производственных условиях. Первое испытание инактивированной вакцины было проведено в крайне неблагоприятных эпизоотических условиях на АОЗТ «П/ф Синявинская», расположенной в Ленинградской области.

Заболевание ИББ в острой форме на молодянке кур 2-х месячного возраста началась в цехах Синявинской п/ф в октябре 1996 года. За 23 дня из 284800 голов птиц в двух корпусах от ИББ пало 69895 голов (24,5%).

В последующие 2 месяца болезнью Гамборо было охвачено всё поголовье. Болезнь не удавалось приостановить трехкратной иммунизацией живыми вакцинами ВНИВИП и Бюр-706. Показатели сохранности птицы упали к концу 1996 года до рекордно низкого уровня (до 57,3-58,3%).

За октябрь-декабрь 1996 г. и январь-февраль следующего года в хозяйстве пало 340567 голов или около одной трети от всех посаженных цыплят (29,3%). Прямые убытки только от падежа составили 3375,0 миллионов рублей (в додемонинированном исчислении). Всего потери от болезни Гамборо с учетом всех платежей (без упущенной выгоды), в том числе затрат на проведение профилактических мероприятий по борьбе с заболеванием составили 10235 миллионов рублей.

Для ликвидации энзоотии ИББ на п/ф Синявинская, была применена разработанная нами инактивированная вакцина (впоследствии получившая в РФ торговое название «Авикрон», а на Украине - «Эмульсин»).

На первом этапе было проведено комплексное серологическое и вирусологическое обследование птицы. При этом была подтверждена этиология энзоотии и выделен возбудитель ИББ, который по морфологическим характеристикам не отличался от референтных штаммов. По антигенным свойствам он оказался аналогичным известным полевым штаммам вируса ИББ, а по вирулентности превосходил эталонный штамм 52/70.

Из выделенного вируса были оперативно изготовлены серии инактивированной вакцины по отработанной нами технологии и в середине февраля 1997 года была проведена широкая иммунизация птицы на п/ф Синявинская.

Сохранность привитого молодняка птицы (привито 531000 голов) была увеличена почти на одну треть (на 26,2-28,5%). При этом важно отметить, что клинического или патолого-анатомического проявления ИББ у привитых цыплят не регистрировали.

Начиная с апреля 1997 года и по настоящее время на этой птицефабрике прививали птицу против ИББ только инактивированной вакциной. Суммарно за 1997 г. инактивированной вакциной было привито 1,538 млн. цыплят. Сохранность птицы за 500 дней содержания составила 93,8% против 66,8%, полученных в предшествующие годы.

В итоге, при применении инактивированной вакцины потери составили 95368 голов на 1,5382 млн. птицы (6,2%); при использовании живых вакцин цыплят погибало в 4 раза больше - 385235 гол (33,2%) при содержании меньшего по численности поголовья (1,1606 млн. птицы).

В последующие шесть лет (до 2003 г.), несмотря на исключительно высокую численность и плотность посадок в многоэтажных птичниках, в хозяйстве не было зарегистрировано ни одной вспышки болезни Гамборо.

Кроме того, показатели общей сохранности поднялись с 91,16% до 98,01%, значительно сократилась выбраковка птицы с 45,9% до 1,4%, практически исчезли случаи проявления колибактериоза и микоплазмоза.

Инактивированную вакцину против ИББ применяли на птицефабриках Ленинградской области, в других регионах Российской Федерации (птицефабрики «Заводская», «Красные Зори», «Лаголово», «Томская») и странах СНГ (п/ф «Лусакертская» и «Лусакат», (Армения); «Одесская» (Украина), где также был зарегистрирован рост показателей сохранности и не только молодняка (возраст до 120 дней), но и взрослой птицы (до 500 дня).

Так на п/ф Синявинская яйценоскость последовательно увеличивалась и составляла в 1998 г. - 260,1 (яиц на несушку); в 1999 г. - 260,1; в 2000 г. - 332,2; в 2001-333,7; в 2002-333,7.

Таким образом, по результатам многолетнего (с 1997 года) применения инактивированной вакцины против ИББ на больших по численности группах молодняка птицы с целью предупреждения ИББ, можно сделать вывод не только о ее высокой профилактической эффективности, но и о существенном положительном влиянии на повышение основных производственных показателей (сохранность и яйценоскость) у выращенного взрослого потомства.

3.3.3. Сравнительная заболеваемость, сохранность и продуктивность птицы, вакцинированной в раннем возрасте инактивированной или живой вакцинами против ИББ. В процессе широкой апробации инактивированной вакцины против ИББ нам удалось организовать прямое сопоставление эффективности инактивированной и живой вакцин на птицефабриках Одесской и Ленинградской областей (п/ф «Одесская» и «Заводская»).

На п/ф «Одесская» в 2001 - 2002 гг. в двух птичниках с идентичными условиями содержания и кормления было привито по 21500 цыплят инактивированной и коммерческой живой вакциной против ИББ из штамма 228Е (фирма «Интервет»). Инактивированную вакцину вводили однократно, парэнтерально семидневным цыплятам (первая группа). Живую вакцину выпаивали дважды на 17 и 27 дни жизни цыплят (вторая группа).

Титры специфических антител против ИББ после иммунизации были, одинаково высокими в обеих группах и сохранялись на этом уровне в течение четырех месяцев (срок наблюдения).

Проявление болезни Гамборо не было зарегистрировано в обеих группах. В то же время, во второй группе, получившей прививку живой вакциной сохранность птицы была ниже (падеж за первые 60 дней составил 2709 голов или; 12,6%). Напротив, в первой группе, привитой инактивированной вакциной.за тот же период пало 1224 головы или 5,69%. Основная причина гибели цыплят была диагностирована, как микотоксикоз.

К концу периода наблюдения (14 недель) разница в сохранности между группами составила 2,07% (90,04 и 87,97%, соответственно).

Сходная тенденция была отмечена и при анализе продуктивности птицы. Средний показатель яйценоскости в группах составил 80,82 и 76,22% (разница 4,6%).

Не менее убедительные показатели удалось получить на птицефабрике «Заводская», где сравнивали эффективность выращивания птицы, привитого живой вакциной из «промежуточного» штамма «Винтерфилд 2512» и двумя вариантами инактивированных вакцин (с эмбриональным и бурсальным антигенами) против ИББ. В группы наблюдения входило от 20 до 30 тысяч цыплят. Всего для оценки состояния выращиваемого стада регистрировали 11 показателей, из которых 7 (прирост живой массы в различные сроки, выбраковка, однородность стада и конверсия корма) ранее не изучали.

По итогам наблюдения наиболее выгодно по сохранности и продуктивности на всех этапах выращивания отличалась птица, иммунизированная в первые дни жизни инактивированной вакциной из бурсального антигена. Производственные показатели в группах, вакцинированных живой вакциной, заметно отставали.

Инактивированная вакцина из эмбрионального антигена оказалась непригодной для птиц раннего возраста, поскольку отход цыплят от ИББ в этом случае составлял 48,3%.

У птицы, привитой живой вакциной против ИББ доля болезни Марека в общем объеме падежа составила 23,0%. В группе, получившей инактивированную вакцину гибель от БМ была в 5 раз ниже (4,4%). Собранный нами в Одесской области информация подтверждала ранее полученные сведения об ежегодном последовательном снижении случаев проявления болезни Марека (до 3,0%) на поголовье, привитом инактивированной вакциной против ИББ на птицефабрике Синявинская (Ленинградская область).

Таким образом, получены достоверно более высокие показатели сохранности и продуктивности поголовья, где применяли парэнтерально инактивированную вакцину против ИББ, по сравнению с группами, получившими перорально живые вакцины из штаммов различной степени аттенуации. Кроме того, доказано, что использование инактивированной вакцины против болезни Гамборо у цыплят в раннем возрасте позволяет существенно улучшить эффективность иммунизации против болезни Марека.

3.3.4. Заболеваемость, сохранность и продуктивность птицы, иммунизированной эмульсионной инактивированной вакциной против ИББ в птицеводческих хозяйствах мясного направления. В 2002-2003 гг. были проведены опыты по оценки эффективности применения одной живой из штамма «БГ» и двух инактивированных вакцин Авикрон-1 ИББ (моновалентная против ИББ) и Авикрон-2 ИББ+НБ (ассоциированная против ИББ и НБ) на птицефабрике Староминская (Краснодарский край), специализирующейся на выращивании бройлеров (кросс Ск-Русь).

При выращивании большого поголовья бройлеров (до 2,912 миллионов голов) было показано, что применение инактивированных вакцин позволяет получать достоверно более высокие экономические показатели по индексу продуктивности по сравнению с традиционно используемыми живыми вакцинами.

Таким образом, в результате многолетнего применения инактивированной вакцины против ИББ «Авикрон» в условиях крупномасштабного производства, была доказана безопасность и эффективность иммунизации цыплят яйценоских и мясных кроссов всех возрастов, совместимость с другими вакцинами, эффективность использования вакцины на любом эпизоотическом фоне, с предсказуемым стабильно воспроизводимым, длительным (до 1,5 лет) профилактическим эффектом, отсутствие поствакцинальных реакций и феномена иммуносупрессии, повышение эффективности других антиинфекционных препаратов, существенное снижение потребления антибиотиков, исключение потенциальной возможности попадания в хозяйства патогенных возбудителей - возможных контаминантов живых вакцин, повышение стабильности работы и рентабельности предприятия, за счет повышения сохранности птицы и выращивания здорового потомства с высокой продуктивностью.

Серийное производство вакцины «АВИКРОН» против ИББ, начатое в 1997 году в ООО «Кронвет», постоянно расширяется. В первый год было наработано и применено в хозяйствах РФ 1,917 млн. доз вакцины, в 2003 г. - 10,730

млн. доз вакцины. Всего за все 7 лет было реализовано 47,9795 млн. доз разработанной нами вакцины.

3.4. ИНАКТИВИРОВАННАЯ АССОЦИИРОВАННАЯ ВАКЦИНА ДЛЯ ИММУНИЗАЦИИ ЦЫПЛЯТ И ВЗРОСЛОЙ ПТИЦЫ

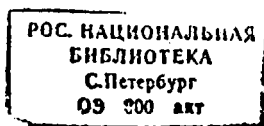
Проблему инфекционной патологии в промышленном птицеводстве оказалось возможным решать более эффективно с помощью неинфекционного вакцинного препарата, полностью лишённого известных недостатков живых вакцин, что и было нами обосновано в моновалентном варианте вакцины против ИББ (раздел 3.3.). Поэтому логичным развитием настоящего исследования стала разработка ассоциированной вакцины, предотвращающей распространение актуальных инфекционных заболеваний в современном промышленном птицеводстве, таких как НБ, ИБК, ИББ, РВТ, ССЯ-76, ПМВ-2 и РМП.

3.4.1. Разработка технологии производства инактивированной ассоциированной вакцины. Большинство технологических этапов были отработаны на модели препарата против ИББ и оказались вполне пригодными для изготовления поликомпонентных препаратов. Особенности технологии касались главным образом получения вирусной биомассы и определения оптимального соотношения компонентов, входящих в состав вакцин. Производственные штаммы для наработки инактивированной ассоциированной вакцины против НБ, ИБК, ИББ, РВТ, ССЯ-76, ПМВ-2 и РМП селекционировали по показателям продуктивности из коллекций вирусов ФГУ ВГНКИ или ООО «Кронвет». Использовали общепринятые условия культивирования. Минимально необходимые объемы и активность антигенов в готовом препарате устанавливали в многократных повторных наблюдениях на цыплятах и взрослой птице различных возрастов.

3.4.2. Изыскание оптимальных условий применения инактивированной ассоциированной вакцины «АВИКРОН». На следующем этапе были проведены клинико-иммунологические испытания ассоциированной инактивированной вакцины для цыплят различного возраста и взрослой птицы. Учитывая, что цыплята раннего возраста наиболее чувствительны к различным препаратам, именно на них были отработаны оптимальные условия применения ассоциированной вакцины.

Установлено, что вакцинация групп цыплят в возрасте 1, 3, 5, 7, 10, 13, 15, 17, 20, 25, 30, 35 и 40 дней жизни не нарушала их естественного физиологического развития. После иммунизации, не отмечали каких-либо местных и общих клинических симптомов, которые можно было бы расценить, как поствакцинальные осложнения. При этом местом введения вакцины, в том числе и по технологическим соображениям, была выбрана верхняя часть шеи (подкожная аппликация), объем от 0,3 см³ до 1,0 см³.

Для сравнительного изучения иммуногенных свойств вакцины «Авикрон» были изготовлены монопрепараты (Авикрон-1) с одним из перечисленных



антигенов: ИБК, НБ, НББ, РВТ, ССЯ-76, РМП, а также ассоциированная вакцина Авикрон-6, содержащая в равном количестве шесть упомянутых антигенов.

Под наблюдением находились 96 цыплят 90-суточного возраста, которых распределили в 8 групп по 12 цыплят в каждой. Птице шести опытных групп вводили моновакцины «Авикрон-1». Цыплята седьмой опытной группы были вакцинированы 6-ти компонентным препаратом Авикрон-6. Восьмая группа интактных цыплят служила контролем. Цыплята всех групп содержались в идентичных условиях.

В момент иммунизации, а затем через каждые 30-31 сут, у цыплят отбирали образцы сыворотки крови и одновременно исследовали в ИФА или РТГА.

Испытуемые моно- и ассоциированная вакцины индуцировали у цыплят высокие титры антител к соответствующим возбудителям уже через 30 сут после введения. Фундаментальным представляется факт адекватного антительного ответа на антигены, включенные в состав как ассоциированных, так и в моновалентные формы препаратов. Следовательно, при парэнтеральной иммунизации птицы одновременно несколькими антигенными белками, объединенными в составе вакцины Авикрон-6, удавалось создать полноценный иммунитет одновременно к нескольким возбудителям инфекционных болезней.

Отслеживая динамику изменения титров антител в течение года, установили, что высокие показатели иммунитета сохранялись длительное время и при этом достоверной разницы в группах цыплят, получивших моновакцины (Авикрон-1) или ассоциированную вакцину (Авикрон-6), не наблюдали. Аналогичные результаты были получены и с введенным позже в состав вакцины парамиксовирусом второго серотипа (ПМВ-2).

По нашим данным вакцину Авикрон можно безопасно и эффективно использовать в любом возрасте, начиная с первого дня жизни цыпленка. Однако, для цыплят раннего возраста наиболее актуально применять вакцину из четырех антигенов ИББ, НБ, РВТ и РМП. В то же время взрослую птицу предпочтительнее иммунизировать ассоциированной вакциной Авикрон в возрасте 90-120 дней, при одном обязательном условии - не позже, чем за один месяц до начала яйцекладки.

Среди рекомендуемого антигенного состава вакцины особо следует выделить информацию о протективном компоненте НБ. При применении инактивированной вакцины с данным антигеном для защиты цыплят в хозяйствах, расположенных в зонах острого эпизоотического неблагополучия по ньюкаслской болезни, желательнее проводить дополнительную прививку живой вакциной против НБ. Благодаря разному механизму реализации иммунного ответа, инактивированная и живая вакцины создают более прочный барьер (комплекс местного и гуморального иммунитета) на пути распространения полевых штаммов вируса ньюкаслской болезни. Важно, что профилактическую работу с помощью живой и инактивированной вакцин можно успешно проводить одновременно или последовательно в любые выбранные сроки.

Имеет определенные особенности процедура профилактики ИБК с применением инактивированной вакцины. В этом случае, в предлагаемой нами схеме профилактики для птицы раннего возраста предусматривается обязательное однократное применение живой вакцины, а лишь затем или одновременно введение инактивированной вакцины «Авикрон» с антигеном ИБК.

Таким образом, результаты исследования свидетельствовали о возможности совмещения в одной инактивированной вакцине нескольких (до шести) антигенов, принадлежащих возбудителям актуальных инфекционных заболеваний птиц.

Производство ассоциированной инактивированной вакцины Авикрон было начато в 1999 году и продолжается до последнего времени. Соответственно по годам было наработано 1999 г. - 0,5907, 2000 г. - 2,4356, 2001 г. - 3,152, 2002 г. - 4,538, 2003 г. - 7,1904 млн. доз вакцины. Всего за 5 лет выпущено **17,9067** млн. доз данного препарата.

Инактивированные вакцины «Авикрон» в практических условиях подтвердили свою безвредность и высокую иммуногенность тем, что стабилизировали эпизоотическую ситуацию в ряде птицеводческих хозяйств, снизив также частоту вторичных инфекций и существенно улучшив рентабельность производства. Так, в последние годы показатели сохранности птицы на крупнейшей птицефабрике Европы «Синявинская» к 500 дню жизни птицы, по данным журнала «Poultry International» и официальной отчетности составили 97-98%, а продуктивность до 335 яиц на несушку в год.

3.5. РЕАКЦИЯ ДИФФУЗИОННОЙ ПРЕЦИПИТАЦИИ ДЛЯ ТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ЦЕЛЕЙ И ДИАГНОСТИКИ ИББ В ПРОМЫШЛЕННОМ ПТИЦЕВОДСТВЕ.

3.5.1. Разработка технологии получения компонентов и методики постановки реакции диффузионной преципитации. В последние годы в ветеринарной практике наибольшую популярность приобрел иммуноферментный анализ (ИФА). Вместе с тем, этот метод, обладая рядом бесспорных достоинств, требует дорогостоящего оборудования и расходных материалов (P.D.Lukert, Y.M.Saif, 2003).

Кроме того, практически все известные коммерческие ИФА-наборы специализированы на выявлении специфических антител. В то же время, нередко, для расшифровки эпизоотической ситуации в хозяйстве, а в нашем случае и для осуществления технологических контролей в процессе изготовления вакцин против ИББ наиболее ценной является оперативная информация о количественном определении специфического антигена. Мы полагали, что таким методом может стать предельно простая многоцелевая (выявление антител и антигенов) реакция диффузионной преципитации.

Однако, в классическом исполнении указанный метод требовал существенной модификации, как в отношении повышения его чувствительности, так и

в отработке условий его применения и накопления исследовательского материала для интерпретации получаемых результатов и формулирования практических рекомендаций.

В качестве положительного антигена ИББ для РДП из всех обследованных вариантов (эмбриональный, культуральный и бурсальный) предпочтение было отдано материалу из бурс цыплят, инфицированных высоковирулентным изолятом Синявинский вируса ИББ. При этом задействовали ранее отработанную технологию накопления и инактивации антигена для инактивированной вакцины против ИББ.

Положительную сыворотку крови получали путем иммунизации СПФ-кур вирусом ИББ по разработанной нами схеме.

За период наблюдения (36 месяцев) не регистрировали снижения функциональной активности, как образцов бурсального антигена, так и положительных сывороток, что позволило установить срок годности тест-наборов 24 месяцев со дня изготовления.

3.5.2. Отработка методики практического применения реакции диффузионной преципитации. Нам удалось выяснить, что диагностические полосы преципитации образуются в агаре между лунками с испытуемыми гомологичными пробами, только тогда, когда активность антигенов и антител находятся в оптимальных соотношениях. При этом число видимых линий преципитации соответствует числу пар антиген-антитело в исследуемой системе. В противном случае, использование в реакции хотя бы одного из основных компонентов в несбалансированном разведении (иначе в слишком активном виде) не позволяет получать диагностических полос преципитации, даже в случае гомологии пары антиген-антитело. Вероятно, более слабый компонент реакции не способен под давлением более активного диффундировать за пределы лунки с испытуемой пробой. В этом случае линия преципитации, даже если образуется, остается невидимой на границе агара и лунки со слабым компонентом. Для повышения диагностической чувствительности РДП мы предлагаем проводить предварительное шахматное титрование компонентов, что гарантировано обеспечивает максимальную специфичность, чувствительность и воспроизводимость реакции.

Определение антител в РДП. Используя оптимальные соотношения компонентов, в РДП было проверено около 800 сывороток с различным содержанием антител к вирусу ИББ. Параллельно эти сыворотки были изучены всеми доступными нам серологическими методами (ВИЭФ, РАЛ, ИФА). Наиболее чувствительным, как и ожидалось, оказался ИФА (100% положительных случаев). В РДП определяли антитела примерно в половине случаев (51,1%). Другие серологические методы заняли промежуточное положение (ВИЭФ - 63,8%, РАЛ-98,6%).

Для того, что бы получить более точное представление о корреляции показателей, регистрируемых в РДП и ИФА, исследовали большие по численности пулы сывороток крови, собранных у птицы различного возраста на 22 птицефабриках РФ.

При анализе результатов создалось впечатление, что корреляция между данными, полученными в этих серологических реакциях, отсутствует. Разброс между РДП и ИФА в разных хозяйствах составил от 8,3 до 29,7%. Однако, после перераспределения сывороток в 8 групп с последовательно синхронно увеличивающимися в обеих реакциях титрами антител, оказалось, что четкая взаимосвязь в показателях РДП и ИФА все же прослеживается (табл. 6). Так сыворотки в пуле 1, не прореагировавшие в РДП (титр 0), в ИФА имели титры до 563. Сыворотки из пула 8 с максимальным уровнем антител в РДП (титр 64) также отвечали в ИФА с наивысшими показателями (титры 21864-38512) Такие же корреспондирующие соотношения при сопоставлении данных РДП и ИФА прослеживали и во всех других пулах сывороток.

Таблица 6

Соотношение титров антител к вирусу ИББ в сыворотках крови домашней птицы полученных при параллельном исследовании в РДП и ИФА.

Пул сывороток с соответствующими титрами антител к вирусу ИББ в РДП и ИФА	Количество сывороток в пуле*	Титры антител в сыворотках крови птицы к вирусу ИББ, полученные в	
		РДП	ИФА
1	986	0	0-563
2	1564	цельная	496-1184
3	2452	2	1030-2458
4	2184	4	2654-4081
5	892	8	3750-8115
6	304	16	7863-12140
7	186	32	14035-19680
8	112	64	21864-38512
Всего обследовано	8680	0-64	0-38512

Примечание: * - сыворотки, объединенные в пулы (группы) в зависимости от титра антител к вирусу ИББ, были исследованы раздельно.

Наиболее диагностически ценным из всего спектра сывороток считали пул 2. Известно, что птица с титрами антител в ИФА 500 и выше приобретает невосприимчивость к инфицированию полевыми штаммами вируса ИББ и именно эта группа сывороток, как оказалось, положительно реагирует в РДП в неразведенном (цельном) виде.

Полученную информацию использовали, как базовую для разработки экспресс-теста определения антительного ответа цыплят, привитых инактивированной вакциной и оценки восприимчивости птицы к естественному инфицированию ИББ.

В результате было установлено, что если более 50% сывороток крови цыплят в отдельно взятом стаде, реагируют положительно в РДП в цельном (неразведенном) виде (что соответствует среднему титру в ИФА 718 ± 103), то эта птица невосприимчива к естественному или лабораторному заражению высоко-

вирулентными штаммами возбудителя ИББ и не нуждается в дополнительной защите от ИББ.

Напротив, если положительно реагируют в РДП менее 50% сывороток (что соответствует в ИФА среднему титру 284 ± 69), то такая птица может быть потенциально заражена полевым вирусом ИББ и требует срочной иммунизации.

Определение антигена вируса ИББ в РДП. Авторский вариант РДП разрабатывали, главным образом, для экспресс-выявления вирусного антигена в тканях бурс цыплят, используемых в технологии изготовления инактивированных вакцин против ИББ и патологическом материале от больной и павшей птицы.

Для реализации поставленной задачи на первом этапе была отработана методика подготовки антигена к исследованию в РДП. Использовали гомогенат фабрициевых сумок (5-10 штук) от экспериментально зараженных, больных или павших цыплят, который после трехкратного замораживания и оттаивания центрифугировали. Пробу надосадочной жидкости исследовали в РДП.

При постановке РДП в варианте поиска антигена ИББ мы убедились не только в высокой чувствительности и специфичности метода, но и обратили внимание на то, что положительная сыворотка выявляет в реакции только патогенные полевые вирусы. Такая закономерность прослеживалась как в лабораторных условиях, так и при работе в птицеводствах. Вакцинные штаммы, полученные в тканевых культурах, СПФ-эмбрионах или выделенные из бурс иммунизированных цыплят не определялись в РДП, тогда как четко диагностировались другими серологическими тестами. Более того, РДП с указанными вирусами была отрицательной даже после их 100-кратной концентрации.

Впервые обнаруженный нами феномен отсутствия преципитиногенов у аттенуированных штаммов, широко используемых в составе живых вакцин против ИББ, был предложен для дифференциальной диагностики энзоотии в птицеводстве. Иными словами, если в РДП удастся выявить антиген ИББ, это свидетельствует о циркуляции в хозяйстве полевых вирусов, так как вакцинные штаммы этим методом не определяются.

Таким образом, нами разработана новая модификация РДП, как простой воспроизводимый метод контроля качества инактивированных вакцин, экспресс-диагностики антител и антигенов вирусов ИББ с целью оперативной оценки иммунного статуса поголовья или распространения патогенных штаммов ИББ в птицеводствах.

Раздел работы был завершён внедрением этого метода в широкую практику в РФ и на Украине. Свидетельством диагностической информативности «Набора антигенов и сывороток для выявления специфических антител и антигена вируса инфекционной бурсальной болезни в реакции диффузионной преципитации Биотест-РДП» может быть список из 64 персональных или корпоративных потребителей, использующих его для технологических, диагностических или научных целей среди которых Всероссийский государственный научно-исследовательский институт ветеринарный препаратов и кормовых добавок,

Державний науково-дослідний контрольний інститут ветеринарних препаратів та кормових добавок (Україна, Львів), Всеросійський науково-дослідницький ветеринарний інститут птицеводства (ВНІВІП, Г.Ломоносов), Курська біофабрика, ветеринарні лабораторії областей і автономних республік.

3.6. ИНФЕКЦИОННАЯ АНЕМИЯ ЦЫПЛЯТ В ПРАКТИЧЕСКОМ ПТИЦЕВОДСТВЕ РОССИИ

Схожість деяких симптомів ІАЦ з іншими імуносупресивними вірусними інфекціями цыплят і, перше за все з клінікою ІББ, а також відсутність діагностических тест-систем, довге час не дозволяли практическим спеціалістам однозначно судити про її циркуляцію в птицеводстві РФ.

В 2000 році в ході організованого багаторічного моніторингу (1996-2002 гг.) за епізоотическою ситуацією на п/ф Синявінська м. стали учасниками дослідження причини вибуху інфекційної хвороби неясної етіології. Хвороба супроводжувалася смертю 1,2-1,5% молодят пташки в віці 1-1,5 місяця на 5-7-ий день від появи перших клініческих ознак. У померлих цыплят відзначали блідість гребня, кілюва, кінцівок, крововиливи в м'язах груди, голени, бедер і крильов. Характерним при відкритті були атрофія фабричесвої сумки і тимуса. Рідше виявляли збільшену печінку, нирки. Особливу увагу привертало істотне змінення кольорової гамми кісткового мозку від червоно-розового до блідо-жовтого або навіть темно-сірого. Крім того, в фабричесвої сумці, як правило, спостерігали відкладення сгустков фібрину.

Для встановлення діагнозу був використаний комплекс методів, включаючий епізоотологіческі, клініко-імунологіческі, патологоанатоміческі, серологіческі і вірусологіческі приєми. Був виділений вірус, який за морфологіческіми властивостями і серологіческими даними повністю відповідав описаному в літературі характеристикам збудителя ІАЦ.

Спеціальних профілактических заходів після встановлення етіології хвороби на птицеводстві Синявінська не проводили. За погодженням з адміністрацією підприємства почали поголовну імунізацію цыплят перших днів життя інактивованою вакциною проти ІББ, перші спроби по створенню якої були початі в ООО «Кронвет».

При цьому опирались на три базових аргумента:

- за літературними даними відомо, що антитіла до збудителя ІАЦ у бурсектомованих цыплят не виробляються і хвороба протікає в особливо важкій формі; за нашими багаторічними спостереженнями, стало очевидним, що імунізація цыплят в ранньому віці інактивованою вакциною проти ІББ не тільки перешкоджає поширенню основної хвороби в стаді, але і сприяє збереженню фізіології імунної системи пташки, в частности, повноцінному функціонуванню фабричесвої бурси; вірус ІАЦ нано-

сит наибольший ущерб, при сочетании инфицировании птицы с возбудителем ИББ.

В итоге, как мы и предполагали, профилактика ИББ с помощью инактивированной вакцины, способствовала снижению заболеваемости ИАЦ. Эффективность данного приема была положительно оценена и в ряде других птицеводств, где также удавалось предупредить распространение ИАЦ, которое ранее наносило существенный экономических ущерб.

Кроме того, вполне вероятно, что часть неудовлетворительных результатов вакцинации против ИББ, регистрируемых в птицеводствах РФ, может быть следствием ассоциированных вирусных инфекций, среди которых сочетание ИАЦ + ИББ получило достаточно широкое распространение.

Полученная информация о циркуляции ИАЦ в отечественном птицеводстве обуславливает необходимость пересмотра ряда положений в ранее принятой тактике вакцинопрофилактики:

- следует рассматривать появление ИАЦ в хозяйстве, как ассоциированную с ИББ инфекцию, так как последнее заболевание распространено повсеместно;

- для стабилизации эпизоотической ситуации в этом случае предпочтительно использовать инактивированные вакцины против ИББ, так как известно, что живые вакцины, в отличие от инактивированных, основательно разрушают функциональные клетки бурс, в результате специфические антитела, играющие ведущую роль в защите от ИАЦ, не вырабатываются или синтезируются недостаточно и ИАЦ беспрепятственно распространяется и протекает в тяжелой форме.

- если масштабное использование инактивированных вакцин против ИББ невозможно, хозяйствам следует рекомендовать проводить иммунизацию против ИАЦ, как дополнительное, но необходимое мероприятие.

3.7. ИММУНОПРОФИЛАКТИКА БОЛЕЗНИ МАРЕКА

В современном птицеводстве широко распространены три вирусные инфекции, которые можно рассматривать, как единую группу, в которой ведущим объединяющим проявлением является поражение иммунной системы цыплят со стойкими иммунодепрессиями и, соответственно, негативными экономическими последствиями для производства. Это вирусы ИББ, ИАЦ (рассмотрены выше) и БМ. Иммунопрофилактике болезни Марека посвящен завершающий раздел исследования.

Прежде чем рассмотреть вопросы современной специфической профилактики БМ, следует отметить, что синергизм поражений, вызванных тремя иммунодепрессивными вирусами имеет ярко выраженный характер и проблема эпизоотического благополучия может быть решена только в комплексе, т.е. неудача в профилактике одной из инфекций этой группы, например ИББ, немедленно осложняет ситуацию с БМ, даже если вакцинация против последней была проведена профессионально безупречно, с учетом последних рекомендаций.

Это положение хорошо иллюстрируется результатами заражения цыплят патогенными вирусами БМ, ИББ и ИАЦ в виде моно-, ди- и три инфекции. В опыте четко прослеживалось, как при переходе от моно- к ассоциированным инфекциям, умножается поголовье павшей птицы. Раздельное инфицирование БМ, ИББ, ИАЦ приводило к гибели цыплят 45,3, 31,3 и 4,7%, соответственно. Наиболее драматичным по числу погибших цыплят было сочетание БМ + ИББ (80,7%). Возбудитель ИАЦ также способствовал массовой гибели цыплят, как при сопровождении вирусом ИББ (60,7%), так и в присутствии вируса БМ (65,3%). Репродукция в организме цыплят сразу трех иммунодепрессивных вирусов практически не оставляло шансов на выживание (92,0%).

Такая ситуация выстраивается скорее всего из-за тяжелого поражения иммунной системы цыплят. Ранее, в результате скрининга ряда иммунологических методов, мы показали, справедливость этого суждения для ИББ.

Существует декларативное предположение, что вирусы БМ, репродуцируясь в макроорганизме также включают патогенетический механизм, расстраивающий функциональную слаженность иммунной системы (ущербность В- и Т- клеточных реакций). Однако в доступной литературе нам не удалось обнаружить экспериментальных данных, подтверждающих эту позицию и, тем более, сведений по диагностике функциональных состояний обозначаемых, как иммунодепрессии при и после БМ.

В то же время перспектива содержания птицы (эпизоотические события, частота и тяжесть заболеваний в стаде, вторичные инфекции, экономические показатели роста и продуктивности) в результате инфицирования вирусами БМ также, как и в случае с ИББ, могут быть спрогнозированы диагностикой выраженности иммунодепрессивного отягощения. Нам удалось, используя метод коли-клиренса, получить достоверные сведения не только о факте иммуносупрессии при БМ на функциональном уровне, но и проследить развитие этого процесса в динамике.

СПФ-цыплят 1-дневного возраста заражали вирулентными штаммами БМ (ЗК, Конкур, Rb 1, изолят Тверской) и через 1, 5, 7, 10, 15 и 20 дней проводили тестирование по коли-клиренсу. Неинфицированные цыплята освобождались от культуры референс-патогенного штамма E.coli, введенного парэнтерально, в весьма короткие сроки (через 24,3-36,3 часов). Такие же показатели были отмечены в первые сутки после заражения цыплят патогенными вирусами. В дальнейшем ситуация последовательно ухудшалась во всех опытных группах. Феномен длительной септицемии начал отчетливо прослеживаться с пятого дня наблюдения и показатель коли-клиренса максимально вырос к 10 дню (в среднем до 140 часов) и оставался на высоком уровне весь период наблюдения (до 20 дня). Для сравнения коли-клиренс, у цыплят инфицированных патогенными вирусами ИББ 120,3-137,8 часов.

Таким образом, впервые удалось получить экспериментальное подтверждение выраженного снижения функциональной активности иммунной системы у птицы при инфицировании вирулентными штаммами БМ, с одной сторо-

ны, и возможность осуществлять диагностический мониторинг, фиксируя иммунодепрессивное состояние в стаде, как результат неблагополучия по БМ, с другой.

Переходя к собственно вакцинопрофилактике БМ, следует заметить, что это одна из сложнейших проблем современного птицеводства. Стабильность защитного эффекта применяемых вакцин зависит прежде всего от функциональной состоятельности иммунной системы, что было подтверждено результатами многолетних (1996-2003 гг.) наблюдений с низкой заболеваемостью БМ на крупнейшей птицефабрике Европы (Синявинская) на фоне применения инактивированной вакцины против ИББ.

Нам удалось выявить и другие базовые механизмы, постоянно регистрируемого (циклического характера) снижения эффективности коммерческих в принципе кондиционных вакцин против БМ. В частности установлено, что повторное в течение нескольких лет использование в хозяйстве вакцин против БМ одного штаммового состава в конечном счете неизменно приводит к высокой заболеваемости с драматическими экономическими итогами, хотя сами вакцинные штаммы для СПФ-цыплят остаются неизменно высокоиммуногенными.

Для того чтобы выяснить закономерности сложившейся ситуации с вакцинопрофилактикой БМ и заранее упреждать негативные последствия, в том числе и экономического характера, связанные с неудачной массовой иммунизацией птицы, мы организовали комплексное исследование эффективности различных вакцин против БМ (FC-126, ВНИВИП, SBi). При этом использовали цыплят, полученных от родителей, иммунизированных различными в штаммовом отношении вакцинами против БМ. При этом оказалось, что даже высокоэффективная вакцина из штамма ВНИВИП (серотип 1) не обеспечивала 100% защиту у цыплят, если их родители были иммунизированы аналогичной вакциной, а вакцинируемое поголовье имело антитела в крови той же специфичности. Напротив, если вакцина из штамма ВНИВИП попадала в организм цыплят, родители которых были в прошлом иммунизированы гетерологичными штаммами (FC-126 или FC-126 + SB_i), то её иммуногенность поднималась до максимальной (100%) отметки. То же заключение можно сделать и по другим вакцинным штаммам.

При проведении этого цикла исследований нами была впервые разработана и внедрена в широкую практику в Российской Федерации вакцина из апатогенного штамма ВНИВИП (серотип 1) и бивалентная вакцина из штамма ВНИВИП +FC-126 (ТУ 10.09-56-90). Аналогичный состав вакцины в последующем был внедрен и на территории Украины (ТУ 24.4-20078518-586-2001).

Важность полученных данных, на наш взгляд, имеет уровень академического характера. Известно, что суточные цыплята в крови содержат родительские антитела к достаточно большому перечню вирусов, в том числе к возбудителю БМ. Однако, фон родительских антител и его значение, в противоположность проблеме ИББ, где обязанности ветеринарных специалистов расписаны в деталях, никогда не принимался во внимание при профилактике БМ.

В хрестоматийном для промышленного птицеводства случае с живыми вакцинами против ИББ проблему родительских антител принято решать отсроченной иммунизацией. Наиболее благоприятный день для введения вакцины рассчитывается по специально разработанным формулам, определяющим темпы падения антител к вирусам ИББ. «Час X» считается оптимальным, когда титры антител снижаются до уровня пробиваемого аттенуированными вакцинами вирусами, но ещё есть некоторая уверенность, что птица не успела заразиться полевыми штаммами.

Полную противоположность событий мы наблюдаем с БМ. При БМ патогенетический механизм наращивания иммунной защиты (интерференция) весьма сходен с иммунизацией человека или животного, инфицированного вирусом бешенства (конкурентная оккупация чувствительных клеток мишеней по принципу «кто быстрее»). Поэтому, учитывая, что вакцина против БМ защищает только при наиболее раннем введении (в первые часы жизни цыплят), а невосприимчивость птицы формируется по нашим данным только к 5-14 дню на фоне интенсивной диссеминации, даже ослабленных вакцинных вирусов БМ' (также по нашим данным), прием отсроченной иммунизации здесь не приемлем.

Для того, чтобы в такой ситуации избежать периодических провалов в профилактике БМ, мы предложили ввести в повседневную практику птицеводства принципиально другой подход, предусматривающий график обязательной ротации вакцинных штаммов БМ в каждом хозяйстве. Новый методический прием, не требующий дополнительных затрат, как в случае с ИББ предусматривает только контроль за соблюдением базового правила - родительское стадо и продуктивное поголовье должно быть привито вакцинными штаммами, принадлежащими к разным серотипам вируса БМ. Кроме того, как на родителях, так и на потомстве вакцинные штаммы необходимо менять не реже, чем через 3-5 лет.

Наш последующий опыт показал, что те хозяйства, которые проводят профилактику БМ в рамках нашего нововведения, стабильно получают дополнительную экономическую прибыль, благодаря низкой заболеваемости БМ.

В ходе выполнения настоящего исследования была обоснована также экономическая целесообразность вакцинации бройлеров против БМ.

4. ВЫВОДЫ

1. В результате сравнительного изучения широкого спектра иммунологических методов в условиях искусственно индуцированной иммунодепрессии для оценки функционального состояния иммунной системы домашней птицы отобраны наиболее информативные и доступные (бурсальный индекс и коли-клиренс). Эти методы рекомендованы для организации постоянного контроля за состоянием иммунной системы птицы в практике промышленного птицеводства. При этом установлено, что полностью безвредными для цыплят раннего возраста являются вакцины, содержащие неинфекционные вирусные антигены.

2. Доказано наличие скрытой вирус-индуцированной иммуносупрессии у птиц, содержащихся в промышленных условиях, которая не выявлялась традиционными методами, но достоверно регистрировалась по показателям повышенного проявления вторичных вирусных и бактериальных заболеваний и иммунологическим тестам. Своевременная диагностика и профилактика иммунодефицитного состояния существенно улучшает эпизоотическую ситуацию, повышает продуктивность и экономическую стабильность в птицеводстве.

3. Разработан принципиально новый подход к комплексному решению эпизоотических проблем в современном промышленном птицеводстве. В качестве альтернативы, общепринятой практики защиты молодняка птицы от инфекционной патологии с помощью живых вакцин, предлагается переход на всех этапах выращивания птицы на преимущественное использование моно- и ассоциированных инактивированных препаратов. Реализация такого предложения позволяет не только стабилизировать эпизоотическую ситуацию по спектру актуальных инфекционных заболеваний, снизить избыточное инфекционное давление, создаваемое живыми вакцинными вирусами на автономно эволюционирующую биологическую нишу, которую представляет современное птицеводство, но и выращивать здоровую птицу с постоянно высокими показателями продуктивности.

4. В развитие новой концепции профилактики инфекционных болезней в промышленном птицеводстве разработана и внедрена в широкую ветеринарную практику, не имеющая аналогов, инактивированная эмульсионная вакцина против ИББ, предназначенная для иммунизации взрослой птицы и цыплят с первого дня жизни. Указанный препарат не индуцирует поствакцинальной иммуносупрессии; снижает частоту сопутствующих инфекционных заболеваний; усиливает иммуногенность других вакцин; эффективен независимо от исходного уровня материнских антител к ИББ; обладает высокой иммуногенностью на любом эпизоотическом фоне; обеспечивает предсказуемость и регулярную воспроизводимость профилактических результатов и полностью совместим с другими вакцинами.

5. Разработана и внедрена ассоциированная инактивированная эмульсионная вакцина, не имеющая аналогов в отечественной и зарубежной практике. Ассоциированная вакцина предназначена для профилактики шести наиболее распространенных в современном промышленном птицеводстве инфекционных заболеваний молодняка и взрослой птицы, начиная с первого дня жизни.

6. Обнаружен феномен задержки периода полураспада материнских антител к вирусу ИББ у цыплят первых пяти дней жизни. Установлено, что в этот период титры антител не только не снижаются, но и нередко, возрастают. Новые сведения о динамике изменения уровня специфических антител позволяют более точно рассчитать дату иммунизации против ИББ и тем самым существенно повысить эффективность используемых препаратов.

7. Разработана тест-система на основе модифицированной реакции диффузионной преципитации, предназначенная для экспресс-диагностики антител и

антигенов вируса ИББ с целью оперативной оценки защищенности поголовья от болезни Гамборо или распространения соответствующих вирусов в птицеводствах, а также для технологических целей при производстве инактивированных вакцин. При этом невосприимчивость стада к ИББ определяется при наличии более 50% положительных сывороток в обследованной партии птицы. При вирусологическом тестировании - обнаружение антигена в фабрициевых сумках птицы указывает на циркуляцию в стаде полевых вирусов ИББ.

8. Впервые установлен факт циркуляции в птицеводствах РФ вируса инфекционной анемии цыплят, что обуславливает необходимость корректировки тактики иммунопрофилактики.

При этом доказано, что профилактика ИББ живыми вакцинами, разрушающими лимфоидную ткань бурс, может стимулировать заболеваемость ИАЦ. Для оптимизации эпизоотической ситуации при подозрении на ИАЦ, необходимо проводить иммунизацию птиц только инактивированной вакциной против ИББ или целенаправленно профилактировать данное заболевание.

9. Неудовлетворительные итоги иммунизации против ИББ могут быть обусловлены проявлением смешанной вирусной инфекции ИАЦ + ИББ.

10. Расшифрована причина периодических неудач при применении коммерческих вакцин против болезни Марекка, которая заключается в абсолютной комплементарности вакцинных штаммов с материнскими антителами, полученными на аналогичные вирусные антигены. Подтверждена эффективность методического приема ротации вакцинных штаммов, суть которого заключается в том, что в состав вакцин против БМ, предназначенных для иммунизации новой партии цыплят не должны входить штаммы, антигенная структура которых аналогична вакцинным вирусам, используемым для прививки родителей. При этом, как на родителях, так и на потомстве, вакцинные штаммы необходимо менять не реже, чем через 3-5 лет.

Обоснована экономическая целесообразность вакцинации бройлеров против БМ.

5. ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ

Предлагается расширить практику применения в промышленном птицеводстве принципиально нового подхода к стабилизации эпизоотической ситуации с помощью моно- и поликомпонентных инактивированных вакцин против наиболее актуальных инфекций. Переход к вакцинопрофилактике с первых дней жизни птицы, преимущественно на неинфекционные препараты, обеспечивает не только надежную защиту от соответствующих инфекций, прежде всего от ИББ, но и является источником дополнительной прибыли в хозяйственной деятельности предприятия за счет комплексного оздоровления поголовья.

Другим стабилизирующим фактором предлагается сделать диагностический мониторинг за ИББ, основанный на экономически и технологически дос-

тупном в повседневном пользовании экспресс-методе РДП. Применение «Биотест-РДП наборов», разработанных для выявления специфических антител и антигена вируса ИББ, позволяет с высокой достоверностью в динамике оценить два ключевых показателя: защищенность птицы любого возраста от потенциального заражения и циркуляцию полевых вирусов в стаде.

Результаты научных исследований были использованы и вошли в нормативные документы на следующие биологические препараты:

«Вакцина против инфекционной бурсальной болезни жидкая инактивированная» (Регламент производства, Наставление по применению вакцины, ТУ 9384-004-23074685-02, утверждены 06.02.03 г.);

Этот препарат был зарегистрирован на Украине под названием:

«БУРСИТ» Вакцина шактивована проти шфекцшноГ бурсальной хвороби (Регламент производства, Наставление по применению вакцины, ТУ У 24.4.20078518-562-2001, утверждены 28.04.01 г.);

«Вакцина инактивированная АВИКРОН» (Регламент производства, Наставление по применению вакцины, ТУ 9389-002-23074685-2001, утверждены 02.09.01 г.);

Этот препарат был зарегистрирован на Украине под названием:

«Эмульсин» (моновалентт та асоцийовани форми) протии шфекцшног бронхпу курей,. нююкаслско1 хвороби, шфекцшно! бурсально1 хвороби, ре-ОВірусНюю теносиновпу, синдрому зниження яйценоскоеп-76, рестраторного мжоплазмозу птиц! (Регламент производства, Наставление по применению вакцины, ТУ У 24.4.24792862-598-2001, утверждены 01.10.01 г.);

«Набор антигенов и сывороток для выявления специфических антител и антигена вируса инфекционной бурсальной болезни в реакции диффузионной преципитации "Биотест-РДП» (Регламент производства, Наставление по применению набора, ТУ 9384-05-23074685-01, утверждены 27.12.01 г.);

Этот диагностический набор был зарегистрирован на Украине:

Набір антигешв та сироваток для діагностики хвороби Гамборо в реакції дифузжм преципитаци (Регламент производства, Наставление по применению набора, ТУ Украины 46.15:407-99, утверждены 12.02.99 г.);

Мареке Вірус-вакцина рщка культуральна проти хвороби Марека (моно-, бі- і полівалентна форми) (Регламент производства, Наставление по применению вакцины, ТУ У 24.4-20078518-586-2001, утверждены 06.03.01 г.).

6. СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Алиев А.С., Джавадов Э.Д., Кудрявцев Ф.С. Способ получения антигена вируса болезни Гамборо // Авторское свидетельство № 1768636, 15.06.1992.

2. Коровин Р.Н., Джавадов Э.Д., Николаева И.П. Вихрева И.Н. Штамм вируса болезни Марека для изготовления вакцины против болезни Марека // Авторское свидетельство № 1707075, 25.01.1993 г.

3. Алиев А.С., Сираждинов Р.С., Калыкова Г.К., Джавадов Э.Д. Методические рекомендации по применению иммуноферментного анализа при диагно-

стике инфекционной бурсальной болезни птиц // Методические рекомендации Спб., 1995, 15с.

4. Коровин Р.Н., Джавадов Э.Д., Николаева И.П., Вихрева И.Н. Вакцина против болезни Марека и способ профилактики болезни Марека // Патент № 2059404, 10.05.1996 г.

5. Djavadov E.D., Vichreva I.N. Control of Marek's disease by vaccine from apathogenic strain of Marek's disease virus // XI th International congress of the World Veterinary Poultry Association. Budapest, 18-22 august, 1997, p.238/

6. Aliev A.S., Djavadov E.D. Epizootology and prophylaxys of infectious bursal disease in Russian industrial poultry // XI th International congress of the World Veterinary Poultry Association Budapest, 18-22 august, 1997, 246.

7. Djavadov E., Vichreva I., Manoyan M. Detection of antimyelin antibodies at Marek's disease // Archiv fur Geflugelkunde 11-th European Poultry Conference, Bremen, 2002, 177.

8. Алиев А.С., Джавадов Э.Д., Сираждинов Р.С., Иванов А.И. Экономическая эффективность мероприятий против инфекционной бурсальной болезни птиц // Сб. науч. трудов Международной конференции "Экономические отношения в АПК и их развитие в агропромышленном комплексе в условиях становления рыночной экономики», «Приоритетные учебные программы и передовые методики обучения руководящих кадров и специалистов» СПб., 1997, 128-129.

9. Джавадов Э.Д., Кудрявцев Ф.С., Кожемяка Н.В: Эффективность вакцинации против болезни Марека // Ветеринария, 1999, 5, 28-30.

10. Джавадов Э.Д. К вопросу об инфекционной анемии цыплят // Сб. науч. трудов 1-ой международной конференции «Современные вопросы ветеринарной медицины и биологии», Уфа, 2000, 133-135.

11. Джавадов Э.Д. Разработка эмульсионной инактивированной вакцины против инфекционной бурсальной болезни птиц // Сб. науч. трудов 1-ой международной конференции «Современные вопросы ветеринарной медицины и биологии», Уфа, 2000, 135-139.

12. Джавадов Э.Д. Иммунодефициты вирусной этиологии в промышленном птицеводстве: состояние и перспективы // Специализированный информационный каталог «Медицина, ветеринария, фармация», Зооиндустрия, 2001, 5, 15-17.

13. Джавадов Э.Д., Смоленский В.И., Кудрявцев Ф.С., Полежаев Ф.И. Инфекционная анемия цыплят // Ветеринария, 2001, 9, 19-22.

14. Джавадов Э.Д. Разработка эмульсионной инактивированной вакцины против инфекционной бурсальной болезни // Сб. IV региональной конференции "Золотое кольцо России", посвященной проблемам профилактики и лечения домашних животных и птиц, Владимир, 2001, 61-64.

15. Vichreva I.N., Djavadov E.D. Blocking -ELISA for detection of antibodies to infectious bursal disease virus (IBDV) // Proceedings XII international congress of the World Veterinary Poultry Association, Cairo-Egypt, 2001, 287.

16. Djavadov E.D. Comparison of three serological tests for detection of anti bodies to infectious bursal disease virus // Proceedings XII international congress of the World Veterinary Poultry Association, Cairo-Egypt, 2001,288.

17. Djavadov E.D., Kudriavtsev F.S., Polezhaev F. I., Smolensky V. I. Chicken infectious anemia - new reality for poultry in Russia // Proceedings XII international congress of the World Veterinary Poultry Association, Cairo-Egypt, 2001, 302.

18. Джавадов Э.Д., Смоленский В.И., Кудрявцев Ф.С., Полежаев Ф.И. Инфекционная анемия цыплят // «Рацветинформ», 2002,1, 7-8.

19. Джавадов Е., Полежаев Ф., Будченко О., Косенко М., Авдосьева Л, Мельничук І., Басараб О., Смоленский В. Перспективи застосування шактивно-ВаННої вакцини для профілактики шфекшно{ бурсальної хвороби молодняка птиць // Ветеринарна медицина України, 2002, 3,16-18.

20. Djavadov E., Manoyan M. Efficiency killed vaccine against infectious bursal disease at vaccination of young chickens // Archiv für Geflügelkunde 11-th European Poultry Conference, Bremen, 2002, 177.

21. Будченко А.А., Полежаев Ф.И., Джавадов Э.Д. Новые принципы вакциннопрофилактики птицы для достижения высокой сохранности и продуктивности // «Ветеринарный вестник Одесщины», 2002,4, 2.

22. Джавадов Э.Д., Полежаев Ф.И., Пастушенков В.Л., Маноян М.Г. Диагностика иммунного статуса птицы в условиях промышленного птицеводства //Ветеринария в птицеводстве, 2002,5-6,34-41.

23. Джавадов Э.Д., Иванов А.И., Кудрявцев Ф.С., Иванова Т.Е., Полежаев Ф.И., Смоленский В.И. Использование инактивированных вакцин для профилактики инфекционной бурсальной болезни // Ветеринария, 2002,5,22-26.

24. Джавадов Э.Д., Дубовой А.С., Полежаев Ф.И. Опыт применения поливалентной инактивированной вакцины "Авикрон" для молодняка домашней птицы // Материалы конференции по птицеводству, Зеленоград, 2003, 214-216.

25. Джавадов Э.Д., Полежаев Ф.И., Маноян М.Г. Диагностические методы оценки состояния иммунитета домашней птицы // Материалы конференции по птицеводству, Зеленоград, 2003, 213-214.

26. Джавадов Э.Д., Полежаев Ф.И., Пастушенков В.Л. Диагностика иммунодефицита птиц (иммунологические методы)//Ветеринария, 2003,10,11-13.

27. Джавадов Э.Д., Дубовой А.С. Инактивированные вакцины для птицеводства//«Рацветинформ», 2003 ,6, 11.

28. Джавадов Э.Д., Полежаев Ф.И., Пастушенков В.Л. Диагностика иммунодефицита птиц (серологические, патоморфологический, бактериологический методы) // Ветеринария, 2004, № 3,15-18.

29. Дубовой А.С, Джавадов Э.Д., Полежаев Ф.И. Иммунитет у птицы, привитой поливалентной инактивированной эмульсинвакциной «Авикрон». // Ветеринария, 2004,4,13-14.

30. Джавадов Е., Полежаев Ф., Смоленский В., Авдосьева І. Экспрес-метод контролю епізоотичної ситуації з шфекшної хвороби птиць // Ветери-

нарна медицина УкраГни, 2004, 5,31-33.

31. Джавадов Э.Д., Полежаев Ф.И., Смоленский Ф.И. Экспресс-диагностика болезни Гамборо // Птицеводство, 2004, № 4,37-39.

Первые слова благодарности по завершению представленной работы автор относит светлой памяти своего учителя

Филиппа Самойловича КУДРЯВЦЕВА,

открывшего ему захватывающий мир инфекционной патологии.

Автор благодарит также своих консультантов В.И.Смоленского и Ф.И.Полежаева за творческое содружество и коллег-соавторов: академика РАСХН, доктора ветеринарных наук, профессора, директора ВНИВИП Р.Н.Коровина; доктора ветеринарных наук, профессора кафедры эпизоотологии < • СПбГАВМ А.С.Алиева, доктора медицинских наук, профессора, зам. начальника кафедры клинической биохимии и лабораторной диагностики Военно-медицинской академии им. Кирова В.Л.Пастушенкова; кандидата биологических наук, заведующего кафедрой организации и технологии производства в отраслях АПК Академии менеджмента и агробизнеса нечерноземной зоны Р.С.Сираждинова; кандидата биологических наук, научного сотрудника НИИ «Авивак» И.П.Николаеву; старшего научного сотрудника ВНИВИП А.С.Дубового; научного сотрудника лаборатории электронной микроскопии НИИ особо чистых биопрепаратов И.Л.Потокина; ветеринарных специалистов И.Н.Вихреву, Г.К.Калькову, А.А.Будченко, И.К.Авдосьеву, М.Г.Маноян, А.И.Иванова, Т.Е.Иванову, М.В.Косенко, И.Л.Мельничук, А.Б.Бассараб, принимавших непосредственное участие в выполнении отдельных разделов работы.

В производстве и внедрении средств специфической профилактики и диагностики иммунодепрессивных болезней птиц принимали участие сотрудники ООО «Кронвет», птицевладельцев и ветеринарных лабораторий РФ и СНГ.

Отпечатано в ООО "Типография Спектрум"
С-Пб. пр. Нарвский, 18 Тел.: 325-23-23
Подписано в печать 10.09.04.
Тираж 100 экз.

16959