

ИЗУЧЕНИЕ ПАТОГЕННЫХ СВОЙСТВ ПОЛЕВЫХ ИЗОЛЯТОВ АДЕНОВИРУСОВ КУР, ВЫДЕЛЕННЫХ НА ТЕРРИТОРИИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

Введение

Аденовирусы кур - многочисленная, но сравнительно мало изученная группа вирусов. Сообщения об их выделении поступают из многих стран всех континентов. В настоящее время представители этой группы вирусов объединены в 12 серологических вариантов (FAV 1–12) [6]. Патогенность и этиологическая роль многих серотипов аденовирусов кур еще не выяснена окончательно, однако известно, что отдельные серотипы являются возбудителями таких остропротекающих инфекционных болезней, как СЕЛО-инфекция, гепатит с тельцами-включениями (ГТВ) и синдром гидроперикардита кур (СГПК) [1, 5, 7].

С начала 90-х годов вспышки СГПК с высоким уровнем смертности (30–80%) регистрируются на территории Российской Федерации. Согласно данным сотрудников ФГУ «ВНИИЗЖ», поражения цыплят синдромом гидроперикардита преобладают в регионах Урала и Сибири, а также зарегистрировано несколько вспышек заболевания в птицеводствах Северного Кавказа, в республиках Карелия, Марий Эл, Кабардино-Балкария и Ингушетия [2].

Выраженность клинических признаков и патологических изменений при аденовирусной инфекции кур различна в каждом конкретном случае. На интенсивность их проявления оказывает влияние, прежде всего, инфицирующий штамм вируса. В одном случае аденовирусная инфекция вызывает проявление клинических признаков и выраженных патологоанатомических изменений с гибелью пораженных птиц, в другом – при латентном течении болезни имеет место персистенция вируса в организме. Птицы, пораженные аденовирусами, являются потенциальными вирусоносителями в течение всего периода жизни [3].

Целью нашего исследования было изучить патогенный потенциал изолятов аденовирусов кур, выделенных от цыплят-бройлеров на территории Российской Федерации.

Материалы и методы

В исследованиях использовали следующие **полевые изоляты** аденовирусов кур, выделенные в результате проведения ком-

плекса вирусологических исследований сотрудниками ФГУ «ВНИИЗЖ» из патологического материала от птиц, павших с признаками аденовирусной инфекции в течение 2000–2003 гг.: «Башкирский», «Равис-Сосновский», «ПА-01», «Кировоградский», «Тбилисский» и «ВД-20», а так же **референтные штаммы** FAV (1–12) аденовирусов птиц I группы фирмы «Srafas» (США).

Культура клеток. Изоляты культивировали в первичной культуре клеток печени 15-суточных эмбрионов СПФ-кур фирмы «Lohman Tierzucht» (Германия), приготовленной согласно методике, утвержденной директором ФГУ «Федеральный центр охраны здоровья животных» в 2001 г. В дальнейших исследованиях использовали вирусный материал, полученный после третьего пассажа.

Молекулярно-биологические и серологические исследования. Для идентификации вируса, выделенного из патологического материала, использовали полимеразную цепную реакцию (ПЦР) и секвенирование амплифицированных фрагментов консервативной области гена гексона [4].

Определение активности и специфичности антигенов аденовирусов птиц I группы проводили в прямом жидкофазном блокирующем варианте ИФА с гипериммунными сыворотками кур, кролика или морской свинки к серотипам FAV 1, FAV 2, FAV 4, FAV 6 аденовирусов птиц I группы по методикам, утвержденным директором ФГУ «ВНИИЗЖ» (2000–2005 гг.).

Подопытные животные. Экспериментальную работу проводили на клинически здоровых цыплятах, не иммунных к аденовирусам птиц I группы, полученных из хозяйств, благополучных по острым инфекционным заболеваниям, а также на СПФ-цыплятах 1–5-суточного возраста.

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

Результаты исследований

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

Патогенность для СПФ-цыплят. В опыте использовали 70 СПФ-цыплят 3-суточного возраста, которых разделили на 1 контрольную и 6 опытных групп, по 10

птиц в каждой. Цыплят каждой опытной группы инфицировали внутримышечно в область бедра в дозе 0,5 см³ одним из культуральных изолятов аденовируса кур с титром инфекционной активности не менее 3,5±0,1 lgТЦД₅₀/см³. За птицей вели наблюдение в течение 10 суток. Каждую группу птиц содержали в отдельных боксах, корм и воду давали без ограничения.

Для оценки патогенного потенциала полевых изолятов «Башкирский», «Равис-Сосновский», «ПА-01», «Тбилисский», «Кировоградский» и «ВД-20» было проведено три последовательных пассажа на СПФ-цыплятах. Павших цыплят вскрывали в стерильных условиях и отбирали пораженные органы (печень, почки, селезенку, кишечник), готовили 10% суспензию на фосфатном буфере (рН 7,2–7,4). Очищенную суспензию использовали для последующего заражения цыплят, как описано выше. Результаты опыта представлены в табл.1.

Наблюдения за цыплятами показали,

Таблица 1

Патологоанатомические изменения в органах СПФ-цыплят, инфицированных изолятами аденовирусов птиц I группы

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

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

что в группе птиц, зараженных изолятом «Башкирский», через 72 часа после инфицирования отмечали развитие клинических признаков аденовирусной инфекции, при этом наблюдали общее угнетение, выделение жидких каловых масс коричнево-красного цвета, снижение аппетита и подвижности, затрудненное дыхание, отставание в росте. После переболевания, на 7-е сутки, состояние цыплят улучшалось. При вскрытии вынуждено убитой птицы видимых патологических изменений не выявлено, но при дальнейшем исследовании гомогенатов органов аденовирус кур серотипа FAV 1 был выделен из кишечника всех инфицированных цыплят, титр которого в ИФА составил 1:1024. Дальнейшее пассирование изолята «Башкирский» на СПФ-цыплятах не привело к усилению его патогенных свойств.

У цыплят, инфицированных изолятом «Равис-Сосновский» (рис. 1) и «ВД-20», через 48 часов наблюдали отказ от корма, снижение подвижности, взъерошенность перьевого покрова, птица сидела скуленно, нахохлившись, а также выделение жидких каловых масс красно-желтого цвета. Пик падежа в этих группах цыплят приходился на 3 сутки после заражения. Смертность в группе цыплят, инфицированных изолятом «Равис-Сосновский», в первом пассаже достигла 80%, а в группе, инфицированной изолятом «ВД-20», — 90%. При вскрытии павших цыплят обеих групп наблюдали признаки аденовирусной инфекции, выраженные в разной степени. Так, у 8 и 9 цыплят, зараженных изолятами «Равис-Сосновский» и «ВД-20», соответственно, наблюдали увеличение печени, которая была дряблой консистенции с точечными кровоизлияниями (рис. 4). Почти были также увеличены в размере и гиперемированы, темно-коричневого цвета (рис. 2, 3). У 5 цыплят из 10, зара-

женных изолятом «ВД-20», каналцы почек и мочеточники были заполнены уратами (рис. 2). В фабрициевой сумке и сердце видимых изменений не было отмечено у всех цыплят каждой из инфицированных групп.

Клинические признаки и патологоанатомические изменения в органах СПФ-цыплят, инфицированных изолятами аденовирусов птиц I группы, представлены на рис. 1-10.

С каждым последующим пассажем наблюдали снижение патогенного потенциала изолятов «Равис-Сосновский» и «ВД-20». Так, уже при заражении цыплят вирусом, полученным после 1 пассажа, смертность в группе цыплят, инфицированных изолятом «Равис-Сосновский», составила 10%, а при использовании для заражения вируса 2 пассажа данный изолят не вызывал клинических признаков заболевания у цыплят в течение 10 суток наблюдения. Смертность среди цыплят, зараженных изолятом «ВД-20», к 3 пассажу снизилась до 20%.

При тестировании в ИФА очищенных 10% суспензий печени от павших цыплят, были получены положительные результаты, которые представлены в табл. 2.

Как видно из данных табл. 2, титры 10% суспензий печени, содержащие изолят «Равис-Сосновский» от 1 и во 2 пассажей, составили в Б-ИФА 1:32 и 1:4, соответственно. Титры 10% суспензий печени, содержащие изолят «ВД-20», также снижались по мере пассирования и составили в каждом из трех пассажей 1:1024, 1:512 и 1:4, соответственно.

В группах цыплят, инфицированных изолятами «ПА-01», «Тбилисский» и «Кировоградский», аденовирусная инфекция проявлялась в виде внезапного падежа птиц в течение 1-5 суток после заражения. После этого срока гибель цыплят не отмечена. Пик падежа пришелся на 3 сутки пос-

Таблица 2

Результаты тестирования гомогенатов органов СПФ-цыплят, павших после инфицирования изолятами аденовирусов птиц I группы, в Б-ИФА

Изолят	Серотип	Титр вируса в Б-ИФА		
		1 пассаж	2 пассаж	3 пассаж
«Башкирский»	FAV 1	1:1024	1:1024	1:1024
«Равис-Сосновский»	FAV 2	1:32	1:4	Отр.
«ПА-01»	FAV 4	1:64	1:128	1:512
«Тбилисский»	FAV 4	1:16	1:64	1:256
«Кировоградский»	FAV 4	1:32	1:128	1:512
«ВД-20»	FAV 6	1:1024	1:512	1:4



Рисунок 1. СПФ-цыплята, инфицированные изолятом «Равис-Сосновский»

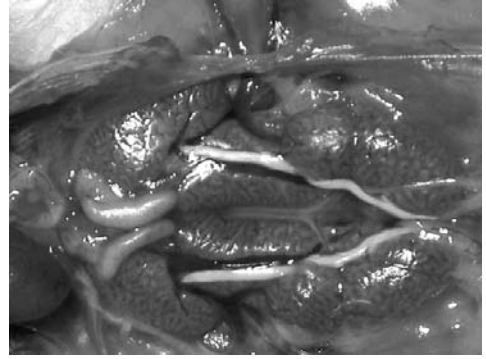


Рисунок 2. Поражения почек у СПФ-цыплят, инфицированных изолятом «ВД-20»

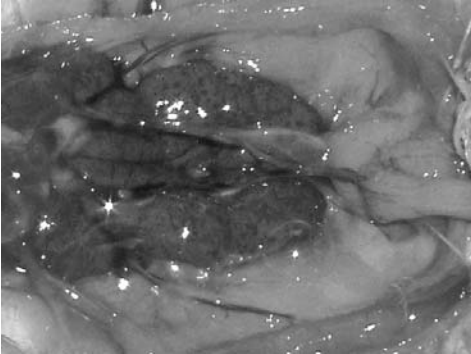


Рисунок 3. Поражения почек у СПФ-цыплят, инфицированных изолятом «Равис-Сосновский»

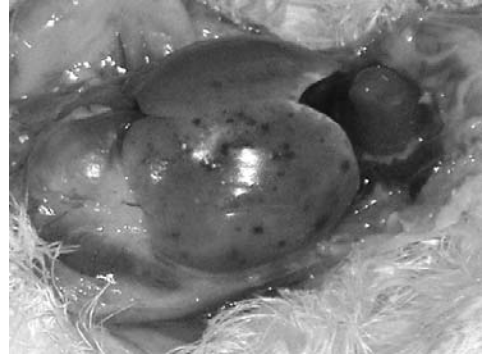


Рисунок 4. Поражения печени у СПФ-цыплят, инфицированных изолятом «ВД-20»



Рисунок 5 и 6. Поражения сердца и печени (гидроперикардит и гепатит) у СПФ-цыплят, инфицированных изолятом «ПА-01»

ле заражения. Смертность составила 90% в группе цыплят, зараженных изолятом «ПА-01», 80% — изолятом «Тбилисский» и 90% — изолятом «Кировоградский».

При патологоанатомическом вскрытии павших цыплят из каждой группы были отмечены следующие изменения: печень увеличена в объеме, неравномерно окрашена с участками светло-желтого цвета и кровоизлияниями, желчный пузырь переполнен и стенки его напряжены, у 50% трупов сердце было деформировано, сердечная сорочка увеличена и содержала прозрачную

жидкость соломенно-желтого цвета вязкой консистенции (рис. 5, 6, 9). Почки увеличены в размере и гиперемированы, желто-коричневого цвета (рис. 10), на разрезе рисунок строения ярко выражен. В некоторых случаях визуально просматривались отложения мочевиновых солей в мочеточниках. Изменений в легких не зарегистрировано. Селезенка была не увеличена. В сумке Фабрициуса видимых изменений не отмечено.

Каждый последующий пассаж изолятов «ПА-01», «Тбилисский» и «Киро-



Рисунок 7. Сердце и печень у клинически здоровых СПФ-цыплят



Рисунок 8. Почки у клинически здоровых СПФ-цыплят

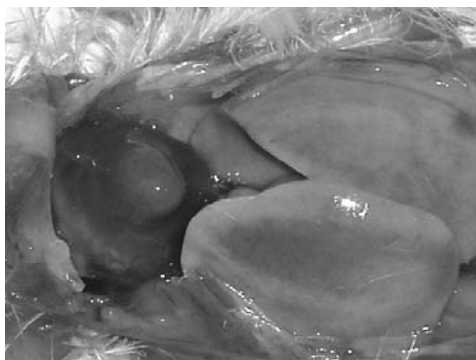


Рисунок 9. Поражения печени (гепатит) у СПФ-цыплят, инфицированных изолятом «ПА-01»

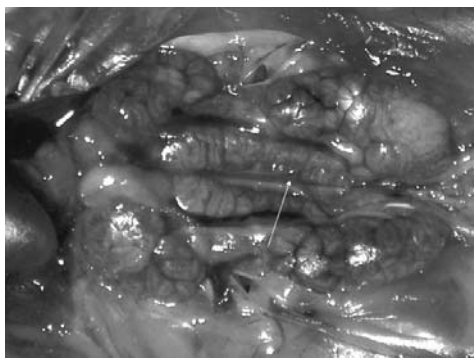


Рисунок 10. Поражения почек (нефрит) у СПФ-цыплят, инфицированных изолятом «ПА-01»

воградский» (в результате последовательного заражения 10 СПФ-цыплят каждым изолятом) приводил к повышению их патогенного потенциала, так, к 3 пассажу гибель цыплят в каждой из этих групп составила 100% на 3 сутки после заражения.

При тестировании в ИФА гомогенатов печени, отобранной от павших цыплят, были получены положительные результаты в каждом пассаже и составили для изолята «ПА-01» — 1:64, 1:128 и 1:512, для изолята «Тбилисский» — 1:16, 1:64 и 1:256, для изолята «Кировоградский» — 1:32, 1:128 и 1:512, соответственно.

Цыплята контрольной группы оставались клинически здоровыми в течение всего периода наблюдения.

Патогенность для коммерческих цыплят. Патогенный потенциал полевых изолятов «Башкирский», «Равис-Сосновский», «ПА-01», «Тбилисский», «Кировоградский» и «ВД-20» оценивали по их действию на 10-суточных цыплят кросса «Хайсекс коричневый», не имеющих антител к аденовирусам кур серотипов FAV 1, FAV 2, FAV 4 и FAV 6. В опыте использовали 70 цыплят, которых разделили на 1 контрольную и 6 опытных групп, по 10 птиц в каждой.

Цыплят каждой опытной группы инфицировали внутримышечно в область бедра в дозе $0,5 \text{ см}^3$ одним из выделенных культуральных изолятов аденовируса кур с титром инфекционной активности не менее $3,5 \pm 0,1 \text{ lgTCID}_{50}/\text{см}^3$. За птицей вели наблюдение в течение 10 суток. Каждую группу птиц содержали в отдельных боксах, корм и воду давали без ограничения.

Результаты исследований представлены в табл. 3.

Наблюдения за цыплятами после их инфицирования показали, что в группах цыплят, инфицированных изолятами «Башкирский», «Равис-Сосновский» и «ВД-20», клинических проявлений аденовирусной инфекции не наблюдали в течение 14 суток (срок наблюдения), птица была подвижная, охотно поедала корм. При тестировании в ИФА гомогенатов печени и кишечника, отобранных от вынужденно убитых цыплят, были получены сомнительные результаты.

В группах цыплят, инфицированных изолятами «ПА-01», «Тбилисский», «Кировоградский», через 48 часов после заражения наблюдали клинические признаки, характерные для аденовирусной инфекции.

Патологоанатомические изменения у цыплят кросса «Хайсекс коричневый» при инфицировании изолятами аденовирусов птиц I группы

Изолят	Серотип	Патологоанатомические изменения			Гибель	Титр в ИФА
		Гепатит	Гидроперикардит	Нефрит		
«Башкирский»	FAV 1	0/10*	0/10	0/10	0/10	с/м
«Равис-Сосновский»	FAV 2	0/10	0/10	0/10	0/10	с/м
«ПА-01»	FAV 4	9/10	3/10	9/10	9/10	1:512
«Тбилисский»	FAV 4	10/10	2/10	10/10	10/10	1:512
«Кировоградский»	FAV 4	7/10	4/10	7/10	7/10	1:512
«ВД-20»	FAV 6	0/10	0/10	0/10	0/10	с/м
Контрольная группа	-	0/10	0/10	0/10	0/10	Отр.

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

Пик падежа в этих группах цыплят пришелся на 3 сутки после заражения, гибель составила 90%, 100% и 70%, соответственно. При патологоанатомическом вскрытии павших цыплят каждой группы был отмечен гепатит, нефрит, а так же в 30% случаев — гидроперикардит. При тестировании в ИФА гомогенатов печени были получены положительные результаты, которые составили 1:512 для каждой группы цыплят.

Выводы

На основании клинических признаков и патологоанатомических изменений у птиц, инфицированных изолятами аденовирусов кур, установлены следующие патогенные свойства:

РЕЗЮМЕ

СПФ-цыплят 3-суточного возраста путем внутримышечной инъекции инфицировали полевыми изолятами аденовирусов кур. Установлено, что наибольшим патогенным потенциалом в отношении цыплят обладали изоляты «ПА-01», «Тбилисский» и «Кировоградский». Изолят «Башкирский» обладал умеренной патогенностью и был способен реплицироваться в организме СПФ-цыплят, не приводя к их гибели. Изоляты «Равис-Сосновский» и «ВД-20» в отношении СПФ-цыплят проявляли патогенные свойства, которые постепенно ослабевали при дальнейшем пассировании, однако у цыплят кросса «Хайсекс коричневый», они не вызывали клинических проявлений заболевания, т.е. проявляли апатогенные свойства.

ABSTRACT

Three day-old SPF chickens were intramuscularly infected with field chicken adenovirus isolates. PA-01, Tbilissky and Kirovogradsky isolates were found to be the most pathogenic for chickens. Bashkirsky isolate was moderately pathogenic and was capable to replicate in SPF chickens without causing their death. Ravis-Sosnovsky and VD-20 isolates were pathogenic for SPF chicks but their pathogenicity gradually decreased during the subsequent passaging. However, these isolates did not induce any clinical signs associated with the disease in Brown Highsex cross chickens i.e. they were nonpathogenic.

Литература

- В.А. Бакулин. Патоморфогенез и дифференциальная диагностика болезни Гамборо, аденовирусной инфекции и других иммунодепрессивных болезней птиц // Архив ветеринарных наук. Прил. к Т. 1 (48). СПб., Ломоносов, 1998. С. 322.
- В.В. Борисов, Д.С. Сурнев, А.В. Борисов и др. Вирусный синдром гидроперикардита кур // Птица и птицепродукты. 2003. № 1. С. 29–32.
- Р.Н. Коровин, И.К. Рождественский. Аденовирусные инфекции сельскохозяйственной птицы // Агропромиздат., 1990. С. 31.
- В.А. Лобанов. Первичная структура генов фибра и гексона аденовирусов птиц и разработка новых методов диагностики аденовирусной инфекции: автореф. дис. канд. биол. наук. Владимир, 1999. 26 с.
- Н.В. Фомина. Аденовирусная инфекция животных: В 2-х т. М.: Колос, 1995. Т. 2. С. 15–16, 193.
- R.L. Reece, D.C. Grix, D.A. Barr. An unusual case of inclusion body hepatitis in a cockerel // Avian Dis. 1986. V. 30, N. 1. P. 224–227.
- H. Toro, C. Prusas, R. Raue. Characterization of fowl adenoviruses from outbreaks of inclusion body hepatitis/hydropericardium syndrome in Chile // Avian Dis. 1999. V. 43. P. 262–270.