

«ВСЕРОССИЙСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ВЕТЕРИНАРНЫЙ  
ИНСТИТУТ ПТИЦЕВОДСТВА» - ФИЛИАЛ  
ФЕДЕРАЛЬНОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО БЮДЖЕТНОГО НАУЧНОГО  
УЧРЕЖДЕНИЯ ФЕДЕРАЛЬНОГО НАУЧНОГО ЦЕНТРА «ВСЕРОССИЙСКИЙ  
НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ И ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ ИНСТИТУТ  
ПТИЦЕВОДСТВА»  
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК  
(ВНИВИП)

---

На правах рукописи

БАЛЕНДОР  
Евгений Валентинович

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

06.02.02 – ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология,  
микология с микотоксикологией и иммунология

Диссертация  
на соискание ученой степени  
кандидата ветеринарных наук

Научный руководитель:  
кандидат ветеринарных наук  
М.Е. Дмитриева

Санкт-Петербург – 2021

## СОДЕРЖАНИЕ

стр.

<b>ВВЕДЕНИЕ</b> .....	4
<b>1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ</b> .....	<b>11</b>
1.1. СОВРЕМЕННОЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЕ ОБ ИММУНОСУПРЕССИВНЫХ СОСТОЯНИЯХ .....	11
1.1.1. Причины возникновения иммуносупрессивных состояний .....	11
1.1.2. Механизм иммуносупрессии вирусной этиологии .....	12
1.1.3. Иммуносупрессивные болезни в промышленном птицеводстве .....	14
1.2. ИНФЕКЦИОННАЯ АНЕМИЯ ЦЫПЛЯТ (ИАЦ) .....	19
1.2.1. Распространение и экономический ущерб .....	19
1.2.2. Классификация и биологические свойства вируса .....	21
1.2.3. Эпизоотология .....	26
1.2.4. Клинические признаки .....	28
1.2.5. Патогенез .....	30
1.2.6. Патоморфологические изменения .....	32
1.2.7. Иммунитет .....	34
1.2.8. Диагностика .....	35
1.2.9. Дифференциальная диагностика .....	39
1.2.10. Методы контроля и профилактика .....	40
1.3. ЗАКЛЮЧЕНИЕ ПО ОБЗОРУ ЛИТЕРАТУРЫ .....	44
<b>2. СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ</b> .....	<b>48</b>
2.1. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ .....	48
2.2. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ .....	54
2.2.1. Общая характеристика птицеводческого хозяйства. Основные зооветеринарные аспекты выращивания бройлеров .....	54
2.2.2. Причины возникновения болезни в птицеводческом хозяйстве. История течения болезни .....	57
2.2.3. Клинические признаки ИАЦ у бройлеров .....	57
2.2.4. Патологоанатомические изменения .....	62
2.2.5. Серологическая диагностика ИАЦ .....	69

2.2.6. Гематологические исследования крови цыплят-бройлеров .....	74
2.2.7. Вирусологические исследования патологического материала .....	75
2.2.8. Молекулярно-биологические исследования патологического материала ....	76
2.2.9. Получение и очистка вирусосодержащего материала .....	85
2.2.10. Электронно-микроскопическое исследование патологического материала .....	88
2.2.11. Постановка биопробы на СПФ-цыплятах .....	89
2.2.12. Влияние иммуносупрессии, обусловленной вирусом ИАЦ, на формирование поствакцинального иммунного ответа .....	91
2.2.12.1. Иммунный ответ после вакцинации цыплят против ньюкаслской болезни .....	91
2.2.12.2. Иммунный ответ после вакцинации цыплят против инфекционной бурсальной болезни .....	93
2.2.12.3. Иммунный ответ после вакцинации цыплят против инфекционного бронхита кур .....	96
2.2.13. Влияние ИАЦ на качество мясной продукции .....	98
2.2.14. Построение системы профилактики ИАЦ на птицефабрике .....	102
<b>3. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЙ .....</b>	<b>107</b>
<b>4. ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....</b>	<b>125</b>
<b>5. ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ .....</b>	<b>126</b>
<b>6. ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ.....</b>	<b>127</b>
<b>СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ .....</b>	<b>128</b>
<b>СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ .....</b>	<b>130</b>
<b>ПРИЛОЖЕНИЯ .....</b>	<b>164</b>

## ВВЕДЕНИЕ

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

Промышленное птицеводство – основной поставщик высококачественного белка животного происхождения. Рост производства яиц и мяса птицы в России происходит за счет ввода новых мощностей, повышения продуктивности и сохранности поголовья, уменьшения расхода кормов на единицу продукции, снижения энергетических и ресурсных затрат, глубокой переработки и расширения ассортимента продукции [51].

Наряду с интенсивным развитием отрасли растет и конкуренция между птицеводческими предприятиями. Эффективность производства и качество выпускаемой продукции определяют конечный финансовый результат и успех предприятия на продовольственном рынке [24]. Однако с развитием птицеводства расширяется и спектр актуальных инфекционных болезней, к которым относится и инфекционная анемия цыплят.

Инфекционная анемия цыплят (ИАЦ) - иммунодепрессивная болезнь, которая характеризуется отставанием в росте и развитии, апластической анемией, дерматитами, повышенной восприимчивостью к возбудителям других инфекций (вирусных, бактериальных, паразитарных), а также снижением эффективности вакцинаций против ньюкаслской болезни, инфекционного бронхита кур, инфекционной бурсальной болезни, болезни Марека и др. [25,29,30,32,71,104,128,201,232,315]. Болезнь описана под разными названиями, такими как: геморрагический синдром, гангренозный дерматит, болезнь «синего крыла», вирусная анемия цыплят, ВАЦ, ИНАН и др. [5,25,69,111,107,112,125,127,242,258,303,314]. Инфекционная анемия цыплят широко распространена в странах с развитым промышленным птицеводством [3,72,79,88,112,115,117,124,138,230,258,271]. Экономический ущерб от ИАЦ складывается из потерь от падежа птицы (в том числе при возникновении

секундарных инфекций), снижения продуктивности, повышения конверсии корма, а также затрат на антибактериальные и витаминные препараты.

В настоящее время все чаще регистрируются проблемы с качеством мясной продукции, связанные с воздействием вируса ИАЦ [30], что приводит к весьма ощутимым финансовым потерям.

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

В настоящее время в мире не производится ни одной коммерческой вакцины, способной обеспечить полноценную защиту птицы от вируса ИАЦ [190,212,213,220,236,258,260,265,290,298,302,322].

Современные зарубежные исследователи считают, что ИАЦ представляет серьезную угрозу для промышленного птицеводства и требует установления эпидемиологического статуса болезни во всем мире [108,109,167,218,230].

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

**Степень разработанности проблемы.** С развитием молекулярно-генетических методов исследований в последние годы внесены существенные изменения в классификацию вируса ИАЦ. В результате обнаружения сходства вируса ИАЦ с вирусом Torque Teno (TTV) и мини-вирусом Torque Teno (TTMV)

[66,142,147,244,264], возбудитель в 2015 году был отнесен к семейству *Anelloviridae* [75,120,253]. Традиционно считалось, что вирус ИАЦ инфицирует только кур, однако в настоящее время варианты вируса выделены от домашних воробьев [122], мышей, кошек, собак и человека. Есть сведения о выделении вируса ИАЦ от индеек [258] и антител у японских перепелов [42,113].

У инфицированной вирусом инфекционной анемии цыплят (ВАЦ) птицы нередко отмечается депрессия вакцинного иммунитета против болезни Марека (БМ), ньюкаслской болезни (НБ), герпесвируса индеек [71,128,201,232,233,315], инфекционного ларинготрахеита птиц (ИЛТ) [179], инфекционной бурсальной болезни (ИББ), инфекционного бронхита кур (ИБК), кокцидиоза [23] и др.

При ассоциированных инфекциях ВАЦ усиливает патогенность вирусов инфекционной бурсальной болезни [56,274], болезни Марека [56,95,140,207,274], ньюкаслской болезни [56,96,140,274], реовируса [76,111,112,193], аденовируса [76,140,294], а также таких возбудителей как *Staphylococcus aureus* [140,204,246], *Clostridium perfringens* [124], *Eimeria tenella* [319], *Cryptosporidium baileyi* [146].

Способность вируса ИАЦ разрушать целые звенья иммунной системы, усиливать, при ассоциированных инфекциях, патогенность возбудителей инфекционных болезней различной этиологии, инфицировать другие виды животных, а также человека, требуют дальнейшего изучения, разработки средств диагностики и специфической профилактики, а также мер по профилактике болезни и снижению иммунодепрессивного воздействия ВАЦ на организм птицы.

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

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

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

- провести серологические, гематологические, вирусологические, электронно-микроскопические и молекулярно-биологические исследования патологического материала с целью выделения и идентификации возбудителя;
- изучить влияние иммуносупрессии, обусловленной вирусом ИАЦ, на иммунный ответ у цыплят-бройлеров после вакцинации против ньюкаслской болезни, инфекционной бурсальной болезни и инфекционного бронхита кур;
- разработать систему профилактики инфекционной анемии цыплят для промышленного птицеводческого хозяйства мясного направления;
- разработать на основе проведенных исследований Методические положения по диагностике и профилактике инфекционной анемии цыплят для птицеводческих хозяйств промышленного типа.

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

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

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

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

**Теоретическая и практическая значимость работы.** Разработана и внедрена в ООО ТПК «Балтптицепром» система профилактики инфекционной анемии цыплят.

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

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

**Методология и методы исследования.** Методология работы включала анализ научной литературы, поисковые исследования, основанные на стандартных процедурах с использованием различных материалов и животных. В работе использовали клинические, патологоанатомические, вирусологические, серологические, молекулярно-биологические, электронно-микроскопические, биохимические, физические и статистические методы исследований.

**Основные положения, выносимые на защиту:**

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

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

3. Изучение влияния иммуносупрессии, обусловленной вирусом ИАЦ, на иммунный ответ после вакцинации цыплят-бройлеров против ньюкаслской болезни, инфекционной бурсальной болезни и инфекционного бронхита кур;

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

**Степень достоверности и апробация результатов работы.** Научные положения, выводы и практические рекомендации, сформулированные в диссертационной работе научно обоснованы, достоверны и вытекают из результатов собственных исследований. Исследования проведены на большом фактическом материале с использованием современных методов исследований.

Материалы диссертации доложены на заседаниях Методического совета отдела вирусологии и ОБП и Ученого совета ВНИВИП (2014-2021гг.), на Международной научно-практической конференции «Ветеринарная наука в промышленном птицеводстве» (Санкт-Петербург, 2014), Международном

птицеводческом конгрессе ВНАП «Потенциал птицеводческого производства в развивающихся странах» (Анталия, Турция, 2015г.), XII Международной научно-практической конференции «Eurasiascience» (Москва, 2017), Международной научно-практической конференции «Проблемы и приоритеты развития науки в XXI веке (Смоленск, 2017), Международной научно-практической конференции «Перспективы развития науки и образования» (Тамбов, 2017), Научно-практической конференции «Современные подходы и перспективы решения актуальных зооветеринарных проблем в промышленном птицеводстве» (Санкт-Петербург, 2018).

**Личный вклад автора в выполнение работы.** Диссертационная работа выполнена автором самостоятельно. Отдельные этапы экспериментальных работ выполнены совместно с сотрудниками Всероссийского научно-исследовательского ветеринарного института птицеводства – филиала Федерального научного центра «Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт птицеводства» Российской академии наук (ВНИВИП), ФГБУ НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева Министерства здравоохранения РФ (Санкт-Петербург).

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

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

Первые слова благодарности по завершению представленной работы автор обращает своему научному руководителю кандидату ветеринарных наук Дмитриевой М.Е. за научное руководство.

Автор благодарит коллег-соавторов: академика, доктора ветеринарных наук, профессора Джавадова Э.Д., сотрудников ВНИВИП Дубового А.С., Занько М.А., Дмитриева К.Ю.

Автор выражает признательность исполнительному директору ООО ТПК «Балтптицепром» Гулиеву Р.Д. за содействие в выполнении работы.

## 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1. СОВРЕМЕННОЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЕ ОБ ИММУНОСУПРЕССИВНЫХ СОСТОЯНИЯХ

#### 1.1.1. Причины возникновения иммуносупрессивных состояний

Иммунная система является одной из важнейших гомеостатических систем организма, которая во многом определяет степень здоровья животных и их адаптивные возможности. Основной функцией иммунной системы является поддержание генетического постоянства организма, элиминация как экзогенных, так и эндогенных антигенов, несущих признаки генетически чужеродной информации. Нарушение функции иммунной системы рассматривается как один из патогенетических механизмов любого патологического процесса.

Нарушение выполнения иммунной системой защитной функции в результате структурных или функциональных дефектов отдельных ее звеньев является основой иммунодефицитных состояний.

Термином иммунодефициты обозначают нарушения иммунного статуса организма, обусловленные дефектом одного или нескольких механизмов иммунного ответа. В связи с тем, что иммунодефицитам сопутствуют различные патологические процессы, включая инфекционные болезни, вызываемые вирусами, бактериями, грибами, простейшими, в последние годы проблема иммунодефицитных состояний у животных стала актуальной [50].

Имунодефициты могут иметь наследственную основу (первичные иммунодефициты), а также формироваться во внутриутробном/эмбриональном или постнатальном периодах жизни под влиянием различных неблагоприятных факторов [41,48].

Первичные иммунодефициты обусловлены генетическими нарушениями в развитии и созревании клеток иммунной системы. Они проявляются повышенной чувствительностью к различным инфекционным заболеваниям бактериальной, вирусной или паразитарной природы. Преобладание тех или иных инфекций связано с преимущественной недостаточностью либо клеточного, либо

гуморального звеньев иммунной системы, либо их комбинированным поражением [15,33,37,48].

Вторичные (приобретенные) иммунодефициты имеют более широкое распространение по сравнению с первичными иммунодефицитами и возникают под воздействием бактерий, вирусов (в том числе вакцинных штаммов вирусов-иммунодепрессантов), гельминтов, при воздействии на организм ионизирующей радиации, химических ксенобиотиков, антимикробных препаратов, кокцидиостатиков, стресс-факторов, неполноценного кормления, при нарушении условий содержания и т.д. [6,36,48].

К примеру, у стрессированных цыплят увеличивается масса надпочечников и снижается масса тимуса и фабрициевой сумки. При гистологическом исследовании выявляется гипертрофия надпочечников и атрофия тимуса [43].

Иммуносупрессивными свойствами обладают микотоксины [48], антибиотики [176]. Цефалоспорины тормозят пролиферативный ответ лимфоцитов на митогены, аминогликозиды тормозят хемотаксис гранулоцитов, хлорамфеникол снижает трансформацию лимфоцитов, тетрациклины снижают синтез белка и функциональную активность иммунокомпетентных клеток, макролиды снижают синтез белка на этапе транслокации, не влияя на пролиферацию Т- и В-лимфоцитов, противогрибковые антибиотики обладают выраженным иммунодепрессивным эффектом в отношении нейтрофилов [46].

Высокая плотность поголовья, неоднородность его иммунного статуса, нарушения ветеринарно-санитарного режима создают благоприятные условия для пассирования патогенных и условно-патогенных микроорганизмов, что приводит к возникновению инфекционных болезней, сопровождающихся состоянием иммунодефицита [41,48].

### **1.1.2. Механизм иммуносупрессии вирусной этиологии**

Репликация вирусов в иммунокомпетентных клетках, таких как Т- и В-лимфоциты или макрофаги, приводит к подавлению функции иммунной системы. Инфицирование и, соответственно, разрушение хотя бы одной субпопуляции

иммунокомпетентных клеток приводит к нарушению функции иммунной системы. На возникновение и проявление иммуносупрессии, обусловленной вирусами, непосредственное влияние оказывают ряд факторов. К наиболее важным факторам относятся возраст и генотип животного, наличие других болезней и инфекций, а также факторы окружающей среды. Воздействие вирус-индуцированной иммуносупрессии на организм усиливается при наличии функциональных нарушений иммунной системы различной этиологии. При вирусных инфекциях, сопровождающихся разрушением значительного количества иммунокомпетентных клеток, возможно развитие генерализованных иммунодефицитов, сопровождающихся развитием вторичных инфекций, которые зачастую являются причиной повышенной смертности [4].

По данным И.А. Болотникова с соавт. [9], супрессия Т-зависимого или В-зависимого звена иммунной системы наблюдается при многих вирусных инфекциях, таких как БМ, ИБК, реовирусная инфекция и др. Молекулярные механизмы подавления иммунитета в каждом случае имеют свои особенности и различную степень выраженности. Особого внимания заслуживают вирус ИББ, который является специфическим возбудителем, резко угнетающим функцию лимфоцитов фабрициевой сумки, а также возбудитель синдрома анемии кур, оказывающий супрессорное влияние на Т- и В-системы иммунитета.

В связи с тем, что вирус инфекционной бурсальной болезни (ВИББ) реплицируется в В-лимфоцитах фабрициевой сумки, вызывая их полное разрушение, иммунодефицит является ведущим звеном в патогенезе ИББ [22].

По данным А.А. Родькиной [31], при ИББ доминирующим признаком является глубокая деструкция фабрициевой сумки, в первую очередь В-клеток мозгового слоя фолликулов. Развитие болезни усиливает апоптоз клеток, что проявляется сгущением и уплотнением хроматина, и его фрагментацией. У здоровых цыплят локализация апоптозных клеток отмечается на границе между корковым и мозговым слоями фолликулов, а у больных цыплят – практически во всех частях.

При болезни Марека наблюдается лимфоидное разрежение коркового вещества долек тимуса, дегенеративные и атрофические изменения в фабрициевой сумке, что приводит к развитию иммунодепрессии. В крови до 30 раз снижается концентрация тимического фактора [48]. В организме птиц, пораженных вирусом болезни Марека (ВБМ), происходит бласттрансформация и плазмоцитарная дифференциация Т- и В-лимфоцитов в иммунокомпетентных органах. Появление лимфоидных клеток плазмоцитарного ряда в мозговой и корковой зонах тимуса, периартериальных участках белой пульпы селезенки свидетельствует о развитии иммуносупрессии [431].

При ИББ, ИАЦ, реовирусной инфекции, БМ и в некоторой степени при ретикулоэндотелиозе (РЭ) репликация возбудителей данных инфекций в лимфоидных клетках вызывает их последующую гибель по причине апоптоза или некроза (болезнь Марека) [10].

Примером вирусной индукции апоптоза является вирус инфекционной анемии цыплят, в состав которого входит белок VP3 (апоптин) – главный вирусный белок, вызывающий апоптоз [226].

### **1.1.3. Иммуносупрессивные болезни в промышленном птицеводстве**

Поддержание здоровья поголовья сельскохозяйственной птицы базируется на профилактике инфекционных болезней посредством вакцинации в сочетании с созданием благоприятных условий содержания, кормления и мерами по биобезопасности. Успех программы вакцинации зависит от способности птицы формировать поствакцинальный иммунный ответ. Существует множество факторов, влияющих на формирование иммунитета, в том числе иммуносупрессия. Иммуносупрессия – это состояние временной или постоянной дисфункции иммунных реакций, обусловленное какими-либо поражениями иммунной системы, которые проявляются повышенной чувствительностью к различным болезням и нередко неадекватными иммунными реакциями. В настоящее время иммуносупрессия является главной проблемой промышленного птицеводства [267].

Иммунодепрессивные болезни всегда сопровождаются разрушением клеток и целых звеньев иммунной системы, повышенной восприимчивостью организма к патогенам различной этиологии, что делает лечение вторичных инфекций на фоне иммунодепрессии бесперспективным и, как следствие, приводит к значительным экономическим потерям [82,258].

К вирусам, вызывающим иммуносупрессию относятся ВБМ, ВИББ, вирус ретикулоэндотелиоза (ВРЭ), реовирусы, вирус лейкоза птиц (ВЛП). При интерпретации иммунодепрессивных эффектов, вызываемых вышеперечисленными вирусами, нельзя исключать влияние ВАЦ в качестве сопутствующей инфекции [267]. Так К.А. Schat [266] установил, что опухоли, взятые от цыплят с поражением гематopoэтической ткани при болезни Марека, были положительными на ВАЦ. Следует отметить, что с иммуносупрессиями также связаны эймериозы [6,267], простогонимоз, плягиорхоз, криптоспоририоз, спирохетоз, микоплазмоз, хламидиоз при которых местом обитания паразитов является, в том числе, и фабрициева сумка [6].

Иммуносупрессия возникает на фоне сопровождающихся сепсисом инфекционных болезней вирусной, бактериальной и грибковой этиологии, включая неопластические болезни. Неопластические болезни нередко возникают у птиц с поражениями иммунной системы [6].

Любая форма ИАЦ (клиническая или субклиническая) является иммунодепрессивной [8,17,140]. Вирус ИАЦ вызывает депрессию вакцинного иммунитета против БМ, НБ и герпесвируса индеек [71,128,201,232,233,315], ИЛТ [179], ИББ, ИБК, кокцидиоза [23]. Установлено, что при экспериментальном заражении ВАЦ возникают функциональные дефекты иммунной системы [55,232], что свидетельствует о специфическом поражении вирусом клеток лимфоидной ткани [130,281,282] прежде всего предшественников Т-клеток в тимусе и зрелых Т-лимфоцитов в селезенке [130,156,282]. ВАЦ вызывает разрушение клеток костного мозга, вследствие чего возникает анемия и уменьшается количество циркулирующих лейкоцитов [286].

При заражении ВАЦ происходит увеличение числа моноцитов, что негативно влияет на функцию макрофагов. С.D.G. McConnell et al. [188] установили, что у инфицированных ВАЦ цыплят, макрофаги теряют способность продуцировать интерлейкин-1, который играет ведущую роль в формировании противовоспалительной реакции. По данным V.v. Bulow [77] уменьшение продукции интерлейкина-1 значительно снижает способность иммунной системы индуцировать эффективный иммунный ответ на заражение. В результате увеличивается восприимчивость к бактериальным инфекциям. Уменьшение количества Fc-рецепторов и снижение фагоцитарной активности способствует усилению пролиферации бактерий в организме хозяина [188].

У птиц, инфицированных одновременно ВАЦ и ВИББ отмечается патологический синергизм [258], наблюдается значительное уменьшение в тимусе и селезенке Т-клеток и макрофагов по сравнению с птицами, инфицированными только ВАЦ [89]. При изучении патоморфологических изменений у цыплят при ассоциированном течении ИАЦ и ИББ, И.Н. Громов с соавторами [16] установили, что спонтанное заражение цыплят цирку- и бирнавирuсами вызывает развитие тяжелого приобретенного иммунодефицита. При этом доминирующими являются патоморфологические признаки, характерные для ИББ. На фоне ассоциированного течения ИАЦ и ИББ вакцинопрофилактика реовирусной инфекции и болезни Гамборо оказывается малоэффективной.

Инфекционная анемия как моноинфекция у цыплят протекает относительно легко и заканчивается выздоровлением. При одновременном инфицировании птицы вирусами ИББ и ИАЦ, инфекционная анемия проявляется клинически. Ассоциированное течение ИАЦ с ИББ и/или с БМ приводит к тяжелому иммунодепрессивному состоянию и сопровождается высокой смертностью, повышенной восприимчивостью птицы к вторичным инфекциям, резким снижением показателей продуктивности и угрозой возникновения инфекционных болезней (нюкаслская болезнь) [23].

У цыплят-бройлеров ассоциированное течение реовирусной инфекции и ИАЦ часто сопровождается поражением печени, а также может проявляться синдромом «синего крыла» [111,112].

Установлено, что у инфицированных ВАЦ или переболевших ИАЦ цыплят иммунный ответ после применения живой вакцины против ньюкаслской болезни из штамма «Ла-Сота» был ниже на 40% [29,320], а после применения инактивированной вакцины против НБ по данным P.G. Vox et al. [71] иммунный ответ в хозяйствах, неблагополучных по ИАЦ, был ниже на  $4,6 \log_2$ .

Острые иммуносупрессии, слабые поствакцинальные реакции и повышенную чувствительность к другим патогенам вызывают штаммы 1-го серотипа вируса ИББ, если цыплята инфицированы до 3-недельного возраста [184,269]. Снижение антительной реакции у цыплят до 3-недельного возраста, инфицированных ВИББ, связано с деплецией В-клеток в бурсе, экспрессирующих поверхностные IgM [251]. Поражение бурсы временное явление, структура ткани со временем восстанавливается. Однако подавление антительной реакции сохраняется до 7-ми недель после инфицирования. На длительность процесса восстановления влияют возраст при инфицировании и вирулентность вируса [166]. Также было установлено, что в процессе восстановления формируется 2 типа фолликулов: мелкие, не имеющие коркового слоя и крупные, имеющие нормальную структуру, с быстро делящимися В-клетками. От соотношения мелких и крупных фолликулов зависит способность восстановления антителообразования [306,307].

ВБМ-индуцированную иммуносупрессию можно разделить на раннюю фазу иммуносупрессии (цитолитическую), которая характеризуется разрушением лимфоцитов в лимфоидных органах в течение первых 2-х недель после инфицирования и атрофией тимуса и бурсы. Поздняя фаза иммуносупрессии характеризуется реактивацией вируса и развитием опухолей [261,262]. По мнению К.А. Schat [262], опухолевые клетки также могут вызывать иммуносупрессию. В последнее время ВБМ эволюционировал от вирулентных и высоковирулентных до высоковирулентных+ (vv+) патотипов [308]. Усиление патогенности ВБМ

увеличило частоту выявления опухолей и появление новых неврологических синдромов [123]. Вследствие того, что vv+ штаммы вызывают более сильное поражение лимфоидных органов, возникают более тяжелые формы иммуносупрессии [80].

Благодаря высокой устойчивости и способности к персистенции возбудителей ИББ, БМ и ИАЦ, данные инфекции становятся эндемичными, в результате чего иммунизация птицы в промышленном птицеводстве происходит в условиях иммунодефицита [296]. Так, репликация вируса ИБК в условиях иммунодепрессии, обусловленной ВИББ и ВАЦ, приводит к генотипическому дрейфу вируса ИБК [118,119]. ВАЦ, вызывая Т-клеточный иммунодефицит, негативно влияет на формирование клеточного иммунитета к вирусу ИБК [90]. С другой стороны, ВИББ, вызывая В-клеточный иммунодефицит, препятствует формированию полноценного гуморального иммунного ответа против вируса ИБК [89]. Таким образом, иммунодефициты, вызываемые вирусами ИАЦ и ИББ, широко распространены среди коммерческих цыплят [143] и часто сопряжены с ИБК, что способствует появлению новых штаммов вируса ИБК [119,191,296].

Ассоциированное течение ИАЦ и ИББ широко распространено в промышленном птицеводстве [143,274]. По данным Н. Того et al. [297], вирусы ИАЦ и ИББ являются причиной проблем в коммерческих стадах несмотря на наличие у поголовья птицы материнского иммунитета и проведение иммунизации.

Вирусы ИББ, БМ и ИАЦ не только вызывают массовую потерю определенной субпопуляции иммунокомпетентных клеток, что приводит к выпадению одного из звеньев иммунитета и, следовательно, к снижению резистентности организма, но и обладают способностью к персистированию, что увеличивает продолжительность и тяжесть болезни [26].

По данным Э.Д. Джавадова [21] в опытах, при воспроизведении моноинфекции ИАЦ, смертность СПФ-цыплят составляла 4,7%, при моноинфекции ИББ – 31,3%, а при моноинфекции БМ – 45,3%. При инфицировании вирусами ИББ и ИАЦ, смертность СПФ-цыплят повышалась до 60,7%, при диинфекции БМ + ИАЦ и БМ + ИББ – до 65,3% и 80,7% соответственно.

При одновременном заражении СПФ-цыплят вирусами ИББ, БМ и ИАЦ смертность составляла 92,0%.

## **1.2. ИНФЕКЦИОННАЯ АНЕМИЯ ЦЫПЛЯТ**

### **1.2.1. Распространение и экономический ущерб**

Впервые ВАЦ был выделен N. Yuasa [10,231,258,274] в Японии в 1979 году от больных и павших цыплят, привитых вакциной против болезни Марека, а также обнаружен в самой вакцине [13,17,18,25,53,231,266,311]. Болезнь сопровождалась высокой смертностью, атрофией и некротическими поражениями тимуса и бурсы, поражениями, характерными для БМ. В результате проведенных вирусологических исследований из почек больных цыплят были изолированы вирулентный ВБМ и ВАЦ [13,25,34]. Однако, при проведении ретроспективного серологического анализа было установлено, что ВАЦ циркулировал на юго-востоке США с 1959 года [295], хотя выделен был только в 1989 году [124].

Спустя несколько лет вспышки болезни стали регистрировать в США, Англии, Германии, Швеции, Австралии, Новой Зеландии, Северной Ирландии, Канаде, Бразилии, Малайзии, Аргентине, Китае, Южной Африке и др. [19,25,47,72,78,91,107,115,117,129,130,172,180,183,195,199,230,231,242,254,278, 292,305,313,314]. Распространение возбудителя ИАЦ доказывают и результаты серологических исследований [126,159,187,194,197,234,255,293,312,317]. По данным ряда исследователей [196,219] антитела к ВАЦ выявлены у СПФ-птицы, что повышает вероятность распространения инфекции с контаминированными вакцинами.

В настоящее время инфекционная анемия цыплят широко распространена в странах с развитым птицеводством [18,42,67,94,136,140,266,275], причем не только в крупных промышленных предприятиях, но и в мелких товарных хозяйствах и частных подворьях [3,63,64,138,230,271].

В Российской Федерации в 2000 году Э.Д. Джавадовым [20,21,25] впервые была диагностирована инфекционная анемия цыплят и выделен вирус ИАЦ от молодняка кур-несушек 25-40 суточного возраста из птицефабрики «Синявинская»

Ленинградской области. Болезнь характеризовалась острым течением, гибелью цыплят на 5-7 день после появления клинических признаков, бледностью гребня, клюва, нижних конечностей, кровоизлияниями в мышцах бедра, голени, груди и крыльев. Смертность не превышала 1,2-1,5 %. При патологоанатомическом вскрытии выявляли атрофию тимуса и бурсы, наличие сгустков фибрина в фабрициевой сумке. Также был установлен ранее не встречавшийся в птицеводческом хозяйстве признак – изменение цвета костного мозга – красно-розового на бледно-желтый или темно-серый цвет [21].

При исследовании методом иммуноферментного анализа (ИФА) сывороток крови птиц из 63 птицеводческих хозяйств России, Украины и Республики Беларусь В.А. Лобанов с соавт. [3,39] установили, что количество сероположительных к ВАЦ проб составляет от 10 до 100%. При этом у птицы в возрасте старше 150 суток количество положительных проб составляет 94-100%, а у птицы моложе 60 суток – 65-90%. По данным зарубежных исследователей [60,62,140,170,187,234,255], количество положительных проб сыворотки крови, полученных от бройлеров, промышленных и племенных кур, варьирует от 67 до 97,4%.

Результаты серологического скрининга сывороток крови от птицы из птицефабрик мясного направления выращивания, проведенного сотрудниками НПП «Авивак», свидетельствуют о том, что ВАЦ имеет повсеместное распространение, независимо от географического расположения птицеводческих хозяйств [1,3]. Широкое распространение ВАЦ подтверждается исследованиями и сотрудниками ВНИВИП [40], а также исследованиями В.Н. Ирзы (ФГБУ «ВНИИЗЖ») [35].

Независимо от формы проявления, ИАЦ наносит значительный экономический ущерб промышленным птицеводческим предприятиям, который складывается из потерь от гибели птицы, низкого прироста живой массы, увеличения конверсии корма, повышенной выбраковки птицы, снижения категорийности тушек, а также из затрат на проведение лечебных и ветеринарно-санитарных мероприятий [1,3,25,160,183,202,230]. В хозяйствах, неблагополучных

по ИАЦ потери чистой прибыли могут достигать более 18% из-за снижения мясной продуктивности и сохранности птицы [57,192,230]. Кроме этого, на фоне иммунодепрессии, вызванной вирусом ИАЦ, снижается эффективность специфической профилактики [3,17,25,230,232], повышается восприимчивость бактериальным инфекциям, вызываемым *E.coli*, *St.aureus*, *S.typhimurium*, клостридиями и др. [3,45,252] и, как следствие, увеличиваются затраты на антибиотики [230], что также приводит к экономическим потерям.

### 1.2.2. Классификация и биологические свойства вируса

Вирус инфекционной анемии цыплят в 1993 году на пленарной сессии Международного комитета по таксономии вирусов (ICTV) был отнесен к семейству *Circoviridae* роду *Circovirus* [147]. В 1999 году ВАЦ был выделен в отдельный род *Gyrovirus* [147,288]. Геном ВАЦ отличается от других вирусов, принадлежащих семейству *Circoviridae*, отсутствием репликативного белка. В 2015 году на сессии ICTV вирус ИАЦ был отнесен к семейству *Anelloviridae* [75,120,253]. Анализ структуры генома показал, что ВАЦ имеет такие же особенности, как вирусы Torque Teno (TTV) [66,142,147,211,216,244,264] и мини-вирус Torque Teno (TTMV), которые являются членами рода *Anellovirus* [66,142,147,155,244]. Величина вируса, по результатам исследований разных ученых, составляет от 18 до 26,5 нм [1,3,10,11,17,25,34,121,198,266]. Возбудитель представляет собой безоболочечный, сферический, Т-3 икосаэдр, обладающий кубическим типом симметрии вирион [1,3,5,25,34], капсид которого состоит из 32 капсомеров [1,3,5,11,17,25,34,121,284]. Плавающая плотность вируса в хлористом цезии по данным различных исследователей составляет от 1,33-1,34 г/см<sup>3</sup> до 1,35-1,37 г/см<sup>3</sup> [5,10,17,58,121,133,224,284]. Коэффициент седиментации ВАЦ в градиенте изокинетной сахарозы составляет 91S [3,10,25,58,258].

Геном ВАЦ представлен кольцевой, ковалентно связанной, одноцепочечной минус-ДНК [10,121,221,241,284]. По данным D. Todd et al. [287], репликативная форма генома вируса ИАЦ состоит из 2298 или 2319 пар оснований.

A. Kato et al. [10,165], M.H.M. Noteborn et al. [17,221,222], M.M. Miller and K.A. Schat [210] установили, что все исследованные штаммы ВАЦ по результатам определения последовательностей аминокислот имели три частично перекрывающиеся открытые рамки считывания, кодирующие белки, имеющие массу 52 кДа (ORF1), 24 кДа (ORF2) и 13 кДа (ORF3), одну область промотора и один сигнал полиаденилирования.

Основным белком капсида является структурный белок VP1 (51,6 кДа). Его кодирует, как и белки VP2 (24,0 кДа), VP3 или апоптин (13,6 кДа), полицистронная мРНК, состоящая из 21000 нуклеотидов и являющаяся основным транскриптом генома вируса ИАЦ [17,94,258,289]. Белок VP1 является наиболее вариабельным из всех белков ВАЦ [108,120,154,215,230,300], используется для проведения молекулярно-биологических исследований и характеристики вируса [92,108]. Он содержит гипервариабельную область, состоящую из 13 аминокислот (139-151), которая играет важную роль в репликации и распространении вируса [94,108,109,250]. Белок VP1 несет эпитопы, отвечающие за генерацию вируснейтрализующих антител [94,212].

Белок VP2 с фосфатазной активностью выполняет связующую функцию в процессе сборки вирионов и необходим для достижения VP1 определенной конформации [49,94,110,225,230,237,238,258,266]. Как и VP1, белок VP2 незаменим для репликации вируса [239,258,298,310]. Он также обладает антигенной активностью и отвечает за выработку вируснейтрализующих антител [168,298]. По данным M.A. Peters et al. [240], белок VP2 был модулирован для ослабления штаммов вируса инфекционной анемии цыплят. Белок VP2, вероятно, играет второстепенную роль в индукции апоптоза [163,226].

Вирус ИАЦ обладает однонаправленной стратегией транскрипции вирусного генома. Минорный белок апоптин вызывает апоптоз Т-лимфоцитов и считается важным фактором в патогенезе болезни [14,288]. VP3 играет важную роль в возникновении генерализованной лимфоидной атрофии и анемии, которая приводит к гибели инфицированных ВАЦ цыплят [157,158,224]. Кроме этого, апоптин индуцирует апоптоз в куриных лимфобластоидных клеточных линиях

[221,223,258], в злокачественных лимфобластоидных клеточных линиях [258,323] и в клетках остеосаркомы человека [258,324]. Результаты исследований С. Backendorf et al. [61] свидетельствуют, что апоптин индуцирует запрограммированную гибель только трансформированных клеток и не вызывает апоптоза в нормальных клетках. Около 70 линий опухолевых клеток человека чувствительны к апоптину. Он вызывает селективную гибель клеточных линий, полученных из опухолей человека при таких болезнях как лимфома и саркома толстой кишки, меланомы, рак молочной железы, рак легких и др. По данным Y.H. Zhang et al. [321], апоптин также индуцирует апоптоз в SV-40 трансформированных фибробластах или в клетках, подвергшихся облучению, полученных от людей с наследственными опухолевыми синдромами.

В результате трансляции генома образуется полипротеин, который расщепляется с образованием зрелых белков [14]. В настоящее время клонирован полный геном ВАЦ. При использовании его для гибридизации с ДНК полевых изолятов было установлено, что все полевые изоляты ВАЦ имеют высокую степень идентичности с клонированной прототипной ДНК [13]. В результате исследований с применением поликлональных куриных антител было выявлено, что между японскими, европейскими и американскими изолятами ВАЦ отсутствуют какие-либо антигенные различия [304]. Не было установлено различий и при исследованиях с использованием реакции перекрестной нейтрализации и метода флюоресцирующих антител (МФА) [197,230,313]. По данным К.А. Schat [263] филогенетический анализ секвенированных изолятов вируса, выделенных из разных стран мира, не выявил каких-либо биологических различий между ними. Это послужило основанием считать, что все штаммы ВАЦ принадлежат к одному серотипу [52,120,291]. При изучении белков генома вирусов ИАЦ, выделенных в хозяйствах Бангладеш, и белков американских изолятов вируса были установлены несущественные различия в их структуре. Так различия в белке VP2 составили 1,4%, а белки VP1 и VP3 отличались до 4,0% и 2,2%, соответственно [154,300].

Недавние сообщения [105,230,275,304] указывают на наличие различий между изолятами ВАЦ и на появление новых изолятов вируса по всему миру. На

основании современных исследований ряд ученых выделяют второй серотип ВАЦ [105,136,276,277]. На основе результатов филогенетического анализа нуклеотидной последовательности гена VP1 ВАЦ подразделяется на генотипы А и В [171,270]. Кроме того, небольшой кластер вирусов ИАЦ рассматривается как возможный генотип С, состоящий из рекомбинантных вирусов [139].

На основе различий в последовательности ДНК [65,139,217], в характере реакции с моноклональными антителами [313], в результатах сравнительных клинических и серологических исследований полевых французских и эталонных штаммов [148] можно говорить о том, что штаммы ВАЦ имеют отличия в патогенности. Существующие данные позволяют условно разделить выделенные штаммы ВАЦ на высокопатогенные (ТК 5803, А2) и низкопатогенные – Gifu-1 (G1), CUX-1, CIA-11, CUX-15, Via [115,129,131,183,242,313], Texan [17].

А.С. Алиевым с соавт. [4] при изучении изолятов ВАЦ, выделенных от цыплят-бройлеров, было установлено, что в птицеводческих хозяйствах России циркулируют ВАЦ, различающиеся по патогенности в отношении СПФ-цыплят без клинической манифестации инфекции. Изоляты вируса, обладавшие наиболее выраженными патогенными свойствами, имели высокую антигенную активность.

При заражении геном ВАЦ можно обнаружить в костном мозге, печени, тимусе, фабрициевой сумке, селезенке, сердце, мышцах, легких, что свидетельствует о генерализованном характере инфекции, которая проявляется диссеминацией вируса во все внутренние органы птицы [4,203,256,263]. Благодаря высокой концентрации вируса, печень является лучшим источником для выделения вируса. Максимальный титр вируса отмечается на 7 день после инфицирования [195,203,256]. В крови ВАЦ при экспериментальном заражении обнаруживают в течение первых суток. Однако возбудитель выделяется практически из всех тканей и экскретов инфицированных птиц на протяжении 5 недель с момента инокуляции. Наиболее высокая концентрация вируса отмечается с 7 по 21 сутки после заражения, с максимальным пиком на 6-7-е сутки [21,144,272].

По данным А.С. Алиева [4], ДНК вируса из патологического материала, отобранного от цыплят с признаками анемии из птицефабрик мясного направления,

в значительных количествах и чаще всего выявляется в образцах костного мозга (в 57,6% проб; 8,5 lg копий/мкл), тимуса (в 50,6% проб; 9,3 lg копий/мкл) и печени (в 44,9% проб; 7,7 lg копий/мкл). Из других паренхиматозных органов частота обнаружения генома вируса не превышала 36,8%, а его количество 6,3 lg копий/мкл.

Вирус ИАЦ реплицируется в гемоцитобластах костного мозга, предшественниках Т-клеток в коре тимуса и CD8-лимфоцитах в селезенке, вызывая анемию и иммуносупрессию [42,56,79,169]. ВАЦ негативно влияет на пролиферативный ответ лимфоцитами селезенки, на выработку спленоцитами интерлейкина-2 (ИЛ-2) и интерферона. При инфицировании ВАЦ снижается образование антигенспецифичных цитотоксических Т-лимфоцитов (CTL), подавляющих воздействие других патогенов. Помимо повреждения Т-лимфоцитов, имеет место нарушение таких функций макрофагов как экспрессия Fc-рецепторов, патогеноцитоз и антимикробная активность [42,89,186,266].

Вирус инфекционной анемии цыплят обладает тропизмом к лимфоидной ткани [67,304] и вызывает атрофию костного мозга, кроветворных и лимфоидных органов и тканей у молодых цыплят, что приводит к апластической анемии и иммуносупрессии [67,110,140,169,181,217,254].

Возбудитель ИАЦ, как и ВИББ, обладает высокой устойчивостью к физическим и химическим факторам внешней среды, дезинфектантам, что позволяет ему длительное время сохраняться в птицеводческих помещениях, способствует его повсеместному распространению и затрудняет контроль за инфекцией [103,210,266,274,297].

ВАЦ выдерживает нагревание при 60°C в течение 30 минут и сохраняется при pH 3 до pH 9 [116]. При 100°C вирус полностью инактивируется в течение 15 минут. Вирус устойчив к воздействию метилового и этилового спиртов, эфира, хлороформа, 5% раствора фенола в течение 2-х часов, к действию 90% ацетона, этиленоксида и фумигации формальдегидом – в течение 24-х часов [3,111,129,311]. В течение 2-х часов при 37°C вирус ИАЦ устойчив к действию 5% растворов коммерческих дезинфектантов, включая четвертичные аммонийные соединения,

амфотерные поверхностно-активные вещества, ортодихлорбензол. Многократное замораживание и оттаивание вирусосодержащего материала не влияют на биологическую активность ВАЦ [195,199].

Инактивация ВАЦ наступает при воздействии гипохлорида натрия через 24 часа при комнатной температуре, 1% раствора глутарового альдегида через 10 минут при комнатной температуре, 10% раствора органического йода через 2 часа при температуре 37°C, 0,5%  $\beta$ -пропиолактона через 24 часа при 4°C [318]. 5% раствор формалина в конечной концентрации инактивирует вирус через 24 часа при комнатной температуре [121,196,256].

### 1.2.3. Эпизоотология

До сих пор считалось, что ВАЦ инфицирует только кур, однако антитела к ВАЦ были выявлены у японских перепелов [42,113]. M. Gholami-Anangaran et al. [122] выделили ВАЦ у домашних воробьев (*Passer domesticus*). Куры являются естественными хозяевами ВАЦ, но по данным L. Fang et al. [114] варианты вируса ИАЦ были выделены от мышей, кошек, собак и человека. Есть сведения о выделении ВАЦ от индеек [258].

Вирус передается горизонтально фекально-оральным путем и вертикально [136,203,258,274]. Так, при проведении исследований на птицефабриках Малайзии Z. Nailemariam et al. [136] было установлено, что от 40 до 100% эмбрионов кур инфицировано ВАЦ. От инфицированных петухов вирус передается с семенной жидкостью [42,120,145]. По данным некоторых исследователей вирус может передаваться через респираторный тракт [17,144]. Кроме этого, ВАЦ может передаваться с контаминированными вакцинами [47,67,268]. Контаминация вирусвакцин происходит в результате использования инфицированных ВАЦ СПФ-эмбрионов [181,268]. Установлено, что ВАЦ содержится в стержнях пера инфицированных птиц, перхоти и, следовательно, перо играет определенную роль в передаче вируса [93,116]. Факторами передачи вируса из одного хозяйства в другое являются люди, одежда, инвентарь, транспорт [52].

Наиболее восприимчивы к ИАЦ цыплята до 2-недельного возраста. Однако возрастная устойчивость снижается при коинфекции ВАЦ с иммунодепрессивными агентами, такими как ВИББ, ВБМ и ВРЭ [42,77]. Признаки болезни более выражены у цыплят мясных кроссов [84].

У инфицированных цыплят наблюдается низкий иммунный ответ или его отсутствие после иммунизации, либо более сильная поствакцинальная реакция [52]. По данным S. Rautenschlein [248], иммунологическая компетентность восстанавливается через 16-18 дней после заражения, когда в сыворотке крови появляются антитела.

Однако ВАЦ способен циркулировать в организме длительное время независимо от наличия в крови антител и в любом возрасте [52,148,153,161]. Рядом исследователей установлено, что ВАЦ может сохраняться длительное время в репродуктивных органах и передаваться трансовариально. При этом вируснейтрализующие антитела не являются препятствием для персистенции вируса в репродуктивных органах. В период полового созревания нередко отмечается сероконверсия, что связано с активацией вируса при латентной форме течения ИАЦ у кур [49,74,84,85,116,209].

При заражении цыплят 3-недельного возраста и старше клинические симптомы не развиваются, что связано с определенной возрастной устойчивостью к ИАЦ. Несмотря на это ВАЦ подавляет функцию Т-клеток и макрофагов, что выявляется при гистологическом исследовании [56,291]. ВАЦ у цыплят, инфицированных старше 3-недельного возраста, вызывает субклиническую форму болезни, сопровождающуюся иммунодепрессией и, как следствие, к повышенной восприимчивости к другим инфекциям и снижению эффективности иммунизации [273,298,300].

У взрослых кур ИАЦ протекает в виде субклинической инфекции [201]. Однако отмечаются случаи проявления клинической формы болезни и повышенной смертности у промышленных кур-несушек [29].

А.С. Алиев с соавт. [3] считает, что высокий уровень антител среди не вакцинированной птицы свидетельствует о субклинической форме течения болезни при инфицировании патогенными изолятами ВАЦ.

Сероконверсия у большинства птиц, при естественном заражении имеет место через 2-4 недели [77,194]. Но у части (10% и более) переболевшей птицы могут отсутствовать антитела к вирусу ИАЦ. Данный феномен объясняется тем, что часть птицы в стаде обладает иммунологической толерантностью к данному возбудителю, отсутствием инфицирования или элиминацией антител [1,3,25].

Высокая устойчивость к дезинфектантам и продолжительная персистенция вируса ИАЦ в организме после выздоровления (в течение 2-3 недель) способствует длительной циркуляции возбудителя в популяции птиц.

#### **1.2.4. Клинические признаки**

Клиническое проявление инфекционной анемии цыплят в основном отмечается у цыплят 12-14-суточного возраста, которое обычно обусловлено трансвариальной передачей. Цыплята старше 2-3-недельного возраста также восприимчивы к инфекции, но у них развивается субклиническая форма болезни, о чем свидетельствуют снижение поствакцинального иммунного ответа, повышение вероятности возникновения других инфекций и снижение клеточно-опосредованного иммунного ответа [56,136,141,186,215,258,266].

Вспышки болезни характеризуются анемией и иммунодепрессией [56,230,258,266,314]. D. Todd [291] отмечал, что у цыплят раннего возраста при ИАЦ наблюдается депрессия, бледность, снижение прироста массы тела, уровня гематокрита и лейкоцитов, особенно лимфоцитов и гетерофилов.

К. Dhama et al. [101] отмечали, что при экспериментальном заражении суточных цыплят на 14 сутки после внутримышечного введения иннокулята ВАЦ в дозе 0,1 мл наблюдалось падение гематокрита ниже 27% и желтоватое окрашивание костного мозга. По данным A. Davidson et al. [176] показатели гематокрита могут снижаться до 15-17%, что негативно влияет на продуктивность бройлеров. Снижение гематокрита варьирует и может достигать 32% [119].

Как и при вертикальной передаче вируса, при инфицировании серонегативных цыплят до 1-недельного возраста, клинические признаки проявляются, начиная с 12-х суток после вывода или инфицирования [42,77] и могут сопровождаться увеличением смертности, которая обычно достигает 5-10% [52]. У цыплят отмечается депрессия, взъерошенность оперения, бледность клюва, сережек и слизистых оболочек [215,230], задержка роста [215], потеря аппетита, на концах крыльев иногда выявляется гангренозный дерматит («синие крылья») [52,111,112]. По данным Н. Gelderblom et al. [121] и А.М. Hegazy et al. [140], уровень смертности при ИАЦ обычно составляет 10-20%, но при ассоциированных инфекциях может достигать 60%. N. Sandhya et al. [258] и G.H. Lai et al. [174] отмечают, что заболеваемость при ИАЦ может составлять 80-100%, а смертность при осложнении вторичными инфекциями – более 50-55%.

Часто клиническая картина не характерна и выражается неоднородностью стада, небольшим повышением смертности, отставанием в росте и значительным увеличением количества случаев выявления вторичных инфекций [52].

Вирус инфекционной анемии цыплят может вызывать клиническое проявление болезни, которое характеризуется высокой смертностью, анемией, задержкой роста и развития, параличами нижних конечностей, а также иммунодепрессией, способствующей возникновению у птицы вторичных инфекций [56,120,202,266,288]. Вторичные инфекции могут быть вызваны вирусными, бактериальными, паразитарными или грибковыми патогенами [82,215,230,266]. У кур-несушек ИАЦ сопровождается бледностью гребня и сережек, при осложнении колибактериозом - повышением смертности [29].

Наиболее тяжело болезнь протекает у цыплят, которые коинфицированы другими вирусами, такими как реовирусы, аденовирусы, ВРЭ, ВБМ, ВИББ [116]. Установлено, что вирус ИАЦ играет ключевую роль в этиологии ряда многофакторных болезней [214,288].

### 1.2.5. Патогенез

Установлено, что клетками-мишенями для ВАЦ являются гемоцитобласты костного мозга и предшественники Т-лимфоцитов коркового вещества тимуса [56,120], поэтому на раннем цитолитическом этапе инфекции (через 6-8 суток после заражения) они первыми вовлекаются в патологический процесс [10]. Тимоциты коркового слоя погибают в результате апоптоза клеток-мишеней. На 6-7 сутки после заражения уровень пораженных клеток достигает максимальных значений. Процесс продолжается до 10-12 суток [158].

В костном мозге наблюдается дегенерация кроветворных клеток, увеличение проэритробластов, наличие макрофагов с кроветворными клетками в состоянии дегенерации. Через 10-12 дней после заражения в фабрициевой сумке, селезенке и других лимфоидных органах наблюдается истощение лимфоидных клеток вплоть до некроза [25,132,272,282].

По данным В. Kuscu et al. [169] у молодых цыплят обширные поражения в тимусе и костном мозге происходят в интервале от 10 до 17 суток после заражения.

Начиная с 16 суток после заражения, в тимусе происходит репродукция лимфоцитов и проэритробластов. В костном мозге появляются промиелоциты и восстанавливается кроветворная функция. В результате развития этих процессов к 32-36-суточному возрасту происходит выздоровление [10].

S.H.M. Jeurissen et al. [158] отмечают, что чувствительность тимоцитов или спленоцитов к ВАЦ не зависит от экспрессии кластеров дифференцировки CD4 и CD8. При этом кратковременное истощение лимфоцитов CD4 и CD8 или снижение количества цитотоксических Т-клеток играет важную роль в механизме подавления иммунитета при инфекционной анемии цыплят [89,186].

Репликация вируса в основном происходит в моноцитах и макрофагах, приводя к подавлению иммунной системы [14], а также в лимфобластах коркового слоя тимуса, интра- и экстраиноидальных гемоцитобластах и ретикулярных клетках [55,145,272]. Антигены вируса ИАЦ также выявляли в зрелых Т-лимфоцитах, в селезенке [55], в лимфоидной ткани других органов [272]. В костном

мозге и тимусе на 6-7 день после заражения наблюдается максимальное количество инфицированных клеток [10,272].

У бурсаэктомированных особей уровень персистенции ВАЦ значительно выше [148,316]. Инфицирование ВАЦ бурсаэктомированных цыплят сопровождается снижением гематокрита, нарушением процентного соотношения кластеров дифференцировки CD4/CD8 в тимусе. При этом антитела к ВАЦ не вырабатываются [316].

При заражении вирусом ИАЦ возникает тромбоцитопения, которая играет ведущую роль в возникновении предрасположенности инфицированной птицы к различным патогенам, проникновению которых способствует нарушение целостности стенок сосудов [38].

Вирус ИАЦ в тимусе препятствует созреванию Т-лимфоцитов, что негативно влияет на выработку клеточно-опосредованного иммунного ответа [56]. Иммуносупрессия, вызванная истощением лимфоцитов и макрофагов, повышает восприимчивость организма птицы к различным бактериальным и вирусным инфекциям, а также снижает реакцию на введение вакцин [55,71,96,120,140].

Концентрация макрофагов также значительно снижается после воздействия вируса *in vivo* или *in vitro*, а также подавляются функции макрофагов, такие как продукция интерлейкина-1 (IL-1), экспрессия Fc-рецепторов, фагоцитоз и бактерицидная активность [55,62,89,189].

При инфицировании вирусом ИАЦ отмечаются изменения в бурсе в виде атрофии лимфоидных фолликулов различной степени выраженности с рассеянными некротическими очагами [140,150].

Иммуносупрессия, возникающая в результате повреждения вирусом ИАЦ костного мозга и лимфоидных органов, является причиной низкой эффективности вакцинаций или поствакцинальных осложнений [55,137,230].

По данным D. Todd [288], K. Dhama et al. [99], вирус ИАЦ вызывает депрессию иммунного ответа после вакцинации против НБ, БМ, ИЛТ и оспы, повышенную поствакцинальную реакцию или обострение остаточной

патогенности аттенуированных вакцинных вирусов, а также может привести к появлению вариантных штаммов вирусов.

G.F. De Boer et al. [96] установили, что в результате функциональных нарушений вирусом ИАЦ цитотоксических Т-лимфоцитов и естественных киллеров, возникают поражения, которые провоцируют поствакцинальные осложнения у суточных цыплят при иммунизации их против ньюкаслской болезни вакциной из штамма «Ла-Сота». У цыплят наблюдались такие признаки как угнетение, конъюнктивит, нарушение дыхания, смертность до 30%.

У инфицированной ВАЦ птицы повышается восприимчивость к вирусным, бактериальным инфекциям [52] и инфекциям паразитарной и грибковой этиологии, среди которых: БМ [140,207], ИББ [140,153], НБ [96], реовирусная [112,193] и аденовирусная инфекции [294], ретикулоэндотелиоз [140,291]; бактериальные инфекции, вызываемые *Streptococcus spp.*, *Staphylococcus aureus* [204,278], *Clostridium spp.* [124,278], *Salmonella typhimurium* [25,28,29], *Escherichia coli* [25,28,29,278], а также инфекции, вызываемые *Cryptosporidium baileyi* [146], фузобактериями [25,28,29]; эймериозы, вызываемые *Eimeria tenella* [29,319]; аспергиллез [278].

Вследствие снижения у инфицированных цыплят гематокрита (ниже 27%) кровь приобретает водянистую консистенцию, увеличивается время свертывания, плазма становится бледной. При выздоровлении значение гематокрита возвращается к норме через 28-32 дня после инфицирования [59,116,132,258,282,311]. Низкие значения гематокрита обусловлены панцитопенией [116,281,282,311]. При этом значительно снижается количество лейкоцитов, эритроцитов и тромбоцитов. Состав крови у цыплят при выздоровлении восстанавливается к 40 дню после инфицирования [282].

### **1.2.6. Патоморфологические изменения**

При патологоанатомическом исследовании при ИАЦ выявляют истощение, анемию, увеличение печени, почек и селезенки, наличие в них участков некроза, различную степень атрофии вилочковой железы, атрофию бурсы [79,112,215,257].

Помимо атрофии тимуса, характерным признаком ИАЦ является аплазия и изменение цвета костного мозга [56,230,258,266,314]. По данным ряда исследователей в некоторых случаях обнаруживают наличие геморрагий в слизистой оболочке железистого желудка, подкожные отеки головы и нижних конечностей, круглое сердце, гангренозный дерматит в области крыльев, спины, шеи, груди, нижних конечностей, серозные экссудаты в подкожной клетчатке темно-синего цвета на крыльях («синее крыло»), которые могут распространяться на грудную клетку, брюшную полость, вплоть до клоаки [30,112,133,257], студневидный экссудат в брюшной полости [45].

Гистопатологические исследования доказывают, что иммуносупрессивный эффект при ИАЦ обусловлен разрушительным воздействием вируса на кроветворные и лимфопоэтические клетки, результатом которого является нарушение формирования иммунного ответа. ИАЦ-инфекция вызывает серьезные нарушения функций селезеночных Т-лимфоцитов в виде снижения чувствительности к фитогемагглютинину, конканавалину А и снижения выработки интерлейкина [55]. При гистологическом исследовании обнаруживают уменьшение популяции лимфоцитов не только в селезенке, но и в других лимфоидных органах [42,70].

Гистологические изменения в паренхиматозных органах при ИАЦ могут варьировать. Наиболее типичными являются изменения в костном мозге и тимусе цыплят. Патоморфологические изменения в костном мозге характеризуются аплазией и ожирением, апоптозом кроветворных клеток эритроидного и гранулоцитарных рядов. Изменения в тимусе представлены атрофией и делимфатизацией коркового вещества, ростом в корковом и мозговом слое числа телец Гассалья, склеротизацией и жировым перерождением долек [4,274].

В соответствии с наблюдениями ряда зарубежных авторов в отношении различных штаммов вируса ИАЦ [190,289] следует отметить, что выраженность нарушений в центральных органах кроветворения и иммуногенеза варьирует в зависимости от патогенности возбудителя.

По данным А.С. Алиева [4], при заражении суточных СПФ-цыплят высоковирулентными изолятами ВАЦ, морфологические изменения наиболее часто отмечались в тимусе и костном мозге, так же, как и при естественном заражении. У трупов выявляли признаки анемии, точечные, пятнистые или полосчатые кровоизлияния в перемизии грудных мышц и мышц шеи.

У кур-несушек патологоанатомические признаки представлены общей анемией, аплазией костного мозга, иногда желтушностью кожных покровов, серозно-геморрагическими отеками подкожной клетчатки в области брюшной стенки, груди и конечностей, а также признаками вторичных инфекций [29].

### 1.2.7. Иммунитет

В производственных условиях птица подвергается воздействию множественных стресс-факторов и патогенов различной этиологии, которые негативно влияют на врожденный и адаптивный иммунитет [143]. Основными эндемичными патогенами, вызывающими изменение гуморальных и клеточных иммунных функций, являются вирусы ИББ, БМ и ИАЦ [296].

Птица после переболевания ИАЦ приобретает иммунитет. Однако продолжительность и возрастные аспекты его формирования до конца не изучены. При экспериментальном и естественном заражении вируснейтрализующие антитела против ВАЦ образуются через 21 сутки. Иммунная реакция на заражение у цыплят раннего возраста, несмотря на их высокую восприимчивость к вирусу ИАЦ, низкая. При заражении цыплят старше 28-суточного возраста антитела в сыворотке крови выявляются уже через 4-7 суток после заражения, а их максимальный уровень формируется через 14-21 сутки в зависимости от способа введения вируса [3,301].

Иммунитет при ИАЦ сложный. Вируснейтрализующие антитела защищают от клинического проявления болезни, но не обеспечивают эффективной защиты от инфицирования полевым вирусом. Для специфической профилактики ИАЦ разработаны коммерческие вакцины, которые в основном используются для

вакцинации родительских стад бройлеров, что позволяет снижать уровень вертикальной и горизонтальной передачи вируса [116].

В настоящее время доступные коммерческие вакцины получены из полевых штаммов, ослабленных в результате серийного пассажирования в культуре клеток или в куриных эмбрионах [201]. Тем не менее, вирусы в этих вакцинах обладают остаточной вирулентностью и способны передаваться вертикально или горизонтально, вызывая клинические признаки у молодых цыплят. Кроме этого, вакцинные штаммы вируса ИАЦ способны реверсировать к исходной вирулентности после передачи от цыпленка к цыпленку в полевых условиях [290,302]. В связи с этим производителями рекомендуется иммунизировать цыплят старше 6 недель и не позднее, чем за 4 недели до начала яйцекладки [266].

### 1.2.8. Диагностика

Окончательный диагноз на ИАЦ ставится на основании выделения ВАЦ. Кроме того, для диагностики ИАЦ используют методы выявления вирусного антигена в мазках-отпечатках и срезах тканей, обнаружения антител в сыворотках крови, выделения вирусных нуклеиновых кислот в тканях больных и инфицированных птиц [203].

Вирус ИАЦ не реплицируется в обычных клеточных линиях. Обычно для выделения и культивирования ВАЦ используют культуры клеток MDCC-MSB1 [42,113,203,217]. В культуре клеток вирус вызывает цитопатический эффект, который характеризуется увеличением и деформацией клеток, содержащих малые вакуоли, агрегацией хроматина, дегенерацией и лизисом клеток. Инфекционную активность вируса ( $TCID_{50/ml}$ ) определяют титрованием путем инокуляции клеточных субкультур каждые 2-3 дня. Обычно проводят 7-10 пассажей [256]. Некоторые вирусы ИАЦ не могут адаптироваться к культуре клеток MDCC-MSB1. При культивировании в клеточной линии MDCC-CU 147 (Monoclonal lesion derived T-cell line) заражающая доза в 10 раз ниже, чем при культивировании вируса в MDCC-MSB1. Кроме этого, ВАЦ можно культивировать в лимфобластоидных клеточных линиях MDCC-JP2 (T cell, MDV transformed), LSCC-1104/ X5 B1 (B-cell,

induced by ALV) и LSCCHD11 (AMV transformed) [81,130,266]. Идентификацию вируса в культуре клеток можно проводить методом прямой и непрямой флуоресценции с использованием куриной поликлональной сыворотки, гиперимунной сыворотки крови кроликов или моноклональных антител к ВАЦ [100,200,202,256].

Наиболее специфичным методом для первичного выделения вируса ИАЦ является внутримышечное или внутрибрюшинное заражение СПФ-цыплят суточного возраста [42,113,254,256]. У инокулированных цыплят через 12-16 суток наблюдается анемия, которая сопровождается снижением гематокрита более чем на 25%, характерными патоморфологическими признаками [10,254,256]. Для заражения также можно использовать суспензии селезенки и лейкоцитов [18].

При экспериментальном заражении цыплят гомогенатом печени от павших с признаками ИАЦ птиц у них наблюдается отставание в росте, развитие апластической анемии, сопровождающейся снижением количества эритроцитов, лейкоцитов и тромбоцитов, а также имеет место общая атрофия лимфоидных органов и гибель цыплят в период с 12-х по 24-е сутки после инфицирования [34].

Биопроба на чувствительных суточных цыплятах является наиболее специфичным и достаточным методом для постановки окончательного диагноза [18,130].

Для биопробы также могут быть использованы 4-5-суточные СПФ-куриные эмбрионы [19,21]. Заражение развивающихся КЭ (РКЭ) производят в желточный мешок. Вирус накапливается практически во всех тканях эмбриона. Пик накопления отмечается на 14-е сутки после инокуляции. Наибольшая концентрация вируса отмечается в соматической ткани эмбриона, в желточном мешке, печени, хориоаллантоисной оболочке [5]. Выраженных патологических изменений у инфицированных эмбрионов и их гибели обычно не наблюдается [5,13,34]. Уровень смертности эмбрионов и наличие каких-либо признаков поражения зависит от вирулентности штамма вируса. По данным некоторых исследователей после инокуляции штаммами Gifu-1 и Cux-1 вируса ИАЦ развития каких-либо поражений у эмбрионов не наблюдалось. А после инокуляции

штаммом GL-1 вируса ИАЦ смертность эмбрионов между 16-20-ми сутками инкубации составляла 50%. Поражения эмбрионов характеризовались недоразвитием, массовыми геморрагиями и отеками [172]. У цыплят, выведенных из инфицированного яйца, на 7-е сутки появляются признаки анемии, а на 10-15-е сутки наблюдается их гибель [3,17,25].

Для серологической диагностики ИАЦ применяются реакция нейтрализации (РН), реакция непрямой иммунофлуоресценции (РНИФ) и иммунопероксидазные тесты [73,159,203,256,258], метод иммуноферментного анализа (ИФА). Для выявления вируснейтрализующих антител в сыворотке крови и проведения мониторинга эффективности вакцинации существуют коммерческие ELISA-наборы [42,87]. Однако по данным С.Ж. Cardona et al. [84], М.М. Miller and К.А. Schat [210], серонегативные птицы могут быть инфицированы ВАЦ, который может, например, выявляться в репродуктивном тракте. L.B. Hu et al. [302] также показали, что персистенция ВАЦ у инфицированных птиц может не сопровождаться образованием антител.

Наряду с вышеперечисленными методами и средствами диагностики, выявление значений гематокрита ниже 27% при клиническом исследовании крови в совокупности с изменениями в костном мозге (желтоватый цвет) и атрофией тимуса может указывать на инфицирование ВАЦ [140,243,247,311]. В зависимости от стадии болезни в мазках крови выявляют лейкопению или панцитопению (низкое содержание всех форменных элементов крови) [42,77].

Одним из важных приемов диагностики ИАЦ является патоморфологическое исследование. Данный прием можно использовать при диагностике ИАЦ, протекающей как в виде моноинфекции, так и в виде ассоциации с другими вирусными болезнями [16].

С помощью электронной микроскопии вирусные частицы возбудителя ИАЦ можно обнаружить только в сильно очищенных препаратах инфицированных клеточных культур. Выявление и идентификация вирусных частиц в ультратонких срезах инфицированных клеточных культур или тканях кур затруднено [10].

Одним из методов обнаружения вируса ИАЦ также является метод иммуноэлектронной микроскопии [152,198].

В настоящее время для выделения ДНК ВАЦ широко используют полимеразно-цепную реакцию (ПЦР) [42,74,85,100,106,164,256]. ПЦР является быстрым, высоко специфическим и наиболее чувствительным методом прямого обнаружения вирусных нуклеиновых кислот в инфицированных образцах [106,140,208,214]. С помощью ПЦР вирус ИАЦ можно выделить из различных образцов (гомогенатов, лимфоидных органов, клеточных культур, помета и др.) свежих или замороженных, в том числе из образцов органов, фиксированных формалином и тканей, фиксированных парафином [256,266]. Метод Nested PCR (primers-nt position 2303, 1528) обладает более высокой чувствительностью [251]. С.Л. Markowski-Grimrud et al. [185] разработали штамм-специфичную ПЦР в реальном времени для количественного определения вируса. К.М. Caterina et al. [86] разработали мультиплексную ПЦР для одновременного обнаружения и дифференциации реовируса, аденовируса птиц (серотип I), ВИББ, и ВАЦ. Следует отметить, что ВАЦ является генетически консервативным и незначительные изменения в геноме возбудителя не оказывают негативного влияния на диагностику [176]. По мнению К. Tham and W.L. Stanislawek [283], эффективность ПЦР-анализа зависит от качества праймеров, наиболее оптимальный размер которых составляет 583 п.н.

Для определения наличия вирусной ДНК в тканях кур или в клетках MSB1, инфицированных полевыми штаммами ВАЦ, а также в срезах, фиксированных формалином, можно использовать метод *in situ* гибридизации с использованием биотинизированного ДНК-зонда [10,17,25].

Для диагностики ИАЦ можно использовать рестрикционный анализ (Restriction enzyme analysis (RE)) [230,285]. Сущность метода заключается в обработке ДНК рестрикционными ферментами (специфическими эндонуклеазами), разрезающими молекулу ДНК по определенным последовательностям нуклеотидов. После этого анализируют полученные фрагменты, специфические для каждого вида или варианта микроорганизма.

Метод позволяет дифференцировать изоляты и штаммы вируса ИАЦ, выделенные из регионов с различным географическим положением [230]. D.O. Oluwayelu and D. Todd [228] в результате исследований с использованием RE установили, что в популяциях кур могут циркулировать смешанные популяции штаммов вируса ИАЦ. Данные результаты были подтверждены рядом других исследователей при использовании метода геномного секвенирования [108,228,300]. Метод геномного секвенирования используют для изучения вариаций полевых изолятов, их родства с выделенными и зарегистрированными вирусами, а также для дифференциации полевых изолятов и вакцинных штаммов ВАЦ [85,230,256].

### 1.2.9. Дифференциальная диагностика

ИАЦ, прежде всего, следует дифференцировать от инфекционной бурсальной болезни. ИАЦ и ИББ имеют сходные клинические и патологоанатомические признаки, такие как депрессия, взъерошенность оперения, кровоизлияния в мышцах и на границе мышечного и железистого желудков, повышенная смертность, которые могут проявляться как при инфицировании цыплят высоковирулентными ВАЦ и ВИББ в виде моноинфекции, так и при коинфекции ИАЦ и ИББ. Установить диагноз можно только при проведении лабораторных исследований [54,56,57,227,266,274]. По данным ряда исследователей [227,230,235] при проведении исследований с использованием ПЦР ретроспективно были выявлены случаи ИАЦ там, где первоначально была диагностирована ИББ.

Высокая заболеваемость и смертность могут быть обусловлены иммуносупрессией, вызванной субклинической формой течения ИАЦ, на фоне которой имело место обострение ИББ. Проявление ИББ при этом возникает в результате низкой эффективности вакцинации против ИББ [143,266]. Вирусы ИАЦ и ИББ усиливают действие друг друга и препятствуют формированию иммунного ответа [147,297].

Инфекционную анемию цыплят необходимо также дифференцировать от гиповитаминоза В12, фолиеводефицитной и железodefицитной анемии,

афлотоксикоза, отравления сульфаниламидами и апластической анемии при вирусных болезнях (лимфоидный лейкоз, миелоидный лейкоз, эритроидный лейкоз, БМ), от аденовирусной инфекции [3,10].

### **1.2.10. Методы контроля и профилактика**

В настоящее время очевидна острая необходимость в иммунизации птицы родительских стад и проведение мониторинга на наличие у нее антител к ВАЦ в период выращивания, чтобы избежать вертикальной передачи вируса и обеспечить защиту потомства материнскими антителами против ВАЦ [57,140]. Кроме этого, следует повышать уровень биозащиты и предотвращать коинфекцию ИАЦ и ИББ [57].

Для специфической профилактики ИАЦ на племенных и родительских стадах применяются живые вакцины. Рекомендуется вакцинировать серонегативную птицу до начала яйцекладки, чтобы предотвратить трансвариальную передачу вируса ИАЦ. Вакцину вводят посредством инъекции, с питьевой водой [42,79] или путем прокола перепонки крыла [35].

В некоторых странах в неконтаминированные ВАЦ птичники помещают подстилку или добавляют в питьевую воду гомогенат тканей, полученных от зараженных цыплят с целью инфицирования и формирования антител у птицы родительского стада до начала периода яйцекладки, что уменьшает риск трансвариальной передачи ВАЦ [42,79,116]. Однако данный способ профилактики несет риск заражения и возникновения синергетического эффекта с другими иммунодепрессивными вирусами [42,115], а также поддерживает высокий уровень вируса в популяции птиц [116].

При использовании аттенуированного штамма вируса ИАЦ для иммунизации суточных СПФ-цыплят наблюдались снижение гематокрита, анемия и патоморфологические изменения в органах гемопоэза и лимфоидных органах (деплегия и апоптоз тимоцитов в тимусе и лимфоцитов в селезенке) [151]. А. Kaffashi et al. [161,162] разработали вакцину на основе мутантного штамма «E116G» вируса ИАЦ для иммунизации цыплят суточного возраста.

При проведении специфической профилактики ИАЦ живыми вакцинами следует учитывать тот факт, что вакцинный ВАЦ, как и полевой, передается трансвариально и горизонтально. Авирулентные и аттенуированные вакцинные штаммы вируса ИАЦ, который является сильнейшим иммунодепрессантом, могут обладать остаточной патогенностью, что сопровождается осложнениями в виде возникновения бактериальных инфекций и существенными экономическими потерями [103,288], а также могут вызывать клинические признаки у молодых цыплят [290,302]. Установлено, что аттенуированные штаммы ВАЦ не стабильны и способны реверсировать к исходной патогенности через несколько пассажей на маленьких цыплятах [27,29,290,302].

S.H. Jeurissen et al. [156] и B. Kuscu et al. [169] выявили, что репликация вакцинного штамма вируса в тимусе и его персистенция в организме некоторых птиц вызывают расстройства тимопоэза, такие же как у птиц, инфицированных патогенными вирусами ИАЦ.

По данным G.F. McKenna et al. [190] некоторые аттенуированные штаммы вируса ИАЦ могут вызывать субклинические инфекции, которые не сопровождаются анемией или какими-либо существенными поражениями.

У иммунизированных в раннем возрасте цыплят отмечается длительная персистенция вакцинного вируса ИАЦ в организме и его негативное воздействие на лимфоидную ткань, что потенциально может играть важную роль в развитии субклинических инфекций и влиять на уровень чувствительности к другим патогенам. В настоящее время проводятся исследования по изучению влияния персистенции вакцинных штаммов ВАЦ на эффективность вакцинации против вирусных инфекций [302].

Имеются сведения об эффективности иммунокомплексных вакцин против ИАЦ. Вакцина в своем составе содержит вирус и специфические антитела. Иммунокомплексная вакцина вводится цыплятам в суточном возрасте или *in ovo* и работает по принципу симультанной иммунизации. Однако для создания коммерческих иммунокомплексных вакцин необходимы дополнительные исследования [265].

Для решения проблемы неполной аттенуации ВАЦ рядом исследователей были предприняты попытки разработать субъединичные вакцины [298]. Для получения рекомбинантного белка VP1 использовали *E.coli* [178] и системы растений [173]. Однако трудности, связанные с экспрессией гена VP1, до настоящего времени не позволяют разработать безопасную и эффективную вакцину против вируса инфекционной анемии цыплят [258].

В последние годы ведутся разработки по конструированию ДНК-вакцин [42,212]. ДНК-вакцины являются безопасными, стабильными и способны индуцировать как гуморальный, так и клеточный иммунный ответ [212,259]. Вируснейтрализующие антитела против ВАЦ индуцируются при инокуляции ДНК-вакцинами на основе плазмид, с использованием различных биологических систем, содержащих в векторе одновременно белки VP1 и VP2 [212,213]. Но иммунизация ДНК-вакцинами требует больших затрат времени, так как их необходимо вводить цыпленку несколько раз, чтобы получить достаточный для защиты уровень титров антител [177,212,213,236,259,322]. Несмотря на широкие исследования по созданию генно-инженерных вакцин против ИАЦ, в настоящее время эффективных коммерческих вакцин до сих пор не представлено.

Разработаны инактивированные вакцины против ИАЦ [162,260]. Желательно, чтобы инактивированная вакцина содержала антиген ВАЦ, имеющий до инактивации титр вируса выше  $10^{7.5}$  TCID<sub>50</sub> в дозе, предпочтительнее выше, чем  $10^{8.0}$  TCID<sub>50</sub> или  $10^{9.0}$  TCID<sub>50</sub>. Необходимый титр можно получить с использованием различных методов концентрирования вирусосодержащей жидкости (ультрацентрифугирование и др.) [260].

Исследования A. Pages-Mante et al. [236] и X. Zhang et al. [322] показали, что трехкратное введение курам инактивированной вакцины с титром вируса  $10^{7.5}$  TCID<sub>50</sub> или  $7,9 \times 10^{17}$  копий/мкл в дозе, вызывают индукцию материнских антител, имеющих достаточный уровень для защиты от вируса ИАЦ. Однако достичь высокого титра вируса для производства эффективной инактивированной вакцины является проблемой.

C.W. Canal et al. [83] и D.A. Roussan [255] было установлено, что титры антител у кур в ИФА выше 1:5000, защищают потомство от вируса ИАЦ в течение первых 4-х недель жизни.

Проводятся исследования по разработке вакцин с использованием различных стимуляторов иммуногенеза. Так современные технологии позволили клонировать куриный IL-12, структура и функции которого имеют сходство с таковым у млекопитающих [97]. IL-12 стимулирует секрецию интерферона и репродукцию лимфоцитов в селезенке [135,205,279]. Рядом исследователей установлено, что плазмиды IL-12 или рекомбинантный IL-12 (rchIL-12) повышают эффективность антигенов-кандидатов для производства вакцин, как для человека, так и для животных [182,206]. Следовательно, IL-12 стимулирует иммунный ответ и является потенциальным адъювантом вакцин для человека или животных [249,279,280].

Помимо оптимизации вакцин с помощью рекомбинантных систем, адъювантов, таких как цитокины, эффективность вакцины можно повысить за счет повышения иммуногенности антигенов посредством стимуляции гуморального или клеточного иммунного ответа [149]. Эффективно стимулируют как клеточный, так и гуморальный иммунный ответ virus-like particles (VLP) вакцины (субъединичные) [220].

В результате исследований Т.-У. Tseng et al. [298] было показано, что рекомбинантный белок VP1 совместно с куриным рекомбинантным IL-12, индуцировал высокоспецифичные антитела к ВАЦ. Для генерации VLP CAV использовали систему экспрессии бокаловirusа, где экспрессируемый в этой системе IL-12 служил в качестве адъюванта для улучшения иммунного ответа у вакцинированных цыплят. Было установлено, что в сочетании с rchIL-12 рекомбинантная вакцина против ИАЦ индуцировала системный иммунитет у вакцинированных цыплят и вызывала формирование антител в гораздо более высоких титрах, чем коммерческие вакцины.

Разработанная Т.-У. Tseng et al. [298] вакцина может обеспечить эффективную защиту, исключая недостатки живых аттенуированных вакцин

против ИАЦ. Авторы исследований заявляют, что данная вакцина в будущем будет оптимизирована для крупномасштабного производства.

### 1.3. ЗАКЛЮЧЕНИЕ ПО ОБЗОРУ ЛИТЕРАТУРЫ

Инфекционная анемия цыплят – иммунодепрессивная болезнь, которая характеризуется отставанием в росте и развитии, апластической анемией, дерматитами, повышенной восприимчивостью к возбудителям других инфекций (вирусных, бактериальных, паразитарных), а также снижением эффективности вакцинаций против НБ, ИБК, ИББ, БМ и др. [25,29,30,32,71,104,128,201,232,315]. Любая форма ИАЦ (клиническая или субклиническая) является иммунодепрессивной [8,17,140].

В настоящее время ИАЦ широко распространена в странах с развитым птицеводством [18,42,67,94,136,140,266,275] в том числе в Российской Федерации [1,3,35,39,40]. ИАЦ наносит значительный экономический ущерб, который складывается из потерь от гибели птицы, низкого прироста живой массы, увеличения конверсии корма, повышенной выбраковки птицы, снижения категорийности тушек, а также затрат на проведение лечебных и ветеринарно-санитарных мероприятий [1,3,25,160,183,202,230].

Вирус ИАЦ относится к семейству *Anelloviridae* [75,120,253] роду *Gyrovirus* [147,288]. Штаммы вируса не имеют антигенных различий [304] и относятся к одному серотипу [52,120,291]. Однако недавние сообщения указывают на наличие различий между изолятами ВАЦ и на появление новых изолятов вируса по всему миру [105,230,275,304]. На основании различий в последовательности ДНК [65,139,217], в характере реакции с моноклональными антителами [313] и в результате клинических и серологических исследований [242] можно заключить, что штаммы ВАЦ имеют отличия по патогенности.

Возбудитель обладает высокой устойчивостью к физическим и химическим факторам внешней среды и способностью к персистенции независимо от наличия в крови антител, что позволяет ему длительное время сохраняться в окружающей

среде, способствует его повсеместному распространению и затрудняет контроль за инфекцией [103,210,266,274,297].

Вирус ИАЦ вызывает специфические поражения клеток лимфоидной ткани [130,281,282], прежде всего предшественников Т-клеток в тимусе и зрелых Т-лимфоцитов в селезенке [130,156,282], а также клеток костного мозга [286].

В присутствии ВАЦ повышается восприимчивость к инфекциям различной этиологии, среди которых БМ [140,207], ИББ [140,153], НБ [96], реовирусная [112,193] и аденовирусная инфекции [294], ретикулоэндотелиоз [140,291], инфекции, вызываемые *Streptococcus spp.*, *Staphylococcus aureus* [204,278], *Clostridium spp.* [124,278], *Salmonella typhimurium* [25,28,29], *Escherichia coli* [25,28,29,278], *Cryptosporidium baileyi* [146], фузобактериями [25,28,29], *Eimeria tenella* [29,319], а также аспергиллез [278].

Установлено, что при ассоциированных инфекциях ВАЦ усиливает патогенность вирусов ИББ [56,274], БМ [56,95,140,207,274], БН [56,96,140,274], реовируса [76,111,112,193], аденовируса [76,140,294], а также таких возбудителей, как *Staphylococcus aureus* [140,204,246], *Clostridium perfringens* [124], *Eimeria tenella* [319], *Cryptosporidium baileyi* [146].

Куры являются естественными хозяевами ВАЦ, однако в последние годы варианты вируса были выделены у домашних воробьев [114], индеек [258], от мышей, кошек, собак и человека [114]. Вирус передается горизонтально фекально-оральным и вертикальным путями [136,203,258,274], с семенной жидкостью [42,120,145], с контаминированными ВАЦ вакцинами [42,67,268], с пером и перхотью [93,116], а также через респираторный тракт [144].

Наиболее чувствительны к ИАЦ цыплята до 2-недельного возраста [42,77]. Признаки болезни более выражены у цыплят мясных кроссов [84]. У взрослых кур ИАЦ протекает в виде субклинической инфекции [201]. Однако установлены случаи проявления клинической формы болезни и повышенной смертности у промышленных кур-несушек [29]. Уровень смертности при ИАЦ обычно составляет 10-20%, но при ассоциированных инфекциях может достигать 60% [121,140].

При патологоанатомическом исследовании при ИАЦ выявляют анемию, увеличение печени и селезенки, различную степень атрофии тимуса, атрофию бурсы [215]. Кроме этого, иногда отмечаются желтушность кожного покрова, серозно-геморрагические отеки подкожной клетчатки в области брюшной стенки, груди и конечностей, признаки бактериальных инфекций [29].

После переболевания птица приобретает иммунитет, но продолжительность и возрастные аспекты его формирования до конца не изучены [3,301]. Вируснейтрализующие антитела защищают от клинического проявления болезни, но не обеспечивают защиты от полевого вируса [116].

Для диагностики ИАЦ используют клинические [140,243,247,311], патоморфологические [16], вирусологические [42,113,203,217,256], молекулярно-биологические [42,74,85,100,106,164,185,230,256,285], серологические (РН, РНИФ, ИФА и др.) [42,73,87,159,203,256,258], гистологические [4,42,55,70] и электронно-микроскопические [152,198] и др. методы исследований.

Инфекционную анемию цыплят необходимо дифференцировать от ИББ, гиповитаминоза В12, фолиеводефицитной и железодефицитной анемии, афлотоксикоза, отравления сульфаниламидами и апластической анемии при вирусных болезнях (лимфоидный лейкоз, миелоидный лейкоз, эритроидный лейкоз, БМ), аденовирусной инфекции [3,10].

Для специфической профилактики ИАЦ применяют живые вакцины в возрасте не моложе 6 недель и за 4 недели до начала яйцекладки [35,42,79,116]. При иммунизации живыми вакцинами следует учитывать, что вакцинные вирусы ИАЦ могут, как и полевой вирус, передаваться трансвариально и горизонтально, обладают остаточной патогенностью, не стабильны и способны реверсировать к исходной патогенности через несколько пассажей на маленьких цыплятах [27,29,290,302]. Разработаны, но не получили широкого применения иммунокомплексные [265] и инактивированные вакцины [162,260]. Ведутся исследования по разработке вакцин из штаммов-мутантов [161], генно-инженерных вакцин (ДНК-вакцины, субъединичные вакцины)

[42,173,177,178,212,213,236,259,298,322]. Однако до сих пор в мире не создано вакцины для эффективной защиты от вируса инфекционной анемии цыплят.

В Российской Федерации не разработаны средства серологической диагностики и специфической профилактики инфекционной анемии цыплят, меры по профилактике и ликвидации болезни.

## **2. СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ**

### **2.1. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ**

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

Производственные испытания, связанные с разработкой эффективных лечебно-профилактических и противоэпизоотических мероприятий против ИАЦ и других инфекционных болезней птиц, отбор проб патологического материала для диагностических и мониторинговых исследований проводили в ООО «ТПК «Балтптицепром», г. Калининград. В работе представлены результаты исследований, проведенных в лабораториях ВНИВИП (Санкт-Петербург), ФГБУ «Калининградская межобластная ветеринарная лаборатория» (Калининград), ФГБУ «Всероссийский государственный Центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов» (г. Москва), ФГБУ НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева Министерства здравоохранения РФ (Санкт-Петербург), ООО «Экспертная лаборатория» (г. Москва).

В работе использовали статистические данные экономических, ветеринарных, зоотехнических отчетов, данные, отраженные в актах о проведении вакцинаций, патологоанатомического вскрытия трупов птицы и экспертизах лабораторных исследований.

С целью получения достоверных результатов опытные и контрольные группы птицы имели одинаковые возраст, иммунный статус, условия содержания, кормления и ветеринарного обслуживания. Для исключения контаминации поголовья, за каждой группой был закреплен отдельный обслуживающий персонал. При проведении опытов в виварии ВНИВИП количество голов в группе

составляло не менее 20, в производственных условиях – не менее 20 000 голов (1 птичник).

### ***Животные***

Объектами исследований являлись: СПФ-цыплята суточного возраста, 4-5-суточные СПФ-куриные эмбрионы, цыплята-бройлеры кросса «Росс-308», беспородные цыплята из фермерских хозяйств, в которых не проводились плановые вакцинации.

#### ***В работе использовали следующие методы лабораторных исследований:***

- иммуноферментный анализ с наборами BioChek ELISA Antibody Test Kit, с обработкой результатов с помощью компьютерной программы «BioChek»;
- реакция задержки гемагглютинации (РЗГА);
- биохимическое исследование крови;
- заражение развивающихся куриных эмбрионов в желточный мешок;
- полимеразно-цепная реакция;
- геномное секвенирование;
- электронно-микроскопическое исследование;
- постановка биопробы.

#### ***Получение сыворотки крови***

Отбор проб крови у цыплят проводили натошак из подкрыльцовой вены в количестве не менее 25 проб от каждой партии в производственных условиях и от каждой особи в условиях вивария. У суточных цыплят кровь отбирали тотально. Кровь собирали в пробирки. Пробирки с кровью помещали в термостат при температуре 37°C на 10-20 минут. Затем стеклянной палочкой отделяли сгусток от стенок пробирки. Пробирки помещали в холодильник на 3-4 часа при температуре 4-8°C. Полуавтоматической пипеткой отбирали сыворотку в пробирки типа эппендорф.

#### ***Проведение иммуноферментного анализа***

Для проведения исследований использовали не менее 18 проб сыворотки крови от каждой партии птицы в производственных условиях и не менее 5 проб - в условиях вивария, объемом не менее 0,2-0,3 см<sup>3</sup>.

Исследование проводили в соответствии с наставлениями по проведению ИФА с использованием наборов «BioChek» для обнаружения в ИФА антител к вирусу инфекционной анемии цыплят, вирусу инфекционной бурсальной болезни, вирусу инфекционного бронхита кур. и программы BioChek, производства BioChek UK Limited (Великобритания). Титры антител указывали в обратных значениях.

**Оборудование и приборы:** промывочное устройство (шланг и гребенка-дозатор на 12 лунок), термометр для определения температуры в помещении, обогреватель (кондиционер) для создания необходимой температуры в помещении диагностической лаборатории, полуавтоматические 1-канальные и 8-канальные пипетки различного объема, микропланшетный ридер SUNRISE (Tecan Austria GmbH, Австрия), фильтр с длиной волны 405 нм, компьютер с программой BioChek, принтер для распечатывания результатов исследований.

#### ***Постановка реакции задержки (торможения) гемагглютинации***

Реакция задержки/торможения гемагглютинации (РЗГА/РТГА) основана на нейтрализации гемагглютинирующей активности вирусов специфическими антителами сыворотки крови. РЗГА применяется для ретроспективной серологической диагностики, определения напряженности поствакцинального и постинфекционного иммунитета путем количественного выявления специфических антител в сыворотке крови.

Реакцию ставили по общепринятой методике микропланшетным методом с использованием антигена вируса ньюкаслской болезни производства ВНИВИП.

#### ***Приготовление суспензии вирусосодержащего материала***

Для приготовления суспензии вирусосодержащего материала (ВСМ) использовали кусочки печени вынужденно убитых цыплят с клиническими признаками болезни или кусочки печени, отобранной от свежих трупов цыплят с патологоанатомическими признаками, характерными для ИАЦ. Отобранные кусочки печени взвешивали, измельчали ножницами, помещали в фосфатно-солевой буферный раствор (pH 7,3-7,5) в соотношении 1:10 и гомогенизировали ULTRA-TURRAX® T-25 digital. В полученную суспензию вносили пенициллин в дозе 2000 ЕД/мл, стрептомицин в дозе 2 мг/мл и гентамицин в дозе 50 мг на 1 мл

суспензии. Суспензию в пробирках 3-5 раз замораживали при температуре минус 22°C и оттаивали в термостате при температуре 37°C. Затем суспензию осветляли центрифугированием при 10 000g в течение 30 минут. До использования супернатант хранили при минус 70°C.

**Среды для проведения бактериологических исследований:** мясо-пептонный агар (МПБ), мясо-пептонный бульон (МПБ), Мясо-пептонный печеночный бульон (МППБ) под вазелиновым маслом, среда Сабуро, среда Эдварда.

### ***Заражение куриных эмбрионов в желточный мешок***

Заражение 4-5-суточных СПФ-куриных эмбрионов в желточный мешок производили через отверстие в скорлупе над воздушной камерой. Иглу диаметром 0,6 мм и длиной 4,5 см вводили на глубину 3,5-4 см под углом 45° к вертикальной оси в направлении, противоположном месту расположения зародыша. Объем инокулята составлял 0,2 см<sup>3</sup>. Затем отверстие в скорлупе запечатывали парафином и эмбрионы помещали в инкубатор на 14 суток. Перед сбором материала яйца охлаждали в течение 8-ми часов при температуре 4°C. Скорлупу вскрывали над воздушной камерой. После удаления оболочки со дна воздушной камеры, пинцетом отслаивали пристеночную хориоаллантаоисную оболочку (ХАО) и содержимое яйца помещали в стерильную чашку Петри. Проводили исследование состояния эмбриона. Для дальнейшего исследования пипеткой через прокол подскорлупной оболочки и ХАО над телом зародыша отбирали аллантаоисную жидкость.

### ***Постановка полимеразно-цепной реакции***

Исследования проводили с использованием многоканального термоциклера МС2 «Терцик», детектирующего термоциклера ДТ-322, системы ПЦР с флуоресцентной детекцией в режиме реального времени CFX96 Touch™, системы анализа последовательности молекул ДНК Ion (PGM).

Объектом исследования был патологический материал (гомогенат печени), отобранный от цыплят-бройлеров 22-суточного возраста из ООО «ТПК «Балтптицепром».

В качестве контрольного образца ДНК при проведении ПЦР и ПЦР-РВ использовали ДНК вакцинного штамма вируса ИАЦ (штамм «Сух-1»). Для сравнительного контроля использовали гомогенат печени, отобранной от кур-несушек из ЗАО «Галичское по птицеводству».

Выделение ДНК вируса ИАЦ осуществляли по общепринятой методике с использованием лицензированных коммерческих наборов («ДНК-сорб В», ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия).

### ***Проведение геномного секвенирования***

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

### ***Отбор проб крови для гематологического исследования***

Для проведения гематологического исследования от цыплят 20-26-суточного возраста с клиническими признаками ИАЦ отбирали пробы цельной крови. Забор крови производили путем пункции левого желудочка сердца в количестве 5 мл от каждой особи. Перед забором крови цыплят фиксировали на столе на спине. Прокол делали слева в V-образной вырезке грудной кости с направлением иглы под углом 45° к стенке грудной клетки, вперед. Для стабилизации цельной крови в пробирку вносили антикоагулянт – 4%-ный раствор цитрата натрия из расчета 0,1 мл на 1 мл крови.

### ***Проведение электронно-микроскопического исследования***

Электронно-микроскопическое исследование вирусосодержащего материала проводили методом негативного контрастирования в ФГБУ «Научно-исследовательский институт гриппа им. А.А. Смородинцева» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

### ***Постановка биопробы***

Для постановки биопробы использовали беспородных цыплят, не имеющих антител к вирусу ИАЦ. Цыплятам суточного возраста внутрибрюшинно

иннокулировали вируссодержащую суспензию, полученную из печени клинически больных цыплят-бройлеров, в объеме 0,2 см<sup>3</sup>.

### ***Расчет индекса продуктивности (ИП)***

При расчете индекса продуктивности использовали показатели сохранности птицы, среднесуточного привеса и конверсии корма (расхода корма на 1 кг прироста живой массы). Расчет производили по формуле:

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

**А** – сохранность (в %)

**В** – среднесуточный привес (в граммах)

**С** – конверсия корма.

### ***Статистическая обработка результатов исследований***

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

## **2.2. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ**

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

В 1982 году на территории Калининградской области была построена бройлерная птицефабрика «Прибрежная» с полным технологическим циклом выращивания цыплят-бройлеров. В 2003 году птицефабрика была переименована в ООО «ТПК «Балтптицепром». Производственная территория птицеводческого хозяйства составляет 86 га, на которой расположены следующие производственные площадки: инкубаторий, 4 зоны выращивания бройлеров, цех убоя и переработки птицы (цех по производству колбасных изделий и цех утилизации), комбикормовый завод и площадка вспомогательных служб.

Валовое производство мяса птицы составляет более 19 тыс. тонн в год в убойном весе. Выход мяса и субпродуктов составляет 82%. Предприятие инкубирует более 14,5 млн. яйца в год. Поставщиками инкубационного яйца являются крупные предприятия Европы. Процент вывода составляет 80-83%. В цехе переработки в год выпускается более 3,0 тыс. тонн готовой продукции, ассортиментом свыше 50 наименований (колбасы, сосиски, сардельки, широкий ассортимент деликатесных товаров). Комбикормовый завод фирмы «Авила» в год производит более 40,2 тыс. тонн полнорационного гранулированного комбикорма. Поставщиками сырья для производства кормов являются как российские, так и зарубежные компании. Обеспечение электроэнергией осуществляется 22-мя трансформаторными подстанциями. Годовой расход электроэнергии более 18 млн. кВт час. В хозяйстве имеются собственные очистные сооружения мощностью 7,2 тыс. м<sup>3</sup> в сутки. Транспортный цех представлен тракторами, грузовыми автомобилями, погрузчиками и вспомогательной техникой необходимой для бесперебойного обеспечения технологического процесса.

Хозяйство специализируется на выращивании цыплят-бройлеров кросса «РОСС-308». На откорме ежедневно содержится около 1,3 млн. голов цыплят, что составляет более 13 млн. голов в год.

Цыплята-бройлеры содержатся в 4-ярусных клеточных батареях (оборудование Big Duchman) или на глубокой подстилке (оборудование Big Duchman, Roxell) в соответствии с рекомендациями по выращиванию кросса и утвержденной технологией выращивания. Система обеспечения микроклимата автоматическая. Теплоснабжение - центральная газовая котельная. Часть залов имеют автономное газовое отопление (23 здания).

Кросс «РОСС-308» является высокопродуктивным мясным кроссом и требует соблюдения ветеринарно-санитарных требований, рекомендаций по содержанию и кормлению, чувствителен к стресс-факторам (смена/нарушение режимов микроклимата, изменение рецептуры кормов, наличие в кормах микотоксинов, переуплотнение, резкая смена атмосферного давления и др.), патогенам различной этиологии. При благоприятных условиях содержания и кормления здоровые цыплята способны достигать генетического потенциала. Взвешивание цыплят-бройлеров производится каждые 7 дней по 100 голов от партии по принципу «конверта».

Производственные показатели ООО «ТПК «Балтптицепром» в период проведения исследований представлены в таблице 1.

Таблица 1 - Производственные показатели ООО «ТПК «Балтптицепром»

Показатели	2014 год	2015 год	2016 год	2017 год
Принято на выращивание, гол.	11 202 116	13 125 458	13 172 785	13 010 893
Количество дней откорма	35,9	36,5	36,8	36,9
Сохранность, %	95,9	96,2	95,5	96,5
Сдано на убой, гол.	10 741 122	12 631 782	12 582 965	12 555 558
Получено мяса в убойном весе, тонн	16 550 805	19 200 652	19 062 140	20 882 457
Убойный выход, %	75,9	76,0	75,7	76,5
Средний живой вес 1 головы, грамм	2029	2000	2001	2173
Среднесуточный привес, грамм	56,5	54,8	54,4	58,9
Расход корма на 1 кг привеса, к.ед.	1,68	1,67	1,62	1,62
Индекс продуктивности	322,6	315,6	320,5	351,1

Для обеспечения эпизоотического благополучия птицефабрики разработан комплекс ветеринарно-санитарных, лечебно-профилактических и противоэпизоотических мероприятий. Мероприятия проводятся в соответствии с утвержденными планами, графиками выполнения работ в рамках утвержденного бюджета на ветеринарное обеспечение производственного процесса.

В комплекс ветеринарно-санитарных мероприятий входят работы по подготовке производственных помещений, проведению дезинфекции, дезинсекции и дератизации производственных и вспомогательных цехов, а также территории птицефабрики.

Противоэпизоотические мероприятия направлены на соблюдение ветеринарных правил содержания птиц на птицеводческих предприятиях закрытого типа, обеспечение биологической безопасности производственного процесса и предотвращение заноса возбудителей, прежде всего особо опасных, инфекционных болезней птиц.

Лечебно-профилактические мероприятия включают схему применения антибактериальных, антистрессовых, витаминно-минеральных препаратов и схему специфической профилактики.

Специфическая профилактика проводится в соответствии с эпизоотической ситуацией в птицеводческом хозяйстве и в регионе на основе результатов диагностических и мониторинговых исследований. При составлении схемы вакцинаций и подборе иммунобиологических препаратов учитываются спектр циркулирующих микроорганизмов, прежде всего вирусной этиологии, результаты диагностических и мониторинговых исследований, уровень материнских антител. Уровень материнских антител определяется путем исследования сыворотки крови 1-5-суточных цыплят с использованием ИФА и РЗГА. Учитывая тот факт, что в хозяйстве нет родительского стада, исследования на наличие материнских антител проводятся по широкому спектру инфекций.

На птицефабрике цыплят-бройлеров иммунизируют против НБ, ИББ, ИБК с последующим контролем уровня поствакцинальных антител в установленные сроки с использованием серологических методов исследований.

С целью контроля и прогнозирования эпизоотической ситуации в хозяйстве собирается и систематизируется информация, включающая сведения о поставщиках гибридного молодняка и яйца, схемах вакцинации родительских стад, схемах проведения лечебно-профилактических и противоэпизоотических мероприятий, результатах диагностических и мониторинговых исследований (серологических, микробиологических, вирусологических, паразитологических, молекулярно-биологических) из различных лабораторий, в том числе зарубежных, в возрастном и временном аспекте. В хозяйстве также создан банк сывороток крови цыплят-бройлеров, в котором хранятся образцы за последние 2 цикла выращивания.

### **2.2.2. Причины возникновения болезни в птицеводческом хозяйстве.**

#### **История течения болезни**

Впервые клинические и патологоанатомические признаки инфекционной анемии цыплят в хозяйстве были отмечены в 2008 году на цыплятах, завезенных из Нидерландов компанией «Хаанстра», после ввоза инкубационного яйца из Испании компанией «Мигель Авикола», полученного от невакцинированного против ИАЦ родительского поголовья.

Клиническая картина болезни была представлена снижением потребления корма, живой массы, анемией видимых слизистых оболочек, дерматитами и кровоизлияниями в области крыльев и брюшной стенки, увеличением падежа цыплят начиная с 21-суточного возраста.

При патологоанатомическом вскрытии выявляли атрофию тимуса, увеличение печени, мраморность почек, атрофию фабрициевой сумки.

### **2.2.3. Клинические признаки ИАЦ у цыплят-бройлеров**

В процессе проведения исследований вели наблюдение за партиями цыплят-бройлеров, полученных от разных поставщиков. Первоначально проявление клинических признаков отмечалось в 14-29-суточном возрасте. Больные цыплята были малоподвижны, плохо поедали корм. Отмечались взъерошенность оперения,

отставание в росте и развитии, бледность гребешка, видимых слизистых оболочек, кожных покровов, дерматиты в области крыльев и брюшной стенки. Характерный признак – резкое расслоение цыплят в течение 2-3-суток. На партиях, неблагополучных по ИАЦ, было установлено снижение прироста живой массы. Результаты взвешивания представлены в таблице 2.

Таблица 2 - Результаты взвешивания цыплят-бройлеров в процессе выращивания

Возраст, суток	Норматив, грамм	Номера птичников / средняя живая масса цыплят, грамм				
		Неблагополучные партии по ИАЦ (Венгрия)				
		<b>65</b>	<b>67</b>	<b>68</b>	<b>69</b>	средний (M±m)
0	42,0	42,4	41,1	41,4	38,9	41,0±1,3
7	187,0	116,0	155,0	139,0	134,0	136,0±13,9
14	480,0	294,0	346,0	334,0	333,0	326,8±19,6
21	929,0	759,0	785,0	742,0	766,0	763,0±15,4
28	1501,0	1230,0	1350,0	1311,0	1296,0	1296,8±43,3
35	2144,0	1749,0	1950,0	1905,0	1789,0	1848,3±82,1
Средний живой вес 1 головы при убое, грамм		1666,0	1830,0	1793,0	1829,0	1779,5±67,2
Среднесуточный привес по забитым партиям, грамм		45,0	49,5	49,8	49,4	48,4±1,9
Возраст, суток	Норматив, грамм	Благополучные партии по ИАЦ (Польша)				
		<b>63</b>	<b>64</b>	<b>66</b>	<b>70</b>	средний (M±m)
		0	42,0	39,5	42,0	43,1
7	187,0	187,0	180,0	160,0	159,0	171,5±12,3
14	480,0	497,0	460,0	439,0	462,0	464,5±20,8
21	929,0	934,0	896,0	860,0	864,0	888,5±29,7
28	1501,0	1490,0	1409,0	1357,0	1403,0	1414,8±47,9
35	2144,0	1981,0	1970,0	1941,0	1970,0	1965,5±14,8
Средний живой вес 1 головы при убое, грамм		2087,0	2195,0	2214,0	2217,0	2178,3±53,4
Среднесуточный привес по забитым партиям, грамм		58,0	61,0	58,3	58,3	58,9±2,6

Из таблицы 2 видно, что средний живой вес цыплят-бройлеров неблагополучных по ИАЦ партий был ниже нормативного и ниже среднего живого веса цыплят благополучных по ИАЦ партий на всем протяжении выращивания. Средний живой вес 1 головы цыплят неблагополучных по ИАЦ партий при убое составил  $1779,5 \pm 67,2$  г. Средний живой вес 1 головы цыплят благополучных по ИАЦ партий при убое составил  $2178,3 \pm 53,4$  г, что выше среднего живого веса 1 головы при убое цыплят неблагополучных по ИАЦ партий на 398,8 г. Средний среднесуточный привес цыплят неблагополучных по ИАЦ партий составлял  $48,4 \pm 1,9$  г. Средний среднесуточный привес цыплят благополучных по ИАЦ партий был выше на 10,5 г и составлял  $58,9 \pm 2,6$  г.

Динамика прироста живого веса цыплят бройлеров из неблагополучных и благополучных по ИАЦ партий представлена на рисунке 1.



Рисунок 1 - Динамика прироста живого веса цыплят-бройлеров из неблагополучных и благополучных по ИАЦ партий

На рисунке 1 видно, что цыплята неблагополучных по ИАЦ партий имели живой вес ниже, чем цыплята благополучных по ИАЦ партий начиная с 7-ми суточного возраста на протяжении всего периода выращивания.

На неблагополучных по ИАЦ партиях наблюдался повышенный отход птицы. Показатели сохранности исследуемых партий представлены в таблице 3.

Таблица 3 - Показатели сохранности цыплят-бройлеров (n=4)

Показатели	Номера корпусов, поставщик									
	Неблагополучные партии по ИАЦ (Венгрия)					Благополучные партии по ИАЦ (Польша)				
	65	67	68	69	Средний (M±m)	63	64	66	70	Средний (M±m)
Посажено, голов	41208	41040	41200	42480	41482±580,0	42760	41940	42160	42320	42295±300,5
Пало, голов	3307	2694	4394	7085	4370±1681,6	1004	1143	768	1070	996±140,7
Сохранность по забитым партиям, %	92,0	93,4	89,3	83,3	89,5±3,9	97,5	96,7	97,9	96,8	97,2±0,5

Из данных таблицы 3 видно, что средняя сохранность цыплят неблагополучных по ИАЦ партий составляла  $89,5\pm 3,9\%$ . Средняя сохранность цыплят благополучных по ИАЦ партий была выше на 7,7% и составляла  $97,2\pm 0,5\%$ .

В 2011-2014 гг. повышение падежа цыплят-бройлеров с признаками ИАЦ отмечалось в возрасте 17-29 суток, т.е. наблюдался 1 пик смертности. Динамика падежа цыплят неблагополучных по ИАЦ партий представлена на рисунке 2.



Рисунок 2 - Динамика падежа цыплят-бройлеров неблагополучных по ИАЦ партий в 2011-2014 гг.

На рисунке 2 видно, что на всех представленных партиях отмечается один пик смертности в возрасте от 17 до 29 суток. Для ИАЦ, при отсутствии ассоциации с бактериальными и другими вирусными инфекциями, характерны резкие подъемы

падежа продолжительностью от 2 до 4 суток, что продемонстрировано на рисунке 2.

В 2015-2016 гг. динамика падежа цыплят-бройлеров изменилась, а именно стали выявлять 2 пика смертности – в возрасте 14-21 суток и в возрасте 26-36 суток. Первый пик смертности обусловлен трансвариальной передачей ВАЦ, второй – горизонтальной передачей или полевым заражением. В данный период имели место смена поставщиков гибридного молодняка и яйца, т.е. выращивание на одной площадке цыплят с неоднородным иммунным статусом. Динамика падежа цыплят-бройлеров неблагополучных по ИАЦ партий (накопительно) представлены на рисунке 3.

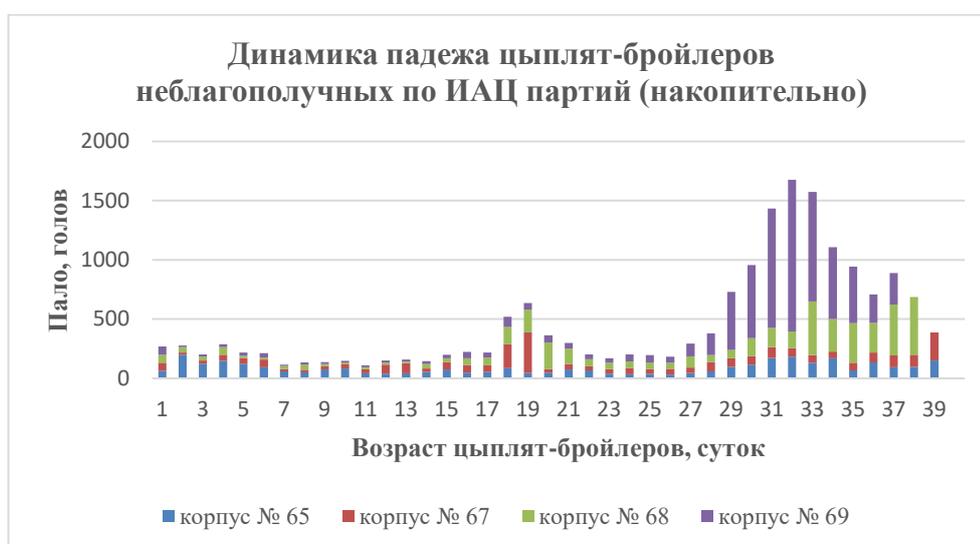


Рисунок 3 - Динамика падежа цыплят-бройлеров неблагополучных по ИАЦ партий (накопительно) в 2015-2016 гг.

На рисунке 3 представлены суммарные данные по падежу цыплят-бройлеров из 4-х неблагополучных по ИАЦ птичников. На рисунке видны 2 пика смертности – в возрасте 14-21 суток и в возрасте 26-36 суток.

Средний уровень падежа в неблагополучных по ИАЦ корпусах и средний уровень падежа в благополучных по ИАЦ корпусах в сравнительном аспекте представлены на рисунке 4.

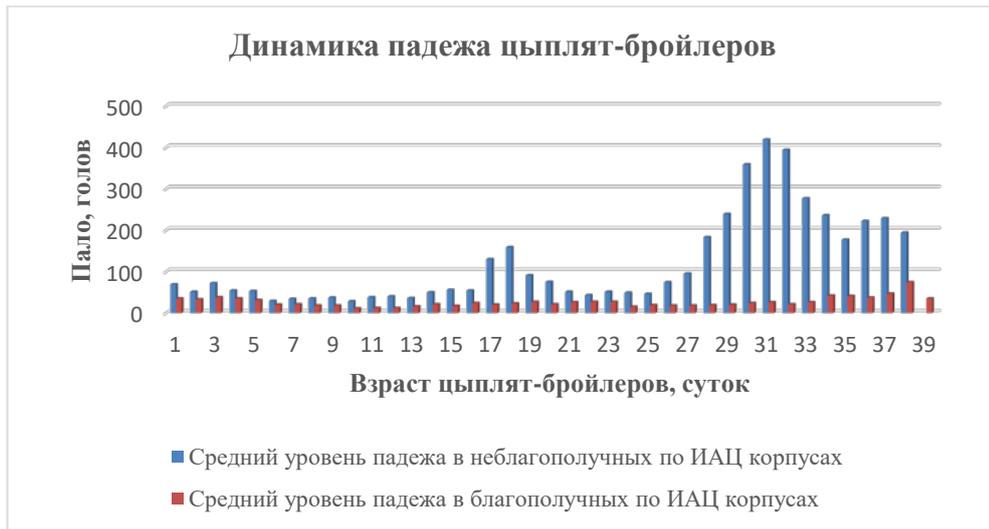


Рисунок 4 - Сравнительная характеристика динамики падежа цыплят-бройлеров в неблагоприятных и благополучных по ИАЦ корпусах

На рисунке 4 видно, что динамика падежа цыплят-бройлеров в неблагоприятных по ИАЦ корпусах характеризуется 2-мя пиками смертности в возрасте 14-21 и 26-36 суток. Динамика падежа цыплят-бройлеров в благополучных по ИАЦ корпусах характеризуется низким уровнем смертности на протяжении всего периода выращивания.

#### 2.2.4. Патологоанатомические изменения

При патологоанатомическом вскрытии наиболее часто выявляли диффузные кровоизлияния в области крыльев (рис. 5), гангренозные дерматиты в области крыльев (рис. 6), так называемый синдром «синего крыла», а также наличие подкожных инфильтратов в области брюшной стенки и нижних конечностей, цвет которых варьировал от соломенно-желтого до буро-зеленоватого (рис. 7, 8), некроз кожи пальцев (рис. 9).



Рисунок 5 - Диффузные подкожные кровоизлияния на медиальной поверхности крыльев



Рисунок 6 - Гангренозный дерматит в области крыльев и брюшной стенки



Рисунок 7 - Подкожные инфильтраты в области брюшной стенки и нижних конечностей (вид снаружи)



Рисунок 8 - Серозно-геморрагический инфильтрат в области брюшной стенки и нижних конечностей (вид после препарирования кожного покрова)



Рисунок 9 - Гангренозное поражение крыльев, некроз кожи пальцев, венозная гиперемия кожи в области груди, брюшной стенки и нижних конечностей

Кроме этого, отмечались такие патологоанатомические признаки как атрофия тимуса (рис. 10), изменение цвета костного мозга (рис. 11), гиперемия бурсы и наличие в ней серозно-слизистого экссудата молочно-белого цвета (рис. 12), гипертрофия печени и почек, синдром «круглое сердце» (рис. 13), штрихоподобные кровоизлияния в мышцах бедра и голени (рис. 14).

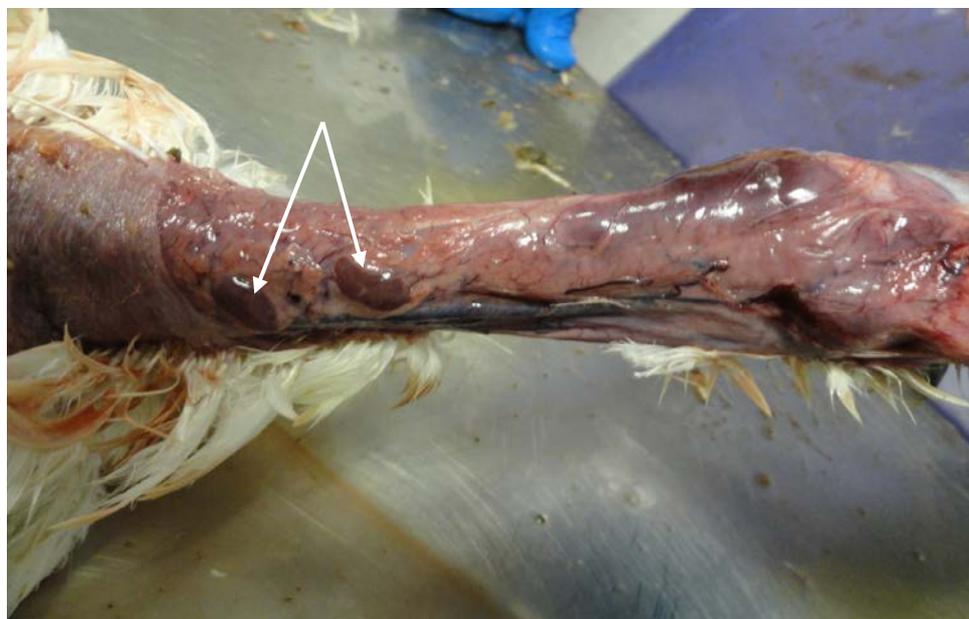


Рисунок 10 – Атрофия тимуса



Рисунок 11 - Изменение окраски костного мозга. Костный мозг бледно-розового цвета

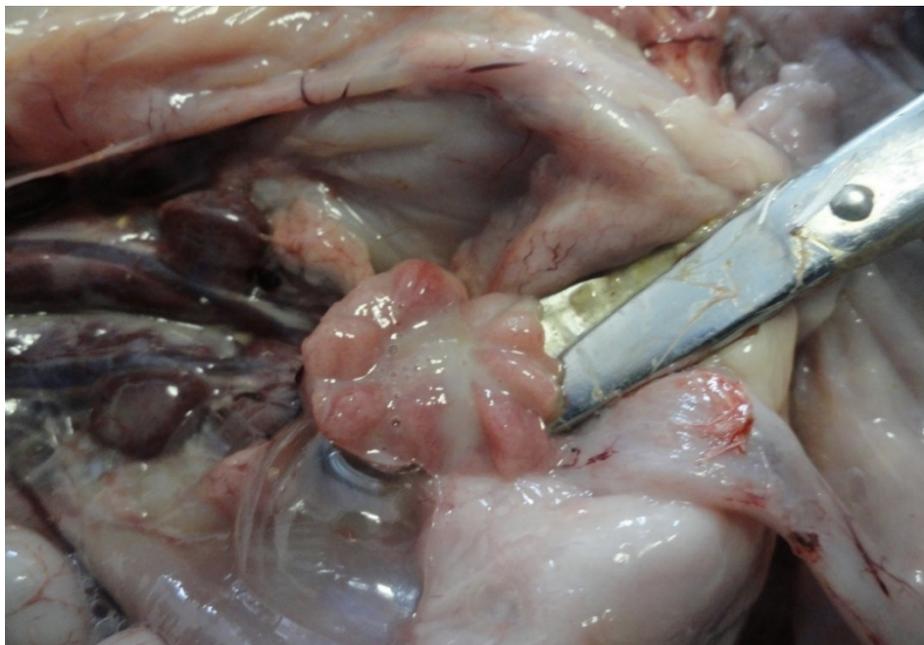


Рисунок 12 - Гиперемия бурсы. Наличие серозно-слизистого экссудата в бурсе. Гипертрофия почек

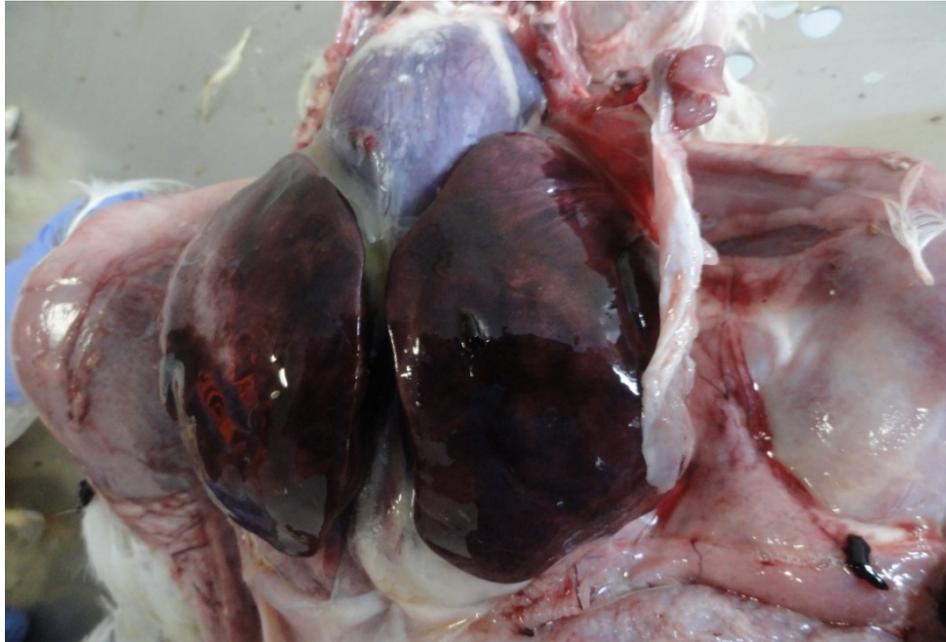


Рисунок 13 - Гипертрофия печени, «круглое сердце» и перимизии на внутренней поверхности бедер



Рисунок 14 - Штрихоподобные кровоизлияния в мышцах бедра и голени

У некоторых цыплят наблюдалось скопление в брюшной полости студневидного инфильтрата соломенно-желтого цвета (рис. 15), диффузные кровоизлияния в слизистой оболочке железистого желудка (рис. 16).



Рисунок 15 - Серозно-слизистый студневидный инфильтрат в брюшной полости. Диффузные подкожные кровоизлияния на медиальной поверхности крыльев. Перимизии в области бедер



Рисунок 16 - Диффузные кровоизлияния в слизистой оболочке железистого желудка

У цыплят 3-5-суточного возраста иногда выявляли гемorragии в фабрициевой сумке (рис. 17). У цыплят раннего возраста также обнаруживали наличие серозно-слизистого экссудата молочно-белого цвета в бурсе,

патологические изменения (обесцвечивание или нарушение структуры) костного мозга.



Рисунок 17 - Геморрагии в фабрициевой сумке (вид на разрезе)

В процессе исследований установлено, что такие патологоанатомические признаки как наличие серозно-слизистого экссудата в бурсе, штрихоподобные кровоизлияния в мышцах бедра и голени, обесцвечивание костного мозга наблюдались у цыплят разного возраста, преимущественно в пики смертности.

Образцы пораженных фабрициевых сумок и костного мозга были отобраны для проведения молекулярно-биологических исследований методом ПЦР. В результате проведенных исследований в образцах был выявлен генетический материал вируса инфекционной анемии цыплят.

Поражение фабрициевых сумок и костного мозга у цыплят раннего возраста свидетельствует о трансвариальной передаче вируса ИАЦ.

### **2.2.5. Серологическая диагностика ИАЦ**

Исследование сывороток крови цыплят-бройлеров на наличие специфических антител к ВАЦ проводили методом ИФА во ВНИВИП. Для проведения исследований использовали микропланшетный ридер SUNRISE (Tecan

Austria GmbH, Австрия) и наборы «BioChek» для обнаружения в ИФА антител к вирусу инфекционной анемии цыплят.

Всего на наличие антител к ВАЦ было исследовано 2622 пробы сывороток крови от цыплят-бройлеров разного возраста. Результаты исследований представлены на рисунке 18.



Рисунок 18 – Количество положительных проб сыворотки крови цыплят-бройлеров на наличие антител к ВАЦ

На рисунке 18 видно, что количество положительных проб снижается к 21 суткам до 1,1%, что обусловлено распадом материнских антител. Начиная с 28-суточного возраста наблюдается увеличение количества положительных проб сыворотки крови вследствие переболевания цыплят ИАЦ и выработки вируснейтрализующих антител.

Были проведены исследования проб сыворотки крови цыплят из партий, полученных от невакцинированных родителей, и из партий, полученных от вакцинированных против ИАЦ родителей. Динамика формирования антител к ВАЦ у цыплят, полученных от невакцинированных (1 пик смертности) и вакцинированных родителей (2 пика смертности) представлена на рисунках 19 и 20.



Рисунок 19 - Уровень средних титров антител к ВАЦ в пробах сыворотки крови цыплят-бройлеров, полученных от невакцинированных и вакцинированных родителей

На рисунке 19 видно, что средний титр материнских антител у суточных цыплят, полученных от невакцинированных родителей, составляет 1:757 (минимальный положительный титр антител предусмотренный в наставлении по применению диагностикума - 1:725), что свидетельствует о наличии положительных проб сыворотки крови и, следовательно, об инфицировании родительского стада ВАЦ. Уровень титров антител в 7, 14, 21, 28-суточном возрасте находится в пределах негативных значений. В возрасте 35-38 суток средний титр антител к ВАЦ в пробах сыворотки крови цыплят составил 1:3711. Наличие антител в сыворотке крови цыплят в отсутствие вакцинации свидетельствует о полевом заражении вирусом ИАЦ.

Средний титр материнских антител у суточных цыплят, полученных от вакцинированных родителей, составляет 1:1981. К 7-суточному возрасту средний титр антител снижается до 1:946. Средний уровень титров антител в 14, 21, 28, 35-38-суточном возрасте находится в пределах негативных значений.

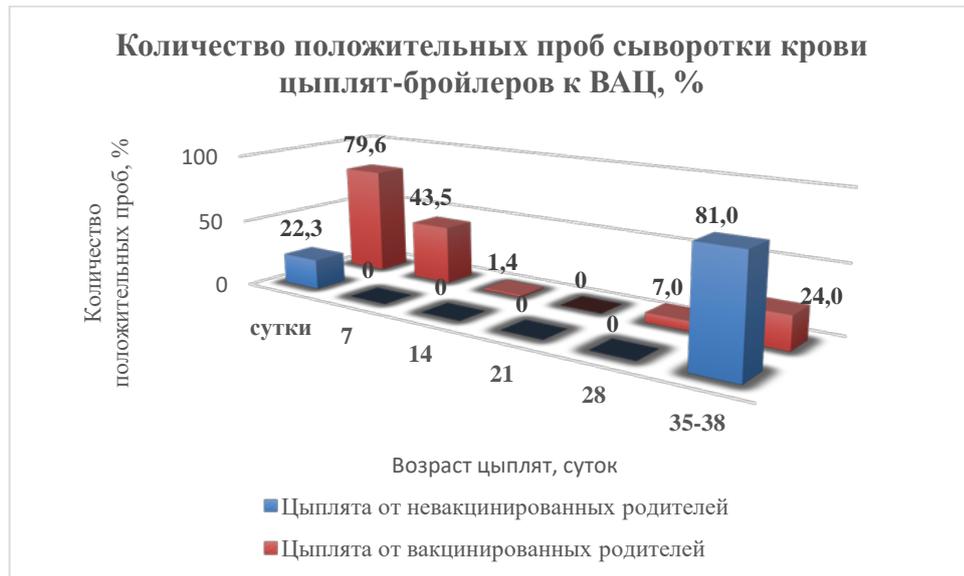


Рисунок 20 – Количество положительных проб сыворотки крови цыплят-бройлеров к ВАЦ, полученных от невакцинированных и вакцинированных родителей

На рисунке 20 видно, что количество положительных проб сыворотки крови цыплят, полученных от невакцинированных родителей, в суточном возрасте составляет 22,3%, в 7, 14, 21, 28-суточном возрасте все пробы имели отрицательные значения. В возрасте 35-38 суток количество положительных проб сыворотки крови составило 81,0%.

Количество положительных проб сыворотки крови цыплят, полученных от вакцинированных родителей, в суточном возрасте составило 79,6%, в 7-суточном – 43,5%, в 14-суточном – 1,4%. В возрасте 21 сутки все пробы были отрицательными. Начиная с 28-суточного возраста количество положительных проб сыворотки крови увеличилось до 7,0%, а в 35-38-суточном возрасте составило 24,0%.

Выявление антител в пробах сыворотки крови цыплят в условиях отсутствия вакцинации против ИАЦ в возрасте 28-38 суток свидетельствует о циркуляции ВАЦ на территории птицефабрики.

Отсутствие антител у цыплят в возрасте 36-38 суток связано с тем, что при горизонтальной передаче ВАЦ, когда инфицирование происходит в возрасте 3-6 недель, антитела не успевают вырабатываться. Активные антитела в сыворотке

крови можно обнаружить в возрасте между 5 и 9 неделями, если передержать часть цыплят после убоя партии в течение 2-3 недель. Кроме этого, отсутствие антител у переболевшей птицы может быть связано с феноменом иммунологической толерантности.

Чтобы установить уровень титров антител после переболевания, было отобрано 25 условно больных голов цыплят с целью их передержки в течение 14 дней. Через 14 дней от цыплят были отобраны пробы сыворотки крови для исследования в ИФА на наличие специфических антител к вирусу ИАЦ. Результаты исследований представлены в таблице 4.

Таблица 4 - Результаты серологических исследований проб сыворотки крови цыплят-бройлеров после передержки (n=25)

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

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

Данные таблицы 4 показывают, что отсутствие антител у цыплят-бройлеров в возрасте 38 суток не является доказательством благополучия партии по ИАЦ. При наличии у птицы клинических, патологоанатомических признаков ИАЦ, признаков бактериальных инфекций (*E.coli*) следует предполагать, что цыплята находились в процессе переболевания и антитела к ВАЦ не успели сформироваться в период содержания.

С целью мониторинга эпизоотической ситуации были проведены исследования проб сыворотки крови цыплят 35-37-суточного возраста методом ИФА на наличие антител к реовирусу, метапневмовирусу, возбудителю орнитобактериоза. В результате исследований было установлено, что диапазон титров антител к реовирусу варьировал от 1:9 до 1:2260, коэффициент вариации составлял от 54 до 119 %, количество положительных проб находилось в пределах от 0 до 23%, что в отсутствие вакцинации свидетельствует о циркуляции реовируса

на отдельных партиях цыплят-бройлеров. Следует отметить, что уровень патологических значений титров антител к реовирусу низкий (минимальный положительный титр антител составляет 1:1352). Циркуляция реовируса на некоторых партиях цыплят-бройлеров, вероятно, является причиной проявления в отдельных случаях синдрома «синее крыло».

При исследовании проб сыворотки крови цыплят на наличие антител к метапневмовирусу и возбудителю орнитобактериоза положительных проб выявлено не было.

### **2.2.6. Гематологические исследования крови цыплят-бройлеров**

По литературным данным [120,285,297,298] у цыплят, инфицированных ВАЦ, наблюдается снижение уровня гематокрита в крови. Для проведения гематологического исследования были отобраны пробы крови от цыплят-бройлеров 19-21-суточного возраста с клиническими признаками ИАЦ (отставание в росте, анемия, наличие диффузных подкожных геморрагий в области крыльев) в период пика смертности. Также были отобраны пробы крови от цыплят, не имеющих клинических признаков болезни.

Клинические исследования проб крови цыплят-бройлеров проводили в ФГБУ «Калининградская межобластная ветеринарная лаборатория». Кровь исследовали по следующим показателям: определение состава и подсчет форменных элементов крови, определение уровня гематокрита. Результаты, полученные в результате лабораторных исследований представлены в таблице 5.

Из данных таблицы 5 видно, что уровень гематокрита в пробах крови, полученных от цыплят с признаками ИАЦ на 4,0-8,6% ниже диагностического уровня (27%) и на 29,5-50,9% ниже, чем уровень гематокрита в пробах, полученных от цыплят без признаков ИАЦ. Также по результатам исследований в пробах крови, полученных от цыплят с признаками ИАЦ отмечаются лейкопения и тромбоцитопения. В пробе № 1, полученной от цыпленка с признаками ИАЦ выявлен лейкоцитоз, что, вероятно, связано с патологическим процессом, обусловленным возникновением вторичных инфекций бактериальной этиологии.

Таблица 5 - Результаты гематологических исследований крови цыплят-бройлеров  
(n=5)

Показатели	Норма	Пробы крови от цыплят с признаками ИАЦ					Пробы крови от цыплят без признаков ИАЦ				
		1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
Эритроциты, 10 <sup>12</sup> /л	2,0- 5,0	2,95	2,58	2,17	2,36	3,54	5,87	5,66	4,94	4,29	4,3
Лейкоциты, 10 <sup>9</sup> /л	20,0- 40,0	95,7	1,3	12,3	7,6	2,7	18,5	15,4	25,8	25,3	22,3
Гемоглобин, г/л	80,0- 120,0	100,0	76,0	87,0	95,0	95,0	117,0	112,0	117,0	110,0	106,0
Гематокрит, %	37,0- 50,0	22,9	20,1	18,4	21,3	23,0	59,5	69,3	53,1	52,5	56,5
Тромбоциты, 10 <sup>9</sup> /л	32,0- 100,0	21,0	13,0	5,0	8,0	14,0	31,0	41,0	30,0	34,0	27,0

### 2.2.7. Вирусологические исследования патологического материала

Для проведения вирусологических исследований были использованы 4-5-суточные СПФ-куриные эмбрионы. Эмбрионы в количестве 30 штук заражали в желточный мешок суспензией, приготовленной из печени клинически больных цыплят в дозе 0,2 см<sup>3</sup>. Эмбрионы инкубировали в течение 14 суток при температуре 37°C с проведением ежедневного овоскопирования. После окончания срока инкубации 10 эмбрионов поместили на 6 часов в холодильник при температуре 4°C, с последующим вскрытием с целью визуальной оценки возможных поражений. В результате вскрытия не было выявлено каких-либо видимых поражений эмбрионов. Из тушек эмбрионов и ХАО были отобраны образцы, которые исследовали в ПЦР. В результате проведенных исследований в образцах тканей эмбрионов и ХАО был выявлен вирус ИАЦ.

В процессе инкубации 3 эмбриона были выбракованы на 3-и сутки после инфицирования по причине неспецифической гибели и 17 инфицированных эмбрионов продолжили инкубировать для получения цыплят. Всего было выведено 12 голов цыплят.

На 7-е сутки 5 цыплят были убиты с диагностической целью. При патологоанатомическом вскрытии были выявлены следующие признаки: анемия

кожных покровов, слизистых оболочек, почек, печени, селезенки, наличие серозно-слизистого экссудата в бурсе, обесцвечивание костного мозга. На 10-11 сутки погибли оставшиеся 7 цыплят с признаками депрессии. При патологоанатомическом вскрытии у павших цыплят были выявлены признаки анемии кожных покровов и внутренних органов, наличие серозно-слизистого экссудата в бурсе, выраженная атрофия тимуса, атрофия и изменение окраски костного мозга на светло-серый или бело-желтый, кровоизлияния в мышцах бедра и голени.

### **2.2.8. Молекулярно-биологические исследования патологического материала**

При проведении молекулярно-биологических исследований с целью определения штамма вируса и изучения структуры генома возбудителя ИАЦ, были исследованы 3 пробы патологического материала: проба № 1 – гомогенат печени, отобранной от цыплят-бройлеров 22-суточного возраста из ООО «ТПК «Балтптицепром»; проба № 2 (сравнительный контроль) – гомогенат печени, отобранной от кур-несушек из ЗАО «Галичское по птицеводству»; проба № 3 (контроль) – вакцинный штамм «Сух-1». Патологический материал отбирали от цыплят и кур с характерными патологоанатомическими признаками ИАЦ, такими как апластическая анемия, кровоизлияния в мышцах и подкожные инфильтраты в области крыльев и брюшной стенки. В качестве пробы № 3 использовали живую вакцину АвиПро Тимовак против ИАЦ производства Lohmann Animal Health (Германия). Отобранный материал исследовали на обнаружение генома вируса инфекционной анемии цыплят с помощью ПЦР и секвенирования.

Экстракцию ДНК из анализируемых проб производили с применением лицензированных коммерческих наборов («ДНК-сорб В», ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия), включающий набор для лизиса, сорбент универсальный, раствор для отмывки 1 и 2, ТЕ-буфер для элюции ДНК.

**Выделение ДНК** проводили из проб № 1, № 2 и № 3. Лизирующий раствор и раствор для отмывки 1 (если они хранились при температуре от 2-8°C) прогревали при температуре от 60°C до 65°C до полного растворения кристаллов. В каждую

пробирку со 100 мкл исследуемой пробы вносили по 300 мкл лизирующего раствора, используя наконечники с фильтром. В пробирку с отрицательным контролем выделения вносили 100 мкл стерильного физиологического раствора. В пробирку с положительным контролем вносили образец, содержащий вакцинный штамм «Сух-1». Далее содержимое плотно закрытых пробирок тщательно перемешивали на вортексе и прогревали 5 мин. при температуре 65°C. Затем центрифугировали при 5000 об/мин в течение 5 секунд. Затем в каждую пробирку с исследуемым материалом добавляли по 25 мкл ресуспендированного сорбента и проводили стадию адсорбции ДНК на носитель.

Очистку адсорбированной ДНК проводили раствором для отмывки 1 и раствором для отмывки 2. Каждый раз тщательно ресуспендировали сорбент на вортексе, центрифугировали 30 секунд при 10000 об/мин на микроцентрифуге и надосадочную жидкость удаляли вакуумным отсасывателем с отдельным наконечником. После чего, пробирки помещали в твердотельный термостат и высушивали сорбент при 65°C в течение 5 минут. После высушивания в пробирки для элюции ДНК к сорбенту добавляли по 50 мкл ТЕ-буфера. В результате чего происходит переход ДНК с поверхности силики в раствор, который отделяется от частичек сорбента центрифугированием. В результате мы получили надосадочную жидкость, содержащую очищенную от ингибиторов ДНК.

Очищенную ДНК можно хранить в течение 1 недели при температуре от 2 до 8°C, и в течение года при температуре не выше минус 16°C.

#### **Аmplификация фрагмента генома вируса инфекционной анемии цыплят**

Для проведения полимеразной цепной реакции и секвенирования был разработан набор специфических олигонуклеотидов на основании известных последовательностей генов, полученных из банков данных GenBank ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)). Олигонуклеотидные праймеры были синтезированы в ООО «Бигль». Последовательности праймеров для выявления вируса инфекционной анемии цыплят представлены в таблице 6.

Таблица 6 - Последовательности праймеров для выявления генома вируса  
инфекционной анемии цыплят

Ген	Праймеры	Последовательность праймеров	Позиция в референтной последовательности	Референтная последовательность	Размер ампликона п.н.
Ген VP1	IACF IACR	F-CATCGGAGGAGACAGCGGTA R-CCCGTCCGCAATCAACTCACC	931-950 1242-1222	MN299313.1	311

Для проведения ПЦР использовали реакционную смесь, содержащую ПЦР-буфер 1x, 2 mM Mg<sup>2+</sup>, 0,2 mM каждого dNTP, 10 пмоль каждого праймера и 0,1 ед/мкл Дна Таq полимеразу.

В микропробирку объемом 0,6 см<sup>3</sup> вносили 5 мкл реакционной смеси, 10 мкл ДНК-матрицы, стерильной водой доводили до объема 25 мкл и добавляли по 1 капле минерального масла.

Для постановки реакции амплификации использовали программируемый амплификатор «Терцик» (ДНК технология, Россия). Протокол амплификации представлен в таблице 7.

Таблица 7 - Протокол амплификации

Температура, °С	Время, сек	Число циклов
95°С	300	1
95°С	10	35
60°С	20	
72°С	20	
72°С	180	1
10°С	хранение	-

После завершения ПЦР, микропробирки передавали в бокс для проведения электрофореза.

**Электрофорез проводили** рабочим раствором трисборатного буфера (ТБЕ), концентрированного с бромидом этидия, который готовили следующим образом. В мерный цилиндр вливали 25 см<sup>3</sup> трисборатного буфера, концентрированного с

бромидом этидия и объем доводили дистиллированной водой до 500 см<sup>3</sup>, тщательно перемешивали. Затем в стеклянную термостойкую колбу на 250 см<sup>3</sup> вносили 1,8 г агарозы, наливали 100 см<sup>3</sup> рабочего буфера, содержимое перемешивали вращением колбы и плавил в микроволновой печи до полного растворения агарозы. Время плавления агарозы в микроволновой печи мощностью 800 Вт при ее загруженности 1 колбой – 1,5 минуты. Колбу с расплавленной агарозой вынимали из микроволновой печи, аккуратно вращая ее, перемешивали содержимое. После этого вновь помещали колбу с агарозой в микроволновую печь на 1,5 минуты (при мощности 800 Вт), доводили агарозу до кипения. Затем колбу вынимали из микроволновой печи и остужали агарозу, вращая колбу, до температуры 65-70°C. Расплавленный гель заливали в форму камеры для горизонтального электрофореза. Устанавливали гребенки, не касаясь дна формы, на расстоянии не менее 3 см друг от друга. Толщину геля устанавливали около 0,6 см. После полного застывания геля (30 мин при комнатной температуре), осторожно вынимали из него гребенки, не повредив лунки. Помещали подложку с готовым гелем в камеру для горизонтального электрофореза, лунки располагали ближе к отрицательному электроду (ДНК будет двигаться к положительному электроду). Готовый рабочий электрофоретический раствор буфера заливали в камеру для горизонтального электрофореза в таком объеме, чтобы он покрывал гель на 5 мм сверху.

Пробирки с продуктами амплификации выставляли в штатив последовательно, смешивали с буфером для нанесения и вносили в лунки геля. Каждую пробу вносили новым наконечником с фильтром. В каждый ряд лунок агарозного геля обязательно вносили отрицательный контрольный образец, положительный контрольный образец и маркер молекулярного веса производства Thermo scientific.

Камеру подключали к источнику тока, учитывая полярность (ДНК движется к положительному электроду), и включали источник питания «Эльф-4». Обязательно соблюдали следующие параметры: напряжение 250 В, время электрофореза – 20 минут. Оптимальное напряжение электрического поля при этом составляло 10 В/см. По завершении времени электрофореза, выключали источник

тока, переносили гель на трансиллюминатор, расположив полосы горизонтально лунками вверх. Изображение геля на компьютере получали с помощью цифровой фотокамеры и программного обеспечения «IuLab».

Размер ожидаемого фрагмента генома вируса инфекционной анемии цыплят составлял 311 п.н. Результаты анализа фрагментов ДНК методом электрофореза представлены на рисунке 21.

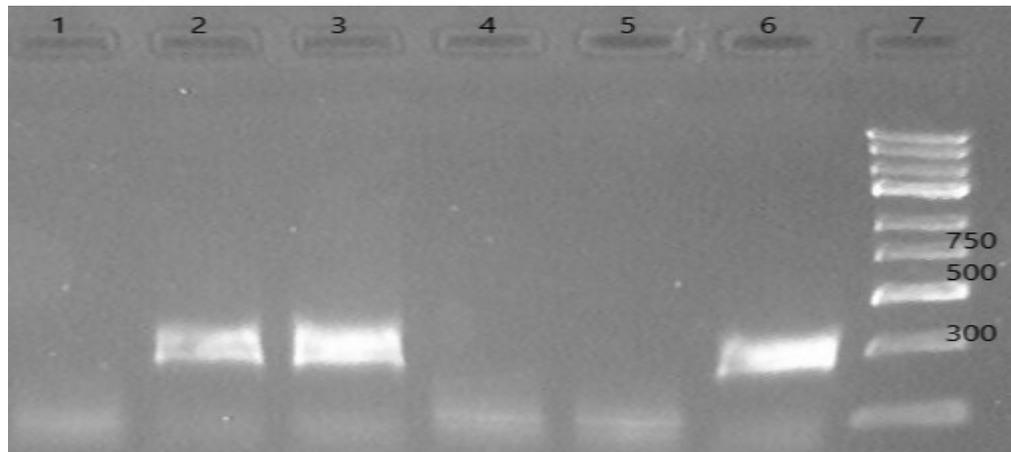


Рисунок 21 - Результаты электрофореза продуктов амплификации фрагмента генома вируса инфекционной анемии цыплят в патологическом материале: 1 - отрицательный контроль выделения; 2,3 - положительные пробы; 4,5 - отрицательные пробы; 6 - вакцинный штамм «Сух-1» ИАЦ; 7 - маркер молекулярной массы.

### **Секвенирование амплифицированных фрагментов генома**

Для очистки ПЦР продукта от излишков праймеров и некорпорированных нуклеотидов использовали набор для ферментативной очистки продуктов ПЦР ExoSAP-IT.

Для очистки брали 5 мкл ПЦР-продукта, добавляли 2 мкл реагента ExoSAP-IT, перемешивали пипетированием и инкубировали по схеме, представленной в таблице 8.

Таблица 8 - Протокол отчистки ПЦР-продукта от невякючившихся праймеров и дНТФ

Температура, °С	Время, мин.	Цикл
37°С	15	1
80°С	15	1

Очищенные ПЦР-продукты секвенировали с использованием прямого и обратного праймера. Для проведения одной реакции в тонкостенные пробирки вместимостью 0,2 см<sup>3</sup> вносили компоненты в пропорциях, указанных в таблице 9.

Таблица 9 - Пропорциональные объемы реагентов для проведения секвенсовой реакции

Реактивы	Объем, мкл.
Очищенный ПЦР-продукт (5-20 нг)	1
Реакционная смесь (из набора)	2
Праймер (5пмоль/мкл)	1
Вода	1

Общий объем реакционной смеси должен составлять 5 мкл. Секвенсовую реакцию проводили на амплификаторе с термостатируемой крышкой, соблюдая режим термостастирования, представленный в таблице 10.

Таблица 10 - Протокол сиквенсовой реакции

Температура, °С	Время, сек	Число циклов
95°С	15	25
50°С	15	
60°С	60	
10°С	хранение	

После окончания программы добавляли в каждую пробирку по 1 мкл 10М ацетата аммония и 18 мкл 96% спирта. Оставляли на 30 минут при минус 20°С. После чего центрифугировали 40 минут при 4000 об/мин сливали супернатант,

промывали осадок 100 мкл 80% этанола, высушивали и растворяли осадок в буфере для нанесения, прилагаемом к набору для секвенирования.

Запускали секвенатор MegaBase 1000 согласно инструкции к прибору, и разделяли продукты секвенирования методом капиллярного электрофореза с детекцией сигнала флюоресценции. Результаты исследований представлены на рисунке 22.

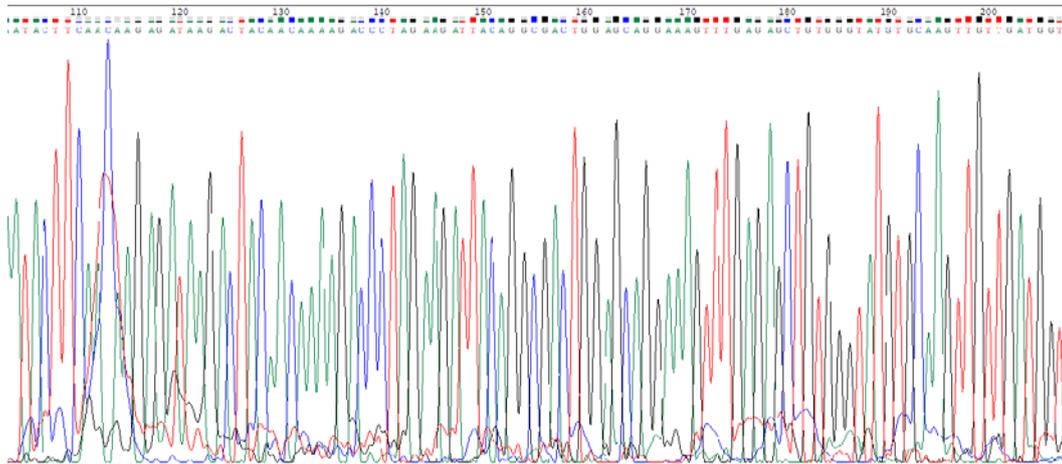


Рисунок 22 - Фрагмент хроматограммы при идентификации ИАЦ

В результате сравнительного анализа полученных нуклеотидных последовательностей фрагментов гена VP1 с другими штаммами и изолятами вируса ИАЦ из базы данных PubMed было установлено, что последовательность фрагмента гена VP1 образца изолята вируса, выделенного от цыплят-бройлеров, имеет гомологию 96% с изолятом CAV/SLA12/13, а также имеет гомологию 89% с изолятом CN\_BR-37 и штаммами JS-China 78, AN-China 34 (GeneBank, [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)).

При анализе последовательности фрагмента гена VP1 образца изолята, полученного от кур-несушек, была обнаружена гомология 96% с изолятом CN\_BR-37 и штаммом JS-China 78 (GeneBank). Составленная на основании результатов исследований дендрограмма представлена на рисунке 23.

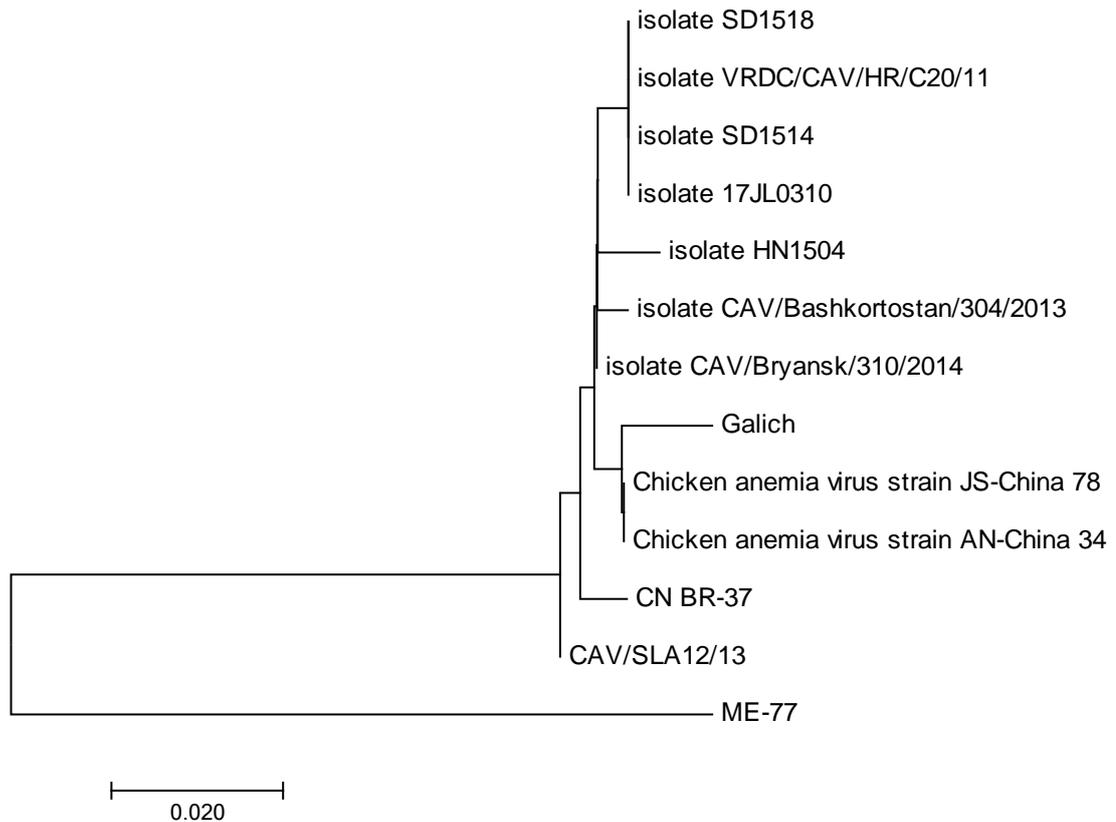


Рисунок 23 - Дендрограмма нуклеотидных отличий последовательностей фрагмента гена VP1 образцов из ПАО «ТПК «Балтптицепром», ЗАО «Галичское по птицеводству» и последовательностей из баз данных PubMed.

Таким образом, в результате проведения молекулярно-биологических исследований было установлено, что оба выделенных изолята имеют высокий процент гомологии с одними и теми же изолятами и штаммами, что подтверждает литературные данные об отсутствии отличий в антигенной структуре всех штаммов ИАЦ и их принадлежности к одному серотипу.

В связи с тем, что ИАЦ и ИББ имеют сходные признаки, и вирулентность полевого вируса ИББ оказывает непосредственное влияние на эффективность профилактики ИББ и ИАЦ, были проведены молекулярно-биологические исследования патологического материала, отобранного от цыплят с признаками ИАЦ, с целью выделения и идентификации вируса ИББ.

Была определена нуклеотидная последовательность фрагмента гена VP2 образца № 474-1 и проведен сравнительный анализ с последовательностями других штаммов и изолятов вируса. Нуклеотидная последовательность фрагмента гена

VP2 образца изолята вируса ИББ, выделенного от цыплят-бройлеров представлена на рисунке 24.

```

CACTGTTCTCAGCCAACATTGATGCTATCACAAGCCTCAGCGTTGGGGGAGAGCTCGTGT
TTCAAACAAGCGTTCAAGGCCTTGTACTGGGCGCCACCATCTACCTTATAGGCTTTGATGG
GACTACGGTAATCACCAGGGCTGTGGCCGCAGACAATGGGCTGACGGCCGGCACCCGACA
ATCTTATGCCATTCAATATTGTGATTCCAACCAACGAGATAACCCAGCCAATTACATCCAT
CAAACCTGGAGATAGTGACCTCCAAAAGTGGTGGCCAGGCAGGGGACCAGATGTCATGGT
CGGCAAGTGGGAGCCTAGCAGTGACGATCCATGGTGGCAACTATCCAGGGGCCCTCCGTC
CCGTCACACTAGTAGCCTACGAAAGAGTGGCAACAGGATCCGTCGTTACGGTCGCTGGGG
TGAGCAACTTCGAGCTGATCCCAAATCCTGAACTAGCAAAGAACCTGGTTACAGAATACG
GCCGATTTGACCCAGGAGCCATGAACTACACAAAATTGATACTGAGTGAGAGGGACCGTC
TTGGCATCAAGACCGTCTGGCCAACAAGGGAGTACACCGACTTTCGTGAGTACTTCATGG
A GGTGGCCGACCTCAATTCTCCCCTGAAGATTGCAGG

```

Рисунок 24 - Нуклеотидная последовательность фрагмента гена VP2 образца № 474-1 изолята вируса ИББ, выделенного от цыплят-бройлеров.

Образец изолята вируса ИББ секвенировали и составили дендрограмму нуклеотидных отличий последовательности фрагмента гена VP2 образца вируса ИББ (474-1) и последовательностей из базы данных (GeneBank). Дендрограмма представлена на рисунке 25.

На дендрограмме, представленной на рисунке 25 видно, что последовательность исследуемого образца была полностью идентична (100%) с последовательностью вакцинного штамма Winterfield 2512, входящего в составе вакцин Севак Transmune IBD, Севак IBD L, Авивак ИББ Винтерфилд 2512, Бурсаплекс Zoetis, АвиПро Экстрим Ломанн Анимал Хелс V217, Авивак ИББ АН и др.

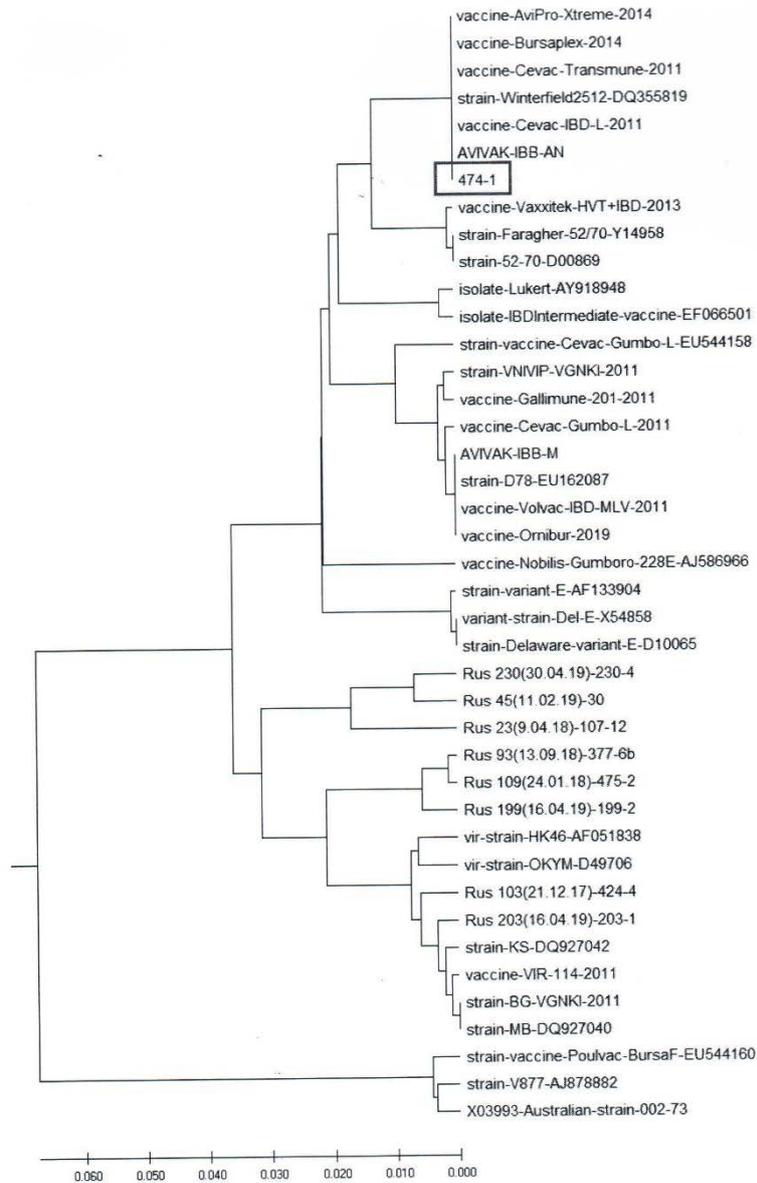


Рисунок 25 - Дендрограмма нуклеотидных отличий последовательности фрагмента гена VP2 образца вируса ИБВ (474-1) и последовательностей из баз данных PubMed.

### 2.2.9. Получение и очистка вирусосодержащего материала

Для приготовления вирусосодержащего материала отбирали кусочки печени вынужденно убитых цыплят 22-суточного возраста с клиническими признаками болезни или кусочки печени, отобранной от свежих трупов цыплят с патологоанатомическими признаками, характерными для ИАЦ. Отобранные кусочки печени взвешивали, измельчали ножницами, помещали в фосфатно-

солевой буферный раствор (рН 7,3-7,5) в соотношении 1:10 и гомогенизировали ULTRA-TURRAX® T-25 digital. В полученную суспензию вносили пенициллин в дозе 2000 ЕД/мл, стрептомицин в дозе 2 мг/мл и гентамицин в дозе 50 мг на 1 мл суспензии. Суспензию в пробирках 3-5 раз замораживали при температуре минус 22°C и оттаивали в термостате при температуре 37°C. Эта процедура вызывает дополнительное разрушение клеток и освобождение вируса. Затем суспензию осветляли центрифугированием при 10 000g в течение 30 минут. Надосадочную жидкость проверяли на стерильность посевом на мясопептонный бульон (МПБ), мясопептонный агар (МПА), мясопептонный печеночный бульон (МППБ) под вазелиновым маслом, среду Сабуро и среду Эдварда. В течение срока наблюдения (10 суток) питательные среды оставались стерильными, что свидетельствовало об отсутствии контаминации ВСМ бактериальной, грибной микрофлорой и микоплазмами. После проверки на стерильность супернатант помещали в морозильник и до использования хранили при минус 70°C.

С целью получения очищенного вируса часть супернатанта подвергали ультрацентрифугированию при 80 000 g в течение 3 часов при 10° С, полученный осадок ресуспендировали в 1,0 см<sup>3</sup> стерильного фосфатно-солевого буферного раствора (рН 7,3 – 7,5).

Концентрацию вируса определяли методом количественной ПЦР и выражали в копиях (к) вирусных частиц в микролитре (к/мкл). Концентрация вируса в вирусосодержащем материале после ультрацентрифугирования составила 10<sup>9</sup> к/мкл.

Для очистки вирусосодержащего материала использовали метод гельхроматографии на макропористом стекле 700Å, обработанном поливинилпирролидоном. Элюцию вируса проводили стерильным фосфатно-солевым буферным раствором (рН 7,3-7,5) с использованием перистальтического насоса, прибора РЭППС-1М (регистратор измерений электропроводности и процента поглощения света элюатом при жидкостной хроматографии при длине волны 280 нм) со скоростью 1,0 см<sup>3</sup>/мин и собирали отдельной фракцией. На ленте самописца выход очищенного вируса регистрировался в виде своеобразного пика.

Примесные белки на ленте самописца выделялись вторым пиком. Хроматограмма очистки вируса представлена на рисунке 26.

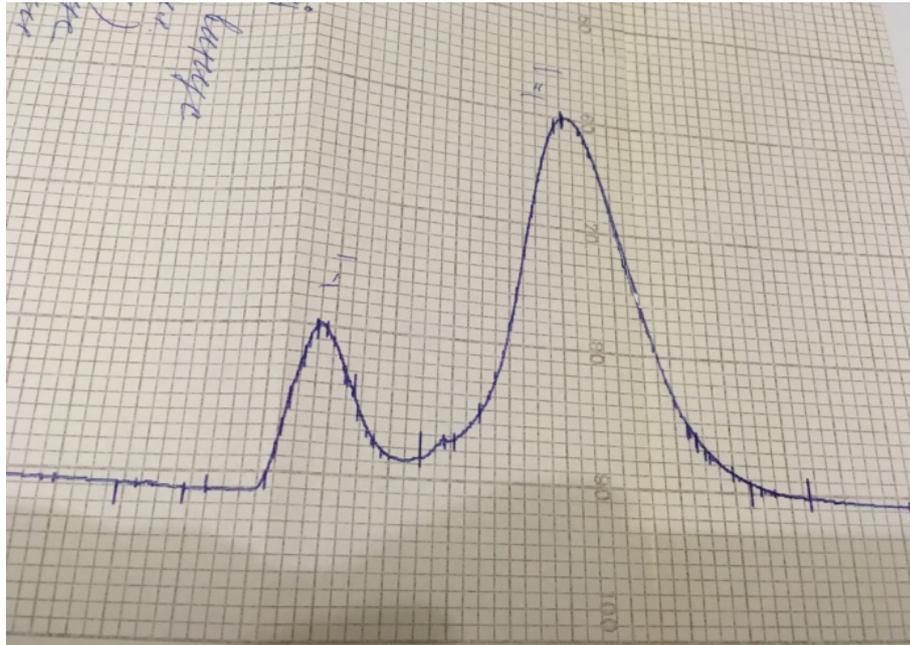


Рисунок 26 - Хроматограмма очистки вируса. Первый пик – вирусный белок, второй пик – примесные белки. Колонка: 2x80см; объем наносимой на колонку вирусодержащей жидкости  $V=0,5 \text{ см}^3$ ; объем очищенного вируса  $15 \text{ см}^3$ ; скорость элюции  $1-2 \text{ см}^3/\text{см}^2/\text{мин}$ .

Очищенный вирусодержащий материал подвергали повторно ультрацентрифугированию при  $80\,000 \text{ g}$  в течение 3 часов при  $10^\circ \text{ C}$ , полученный осадок ресуспендировали в  $0,5 \text{ см}^3$  стерильного фосфатно-солевого буферного раствора (рН 7,3 – 7,5) и в дальнейшем использовали для получения моноспецифической сыворотки и электронно-микроскопического исследования. Концентрация вируса в ВСМ составила  $10^{7,2} \text{ к/мкл}$ .

Моноспецифическую сыворотку получали с целью определения специфичности выделенного вируса. Для этого СПФ-цыплятам 15-суточного возраста в количестве 5 голов внутрибрюшинно 1-кратно вводили ВСМ в объеме  $0,2 \text{ см}^3$ . Через 21 день после введения ВСМ у цыплят отбирали сыворотку крови, которую исследовали в ИФА. При исследовании полученной сыворотки методом иммуноферментного анализа были выявлены антитела к ВАЦ. Средний титр

антител к вирусу ИАЦ в сыворотке крови составил 1:3451 (диапазон значений от 1:2773 до 1:4127). Специфичность была подтверждена при исследовании сыворотки крови экспериментально зараженных цыплят на наличие антител к гетерологичным вирусам: вирусу инфекционной бурсальной болезни, вирусу ньюкаслской болезни, реовирусу, вирусу инфекционного ларинготрахеита кур, вирусу инфекционного бронхита кур, метапневмовирусу. В исследуемых пробах сыворотки крови антител к возбудителям ИББ, НБ, ИЛТ, ИБК, реовирусу и метапневмовирусу выявлено не было.

Таким образом, в результате исследований был получен образец очищенного вируса инфекционной анемии цыплят.

Часть ВСМ, полученного от цыплят-бройлеров 22-суточного возраста, лиофилизировали и в 2016 году депонировали в Государственную коллекцию вирусов Института вирусологии им. Д.И. Ивановского ФГБУ «ФНИЦЭМ им Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России как патогенный штамм «МЕ-77», семейство *Circoviridae*, род *Gyrovirus* под регистрационным номером 2837.

В 2018 году был получен патент на изобретение № 2646116 от 01.03.2018г. (Бюл. № 7) «Штамм вируса инфекционной анемии цыплят «МЕ-77» для производства инактивированных сорбированных и эмульгированных вакцин и диагностикумов».

#### **2.2.10. Электронно-микроскопическое исследование патологического материала**

Для электронно-микроскопического исследования образец очищенного вируса ИАЦ обрабатывали методом негативного контрастирования с использованием 2%-ного раствора фосфорно-вольфрамовой кислоты (ФВК), нейтрализованного (до рН 7,0) гидроксидом натрия. При исследовании образца под электронным микроскопом были обнаружены скопления одинаковых вирусоподобных частиц сферической формы, размером  $20,0-25,0 \pm 1,0$  нм, по морфологическим характеристикам сходные с вирусом анемии цыплят (Рисунок 27).

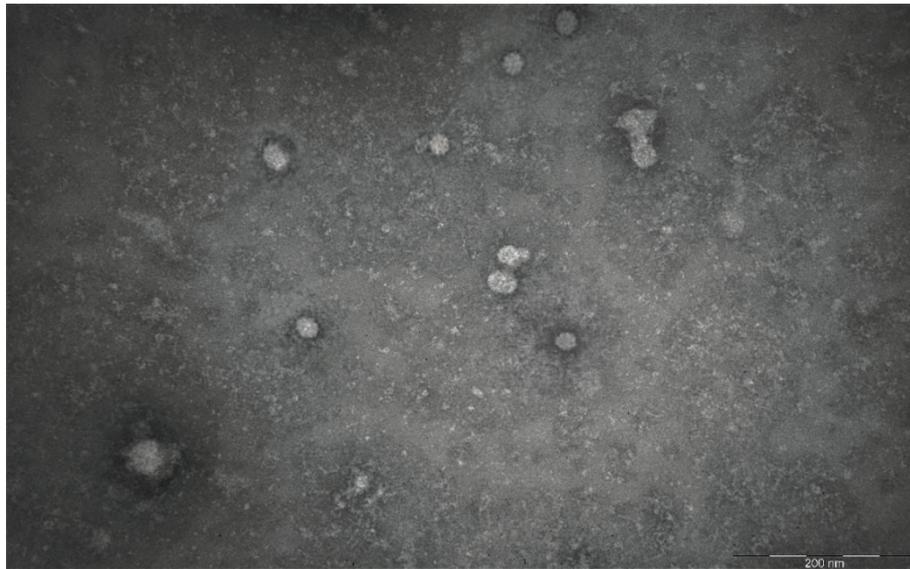


Рисунок 27 - Вирус ИАЦ (негативное контрастирование x200 000)

В процессе исследования других вирусоподобных частиц обнаружено не было, что свидетельствует об отсутствии контаминации исследуемого материала.

#### **2.2.11. Постановка биопробы на СПФ-цыплятах**

Метод биопробы используют как для диагностики инфекционной анемии цыплят, так и для определения полноты инактивации вируссодержащего материала. При постановке биопробы с целью диагностики ИАЦ, так же, как и при диагностике инфекционной бурсальной болезни, использование СПФ-цыплят является принципиальным моментом. При наличии у цыплят материнских антител происходит элиминация вируса материнскими антителами и заражения не происходит.

Для постановки биопробы использовали беспородных СПФ-цыплят суточного возраста, так как цыплята раннего возраста наиболее восприимчивы к вирусу ИАЦ. Заражение проводили гомогенатом печени, отобранной от цыплят-бройлеров, с клиническими и патологоанатомическими признаками ИАЦ. В опытной и контрольной группах было по 25 цыплят. Цыплят содержали в условиях вивария в клеточных батареях по 5 голов в каждой клетке при одинаковых условиях кормления и микроклимата. Каждую группу цыплят содержали в отдельном боксе.

Цыплятам опытной группы инокулировали 10% вирусодержащую суспензию, приготовленную из печени клинически больных цыплят-бройлеров, внутрибрюшинно в объеме 0,2 см<sup>3</sup>. Цыплятам контрольной группы вирусодержащий материал не вводили.

Через сутки после инокуляции убивали по 5 цыплят из каждой группы с целью отбора проб крови. Кровь на наличие вируса ИАЦ исследовали в ПЦР. В результате исследования было установлено наличие вируса ИАЦ в крови цыплят опытной группы через 24 часа после инокуляции ВСМ.

На 10-12 сутки после инокуляции ВСМ у цыплят опытной группы были выявлены следующие клинические признаки: потеря аппетита, депрессия (малоподвижность, сонливость), бледность кожных покровов и видимых слизистых оболочек, отставание в росте и живой массе по сравнению с цыплятами контрольной группы.

В процессе выращивания проводили взвешивание цыплят в возрасте 1, 7 и 14 суток. Результаты взвешивания цыплят представлены в таблице 11.

Таблица 11 - Результаты взвешивания цыплят

Группа цыплят	Возраст цыплят, суток / средняя живая масса цыплят, грамм (M±m)		
	1	7	14
Опытная	35,0±2,0 (n=20)	68,0±2,0* (n=18)	91,0±5,0* (n=14)
Контрольная	35,0±2,0 (n=20)	68,0±2,0* (n=19)	123,0±2,0* (n=19)
Отклонение опыт/контроль	0,0	0,0	32,0

Примечание: \*P<0,05

Данные, представленные в таблице 11, свидетельствуют о том, что при одинаковой средней живой массе цыплят в возрасте 1 и 7 суток (35,0±2,0 и 68,0±2,0 соответственно), отличие средней живой массы между цыплятами опытной и контрольной групп в возрасте 14 суток составило 32,0 грамма, т.е. 26,0%.

Через 14 суток после заражения ВСМ, 5 голов из выживших цыплят опытной группы и оставшиеся цыплята контрольной группы были убиты для проведения

патологоанатомического исследования. В ходе опыта падеж цыплят составил: в опытной группе – 6 голов, в контрольной группе – 1 голова.

При исследовании было установлено, что патологоанатомические изменения во внутренних органах (анемия, истощение, бледность кожных покровов, конъюнктивы, слизистой оболочки ротовой полости, выраженная гипоплазия и атрофия тимуса, обесцвечивание костного мозга) наблюдались у 100% экспериментально зараженных цыплят. У 2-х цыплят выявляли подкожные и внутримышечные кровоизлияния в мышцах бедра, голени.

У цыплят контрольной группы патологоанатомических признаков, характерных для инфекционной анемии цыплят, выявлено не было.

От 10 цыплят опытной группы (с 14-х суток от 9 голов), начиная с суточного возраста отбирали групповые пробы помета с целью определения продолжительности выделения вируса ИАЦ из организма цыплят. Пробы отбирали до 40-суточного возраста. Отобранные групповые пробы помета исследовали в ПЦР.

В результате исследований было установлено, что у цыплят, экспериментально зараженных вирусом ИАЦ в суточном возрасте, вирус ИАЦ выделялся с пометом на протяжении 29 суток после инокуляции.

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

### ***2.2.12.1. Иммунный ответ после вакцинации цыплят против ньюкаслской болезни***

В 2015 году руководством птицефабрики было принято решение сменить поставщика гибридного яйца. Ранее гибридное яйцо завозили из Нидерландов, а новые поставки производили из Венгрии. В результате, на одной площадке были посажены цыплята от разных поставщиков гибридного яйца. В процессе выращивания у цыплят, выведенных из яйца, полученного из Венгрии, были выявлены клинические признаки инфекционной анемии цыплят, а именно: потеря

аппетита, отставание в росте, анемия видимых слизистых оболочек, дерматиты и диффузные подкожные кровоизлияния в области крыльев и брюшной стенки. При патологоанатомическом вскрытии выявляли атрофию тимуса, гипертрофию печени, атрофию фабрициевой сумки, анемию костного мозга. Смертность в среднем составляла 2-3%, в отдельных птичниках достигала 12%.

Вакцинацию против ньюкаслской болезни проводили в суточном возрасте спрей-методом вакциной из штамма «Ла-Сота» тип В1 живой лиофилизированной производства Pfizer Incorporation, США. Ревакцинацию проводили в возрасте 14 суток методом выпаивания вакциной СеВАК® NEW L (живая аттенуированная вакцина против ньюкаслской болезни из штамма «La Sota» вируса НБ) производства Ceva Santé Animale, Франция.

В возрасте 37 суток от цыплят-бройлеров были отобраны пробы сыворотки крови в количестве 25 проб от каждой партии для проведения мониторинговых исследований на наличие антител к вирусу ньюкаслской болезни.

Вакцинация считается успешной, если после применения живой вакцины не менее чем у 80% привитых цыплят титр антител к вирусу НБ в РТГА будет не ниже 1:16 ( $4 \log_2$ ).

Исследование проб сывороток крови на наличие антител к вирусу ньюкаслской болезни проводили с помощью реакции задержки гемагглютинации. Результаты исследований представлены в таблице 12.

По результатам исследований, представленных в таблице 12 видно, что количество иммунных к вирусу НБ цыплят-бройлеров из птичников №№ 26, 27, 28, 59, 60 (поставка из Нидерландов) составляло от 82 до 86%. Количество иммунных к вирусу НБ цыплят-бройлеров из птичников №№ 54, 55, 61, 62, 63 (поставка из Венгрии) составляло от 28 до 68%.

Средний титр антител в пробах сыворотки крови, полученных от цыплят-бройлеров из птичников №№ 26, 27, 28, 59, 60 (поставка из Нидерландов) после применения живой вакцины составил  $4,4 \log_2$ , а средний титр антител в пробах сыворотки крови, полученных от цыплят-бройлеров из птичников №№ 54, 55, 61,

62, 63 (поставка из Венгрии) после применения живой вакцины составил  $2,1 \log_2$ , что ниже на  $2,3 \log_2$  (или ниже на 52,3%).

Таблица 12 - Результаты исследований проб сыворотки крови цыплят-бройлеров на наличие антител к вирусу ньюкаслской болезни

№№ пт.	Воз- раст, сут.	Кол- во проб	Титры антител										
			Нег.	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	1:1024
26	35	25				3	8	10	3	1			
27	35	25			1	2	13	7	2				
28	35	25			2	3	11	6	3				
59	35	25				4	12	5	3	1			
60	35	25			2	3	9	7	4				
54	35	25	6	1	1	3	7	4	3				
55	35	25	12		1	6	4		2				
61	35	25	14	3	1	3	2	2					
62	35	25	10	2	1	5	4	3					
63	35	25	12		1	2	4	4	2				

### ***2.2.12.2. Иммунный ответ после вакцинации цыплят против инфекционной бурсальной болезни***

Вакцинацию против инфекционной бурсальной болезни проводили в возрасте 11 суток методом выпаивания вакциной Пулвак Бурса F живой лиофилизированной производства Zoetis Inc., США.

Сыворотки крови отбирали в возрасте 37 суток в количестве 25 проб от каждой партии цыплят-бройлеров для проведения мониторинговых исследований на наличие антител против вируса ИББ. Допустимые значения средних титров антител после применения живой вакцины Пулвак Бурса F при однократном введении находятся в пределах 1:6000 – 1:10000 (1:12000) (в соответствии с данными по интерпретации результатов исследований с использованием программы и наборов Biocheck).

Исследование проб сывороток крови на наличие антител к вирусу ИББ проводили с помощью иммуноферментного анализа. Результаты исследований представлены на рисунке 28.



Рисунок 28 - Результаты исследований проб сыворотки крови цыплят-бройлеров на наличие антител к вирусу инфекционной бурсальной болезни в возрасте 37 суток

На рисунке 28 видно, что средние значения титров антител к вирусу ИББ в пробах сыворотки крови цыплят из птичников №№ 26, 27, 28, 59, 60 (поставка из Нидерландов) находятся в пределах допустимых значений титров антител к вирусу ИББ после применения живой вакцины, которые обеспечивает защиту поголовья птицы от полевого вируса. Средние значения титров антител в пробах сыворотки крови цыплят из птичников №№ 54, 55, 61, 62, 63 (поставка из Венгрии) после применения живой вакцины низкие или соответствуют серонегативным значениям титров антител, что, соответственно, не обеспечивает защиту поголовья птицы от полевого вируса.

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

Патологические значения титров антител к вирусу ИББ в исследуемых пробах сыворотки крови отсутствовали.

Вакцинация считается успешной, если не менее чем у 80% привитых цыплят титр антител к вирусу ИББ в ИФА будет в 2 и более раз превышать минимальный положительный титр антител (1:391), предусмотренный в наставлении по применению диагностикума, т.е. 1:782 и выше.

При оценке эффективности вакцинации необходимо учитывать также такой показатель как коэффициент вариации (CV). Коэффициент вариации показывает однородность значений титров антител, выраженный в %. Значения коэффициента вариации по исследуемым партиям птицы, представлен на рисунке 29.



Рисунок 29 - Коэффициенты вариации значений титров антител к вирусу ИББ

На рисунке 29 видно, что коэффициенты вариации значений титров антител к вирусу ИББ в сыворотках крови цыплят из птичников №№ 26, 27, 28, 59, 60 ( $\mu=139,8\pm 130,6$ ; min 81 – max 234) ниже, чем при исследовании проб сыворотки крови цыплят из птичников №№ 54, 55, 61, 62, 63 ( $\mu=34,2\pm 5,7$ ; min 31 – max 38) в среднем в 4,1 раза.

### 2.2.12.3. Иммуный ответ после вакцинации цыплят против инфекционного бронхита кур

Вакцинацию против инфекционного бронхита кур проводили в суточном возрасте спрей-методом вакциной из штамма CeBAK® MASS L (живая аттенуированная вакцина против инфекционного бронхита кур из серотипа Массачусетс, штамм «В48» вируса ИБК) и ревакцинацию в 11-суточном возрасте вакциной CeBAK IBIRD (живая аттенуированная вакцина против инфекционного бронхита кур из вариантного штамма «1/96» вируса ИБК) производства Ceva Santé Animale, Франция.

В возрасте 37 суток были отобраны пробы сыворотки крови в количестве 25 проб от каждой партии цыплят-бройлеров для проведения мониторинговых исследований на наличие антител к вирусу ИБК. В соответствии с данными по интерпретации результатов исследований с использованием программы и наборов Biocheck, допустимые значения титров антител после применения в схеме специфической профилактики живой вакцины из вариантного штамма вируса ИБК спрей-методом должны находиться в пределах 1:1000 – 1:6000.

Исследования сыворотки крови цыплят-бройлеров на наличие антител к вирусу ИБК проводили с помощью ИФА. Результаты исследований представлены на рисунке 30.



Рисунок 30 - Результаты исследований проб сыворотки крови цыплят-бройлеров на наличие антител к вирусу ИБК в возрасте 37 суток

Из результатов исследований, представленных на рисунке 30, следует, что средние значения титров антител на птичниках №№ 26, 27, 28, 59, 60 (поставка из Нидерландов) находятся в пределах допустимых значений титров антител к вирусу ИБК после 2-кратного применения живой вакцины с использованием спрей-метода, который обеспечивает защиту поголовья птицы от полевого вируса.

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

Вакцинация считается успешной, если не менее чем у 80% привитых цыплят титр антител к вирусу ИБК в ИФА будет в 2 и более раз превышать минимальный положительный титр антител (1:834), предусмотренный в наставлении по применению диагностикума, т.е. 1:1668 и выше.

Коэффициенты вариации по исследуемым партиям птицы на наличие титров антител к вирусу ИБК, представлены на рисунке 31.

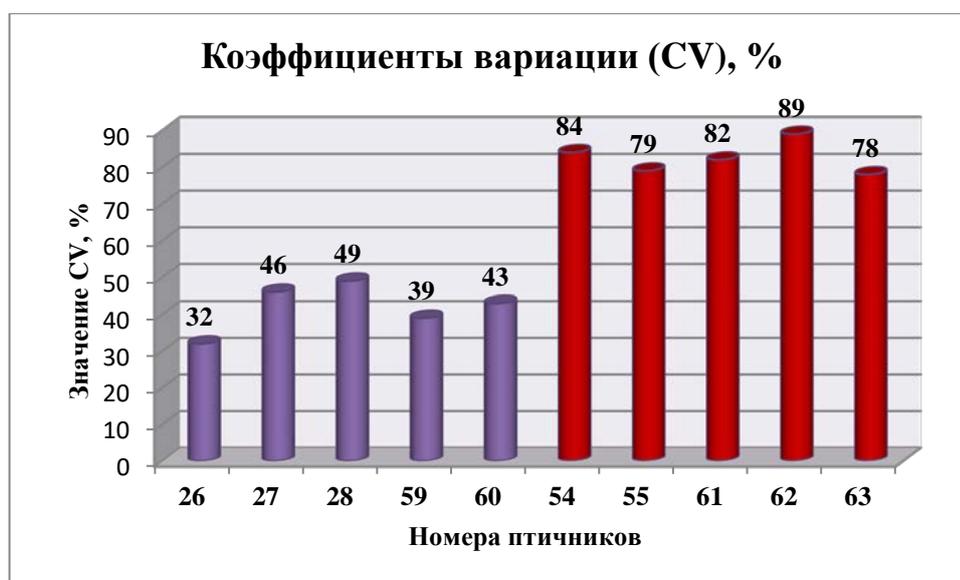


Рисунок 31 - Коэффициенты вариации значений титров антител к вирусу ИБК

На рисунке 31 видно, что коэффициенты вариации значений титров антител к вирусу ИБК в сыворотках крови из птичников №№ 26, 27, 28, 59, 60 ( $\mu=41,8\pm 13,2$ ;

min 32 – max 49) ниже, чем при исследовании проб сыворотки крови из птичников №№ 54, 55, 61, 62, 63 ( $\mu=82,4\pm 8,8$ ; min 78 – max 89) в среднем в 2,0 раза.

### 2.2.13. Влияние ИАЦ на качество мясной продукции

При ИАЦ нередко возникают дефекты мясной продукции. Для оценки влияния ИАЦ на качество мясной продукции и результаты убоя мы проводили наблюдение за партиями цыплят-бройлеров благополучных и неблагополучных по инфекционной анемии цыплят. Благополучными партии считались те партии, на которых в процессе выращивания не были выявлены клинические и патологоанатомические признаки ИАЦ. К неблагополучным партиям относили партии, на которых в процессе выращивания выявляли клинические и патологоанатомические признаки болезни. Отдельно рассматривали партии с напольным и клеточным содержанием птицы. По каждому направлению было проанализировано по 10 партий цыплят. Показатели убоя благополучных и неблагополучных по ИАЦ партий представлены в таблице 13.

Таблица 13 - Показатели выращивания цыплят-бройлеров благополучных и неблагополучных по ИАЦ партий (n=10)

Показатели выращивания (по забитым партиям)	Напольное содержание (M $\pm$ m)			Клеточное содержание (M $\pm$ m)		
	Благополучные по ИАЦ партии	Неблагополучные по ИАЦ партии	Отклонение, $\pm$	Благополучные по ИАЦ партии	Неблагополучные по ИАЦ партии	Отклонение, $\pm$
Средняя живая масса 1 головы при убое, г	2521,0 $\pm$ 99,9	2004,0 $\pm$ 103,8	517,0	2546,0 $\pm$ 225,3	2150,0 $\pm$ 118,9	396,0
Средний среднесуточный привес, г	64,3 $\pm$ 0,8	51,7 $\pm$ 1,3	12,6	63,9 $\pm$ 2,3	53,4 $\pm$ 2,0	10,5
Средняя сохранность, %	95,7 $\pm$ 1,3	95,6 $\pm$ 0,8	0,1	96,1 $\pm$ 1,2	94,7 $\pm$ 3,0	1,6
Средний расход корма на 1 кг привеса	1,60 $\pm$ 0,08	1,68 $\pm$ 0,04	0,08	1,64 $\pm$ 0,06	1,75 $\pm$ 0,06	0,11
Индекс продуктивности (ИП)	372,2 $\pm$ 12,8	291,9 $\pm$ 11,9	80,3	369,4 $\pm$ 17,2	286,7 $\pm$ 19,3	82,7

Примечание: \*P<0,05

Данные таблицы 13 показывают, что все представленные показатели выращивания благополучных по ИАЦ партиям, независимо от системы содержания, выше, чем показатели выращивания неблагополучных по ИАЦ партий. Средний индекс продуктивности благополучных по ИАЦ партий при напольном и клеточном содержании составил  $372,2 \pm 12,8$  и  $369,4 \pm 17,2$  соответственно. Средний индекс продуктивности неблагополучных по ИАЦ партий при напольном и клеточном содержании составил  $291,9 \pm 11,9$  и  $286,7 \pm 19,3$  соответственно, что ниже среднего ИП благополучных по ИАЦ партий при напольном и клеточном содержании на 80,3 и 82,7 соответственно.

При осмотре тушек цыплят-бройлеров были выявлены следующие причины выбраковки тушек: венозная гиперемия кожи в области крыльев («синее крыло»), серозные и серозно-геморрагические отеки и кровоизлияния в подкожной клетчатке в области грудины, брюшной стенки, крыльев и нижних конечностей, наличие на мышцах наружных перимизий. Выявленные дефекты мясной продукции представлены на рисунках 32-37. Тушки с вышеперечисленными дефектами выбраковывали и направляли в промышленную переработку. При выявлении случаев, имеющих признаки осложнения условно-патогенной микрофлорой (рисунок 34), тушки направляли на утилизацию.



Рисунок 32 - Венозная гиперемия в области крыльев («синее крыло»)



Рисунок 33 - Внутрикожные геморрагические инфильтраты в области крыльев



Рисунок 34 - Серозно-геморрагический отек в области груди с признаками фибринозного воспаления

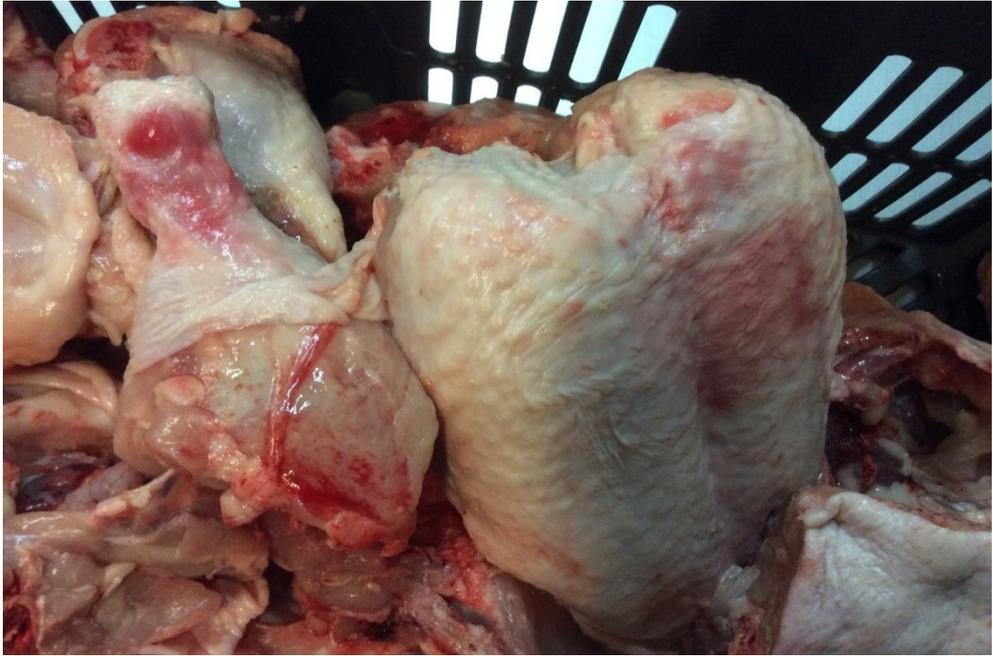


Рисунок 35 - Диффузные внутрикожные серозно-геморрагические инфильтраты в области груди и голени. Перимизии мышц голени



Рисунок 36 - Перимизии мышц и жировых отложений в области бедра

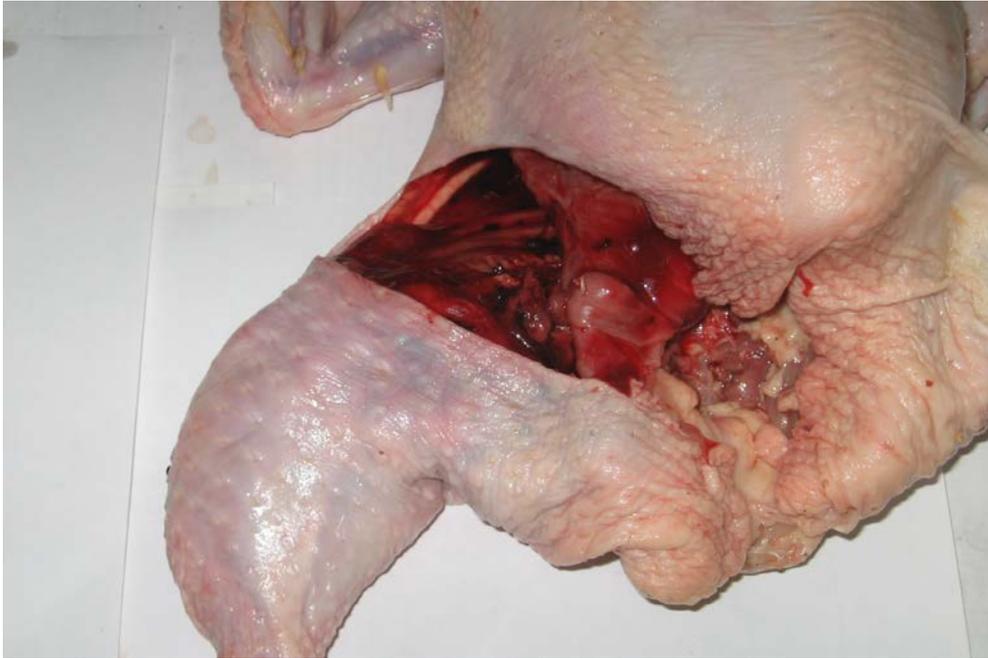


Рисунок 37 - Геморрагический подкожный инфильтрат в области бедра и брюшной стенки

На рисунках 32-37 видно, что вследствие поражения цыплят ИАЦ снижается качество мяса и, как следствие, уменьшается выход мясной продукции, увеличивается количество санитарного брака, что непосредственно влияет на экономические показатели производства.

#### **2.2.14. Построение системы профилактики инфекционной анемии цыплят на птицефабрике**

Основываясь на результатах лабораторных исследований, биологических свойствах вируса инфекционной анемии цыплят, литературных данных, на птицефабрике была разработана система профилактики ИАЦ. Система профилактики ИАЦ включала проведение ветеринарно-санитарных, лечебно-профилактических и противоэпизоотических мероприятий.

Так как вирус ИАЦ является высокоустойчивым, ветеринарно-санитарные мероприятия были направлены на снижение концентрации вируса в птичниках и в окружающей среде. Ветеринарно-санитарные мероприятия включали:

- тщательную механическую очистку и мойку птицеводческих помещений и оборудования с применением моюще-дезинфицирующих средств;

- обработку птицеводческих помещений и оборудования горячими растворами дезинфицирующих средств, обладающими вирулицидной активностью и обеззараживающими свойствами в отношении высокоустойчивых микроорганизмов;

- уборку и дезинфекцию прилегающей территории;

- мойку и дезинфекцию транспорта, контейнеров и др.;

- соблюдение (если возможно) принципа содержания птицы «пусто-занято»;

- закрепление персонала за группами птицы;

- соблюдение персоналом ветеринарно-санитарных правил и правил личной гигиены;

- обеззараживание спец. одежды, спец. обуви, средств индивидуальной защиты, инвентаря.

На устойчивость организма цыплят к патогенам различной этиологии, в том числе к вирусу ИАЦ, непосредственное влияние оказывают условия содержания и кормления:

- соблюдение технологических норм содержания птицы (температура, влажность, содержание в воздухе аммиака, углекислого газа, объем вентиляции, скорость движения воздуха, запыленность, качество подстилки, плотность посадки, обеспечение фронта кормления и поения и др.);

- кормление безопасными кормами (гранулирование и др.);

- кормление сбалансированными кормами, повышение усвояемости ингредиентов корма (правильный подбор ферментов, использование органических форм микроэлементов и др.).

Профилактика микотоксикозов является частью системы профилактики ИАЦ, так как обладая иммунодепрессивными свойствами микотоксины (афлатоксины, трихоцетины, охратоксин А, фумонизины и др.) усиливают иммунодепрессивное влияние ВАЦ на иммунную систему цыплят.

Современная стратегия профилактики инфекционной анемии цыплят основана на иммунизации родительских стад с целью предупреждения вертикальной передачи вируса ИАЦ и защиты молодняка от полевого вируса в

первые дни жизни. В связи с этим поставки инкубационного яйца/цыплят в птицеводческое хозяйство, неблагополучное по ИАЦ, должны осуществляться только от вакцинированных родителей. Посадка цыплят от невакцинированных родителей на площадку, неблагополучную по ИАЦ, приводила к острой вспышке болезни и, как следствие, пассажированию вируса ИАЦ на восприимчивом поголовье с риском повышения вирулентности возбудителя ИАЦ, выделению вируса в окружающую среду (вспышка болезни при смене поставщика гибридного яйца/молодняка в 2015 году).

Для снижения иммуносупрессивного действия вируса ИАЦ и степени проявления болезни необходимо обеспечить благополучие цыплят-бройлеров по болезни Марека и инфекционной бурсальной болезни. В настоящее время, преимущественно в хозяйствах мясного направления, имеющих родительские стада, расположенные вблизи площадок по выращиванию бройлеров, рекомендуется вакцинировать цыплят-бройлеров в суточном возрасте. При этом серотип ВБМ, содержащийся в вакцине против БМ для бройлеров, должен отличаться от серотипов ВБМ, используемых на родительском поголовье птицы.

При разработке системы профилактики ИАЦ были проведены гистологические исследования органов, отобранных от 37-суточных цыплят с целью выявления патоморфологических изменений, указывающих на воздействие вируса болезни Марека (седалищные нервы, селезенка, печень, почки). В результате исследований патоморфологических изменений, связанных с БМ выявлено не было.

По результатам проведенных исследований было принято решение не вакцинировать цыплят-бройлеров против болезни Марека.

Методов лечения ИАЦ не разработано. Лечебно-профилактические мероприятия направлены на ликвидацию и предупреждение развития вторичных инфекций бактериальной этиологии. Антибактериальные средства назначаются с лечебной целью при выявлении первых случаев бактериальных инфекций в периоды повышения смертности, обусловленной инфекционной анемией цыплят.

Для профилактики возникновения бактериальных инфекций (колибактериоз и др.) необходимо использование, начиная с раннего возраста, пробиотических, пребиотических, симбиотических препаратов для формирования в кишечнике популяции полезной микрофлоры. Возможно курсовое применение пробиотиков или введение препаратов в корма или с водой на постоянной основе, начиная с суточного возраста. Также для профилактики бактериальных инфекций, как альтернатива кормовым антибиотикам, применяют фитобиотики, которые представляют собой биологически активные вещества растительного происхождения. Фитобиотики, помимо антимикробного действия, обладают противовирусным, иммуномодулирующим, противогрибковым и противовоспалительным действием

Кроме этого, для снижения бактериального давления следует включать в схему профилактических мероприятий введение подкислителей (препараты содержащие органические кислоты и их соли). Подкислители вводят на постоянной основе в корма или применяют по схеме с водой.

Иммунная система в первые 2 недели жизни цыпленка недостаточно развита. При этом в связи с коротким сроком выращивания цыплят-бройлеров иммунизацию птицы проводят в раннем возрасте. Для поддержания и развития иммунной системы рекомендуется применение в первые 7-14 суток жизни цыпленка иммуностимуляторов/иммуномодуляторов, не обладающих противовирусными свойствами.

В процессе работы с 2011 по 2016 годы были апробированы различные схемы специфической профилактики инфекционных болезней птиц. Схемы включали иммунопрофилактику ньюкаслской болезни, инфекционного бронхита кур (в том числе вариантного штамма), инфекционной бурсальной болезни и с целью минимизации потерь от ИАЦ должны были обеспечивать благополучие по ИББ. В связи с этим в схемах вакцинации менялись вакцины против ИББ и сроки их введения. В процессе работы были использованы такие вакцины против ИББ как:

- иммунокомплексная вакцина СЕВАК®TRANSMUNE IBD, в суточном возрасте, производитель CEVA SANTE ANIMAL (Франция);
- СЕВАК®IBDL, 9- и 15-суточном возрасте, производитель CEVA SANTE ANIMAL (Франция);
- Пулвак Бурса F живая лиофилизированная, в 11-суточном возрасте, производитель Zoetis Inc. (США);
- ТАБИК МБ живая, таблетка, в 8-суточном возрасте, производитель AVIC Biological Laboratories, Ltd. (Израиль).

Оценку эффективности проводили комплексно, с учетом результатов серологических исследований в ИФА на наличие антител к вирусу ИББ, результатов клинического и патологоанатомического исследований, ПЦР, по степени проявления клинических и патологоанатомических признаков ИАЦ, а также по показателям выращивания цыплят-бройлеров (сохранность, живая масса, среднесуточный привес, затраты корма и др.).

Наиболее эффективной оказалась схема специфической профилактики, представленная в таблице 14.

Таблица 14 - Схема специфической профилактики цыплят-бройлеров в ООО ТПК «Балтптицепром»

Возраст, суток	Название болезни	Наименование биопрепарата, штамм	Производитель	Метод введения
1	Ньюкаслская болезнь	АВИВАК – ИБК(Н-120)+НБ (В1)	НПП «Авивак»	спрей
	Инфекционный бронхит кур			
9	Инфекционный бронхит кур	СЕВАК®Ibird (вариантный штамм «1/96»)	CEVA SANTE ANIMAL (Франция)	выпойка
	Инфекционная бурсальная болезнь	СЕВАК®IBDL (Винтерфилд 2512, G-61)		
15	Инфекционная бурсальная болезнь	СЕВАК®IBDL (Винтерфилд 2512, G-61)		
	Ньюкаслская болезнь	СЕВАК®NewL (Ла-Сота)		

При разработке схемы специфической профилактики был использован принцип совмещения вакцинаций с целью увеличения интервалов между

иммунизациями, уменьшения кратности обработок и, как следствие, снижения уровня стресса и нагрузки на иммунную систему цыпленка в раннем возрасте.

Разработанная схема специфической профилактики применяется на птицефабрике с 2016 года по настоящее время.

### **3. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЙ**

Промышленное птицеводство наиболее интенсивно развивающаяся, науко- и технотемкая отрасль сельского хозяйства, обеспечивающая население страны продуктами животного происхождения, а также продовольственную безопасность России. Однако в условиях крупномасштабного производства, в условиях завоза генетического материала и биопрепаратов из-за рубежа, существует риск возникновения и распространения новых, в том числе малоизученных, инфекционных болезней птиц. К таким болезням относится и инфекционная анемия цыплят, которая за относительно короткий период времени получила широкое распространение в Российской Федерации. В настоящее время ИАЦ является причиной ухудшения эпизоотической ситуации, наносит значительный экономический ущерб за счет снижения показателей сохранности и продуктивности, снижения качества мясной продукции, увеличения затрат на антибактериальные и витаминно-минеральные препараты. В Российской Федерации не разработаны нормативные акты по профилактике и ликвидации ИАЦ, средства серологической диагностики и специфической профилактики.

Инфекционная анемия цыплят – иммунодепрессивная болезнь, которая характеризуется отставанием в росте и развитии, апластической анемией, дерматитами, повышенной восприимчивостью к возбудителям других инфекций (вирусных, бактериальных, паразитарных), а также снижением эффективности вакцинаций.

По данным D. Todd [288], K.Dhama et al. [99] и ряда других исследователей [23,25,29,30,32,71,104,128,179,201,232,233,315], вирус ИАЦ вызывает депрессию иммунного ответа после вакцинации против НБ, БМ, ИЛТ, оспы, ИББ, ИБК, кокцидиоза и др., а также повышенную поствакцинальную реакцию или

обострение остаточной патогенности аттенуированных вакцинных штаммов. G.F. De Voer et al. [96] установили, что в результате функциональных нарушений ВАЦ цитотоксических Т-лимфоцитов и естественных киллеров, возникают поражения, которые провоцируют поствакцинальные осложнения у суточных цыплят при иммунизации их против НБ вакциной из штамма «Ла-Сота» с признаками угнетения, конъюнктивита, нарушения дыхания и смертностью до 30%.

Куры являются естественными хозяевами ВАЦ, однако в результате последних исследований варианты вируса выделены от домашних воробьев [122], индеек [258], мышей, кошек, собак и человека [114], что делает проблему изучения ИАЦ актуальной не только в эпизоотологическом, но и эпидемиологическом отношении.

Вирус ИАЦ до конца не изучен, о чем свидетельствуют неоднократные изменения в его классификации [66,75,120,142,147,155,211,216,244,245,253,264, 288]. Высокая устойчивость ВАЦ к физическим и химическим факторам внешней среды, к дезинфектантам [3,103,111,116,121,129,195,196,199,210,256,266,274,297, 311,318], а также способность возбудителя к продолжительной персистенции в организме независимо от наличия в крови антител и возраста [3,52,148,153,161], способствует длительной циркуляции вируса в популяции птиц.

После переболевания ИАЦ птица приобретает иммунитет. Продолжительность и возрастные аспекты формирования иммунитета до конца не изучены [3,301], что помимо вышеперечисленных свойств ВАЦ, затрудняет профилактику и ликвидацию болезни.

Многолетние наблюдения за развитием инфекционной анемии цыплят, результаты диагностических и мониторинговых исследований, информация по профилактике и мерам по снижению ущерба от болезни в одном из промышленных птицеводческих предприятий мясного направления легли в основу нашей работы.

Работа проводилась в промышленном птицеводческом предприятии мясного направления, не имеющем своего родительского стада. Предприятие ввозит из-за рубежа гибридное яйцо кросса «РОСС-308». Поставщиками гибридного яйца являются ведущие европейские производители.

Цыплята-бройлеры содержатся 4-х ярусных клеточных батареях или на глубокой подстилке в соответствии с рекомендациями по выращиванию кросса и утвержденной технологией.

В хозяйстве инкубируется более 14,5 млн. яиц в год. Вывод цыплят составляет 80-83%. Ежедневно на откорме находится более 1,3 млн. голов цыплят, что составляет более 13 млн. голов в год. По итогам работы в 2017 году валовое производство мяса составило 20,9 тыс. тонн в убойном весе, количество дней откорма – 36,9, сохранность – 96,5 %, средний живой вес 1-ой головы – 2173 грамма, среднесуточный привес – 58,9 грамма, расход корма – 1,62 к.ед., индекс продуктивности – 351,1.

Кросс «РОСС-308» является высокопродуктивным мясным кроссом и требует соблюдения ветеринарно-санитарных требований, рекомендаций по содержанию и кормлению, чувствителен к стресс-факторам, патогенам различной этиологии. При благоприятных условиях содержания и кормления здоровые цыплята способны достигать генетического потенциала.

Для обеспечения эпизоотологического благополучия птицефабрики разработан комплекс ветеринарно-санитарных, лечебно-профилактических и противоэпизоотических мероприятий. Мероприятия осуществляются в соответствии с утвержденными планами, графиками выполнения работ в рамках утвержденного бюджета на ветеринарное обеспечение производственного процесса.

Комплекс ветеринарно-санитарных мероприятий проводится в соответствии с ветеринарными правилами содержания птиц на предприятиях закрытого типа (птицефабриках).

Лечебно-профилактические мероприятия включают схему применения антибактериальных, антистрессовых, витаминно-минеральных препаратов и схему специфической профилактики.

Специфическая профилактика проводится в соответствии с эпизоотической ситуацией в птицеводческом хозяйстве и в регионе на основе результатов диагностических и мониторинговых исследований. На птицефабрике цыплят-

бройлеров иммунизируют против НБ, ИББ, ИБК с последующим контролем уровня поствакцинальных антител в установленные сроки.

С целью контроля и прогнозирования эпизоотической ситуации в хозяйстве собирается и систематизируется информация, включающая сведения о поставщиках гибридного молодняка и яйца, схемах вакцинации родительских стад, схемах проведения лечебно-профилактических и противоэпизоотических мероприятий, результатах диагностических и мониторинговых исследований из различных лабораторий, в возрастном и временном аспекте.

Впервые клинические и патологоанатомические признаки инфекционной анемии цыплят в хозяйстве были отмечены в 2008 году на цыплятах, завезенных из Нидерландов компанией «Хаанстра», после ввоза инкубационного яйца из Испании компанией «Мигель Авикола», полученного от невакцинированного против ИАЦ родительского поголовья.

Клиническая картина болезни была представлена снижением живой массы, потребления корма, депрессией, анемией видимых слизистых оболочек, дерматитами и кровоизлияниями в области крыльев и брюшной стенки, увеличением падежа цыплят.

Выявленные клинические признаки описаны в работах российских и зарубежных исследователей [52,111,112,215,230].

В процессе проведения исследований вели наблюдение за партиями цыплят-бройлеров, полученных от разных поставщиков. На партиях, неблагополучных по ИАЦ, было установлено снижение прироста живой массы и сохранности.

Так средний живой вес цыплят-бройлеров неблагополучных по ИАЦ партий был ниже нормативного и ниже среднего живого веса цыплят благополучных по ИАЦ партий на всем протяжении выращивания. Средний живой вес 1 головы цыплят неблагополучных по ИАЦ партий при убое составил  $1779,5 \pm 67,2$  г. Средний живой вес 1 головы цыплят благополучных по ИАЦ партий при убое составил  $2178,3 \pm 53,4$  г, что выше среднего живого веса 1 головы при убое цыплят неблагополучных по ИАЦ партий на 398,8 г. Средний среднесуточный привес цыплят неблагополучных по ИАЦ партий составлял  $48,4 \pm 1,9$  г. Средний

среднесуточный привес цыплят благополучных по ИАЦ партий был выше на 10,5 г и составлял  $58,9 \pm 2,6$  г.

Средняя сохранность цыплят неблагополучных по ИАЦ партий составила  $89,5 \pm 3,9\%$ . Средняя сохранность цыплят благополучных по ИАЦ партий была выше на 7,7% и составляла  $97,2 \pm 0,5\%$ .

По данным Н. Gelderblom et al. [121] и А.М. Negazy et al. [140], уровень смертности при ИАЦ обычно составляет 10-20%, но при ассоциированных инфекциях может достигать 60%. N. Sandhya et al. [258] и G.H. Lai et al. [174] отмечают, что заболеваемость при ИАЦ может составлять 80-100%, а смертность при осложнении вторичными инфекциями – более 50-55%.

По нашим данным смертность с признаками ИАЦ среди цыплят неблагополучных по ИАЦ партий составляла от 1-2 до 12%.

Часто клиническая картина не характерна и выражается неоднородностью стада, небольшим повышением смертности, отставанием в росте и значительным увеличением количества случаев выявления вторичных инфекций [52].

В процессе работы мы также наблюдали на некоторых партиях не характерные признаки, такие как резкое расслоение цыплят в возрасте 12-14 суток, кратковременное повышение падежа (в течение 2-4 дней) в 17-29-суточном возрасте.

По литературным данным клиническое проявление ИАЦ в результате трансвариальной передачи вируса наблюдается в 12-14-суточном возрасте. У цыплят старше 2-3-недельного возраста развивается субклиническая форма болезни, о чем свидетельствуют снижение поствакцинального иммунного ответа, повышение вероятности возникновения других инфекций и снижение клеточно-опосредованного иммунного ответа [56,136,141,186,215,258,266].

Следует отметить, что в 2011-2014 гг. повышение падежа цыплят-бройлеров с признаками ИАЦ отмечалось в возрасте 17-29 суток, т.е. наблюдался 1 пик смертности.

В 2015-2016 гг. динамика падежа цыплят-бройлеров изменилась, а именно стали выявлять 2 пика смертности – в возрасте 14-21 сутки и в возрасте 26-36 суток.

Первый пик смертности обусловлен трансвариальной передачей ВАЦ, второй – горизонтальной. В данный период имели место смена поставщиков гибридного молодняка и яйца, т.е. выращивание на одной площадке цыплят с неоднородным иммунным статусом. Динамика падежа цыплят-бройлеров в благополучных по ИАЦ корпусах характеризовалась низким уровнем смертности на протяжении всего периода выращивания.

По литературным данным при ИАЦ имеет место такой признак, как падение гематокрита в крови ниже 27% [101,120,285,297,298], а по данным А. Davidson et al. [176] показатели гематокрита могут снижаться до 15-17%, что негативно влияет на продуктивность бройлеров. Выявление значений гематокрита ниже 27% при клиническом исследовании крови в совокупности с изменениями в костном мозге (желтоватый цвет) и атрофией тимуса может указывать на инфицирование ВАЦ [140,243,247,311]. В зависимости от стадии болезни в мазках крови выявляют лейкопению или панцитопению [42,77]

При клиническом исследовании проб крови цыплят-бройлеров было установлено, что уровень гематокрита в пробах крови, полученных от цыплят с признаками ИАЦ на 4,0-8,6% ниже диагностического уровня (27%) и на 29,5-50,9% ниже, чем уровень гематокрита в пробах, полученных от цыплят без признаков ИАЦ. Также по результатам исследований в пробах крови, полученных от цыплят с признаками ИАЦ отмечались лейкопения и тромбоцитопения.

По данным С.С. Клоуд с соавт. [38], тромбоцитопения, возникающая при заражении ВАЦ, играет ведущую роль в возникновении предрасположенности инфицированной птицы к различным патогенам, проникновению которых способствует нарушение стенок сосудов.

При патологоанатомическом вскрытии наиболее часто выявляли диффузные кровоизлияния в области крыльев, гангренозные дерматиты в области крыльев, так называемый синдром «синего крыла», а также наличие подкожных инфильтратов в области брюшной стенки и нижних конечностей, цвет которых варьировал от соломенно-желтого до буро-зеленоватого, некроз кожи пальцев.

Кроме этого, отмечались такие патологоанатомические признаки как атрофия тимуса и бурсы, изменение цвета костного мозга, гиперемия бурсы и наличие в ней серозно-слизистого экссудата молочно-белого цвета, гипертрофия печени и почек, синдром «круглое сердце», штрихоподобные кровоизлияния в мышцах бедра и голени. У некоторых цыплят наблюдалось скопление в брюшной полости студневидного инфильтрата соломенно-желтого цвета, диффузные кровоизлияния в слизистой оболочке железистого желудка.

Перечисленные патологоанатомические признаки описаны в литературных источниках как признаки, выявляемые при инфекционной анемии цыплят в экспериментальных и полевых условиях [30,45,79,112,133,215,257].

На некоторых партиях у цыплят 3-5-суточного возраста нами были выявлены гемorragии в фабрициевой сумке, наличие серозно-слизистого экссудата молочно-белого цвета в бурсе, патологические изменения костного мозга (обесцвечивание или нарушение структуры). Мы считаем, что данные поражения у цыплят раннего возраста свидетельствуют о трансвариальной передаче вируса ИАЦ. Это подтверждают и результаты исследований образцов пораженных фабрициевых сумок и костного мозга методом ПЦР.

Следует отметить, что такие патологоанатомические признаки как наличие серозно-слизистого экссудата в бурсе, штрихоподобные кровоизлияния в мышцах бедра и голени, обесцвечивание костного мозга наблюдались у цыплят разного возраста, преимущественно в пики смертности.

Для серологической диагностики ИАЦ применяются РН, РНИФ, иммунопероксидазные тесты, ИФА [73,159,203,256,258].

Исследование сывороток крови цыплят-бройлеров на наличие специфических антител к ВАЦ мы проводили методом ИФА с использованием наборов «BioChek» для обнаружения антител к вирусу ИАЦ.

В результате исследований было установлено, что количество положительных проб снижается к 21 суткам до 1,1%, что обусловлено распадом материнских антител. Начиная с 28-суточного возраста наблюдается увеличение

количества положительных проб сыворотки крови вследствие переболевания цыплят ИАЦ и выработки вируснейтрализующих антител.

Были проведены исследования проб сыворотки крови цыплят из партий, полученных от невакцинированных и из партий, полученных от вакцинированных против ИАЦ родителей. Средний титр материнских антител у суточных цыплят, полученных от невакцинированных родителей, составлял 1:757, что свидетельствует о наличии положительных проб сыворотки крови и, следовательно, об инфицировании родительского стада ВАЦ. Уровень титров антител в 7, 14, 21, 28-суточном возрасте находился в пределах негативных значений. В возрасте 35-38 суток средний титр антител к ВАЦ в пробах сыворотки крови цыплят составлял 1:3711.

Средний титр материнских антител у суточных цыплят, полученных от вакцинированных родителей, составлял 1:1981. К 7-суточному возрасту средний титр антител снижался до 1:946. Средний уровень титров антител в 14, 21, 28, 35-38-суточном возрасте находился в пределах негативных значений.

По данным российских и зарубежных исследователей количество сероположительных проб к ВАЦ проб сыворотки крови, полученных от бройлеров, промышленных и племенных кур, варьирует от 10 до 100% [3,39,60,62,140,170,187,234,255]. Результаты серологического скрининга сывороток крови от птицы из птицефабрик мясного направления выращивания свидетельствуют о том, что ВАЦ имеет повсеместное распространение [1,3,35,40].

В результате анализа результатов проведенных нами исследований было установлено, что количество положительных проб сыворотки крови цыплят, полученных от невакцинированных родителей, в суточном возрасте составляло 22,3%, в 7, 14, 21, 28-суточном возрасте все пробы имели отрицательные значения. В возрасте 35-38 суток количество положительных проб сыворотки крови составляло 81,0%.

Количество положительных проб сыворотки крови цыплят, полученных от вакцинированных родителей, в суточном возрасте составило 79,6%, в 7-суточном – 43,5%, в 14-суточном – 1,4%. В возрасте 21 сутки все пробы были

отрицательными. Начиная с 28-суточного возраста количество положительных проб сыворотки крови увеличилось до 7,0%, а в 35-38-суточном возрасте составило 24,0%.

Выявление антител в пробах сыворотки крови цыплят в условиях отсутствия вакцинации против ИАЦ в возрасте 28-38 суток свидетельствует о циркуляции ВАЦ на территории птицефабрики.

По данным С.Ж. Cardona et al. [84], М.М. Miller and К.А. Schat [210], серонегативные птицы могут быть инфицированы ВАЦ. Исследователи L.B. Hu et al. [302] также показали, что персистенция ВАЦ у инфицированных птиц может не сопровождаться образованием антител.

Это подтверждается и нашими исследованиями. Мы считаем, что отсутствие антител у цыплят-бройлеров в возрасте 36-38 суток связано с тем, что при горизонтальной передаче ВАЦ, когда инфицирование происходит в возрасте 3-6 недель, антитела не успевают вырабатываться. Активные антитела в сыворотке крови можно обнаружить в возрасте между 5 и 9 неделями, если передержать часть цыплят после убоя партии в течение 2-3 недель. В связи с этим в ходе исследований было отобрано 25 условно больных голов цыплят с целью их передержки в течение 14 дней. Так в возрасте 38 суток средний титр антител к ВАЦ составлял 1:209 (1:34 – 1:1396), CV = 145%, количество положительных проб – 3. После передержки в возрасте 52-х суток средний титр составил 1:4369 (1:882 – 1:7379), CV = 40%, количество положительных проб – 23.

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

Кроме этого, отсутствие антител у части (10% и более) переболевшей птицы может быть связано с феноменом иммунологической толерантности, отсутствием инфицирования или элиминацией антител [1,3,25].

С целью выделения и идентификации возбудителя были проведены вирусологические, молекулярно-биологические электронно-микроскопические исследования.

Выделение ВАЦ с использованием культуры клеток является трудоемким процессом, поэтому для проведения вирусологических исследований нами были использованы 4-5-суточные СПФ-куриные эмбрионы, которых заражали в желточный мешок суспензией, приготовленной из печени клинически больных цыплят в дозе 0,2 см<sup>3</sup>. Эмбрионы инкубировали в течение 14 суток при температуре 37°C. После окончания срока инкубации в результате вскрытия не было выявлено каких-либо видимых поражений эмбрионов, что подтверждается литературными данными [5,19,21,34].

Из тушек эмбрионов и ХАО были отобраны образцы, которые исследовали в ПЦР. В результате проведенных исследований в образцах тканей эмбрионов и ХАО был выявлен вирус ИАЦ.

Часть инфицированных эмбрионов были проинкубированы для получения цыплят. При патологоанатомическом вскрытии цыплят 7-суточного возраста были выявлены анемия кожных покровов, слизистых оболочек, почек, печени, селезенки, наличие серозно-слизистого экссудата в бурсе, обесцвечивание костного мозга. Погибшие на 10-11 сутки цыплята имели признаки депрессии. При патологоанатомическом вскрытии у павших цыплят были выявлены анемия кожных покровов и внутренних органов, наличие серозно-слизистого экссудата в бурсе, выраженная атрофия тимуса, атрофия и изменение окраски костного мозга на светло-серый или бело-желтый, кровоизлияния в мышцах бедра и голени.

По данным ряда исследователей [3,17,25] у цыплят, выведенных из инфицированного яйца, на 7-е сутки появляются признаки анемии, а на 10-15-е сутки наблюдается их гибель.

При проведении молекулярно-биологических исследований с целью определения штамма вируса и изучения структуры генома возбудителя ИАЦ, были исследованы 2 пробы патологического материала: проба № 1 – гомогенат печени и костного мозга, отобранных от цыплят-бройлеров 22-суточного возраста из ООО

«ТПК «Балтптицепром»»; проба № 2 (сравнительный контроль) – гомогенат печени и костного мозга, отобранных от кур-несушек из ЗАО «Галичское по птицеводству». Патологический материал отбирали от цыплят и кур с характерными патологоанатомическими признаками ИАЦ, такими как апластическая анемия, кровоизлияния в мышцах и подкожные инфильтраты в области крыльев и брюшной стенки. Отобранный материал исследовали на обнаружение генома ВАЦ с помощью ПЦР и секвенирования.

В результате сравнительного анализа полученных нуклеотидных последовательностей фрагментов гена VP1 с другими штаммами и изолятами вируса ИАЦ из базы данных PubMed было установлено, что последовательность фрагмента гена VP1 образца изолята вируса, выделенного от цыплят-бройлеров, имеет гомологию 96% с изолятом CAV/SLA12/13, а также имеет гомологию 89% с изолятом CN\_BR-37 и штаммами JS-China 78, AN-China 34 (GeneBank, [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)).

При анализе последовательности фрагмента гена VP1 образца изолята, полученного от кур-несушек, была обнаружена гомология 96% с изолятом CN\_BR-37 и штаммом JS-China 78 (GeneBank).

Таким образом, в результате проведенных молекулярно-биологических исследований было установлено, что оба выделенных изолята имеют высокий процент гомологии с одними и теми же изолятами и штаммами, что подтверждает литературные данные [13,52,120,154,197,230,263,291,300,304,313] об отсутствии отличий в антигенной структуре всех штаммов ИАЦ и их принадлежности к одному серотипу.

В связи с тем, что ИАЦ и ИББ имеют сходные признаки, и циркуляция полевого вируса ИББ оказывает непосредственное влияние на эффективность профилактики ИББ и ИАЦ, а также на течение ИАЦ, с целью диагностики и дифференциальной диагностики были проведены молекулярно-биологические исследования патологического материала, отобранного от цыплят с признаками ИАЦ, с целью выделения и идентификации вируса ИББ.

Была определена нуклеотидная последовательность фрагмента гена VP2 образца и проведен сравнительный анализ с последовательностями других штаммов и изолятов вируса. Последовательность исследуемого образца была полностью идентична (100%) с последовательностью вакцинного штамма Winterfield 2512, входящего в состав вакцин Севак Transmune IBD, Севак IBD L, Авивак ИББ Винтерфилд 2512, Бурсаплекс Zoetis, АвиПро Экстрим Ломанн Анимал Хелс V217, Авивак ИББ АН и др.

Для депонирования штамма вируса ИАЦ и проведения электронно-микроскопических исследований необходимо было получить вирусосодержащий материал. С этой целью от цыплят 22-суточного возраста с характерными для ИАЦ признаками отбирали пробы печени и получали 10% гомогенат. Затем ВСМ осветляли, концентрировали ультрацентрифугированием при 80 000 g в течение 3 часов при 10° С, очищали и повторно концентрировали. Концентрацию вируса определяли методом количественной ПЦР и выражали в копиях вирусных частиц в микролитре. Концентрация вируса в вирусосодержащем материале после повторного ультрацентрифугирования составила  $10^{7,2}$  к/мкл.

Для очистки вирусосодержащего материала использовали метод гельхроматографии на макропористом стекле 700Å, обработанном поливинилпирролидоном.

Специфичность выделенного вируса определяли путем исследования моноспецифической сыворотки, полученной от экспериментально зараженных цыплят, в ИФА на наличие антител к вирусу инфекционной анемии цыплят. Средний титр антител к вирусу ИАЦ в сыворотке крови составил 1:3451 (диапазон значений от 1:2773 до 1:4127). Специфичность была подтверждена при исследовании моноспецифической сыворотки на наличие антител к гетерологичным вирусам. В исследуемых пробах сыворотки крови антител к возбудителям ИББ, НБ, ИЛТ, ИБК, реовирусу и метапневмовирусу выявлено не было. Таким образом, в результате исследований был получен образец очищенного вируса инфекционной анемии цыплят.

Часть очищенного изолята вируса ИАЦ, выделенного от цыплят-бройлеров 22-суточного возраста, лиофилизировали и в 2016 году депонировали в Государственную коллекцию вирусов Института вирусологии им. Д.И. Ивановского ФГБУ «ФНИЦЭМ им Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России как патогенный штамм «МЕ-77», семейство *Circoviridae*, род *Gyrovirus* под регистрационным номером 2837.

В 2018 году был получен патент на изобретение № 2646116 от 30.12.2016г./01.03.2018г. «Штамм вируса инфекционной анемии цыплят «МЕ-77» для производства инактивированных сорбированных и эмульгированных вакцин и диагностикумов».

Для электронно-микроскопического исследования образец очищенного вируса ИАЦ обрабатывали методом негативного контрастирования с использованием фосфорно-вольфрамовой кислоты.

В различных литературных источниках описаны морфологические характеристики вируса ИАЦ, в том числе размер вируса [1,3,5,10,11,17,25,34,121,198,266].

При исследовании образца под электронным микроскопом были обнаружены скопления одинаковых вирусоподобных частиц сферической формы, размером 20,0-25,0±1,0 нм, по морфологическим характеристикам сходные с вирусом инфекционной анемии цыплят.

Наиболее специфичным методом первичного выделения ВАЦ является внутримышечное или внутрибрюшинное заражение суточных СПФ-цыплят [42,113,256].

Для постановки биопробы мы использовали беспородных СПФ-цыплят суточного возраста, так как цыплята раннего возраста наиболее восприимчивы к вирусу ИАЦ. Заражение проводили гомогенатом печени, отобранной от цыплят-бройлеров, с клиническими и патологоанатомическими признаками ИАЦ.

Цыплятам опытной группы инокулировали 10% вирусосодержащую суспензию, приготовленную из печени клинически больных цыплят-бройлеров,

внутрибрюшинно в объеме 0,2 см<sup>3</sup>. Цыплятам контрольной группы вирусосодержащий материал не вводили.

Через сутки после инокуляции убивали по 5 цыплят с целью отбора проб крови для исследования в ПЦР на наличие вируса ИАЦ. В результате исследования было установлено наличие вируса ИАЦ в крови цыплят опытной группы через 24 часа после инокуляции ВСМ.

На 10-12 сутки после инокуляции ВСМ у цыплят опытной группы были выявлены следующие клинические признаки: потеря аппетита, депрессия (малоподвижность, сонливость), бледность кожных покровов и видимых слизистых оболочек, отставание в росте и живой массе по сравнению с цыплятами контрольной группы.

В процессе выращивания проводили взвешивание цыплят в возрасте 1, 7 и 14 суток. Полученные данные свидетельствуют о том, что при одинаковой средней живой массе цыплят в возрасте 1 и 7 суток ( $35,0 \pm 2,0$  и  $68,0 \pm 2,0$  соответственно), отличие средней живой массы между цыплятами опытной и контрольной групп в возрасте 14 суток составило 32,0 грамма, т.е. 26,0%.

Через 14 суток после заражения ВСМ 5 выживших цыплят опытной группы и цыплята контрольной группы были убиты для проведения патологоанатомического исследования.

При исследовании было установлено, что патологоанатомические изменения во внутренних органах (анемия, бледность кожных покровов, конъюнктивы, слизистой оболочки ротовой полости, выраженная гипоплазия и атрофия тимуса, обесцвечивание костного мозга) наблюдались у 100% экспериментально зараженных цыплят. У 6-ти цыплят выявляли подкожные и внутримышечные кровоизлияния в мышцах бедра, голени. У цыплят контрольной группы вышеперечисленные патологоанатомические признаки отсутствовали.

Рядом исследователей было установлено, что вирус ИАЦ при экспериментальном заражении выделяется из всех тканей и экскретов инфицированных птиц на протяжении 5-ти недель с момента инокуляции [21,144,272].

Для определения продолжительности выделения вируса ИАЦ с пометом от цыплят опытной группы, начиная с суточного возраста были отобраны групповые пробы помета, которые исследовали в ПЦР. В результате наших исследований было установлено, что у экспериментально зараженных в суточном возрасте цыплят, ВАЦ выделялся с пометом на протяжении 29 суток после инокуляции.

По данным D. Todd [288], K.Dhama et al. [99] и ряда других исследователей [23,25,29,30,32,71,104,128,179,201,232,233,315], вирус ИАЦ вызывает депрессию иммунного ответа после вакцинации против НБ, БМ, ИЛТ, оспы, ИББ, ИБК, кокцидиоза и др., а также повышенную поствакцинальную реакцию или обострение остаточной патогенности аттенуированных вакцинных штаммов. G.F. De Boer et al. [96] установили, что в результате функциональных нарушений вирусом ИАЦ цитотоксических Т-лимфоцитов и естественных киллеров, возникают поражения, которые провоцируют поствакцинальные осложнения у суточных цыплят при иммунизации их против НБ вакциной из штамма «Ла-Сота» с признаками угнетения, конъюнктивита, нарушения дыхания и смертностью до 30%.

В 2015 году руководством птицефабрики было принято решение сменить поставщика гибридного яйца. В результате, на одной площадке были посажены цыплята от разных поставщиков гибридного яйца. В процессе выращивания у цыплят, выведенных из яйца, полученного из Венгрии, были выявлены клинические признаки инфекционной анемии цыплят, а именно: потеря аппетита, отставание в росте, анемия видимых слизистых оболочек, дерматиты и диффузные подкожные кровоизлияния в области крыльев и брюшной стенки. При патологоанатомическом вскрытии выявляли атрофию тимуса, гипертрофию печени, атрофию фабрициевой сумки, анемию костного мозга. Смертность в среднем составляла 2-3%, в отдельных птичниках достигала 12%. У цыплят, выведенных из яйца, полученного из Нидерландов, вышеперечисленных признаков не наблюдалось.

Цыплят, независимо от поставщика гибридного яйца, иммунизировали против ньюкаслской болезни, инфекционного бронхита кур и инфекционной бурсальной болезни по схеме:

- сутки – ИБК (CeBAK®MASS L), спрей; НБ (штамм «Ла-Сота» тип В1), спрей;
- 11 суток – ИБК (CeBAK®IBIRD), выпойка; ИББ (Пулвак Бурса F);
- 14 суток – НБ (CeBAK®New L), выпойка.

В возрасте 37 суток были отобраны пробы сыворотки крови для проведения мониторинговых серологических исследований.

В результате исследований было установлено, что количество иммунных к вирусу НБ цыплят-бройлеров из птичников №№ 26, 27, 28, 59, 60 (поставка из Нидерландов) составляет от 82 до 86%. Количество иммунных к вирусу НБ цыплят-бройлеров из птичников №№ 54, 55, 61, 62, 63 (поставка из Венгрии) составляет от 28 до 68%.

Вакцинация считается успешной, если после применения живой вакцины не менее чем у 80% привитых цыплят титр антител к вирусу НБ в РТГА будет не ниже 1:16 ( $4 \log_2$ ).

Средний титр антител в пробах сыворотки крови, полученных от цыплят-бройлеров из птичников №№ 26, 27, 28, 59, 60 (поставка из Нидерландов) после применения живой вакцины составил  $4,4 \log_2$ , а средний титр антител в пробах сыворотки крови, полученных от цыплят-бройлеров из птичников №№ 54, 55, 61, 62, 63 (поставка из Венгрии) после применения живой вакцины составил  $2,1 \log_2$ , что ниже на  $2,3 \log_2$  (или ниже на 52,3%).

Результаты наших исследований согласуются с литературными данными [29,320] о том, что у инфицированных ВАЦ или переболевших ИАЦ цыплят иммунный ответ после применения живой вакцины против ньюкаслской болезни из штамма «Ла-Сота» ниже на 40% по сравнению со здоровыми цыплятами.

Средние значения титров антител к вирусу ИББ в пробах сыворотки крови цыплят из птичников №№ 26, 27, 28, 59, 60 (поставка из Нидерландов) находились в пределах допустимых значений титров антител к вирусу ИББ после применения живой вакцины, т.е. 1:6000 – 1:10000 (1:12000) (в соответствии с данными по

интерпретации результатов исследований с использованием программы и наборов Biocheck). Средние значения титров антител в пробах сыворотки крови цыплят из птичников №№ 54, 55, 61, 62, 63 (поставка из Венгрии) после применения живой вакцины были низкими или соответствовали серонегативным значениям титров антител. При сравнении средние значения титров антител к вирусу ИББ в пробах сыворотки крови цыплят из птичников №№ 26, 27, 28, 59, 60 ( $\mu=1:5837\pm 1903$ ; min 1:5327 – max 1:7542) были выше средних значений титров антител в пробах сыворотки крови цыплят из птичников №№ 54, 55, 61, 62, 63 ( $\mu=1:1051\pm 1629$ ; min 1:221 – max 1:2390) в среднем в 5,6 раза.

Коэффициент вариации значений титров антител к вирусу ИББ в сыворотках крови цыплят из птичников №№ 26, 27, 28, 59, 60 ( $\mu=139,8\pm 130,6$ ; min 81 – max 234) был ниже, чем при исследовании проб сыворотки крови цыплят из птичников №№ 54, 55, 61, 62, 63 ( $\mu=34,2\pm 5,7$ ; min 31 – max 38) в среднем в 4,1 раза.

Средние значения титров антител в сыворотках крови цыплят из птичников №№ 26, 27, 28, 59, 60 (поставка из Нидерландов) находились в пределах допустимых значений титров антител к вирусу ИБК после 2-кратного применения живой вакцины с использованием спрей-метода, т.е. 1:1000 – 1:6000.

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

Коэффициент вариации значений титров антител к вирусу ИБК в сыворотках крови цыплят из птичников №№ 26, 27, 28, 59, 60 ( $\mu=41,8\pm 13,2$ ; min 32 – max 49) ниже, чем при исследовании проб сыворотки крови цыплят из птичников №№ 54, 55, 61, 62, 63 ( $\mu=82,4\pm 8,8$ ; min 78 – max 89) в среднем в 2,0 раза.

Патологических значений титров антител к вирусу ИББ и вирусу ИБК в исследуемых пробах сыворотки крови выявлено не было.

Таким образом, результаты наших исследований подтвердили литературные данные [25,29,30,32,71,104,128,201,232,315] о том, что вирус ИАЦ вызывает депрессию иммунного ответа после вакцинации против НБ, ИББ и ИБК.

В процессе выполнения работы проводилась ветеринарно-санитарная экспертиза тушек при убое цыплят-бройлеров. Наблюдение вели за благополучными и неблагополучными по ИАЦ партиями цыплят. При осмотре тушек цыплят-бройлеров были выявлены следующие причины выбраковки тушек: венозная гиперемия кожи в области крыльев («синее крыло»), серозные и серозно-геморрагические отеки и кровоизлияния в подкожной клетчатке в области грудины, брюшной стенки, крыльев и нижних конечностей, наличие на мышцах наружных перимизий. Тушки с вышеперечисленными дефектами выбраковывали и направляли в промышленную переработку. При выявлении случаев, имеющих признаки осложнения условно-патогенной микрофлорой, тушки направляли на утилизацию.

Таким образом, было установлено, что вследствие поражения цыплят ИАЦ снижается качество тушек и, соответственно, выход мясной продукции, увеличивается количество санитарного брака, что непосредственно влияет на производственные показатели по забитым партиям.

Так средний индекс продуктивности благополучных по ИАЦ партий при напольном и клеточном содержании составил  $372,2 \pm 12,8$  и  $369,4 \pm 17,2$  соответственно. Средний индекс продуктивности неблагополучных по ИАЦ партий при напольном и клеточном содержании составил  $291,9 \pm 11,9$  и  $286,7 \pm 19,3$  соответственно, что ниже среднего ИП благополучных по ИАЦ партий при напольном и клеточном содержании на 80,3 и 82,7 соответственно.

Основываясь на результатах диагностических исследований, биологических свойствах вируса инфекционной анемии цыплят, литературных данных, на птицефабрике была разработана система профилактики ИАЦ. Система профилактики ИАЦ включала проведение ветеринарно-санитарных, лечебно-профилактических и противоэпизоотических мероприятий, которая позволила снизить степень проявления признаков инфекционной анемии цыплят, стабилизировать эпизоотическую обстановку, повысить эффективность специфической профилактики и, как следствие, улучшить показатели сохранности и продуктивности цыплят-бройлеров.

#### 4. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

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

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

3. Изучено влияние иммуносупрессии, обусловленной вирусом ИАЦ, на иммунный ответ у цыплят-бройлеров после вакцинации против ньюкаслской болезни, инфекционной бурсальной болезни и инфекционного бронхита кур. Установлено, что вирус ИАЦ подавляет выработку антител к вакцинным вирусам НБ, ИББ, ИБК. Было выявлено снижение средних значений титров антител в

сыворотках крови цыплят из неблагополучных по ИАЦ партий к вирусу НБ на  $2,3 \log_2$ , к вирусу ИББ в 3,1 раза, к вирусу ИБК в 2 раза по отношению к средним значениям титров антител в сыворотках крови цыплят из благополучных по ИАЦ партий.

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

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

## **5. ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ**

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

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

Материалы, изложенные в диссертационной работе, используются в учебном процессе высших учебных заведений ветеринарного направления и на курсах

повышения квалификации ветеринарных врачей, работающих в промышленном птицеводстве.

## **6. ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ**

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

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

Таким образом, изучение биологических свойств вируса ИАЦ, эпизоотологии и эпидемиологии болезни, разработка средств диагностики и специфической профилактики являются актуальными и перспективными направлениями дальнейших исследований.

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ, УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧАНИЙ, СИМВОЛОВ, ЕДИНИЦ И ТЕРМИНОВ

БМ – болезнь Марека

ВАЦ – вирус инфекционной анемии цыплят

ВБМ – вирус болезни Марека

ВИББ – вирус инфекционной бурсальной болезни

ВЛП – вирус лейкоза птиц

ВНИВИП – «Всероссийский научно-исследовательский ветеринарный институт птицеводства» - филиал Федерального государственного бюджетного научного учреждения Федеральный научный центр «Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт птицеводства» Российской академии наук

ВРЭ – вирус ретикулоэндотелиоза

ВСМ – вируссодержащий материал

вч – вирусная частица

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ИАЦ – инфекционная анемия цыплят

ИББ – инфекционная бурсальная болезнь

ИБК – инфекционный бронхит кур

ИЛ-2 – интерлейкин-2

ИЛТ – инфекционный ларинготрахит птиц

ИФА – иммуноферментный анализ

КЭ – куриные эмбрионы

МПА – мясопептонный агар

МПБ – мясопептонный бульон

МППБ – мясопептонный печеночный бульон

мРНК – минус-рибонуклеиновая кислота

МФА – метод флюоресцирующих антител

НБ – ньюкаслская болезнь

п.н. – пар нуклеотидов

ПЦР – полимеразно-цепная реакция

РЗГА/РТГА – реакция задержки/торможения гемагглютинации

РКЭ – развивающиеся куриные эмбрионы

РН – реакция нейтрализации

РНИФ – реакция непрямой иммунофлуоресценции

РНК – рибонуклеиновая кислота

РЭ - ретикулоэндотелиоз

СПФ – аббревиатура от англ. Specific-pathogen-free (свободные от специфических патогенов)

ФВК – фосфорно-вольфрамовая кислота

CTL – цитотоксические Т-лимфоциты (от англ. cytotoxic T-lymphocytes)

ICTV – Международный комитет по таксономии вирусов

Ig M – иммуноглобулины М

min – минимальное значение

max – максимальное значение

RE – Restriction endonuclease analysis – рестрикционный анализ

μ - среднее значение

**СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Алиев, А.С. Инфекционная анемия цыплят / А.С. Алиев, М.В. Бурлаков, К.В. Зимин [и др.] // Птица и птицепродукты. – 2011. - № 1. – С. 49-53.
2. Алиев, А.С. Вирусная анемия – скрытая угроза промышленному птицеводству / А.С. Алиев, М.В. Бурлаков, В.С. Прудников [и др.] // Птица и птицепродукты. – 2012. - № 6. – С. 30-33.
3. Алиев, А.С. Инфекционная анемия цыплят / А.С. Алиев, И.Н. Громов, М.В. Бурлаков [и др.]. – СПб.: Изд. ФГОУ ВПО «СПбГАВМ», 2013. – 52 с.
4. Алиев, А.С. Патогенность изолятов вируса инфекционной анемии цыплят / А.С. Алиев, М.В. Бурлаков, И.Н. Громов [и др.] // Ветеринария. – 2015. - № 5. – С. 20-24.
5. Бакулин, В.А. Болезни птиц. – СПб.: Искусство России, 2006. – 688 с.: ил.
6. Бакулин, В.А. Иммунодефициты птиц / В.А. Бакулин // Universum: химия и биология [Эл.научн.ж.]. – 2018. - № 4 (46). – URL: <http://7universum.com/ru/nature/archive/item/5669> (Дата обращения 06.06.2019г.)
7. Иммунодефициты птиц / В.А. Бакулин. – СПб.: Свет, 2019. – 308 с + 4 л. вкл. (8 с.). – ISBN 978-5-9071-4165-0.
8. Благова, В. Вирус анемии цыплят / В. Благова // Птицеводство. 1995. - № 2. – С. 34-35.
9. Болотников, И.А. Практическая иммунология сельскохозяйственной птицы / И.А. Болотников, Ю.В. Конопатов. – СПб.: Наука, 1993. – 208 с.
10. Болезни домашних и сельскохозяйственных птиц / Под ред. Б.У. Кэлнека, Х.Д. Барнса, Ч.У. Биэрда и др. – 10-е изд., пер. с англ. – М.: Аквариум БУК, 2003. – 1232 с.: ил.
11. Болезни сельскохозяйственных птиц: Справочник / Сост. А.П. Лимаренко, И.С. Дубров, А.А. Таймасуков, С.Н. Забашта. – СПб.: Лань, 2005. – 448 с.

12. Ветеринарная энциклопедия: В 6 т. / гл. ред. К.И. Скрябин. – М.: Сов. Энцикл., 1969. – Т.2.: Вирусологическое исследование – Зубы. – 1192 с.: ил.
13. Вирусные болезни животных / В.Н. Сюрин, А.Я. Самуйленко, Б.В. Соловьев и др. – М.: ВНИТИБП, 1998. – 928 с.: ил.
14. Вирусы и вирусные вакцины / В.А. Сергеев, Е.А. Непоклонов, Т.И. Алипер. – М.: Библионика, 2007. – 524 с.
15. Галактионов, В.Г. Иммунология. – М.: Нива России, 2000. – 488 с.
16. Громов, И.Н. Патоморфологические изменения у цыплят при ассоциативном течении инфекционной анемии и инфекционной бурсальной болезни / И.Н. Громов, М.К. Селиханова, А.С. Алиев [и др.] // Вестник ветеринарии. – 2013. - № 64. – С. 60-64.
17. Гусева, Е.В. Инфекционная анемия цыплят: Обзор литературы / Е.В. Гусева, Т.А. Сатина, Т.А. Фомина. – Владимир: ОК НИИ и МС ВНИИЗЖ, 1997. – 72 с.
18. Гусева, Е.В. Вирусные болезни кур: Обзор литературы / Е.В. Гусева, Т.А. Сатина. – Владимир: ОК НИИ и МС ВНИИЗЖ, 1999. – 59 с.
19. Джавадов, Э.Д. К вопросу об инфекционной анемии цыплят // Современные вопросы ветеринарной медицины и биологии: Материалы I научн. конф. (Уфа, 21-22 нояб. 2000г.). – Уфа, 2000. – С. 133-135.
20. Джавадов, Э.Д. Инфекционная анемия цыплят / Э.Д. Джавадов, В.И. Смоленский, Ф.С. Кудрявцев [и др.] // Ветеринария. – 2001. - № 9. С. 19-22.
21. Джавадов, Э.Д. Вирус-индуцированные иммуносупрессии в промышленном птицеводстве и способы их предупреждения: дис....докт. вет. наук:16.00.03 / Джавадов Эдуард Джавадович. – М., 2004. – 345 с.
22. Джавадов, Э.Д. Диагностика иммунодефицита птиц (серологический, патоморфологический, бактериологический методы) / Э.Д. Джавадов, Ф.И. Полежаев // Ветеринария. – 2004. - № 3. – С. 15-18.
23. Джавадов, Э.Д. Ассоциированное течение инфекционной бурсальной болезни и инфекционной анемии цыплят. Проблема и пути ее решения / Э.Д.

Джавадов, М.Е. Дмитриева, М.А. Занько [и др.] // БИО. – 2010. - № 9. (120) – С. 22-23.

24. Дмитриева, М.Е. Инфекционный энцефаломиелит птиц. Методы диагностики и профилактики в условиях промышленного птицеводческого предприятия закрытого типа: дис....канд. вет. наук: 16.00.03, 16.00.04 / Дмитриева Маргарита Евгеньевна. – СПб., 2008. – 195 с.

25. Дмитриева, М.Е. Инфекционная анемия цыплят. Диагностика и профилактика / М.Е. Дмитриева, Э.Д. Джавадов, Е.С. Людькова. – СПб.: РК «Агат», 2011. – 40 с.

26. Дмитриева, М.Е. Особенности вакцинопрофилактики иммунодепрессивных болезней птиц в промышленном птицеводстве / М.Е. Дмитриева М.Е. // Farm Animals. – 2013. - № 3-4. - С. 81-83.

27. Дмитриева, М.Е. Новые вирусные заболевания в промышленном птицеводстве: диагностика и профилактика / М.Е. Дмитриева // Тваринництво сьогодні. – 2013. - № 8. – С. 62-69.

28. Дмитриева, М.Е. Инфекционная анемия цыплят – одна из причин возникновения иммуносупрессии и низкой эффективности специфической профилактики в промышленном птицеводстве // Инновационное обеспечение яичного и мясного птицеводства России: материалы XVIII Междунар. конф. (Сергиев Посад, 19-20 мая 2015г.). – Сергиев Посад, 2015. – С. 458-459.

29. Дмитриева, М.Е. Инфекционная анемия цыплят как фактор снижения эффективности специфической профилактики в промышленном птицеводстве / М.Е. Дмитриева // Вопросы нормативно-правового регулирования в ветеринарии. – 2015. - № 4. – С. 50-53.

30. Дмитриева, М.Е. Инфекционная анемия цыплят и качество мяса бройлеров / М.Е. Дмитриева // Птица и птицепродукты. – 2016. - № 4. – С. 48-49.

31. Жибинов, В.И. Изменения в органах иммуноопоза при болезни Марека / В.И. Жибинов // Ветеринария. – 1990. - № 7. – С. 32-35.

32. Имбург, М. Инфекционная анемия птиц – недремлющая угроза / М. Имбург, Я. Бортюк // БИО. – 2007. – № 7 (82). - С. 31.

33. Иммунология / Б.В. Хаитов, Г.А. Игнатъева, И.Г. Сидорович. – М.: Медицина, 2000. – 432 с.
34. Инфекционная патология животных: В 2 т. / Под ред. А.Я. САмуйленко, Б.В. Соловьева, Е.А. Непоклонова, Е.С. Воронина. – М.: Академкнига, 2006. – Т.1. – 1911 с.
35. Ирза, В.Н. Инфекционная анемия цыплят / В.Н. Ирза // Птицеводство. – 2003. - № 3. – С. 24-26.
36. Исмаилова, А.Ф. Иммунный статус животных. Возможности коррекции иммунодефицитных состояний новыми производными глицирризиновой кислоты / А.Ф. Исмаилова, Г.В. Базекин. – Уфа: БГАУ, 2001. – 157 с.
37. Клиническая иммунология / Е.И. Змушко, Е.С. Белозеров, Ю.А. Митин. – СПб.: Питер, 2001. – 576 с.
38. Клоуд, С.С. Иммунодепрессивные эффекты вирусной анемии и методы борьбы с ними / С.С. Клоуд, Д.К. Розенбергер, К.Р. Поуп // БИО. – 2002. - № 6. – С. 9-12.
39. Лобанов, В.А. Серологический мониторинг инфекционной анемии цыплят и молекулярно-биологическая характеристика изолятов вируса / В.А. Лобанов, М.А. Волкова, В.В. Дрыгин [и др.] // Вестник РАСХН. – 2003. – № 1. – С. 66-68.
40. Людьева, Е.С. Значение серологического мониторинга распространения инфекционной анемии цыплят в птицеводческих хозяйствах Российской Федерации / Е.С. Людьева, Э.Д. Джавадов, М.Е. Дмитриева // Вопросы нормативно-правового регулирования в ветеринарии. – 2009. - № 4. – С. 103-104.
41. Придыбайло, Н.Д. Иммунодефициты у сельскохозяйственных животных и птиц, профилактика и лечение их иммуномодуляторами / Н.Д. Придыбайло. – М., 1991. – 44 с.

42. Руководство по вирусологии: Вирусы и вирусные инфекции человека и животных / Под ред. академика РАН Д.К. Львова. – М.: Изд-во «Медицинское информационное агентство», 2013. – 1200 с.: ил.
43. Салаутин, В.В. Адаптивная реакция у цыплят при стрессах / В.В. Салаутин // Ветеринария. – 2003. - № 1. – С. 23-25.
44. Селиверстова, Н.А. Усовершенствование молекулярно-биологических, гематологических и патологоанатомических методов диагностики инфекционной анемии цыплят: дис...канд. биол. наук: 06.02.02 / Селиверстова Наталья Андреевна. – Новосибирск, 2013. – 117 с.
45. Селиверстова, Н.А. Инфекционная анемия кур, как причина возникновения вторичных бактериальных инфекций респираторной системы у цыплят-бройлеров / Н.А. Селиверстова, В.Н. Афонюшкин // РацВетИнформ. – 2012. - № 10. – С. 11-14.
46. Сизякина, Л.П. Справочник по клинической иммунологии / Л.П. Сизякина, И.И. Андреева. – Ростов-на-Дону: Феникс, 2005. – 448 с.
47. Справочник ветеринарного врача птицеводческого предприятия: В 2 т. / Под ред. Р.Н. Коровина. – СПб.: ГП ППП №1, 1995. – Т. 2. – 176 с.
48. Фармакокоррекция иммунодефицитных состояний у животных / Л.Ю. Топурия, А.А. Стадников, Г.М. Топурия. – Оренбург: изд. Цент ОГАУ, 2008. – 176 с.
49. Федоров, Ю.Н. Иммунодефициты домашних животных / Ю.Н. Федоров, О.А. Верховский. – М., 1996. – 95 с.
50. Федоров, Ю.Н. Иммунологический мониторинг: состояние и перспективы // Актуальные проблемы инфекционной патологии и иммунологии животных: Материалы междунар. научн.-практич. конф. (Москва, 16-17 мая 2006г.). – М.: Изографъ, 2006. – С. 432-434.
51. Фисинин, В.И. Птицеводство России – стратегия инновационного развития. – М.: Тип. Россельхозакадемии, 2009. – 148 с.
52. Хорват-Папп, И. Заболевания бройлеров: пер. с венгерского / И. Хорват-Папп. – 2013. – 690 с.: ил.

53. Юшков, Ю. Патоморфологические исследования для мониторинга инфекционной анемии цыплят / Ю. Юшков, Н. Селиверстова, С. Леонов [и др.] // Птицеводство. – 2013. - № 7. – С. 28-31.
54. Abdu P.A. Gumboro disease. In: Manual of Important Poultry Disease in Nigeria, 3<sup>th</sup> ed., 2014, 5 and 6 Ventures, pp. 16-30.
55. Adair B.M. Characterization of surface markers present on cells infected by chicken anemia virus in experimentally infected chickens / B.M. Adair, F. McNeilly, C.D.C. McConnell [et al.] // Avian Dis. – 1991. – V. 35, N. 4. – P. 783-792.
56. Adair B.M. Immunopathogenesis of chicken anemia virus infection / B.M. Adair // Develop. Comp. Immunol. – 2000. – V. 24. – P. 247-255.
57. Adedeji A.J. Concurrent infectious of chicken infectiou7s anemia and infectious bursal disease in 5-weeks-old pullets in Jos, Plateau State, Nigeria / A.J. Adedeji, N.M. Sati, S.B. Rewan [et al.] // Vet. Sci. – 2016. – V. 2, N. 3. – P. 60-65.
58. Allan G.M. Some biological and physico-chemical properties of porcine circovirus / G.M. Allan, J.A. Smyth, D. Todd [et al.] // J. Vet. Med. B. – 1994. – V. 41. – P. 17-26.
59. Aly M. M. Isolation of chicken infectious anemia virus from outbreaks in broilers chickens in Egypt / M.M. Aly // Vet. Med. Ass. – 2001. – V. 61, N. 6. – P. 137-147.
60. Amin A.A. A serological study of the prevalence of chicken infectious anemia in commercial flocks / A.A. Amin, M.K. Hassan, M.M. Aly [et al.] // Proc. 5<sup>th</sup> Sci. Conf., Egypt. – Vet. Poult. Assoc. – 1998. – P. 69-75.
61. Backendorf C. Apoptin: the rapeutic potential of an early sensor of carcinogenic transformaiton / C. Backendorf, A.E. Visser, A.G. de Boer [et al.] // Annu Rev. Pharmacol. Toxicol. – 2008. – V. 48. – P. 143-169.
62. Ballal A. Serological survey of chicken infectious anemia virus in commercial chicken flocks in Khartoum State-Sudan / A. Ballal, A.M. El-Hussein, I.S.A. Abdel-Rahim // J. of Anim. and Vet. Advances. – 2005. – V. 4, N. 7. – P. 666-667.

63. Balamurugan V. Economically important non-oncogenic immunosuppressive viral disease of chicken-current status / V. Balamurugan, J.M. Kataria // *Vet. Res. Commun.* – 2006. – V.30, N. 5. – P. 541-557.
64. Barrios P.R. Occurrence of chicken anemia virus in backyard chickens of the metropolitan region of belo horizonte // P.R. Barrios, S.Y. Marin, M. Resende [et al.] // *Brazilian J. Poult. Sci.* – 2009. – V. 11. – P. 135-138.
65. Basaraddi M.S. Down regulation in cytokines profiles and immunopathological changes in chicks infected with chicken infectious anaemia virus / M.S. Basaraddi, K. Dhama, M.Y. Wani [et al.] // *African J. Microbiol. Res.* – 2012. – V. 7.1 P. 2464-2474.
66. Bendinelli M. Molecular properties, biology, and clinical implications of TT virus, a recently identified widespread infectious agent of humans / M. Bendinelli, M. Pistello, F. Maggi [et al.] // *Clin. Microbiol. Rev.* – 2001. – V. 14. – P. 98-113.
67. Bhatt P. Prevalence of chicken infectious anaemia virus (CIAV) in commercial poultry flocks of Northern India: a serological survey / P. Bhatt, S.K. Shukla, M. Mahendran [et al.] // *Transboundary and Emerging Dis.* – 2011. – V. 58. N. 5. – P. 458-460.
68. Bhatt P. Amelioration of chicken infectious anaemia virus induced immunosuppression by immunomodulatory and haematonic supplementation in chicks / P. Bhatt, S.K. Shukla, M.Y. Wani [et al.] // *Vet. Arhiv, (In Press.)*.
69. Bisgaard M. An age related and breeder flock associated hemorrhagic disorder in Danish broilers / M. Bisgaard // *Nord. Vet. Med.* – 1983. – V. 35. – P. 397-407.
70. Bounous D.I. Immunosuppression and intracellular calcium signaling in splenocytes from chicks infected with chicken anaemia virus, CL-1 isolate / D.I. Bounous, M.A. Goodwin, R.L. Brooks [et al.] // *Avian Dis.* – 1995. – V. 3. - P. 135-140.
71. Box P.G. Impaired response to killed Newcastle disease vaccine in chicken possessing circulating antibody to chicken anaemia agent / P.G. Box, H.C. Holmes, A.C. Bushell [et al.] // *Avian Pathol.* – 1988. – V. 17. – P. 713-723.

72. Bretano L. Isolation and identification of chicken infectious anemia virus in Brazil / L. Bretano, N. Mores, I. Wents [et al.] // *Avian Dis.* – 1991. – V. 35. – P. 793-800.
73. Brewer J. The development of an enzyme linked immunosorbent assay to detect antibodies to chicken anaemia virus and its comparison with the indirect immunofluorescence antibody test. In: *Proceedings Int. Symp. On IBD&CIA* (Eds. Kaleta, E.F.), Pauschholzhausen, Germany, 21-24 June, 1994, pp. 408-412.
74. Brentano L. Detection of chicken anemia virus in the gonads and in the progeny of broiler breeder hens with high neutralizing antibody titers / L. Brentano, S. Lazzarin, S.S. Bassi [et al.] // *Vet. Microbiol.* – 2005. – V. 105. – P. 65-72.
75. Breitbart M. Move genus Gyrovirus from the family Circoviridae to the family Anelloviridae, ICTV Taxonomy History for Chicken anemia virus, London UK, 2015.
76. Bulow V.v. Effects of dual infection of chicken with adenovirus or reovirus and chicken anemia agent (CAA) / V.v. Bulow, R. Rudolph, B. Fucks // *J. Vet. Med. B.* – 1986. – V. 33. – P. 717-726.
77. Bulow V.v. Unsatisfactory and specificity of indirect immunofluorescence tests for the presence or absence of antibodies to chicken anaemia agent (CAA) in sera of SPF and broiler breeder chickens / V.v. Bulow // *J. Vet. Med. B.* – 1988. – V. 3. – P. 594-600.
78. Buscaglia C. Chicken infectious anemia in Argentina / C. Buscaglia, C.F. Crosetti, P. Nervi // *Proc. 42<sup>nd</sup> Western Poultry Dis. Conf.* – Sacramento, Calif., 1993. – P. 68-70.
79. Buscaglia C. Identification of chicken infectious anemia, isolation of the virus and reproduction of the disease in Argentina / C. Buscaglia, C.F. Crosetti, P. Nervi // *Avian Pathol.* – 1994. – V. 23. – P. 297-304.
80. Calnek B.W. Relationship between the immunosuppressive potential and the pathotype of Marek's disease virus isolated / B.W. Calnek, R.W. Harris, C. Buscaglia [et al.] // *Avian Dis.* – 1998. – V. 42. – P. 124-132.

81. Calnek B.W. Comparativ susceptibility of Marek's disease cell lines to chicken infectious anemia virus / B.W. Calnek, B. Lucio, C. Cardona [et al.] // *Avian Dis.* – 2000. – V. 44. – P. 114-124.
82. Calcagni E. Stress system activity, innate and T. helper cytokines and susceptibility to immune-related disease / E. Calcagni, I. Elenkov // *Annals of the New York Academy of Science.* – 2006. – V. 1069. – P. 62-76.
83. Canal C.W. Prevalence of antibodies against chicken anemia virus (CAV) in breeders in Southem Brazil / C.W. Canal, D.J. Feffeira, M. Macagnan [et al.] // *Resqui. Vet. Bras.* – 2004. – V. 24. – P. 89-92.
84. Cardona C.J. Distribution of chicken infectious anemia virus in the reproductive tissues of specific pathogen-free chickens / C.J. Cardona, W.S. Oswald, K.A. Schat // *J. Gen. Virol.* – 2000. – V. 81. – P. 2067-2075.
85. Cardona C.J. Humoral immune responses to chicken infectious anemia virus in three strains of chicken in a closed flock / C.J. Cardona, B. Lucio, P. O'Connell [et al.] // *Avian Dis.* – 2000. – V. 44. – P. 661-667.
86. Caterina K.T. Development of a multiplex PCR for detection of avian adenovirus, avian reovirus, infection bursal disease virus, and chichken anemia virus / K.T. Caterina, S.Jr. Frasca, T. Girshick [et al.] // *Mol. Cell Probl.* – 2004. – V. 18, N. 5. – P. 293-298.
87. Chandratilleke D. Characterization of proteins of chicken infectious anemia virus with monoclonas antibodies / D. Chandratilleke, P. O'Connell, K.A. Schat // *Avian Dis.* – 1991. – V. 35. P. 854-862.
88. Chettle N.J. An outbreak of disease due to chicken anemia agent in broiler chickens in England / N.J. Chettle, R.K. Eddy, P.J. Wyeth [et al.] // *Vet. Rec.* – 1989. – V. 124. – P. 211-215.
89. Cloud S.S. Immune dysfunction following infection with chicken anemia agent and infectious bursal disease virus / S.S. Cloud, H.S. Lillehoj, J.K. Rosenberger // *Vet. Immunol. Immunopathol.* – 1992. – V. 34, N. 3/4. – P. 337-352.

90. Collisson E.W. Cytotoxic T lymphocytes are critical in the control of infectious bronchitis virus in poultry / E.W. Collisson, J. Pei, J. Dzielawa, S.H. Seo // *Developmental and Comparative Immunol.* – 2000. – V. 24. – P. 187-200.
91. Connor T.J. Biological characterization of Australian isolates of chicken anaemia agent / T.J. Connor, F. McNeilly, G.A. Firth [et al.] // *Aust. Vet. J.* – 1991. – V. 68. – P. 199-201.
92. Craig M.I. Molecular characterization of chicken infectious anemia virus circulating in Argentina during 2007 / M.I. Craig, A. Rimondi, M. Delamer [et al.] // *Avian Dis.* – 2009. – V. 53, N. 3. – P. 331-335.
93. Davidson I. The contribution of feathers in the spread of chicken anemia virus / I. Davidson, N. Artzi, I. Shkoda [et al.] // *Virus Research.* – 2008. – V. 132. – P. 152-159.
94. Davidson I. The consequence of a single nucleotide substitution on the molecular diagnosis of the chicken anemia virus / I. Davidson, I. Raibshtein, A. Al Tori, K. Elrom // *Israel J. Vet. Med.* – 2015. – V. 70, N. 2. – P. 30-32.
95. De Boer G.F. Biological aspect of Marek's disease virus infection as related to dual infections with chicken anemia virus / G.F. De Boer, S.H.M. Jeurissen, M.H.M. Noteborn [et al.] // *Proc. Of the 4<sup>th</sup> Int. Symp. on Marek's Disease, Amsterdam, Netherlands, 1992.* – V. 1. – P. 262-271.
96. De Boer G.F. Interaction between chicken anaemia virus and live Newcastle disease vaccine / G.F. De Boer, D.J. Van Roozelaar, R.J. Moormann [et al.] // *Avian Pathol.* – 1994. – V. 23. – P. 263-275.
97. Degen W.G. Identification and molecular cloning of functional chicken IL-12 / W.G. Degen, N. van Daal, H.I. van Zuilekom [et al.] // *J. Immunol.* – 2004. – V. 172. – P. 4371-4380.
98. De Herdt P. Epidemiology and significance of chicken infectious anemia virus infections in broilers and broiler parents under nonvaccinated European circumstances / P. De Herdt, G. Van den Bosch, R. Ducatelle [et al.] // *Aviav Dis.* – 2001. – V. 45, N. 3. – P. 706-708.

99. Dhama K. Standardization and application of polymerase chain reaction and indirect immunofluorescent technique for detection of chicken infectious anaemia virus / K. Dhama, J.M. Kataria, N. Senthilkumar [et al.] // In. J. Comp. Microbiol. Immunol. Infect. Dis. – 2002. – V. 23. – P. 11-22.
100. Dhama K. Pathogenicity and immunosuppressive effects of chicken infectious anaemia virus (CIAV) in chicks and evaluation of diagnostic tests for its detection. PhD. Thesis, Deemed University, Indian Veterinary Research Institute (IVRI), Izatnagar, (U.P), India, 2002.
101. Dhama K. Chicken infectious anaemia (CIA): a review / K. Dhama, J.M. Kataria, B.B. Dash [et al.] // Ind. J. Comp. Microbiol. Immunol. Infect. Dis. – 2002. – V. 23. – P. 1-15.
102. Dhama K. Immunosuppressive effects of the Indian isolate of chicken anemia virus (CAV) in specific-pathogen-free chicks / K. Dhama, J.M. Kataria, N.S. Kumar [et al.] // Indian J. Poult. Sci. – 2003. – V. 38. – P. 185-194.
103. Dhama K. Chicken infectious anaemia virus: an immunosuppressive pathogen of poultry / K. Dhama, M. Mahendran, R. Somvanshi [et al.] // Indian J. Vet. Poult. – 2008. – V. 32. – P. 158-167.
104. Dmitrieva M. Immunosuppressive effect of the virus CAV to post-vaccination immune response / M. Dmitrieva, E. Djavadov, E. Balendor // Proc. Int. Congress WPSA «The Potential for Poultry Production in Developing Countries», Belek-Antalya, Turkey, 2015. - P. 154-156.
105. Dos Santos H.F. Variants of the recently discovered avian gyrovirus 2 are detected in Southern Brazil and the Netherlands / H.F. dos Santos, M.B. Knak, F.L. de Castro [et al.] // Vet. Microbiol. – 2012. – V. 155. – P. 230-236.
106. Dren C.N. A hot start PCR for the laboratory diagnosis of CAV / C.N. Dren, G. Koch, A. Kant [et al.] // In: Materials of International Symposium for Infectious Bursal Disease and Chicken Infectious Anemia (Rauischholzhausen, Germany; June, 1994). – Giessen, 1994. – P. 413-420.

107. Drouin P. La maladie des ailes bleues chez le poulet-premieres observations en France / P. Drouin, J.P. Picault, G. Plassia [et al.] // *Rec. Med. Vet.* – 1992. – V. 168. – P. 331-339.
108. Ducatez M.F. Molecular epidemiology of chicken anemia virus in Nigeria / M.F. Ducatez, A.A. Owoade, J.O. Abiolaand [et al.] // *Arch. Virol.* – 2006. – V. 151. – P. 97-111.
109. Ducatez M.F. Molecular epidemiology of chicken anemia virus (CAV) in South Eastern Chinese live bird markets / M.F. Ducatez, H. Chen, Y. Guan [et al.] // *Avian Dis.* – 2008. – V. 52. – P. 68-73.
110. Eltahir Y.M. Molecular epidemiology of chicken anemia virus in commercial farms in China / Y.M. Eltahir, K. Qian, W. Jin [et al.] // *Virol. J.* – 2011. – V. 8. – article 145.
111. Engstrom B.E. Blue wing disease of chickens: sings, pathology and natural transmission / B.E. Engstrom, M. Luthman // *Avian Pathol.* – 1984. – V. 13. – P. 1-12.
112. Engstrom B.E. Blue wing disease of chickens: experimental infection with a Swedish isolate of chicken anaemia agent and an reovirus / B.E. Engstrom, O. Fossum, M. Luthman // *Avian Pathol.* – 1988. – V. 17, N. 1. – P. 33-50.
113. Fadly A.M. Isolation and some characteristics of an agent associated with inclusion body hepatitis, hemorrhages, and aplastic anemia in chickens / A.M. Fadly, R.W. Winterfield // *Avian Dis.* – 1973. – V. 17. – P. 182-193.
114. Fang L. Genetic analysis of two chicken infectious anemia virus variants-related Gyrovirus in stray mice and dogs: the first report in China, 2015 / L. Fang, Y. Li, Y. Wang [et al.] // *BioMed. Res. Int.* – 2017. – ID6707868. – P. 1-9. – <https://doi.org/10.1155/2017/6707868>
115. Farkas T. Isolation of chicken anaemia virus from broiler chickens / T. Farkas, Cs. Dren, I. Nemeth [et al.] // *Acta Vet. Hung.* – 1992. – V. 40. – P. 207-223.
116. Fenner's Veterinary Virology, 5<sup>th</sup> ed. Eds. N.J. Maclachian, E.J. Dubovi. Elsevier Science&Technology Books. – 2017. – 602 p.

117. Firth G.A. Isolation of chicken anemia agent from Australian poultry / G.A. Firth, K. Imai // *Aust. Vet. J.* – 1990. – V. 67. – P. 301-302.
118. Gallardo R.A. Host intraspatial selection of infectious bronchitis virus populations / R.A. Gallardo, V.L. van Santen, H. Toro // *Avian Dis.* – 2010. – V. 54. – P. 807-813.
119. Gallardo R.A. Effects of chicken anaemia virus and infectious bursal disease virus – induced immunodeficiency on infectious bronchitis virus replication and genotypic drift / R.A. Gallardo, V.L. van Santen, H. Toro // *Avian Pathol.* – 2012. – V. 41, N. 5. – P. 451-458.
120. Ganar K. Molecular characterization of chicken anemia virus outbreaks in Nagpur province India from 2012 to 2015 / K. Ganar, M. Shah, B.P. Kamdi [et al.] // *Microbial Pathogenesis.* – 2017. – V. 102. – P. 113-119.
121. Gelderblum H. Morphological characterization of chicken anaemia agent (CAA) / H. Gelderblum, S. Kling, R. Lurs [et al.] // *Arch. Virol.* – 1989. – V. 109. – P. 115-120.
122. Gholami-Anangaran M. Molecular detection of chicken anaemia virus (CAV) in house sparrow (*Passer domesticus*) in Iran / M. Gholami-Anangaran, N. Zia-Janromi, E. Rahimi // *Revue Med. Vet.* – 2013. – V. 164, N. 11. – P. 487-490.
123. Gimeno I.M. Neuropathotyping: a new system to classify Marek's disease virus / I.M. Gimeno, R.L. Witter, U. Neumann // *Avian Dis.* – 2002. – V. 46. – P. 909-918.
124. Goodwin M.A. Infectious anemia caused by a parvovirus – like virus in Georgia broilers / M.A. Goodwin, J. Brown, S.L. Miller [et al.] // *Avian Dis.* – 1989. – V. 33. – P. 438-445.
125. Goodwin M.A. Isolation and identification of a parvovirus – like virus (the so-called chicken anemia agent [CAA]) that causes infectious anemia in chick / M.A. Goodwin, R.C. Wellenstein, J. Brown [et al.] // *Proc. 38<sup>th</sup> Western Poultry Dis. Conf.* – Tempe, Ariz., 1989. – P. 21-25.

126. Goodwin M.A. A survey for parvovirus-like virus (so-called chick anemia agent) antibodies in broiler breeders / M.A. Goodwin, J. Brown, M.A. Smeltzer [et al.] // *Avian Dis.* – 1990. – V. 34. – P. 704-708.
127. Goodwin M.A. Inability of so-called chicken anemia agent (CAA) infectious to be diagnosed by anemia and hematopoietic organ atrophy alone / M.A. Goodwin, J. Brown // *Avian Dis.* – 1992. – V. 36, N. 2. – P. 353-355.
128. Goodwin M.A. Effect of so-called chicken anemia agent maternal antibody on chick serologic conversion to viruses in the field / M.A. Goodwin, M.A. Smeltzer, J. Brown [et al.] // *Avian Dis.* – 1993. – V. 37. - N 2. – P. 542-545.
129. Goryo M. Isolation of an agent inducing chicken anemia / M. Goryo, H. Sugimura, S. Matsumoto [et al.] // *Avian Pathol.* – 1985. - V. 14. – P. 483-496.
130. Goryo M. Outbreak of anemia associated with chicken anemia agent in young chicks / M. Goryo, Y. Shibata, T. Suwa [et al.] // *Jpn. J. Vet. Sci.* – 1987. – V. 49. – P. 867-873.
131. Goryo M. Serial propagation and purification of chicken anaemia agent in MDCC-MSB-1 cell line / M. Goryo, T. Suwa, S. Matsumoto [et. al.] // *Avian. Pathol.* – 1987. – V. 16. – P. 149-163.
132. Goryo M. Histopathology of chicks inoculated with chicken anaemia agent (MSB1-TK5803 strain) / M. Goryo, S. Hayashi, K. Yoshizawa [et al.] // *Avian Pathol.* – 1989. – V. 18. – P. 73-89.
133. Goudar M.S. Chicken infectious anaemia – a new threat to poultry? / M.S. Goudar, C.S. Arun // *Poultry Adviser.* – 1992. – V. 15, N. 12. – P. 21-24.
134. Gowthaman V. Adenovirus (FAdV) in India: evidence for emerging role as primary respiratory pathogen in chickens / V. Gowthaman, S.D. Singh, K. Dhama [et al.] // *Pakistan J. Biol. Sci.* – 2013. – V. 15. – P. 900-903.
135. Ha S. Engineering N-glycosylation mutations in IL-12 enhances sustained cytotoxic T lymphocyte responses for DNA immunization / S. Ha, J. Chang, M. Song [et al.] // *Nat. Biotech.* – 2002. – V. 20. – P. 381-386.

136. Hailemariam Z. Detection and characterization of chicken anemia virus from commercial broiler breeder chickens / Z. Hailemariam, A.R. Omar, M. Hair-Bejo [et al.] // *Viol. J.* – 2008. – V. 5. – P. 128-139. Doi: 10.1186/1743-422X-5-128.
137. Haridy M. Pathological and immunohistochemical study of chickens with co-infection of Marek's disease virus and chicken anemia virus / M. Haridy, M. Goryo, J. Sasaki [et al.] // *Avian Pathol.* – 2009. – V. 38. – P. 469-483.
138. Hernandez-Divers S.M. A survey of selected avian pathogens of backyard poultry in northwestern Ecuador / S.M. Hernandez-Divers, P. Villegas, F. Prieto [et al.] // *J. of Avian Med. and Surgery.* – 2006. – V. 20. – P. 147-158.
139. He C.Q. Identification of chicken anemia virus putative intergenotype recombinants / C.Q. He, N.Z. Ding, W. Fan [et al.] // *Virology.* – 2007. – V. 366. – P. 1-7.
140. Hegazy A.M. Chicken infectious anemia virus (CIAV) in broilers and laying hens in Sharkia province, Egypt / A.M. Hegazy, F.M. Addallah, L.K. Abd-El [et al.] // *J. American Sci.* – 2010. – V. 6, N. 6. – P. 752-761.
141. Hegazy A.M. Incidence of chicken anemia virus in Sharkia governorate chicken flocks / A.M. Hegazy, F.M. Abdallah, K. Abd-el Samie [et al.] // *Assuit Vet. Med. J.* – 2004. – V. 60, N. 142. – P. 75-82.
142. Hino S. Torque Teno Virus (TTV): current status / S. Hino, H. Miyata // *Rev. Med. Virol.* – 2007. – V. 17. – P. 45-57.
143. Hoerr F.J. Clinical aspects of immunosuppression in poultry / F.J. Hoerr // *Avian Dis.* – 2010. – V. 54. – P. 2-15.
144. Hoop R.K. Persistence and vertical transmission of chicken anaemia agent in experimentally infected laying hens / R.K. Hoop // *Avian Pathol.* – 1992. – V. 21. – P. 493-501.
145. Hoop R.K. Transmission of chicken anaemia virus with semen / R.K. Hoop // *Vet. Rec.* – 1993. – V. 133. – P. 551-552.
146. Hornok S. Interaction of chicken anaemia virus and *Cryptosporidium baileyi* in experimentally infected chickens / S. Hornok, J.F. Heijmans, L. Bekesi [et al.] // *Vet. Parasitol.* – 1998. – V. 76. – P. 43-55.

147. [https://talk.ictvonline.org/taxonomy/p/taxonomy-history?taxnode\\_id=20172554](https://talk.ictvonline.org/taxonomy/p/taxonomy-history?taxnode_id=20172554)
148. Hu L.B. Depletion of CD4+ and CD8+ T lymphocyte subpopulations by embryonal bursectomy / L.B. Hu, B. Lucio, K.A. Schat // *Avian Dis.* – 1993. – V. 37. – P. 157-169.
149. Hung L. Adjuvant effects of chicken interleukin-18 in avian Newcastle disease vaccine / L. Huhg, H.-P. Li, Y.-Y. Lien [et al.] // *Vaccine.* – 2010. – V. 28. – P. 1148-1155.
150. Hussein H.A. Chicken infectious anemia virus in Egypt: Molecular diagnosis by PCR and isolation of the virus from infected flocks / H.A. Hussein, M.Z. Sabru, E.A. El-Ebiary [et al.] // *Ar. J. Biotech.* – 2002. – V. 5, N. 2. – P. 263-274.
151. Hussein H.A. Immunopathogenesis of attenuated strain of chicken infectious anemia virus in one-day-old specific-pathogen-free chicks / H.A. Hussein, M.M. Youssef, A. Osman [et al.] // *Egypt. J. Immunol.* – 2003. – V. 10, N. 1. – P. 89-102.
152. Imai K. Immunoelectron microscopy of chicken anemia agent / K. Imai, M. Maeda, N. Yuasa // *J. Vet. Med. Sci.* – 1991. – V. 53. – N. 6. – P. 1065-1067.
153. Imai K. Persistent infection with chicken anaemia virus and some effects of highly virulent infectious bursal disease virus infection on its persistency / K. Imai, M. Mase, K. Tsukamoto [et al.] // *Res. Vet. Sci.* – 1999. – V. 67. – P. 233-238.
154. Islam M.R. Sequence analysis of the full-length cloned DNA of a chicken anaemia virus (CAV) strain from Bangladesh: evidence for genetic grouping of CAV strains based on the deduced VP1 amino acid sequences / M.R. Islam, R. Johne, R. Raue [et al.] // *J. Vet. Med. B.* – 2002. – V. 49. – P. 332-337.
155. ICTVdB (2006).00.016.0.02.001. Chicken anemia virus. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/ICTVdB/>
156. Jeurissen S.H.M. Transient depletion of cortical thymocytes induced by chicken anaemia agent / S.H.M. Jeurissen, J.M.A. Pol, G.F. De Boer // *Thymus.* – 1989. – V. 14. – P. 115-123.

157. Jeurissen S.H. Susceptibility of thymocytes for infection by chicken anemia virus is related to pre- and posthatching development / S.H. Jeurissen, M.E. Janse, D.J. van Roozelaar [et al.] // *Dev. Immunol.* – 1992. – V. 2. – P. 123-129.
158. Jeurissen S.H.M. Chicken anemia virus causes apoptosis of thymocytes after in vivo infection and of cell lines after in vitro infection / S.H.M. Jeurissen, F. Wagenaar, J.M.A. Pol [et al.] // *J. Virol.* – 1992. – V. 66. – P. 7383-7388.
159. Jorgensen P.H. A microscale serum neutralization test for the detection and titration of antibodies to chicken anaemia agent – prevalence of antibodies in Danish chickens / P.H. Jorgensen // *Avian Pathol.* – 1990. – V. 19. – P. 583-593.
160. Jorgensen P.H. Investigations on the epidemiology and economical impact of chicken anaemia virus infection in Danish broilers and broiler breeders / P.H. Jorgensen, L. Otte, O.L. Nielsen [et al.] // *Proc. Int. Symp. Infect. Bursal Dis. Chick Infect. Anaemia*, Rauschholzhausen, Germany, 1994. – P. 438-446.
161. Kaffashi A. Viral load in 1-day-old and 6-week-old chickens infected with chicken anaemia virus by the intraocular route / A. Kaffashi, A.J. Noormohammadi, M.L. Allott [et al.] // *Avian Pathol.* – 2006. – V. 35. – P. 471-474. DOI:10.1080/03079450601028837
162. Kaffashi A. Evaluation of chicken anaemia virus mutants as potential vaccine strains in 1-day-old chickens / A. Kaffashi, S. Shrestha, G.F. Browning // *Avian Pathol.* – 2008. – V. 37. – N 1. – P. 109-114. – DOI:10.1080/03079450701812965
163. Kaffashi A. Evidence of apoptosis induced by viral protein 2 of chicken anaemia virus / A. Kaffashi, C.N. Pagel, A.N. Noormohammadi [et al.] // *Arch. Virol.* – 2015. – V. 160. – P. 2557-2563.
164. Kataria J.M. Chicken infectious anaemia (CIA) in India: detection of the agent by polymerase chain reaction and transmission study / J.M. Kataria, R.P. Suresh, K.C. Verma [et al.] // *Indian J. Comp. Microbiol. Immunol. Infect. Dis.* – 1999. – V. 20. – P. 91-95.
165. Kato A. Gene organization of chicken anemia virus / A. Kato, M. Fujino, T. Nakamura [et al.] // *Virology.* – 1995. – V. 209. – P. 480-488.

166. Kim I.-J. Recovery of antibody-producing ability and lymphocyte repopulation of bursal follicles in chickens exposed to infectious bursal disease virus / I.-J. Kim, M. Gagic, J.M. Sharma // *Avian Dis.* – 1999. – V. 43. – P 401-413.
167. Kim H.R. Molecular characterization of chicken infectious anemia viruses detected from breeder and broiler chickens in South Korea / H.R. Kim, Y.K. Kwon, Y.C. Bae [et al.] // *Poult. Sci.* – 2010. – V. 89. – P. 2426-2431.
168. Koch G. Immunogenic and protective properties of chicken anaemia virus proteins expressed by baculovirus / G. Koch, D.J. van Roozelaar, C.A. Verschueren [et al.] // *Vaccine.* – 1995. – V. 13. – P. 763-770.
169. Kuscu B. Lesions in the thymus and bone marrow in chicks with experimentally induced chicken infectious anemia disease / B. Kuscu, A. Gurel // *J. Vet. Sci.* – 2008. – V. 9. – P. 15-23.
170. Kuyucuoglu Y. Detection of chicken infectious anemia virus antibody in layer operations by using ELISA in Afyon region / Y. Kuyucuoglu, H.H. Hadimli, B. Kenar [et al.] // *Vet. Hek. Microbiol. Derg.* – 2003. – V. 3. – P. 21-26.
171. Kye S.J. Phylogenetic analysis and genetic characterization of chicken anemia virus isolates from Cambodia / S.J. Kye, J.V. Kit, H.J. Seul [et al.] // *Poult. Sci.* – 2013. – V. 92. – P. 2681-2686.
172. Lamichhane C.M. Pathogenicity of CL-1 chicken anemia agent / C.M. Lamichhane, D.B. Snyder, M.A. Goodwin [et al.] // *Avian Dis.* – 1991. – V. 35. – P. 515-522.
173. Lacorte C. Assessing the expression of chicken anemia virus proteins in plants / C. Lacorte, H. Lohuis, R. Goldbach [et al.] // *Virus Res.* – 2007. – V. 129. – P. 80-86.
174. Lai G.H. Expression and characterization of highly antigenic domains of chicken anemia virus viral VP2 and VP3 subunit proteins in recombinant E.coli for sero-diagnostic applications / G.H. Lai, M.K. Lin, Y.Y. Lien [et al.] // *BMC Vet. Res.* – 2013. – V. 9. – P. 161.

175. Lauring A.S. The role of mutational robustness in RNA virus evolution / A.S. Lauring, J. Frydman, R. Andino // *Nat. Rev. Microbiol.* – 2013. – V. 11. – P. 327-336.
176. Lesourd B. Antibiotiques et immunité humorale. Une nouvelle approche expérimentale étudiant les interrelations entre antibiotiques et système immunitaire / B. Lesourd // *Immunol. Med.* – 1987. – V. 19. – P. 27-32.
177. Lee M.-S. Production of chicken anemia virus (CAV) VP1 and VP2 protein expressed by recombinant *Escherichia coli* / M.-S. Lee, Y.-Y. Lien, S.-H. Feng [et al.] // *Proc. Biochem.* – 2009. – V. 44. – P. 390-395.
178. Lee M.-S. High yield expression in a recombinant *E. coli* of a codon optimized chicken anemia virus capsid protein VP1 useful for vaccine development / M.-S. Lee, Y.-C. Hseu, G.-H. Lai [et al.] // *Microbiol. Cell Fact.* – 2011. – V. 10. – P. 56.
179. Lebdah M.A. The negative impact of chicken infectious anemia virus infection on immune responses to different Newcastle disease virus vaccination programs / M.A. Lebdah, M.M. Megahed, O.A.A. Hassanin [et al.] // *Zagazig Vet. J.* – 2016. – V. 44, N. 2. – P. 138-148.
180. Li X.X. Isolation and identification of the chicken anemia virus and serological survey in China / X.X. Li, W.Y. Xu, G.Y. Tang // *Proc. Int. Symp. Infect. Bursal Dis. Chik. Infect. Anaemia, Rauschholzhausen, Germany, 1994.* – P. 429-433.
181. Li Y. Genomic analysis of the chicken infectious anemia virus in a specific pathogen-free chicken population in China / Y. Li, Y. Wang, L. Fang [et al.] // *BioMed. Res. Int.* – 2016. – <http://dx.doi.org/10.1155/2016/4275718>
182. Li X. Porcine IL-12 plasmid as an adjuvant improve the cellular and humoral immune responses of DNA vaccine targeting transmission gastroenteritis virus spike gene in a mouse model / X. Li, P. Li, L. Cao [et al.] // *J. Vet. Sci.* – 2019. – V. 81. – P. 1438-1444.
183. Lucio B. Identification of the chicken anemia agent, reproduction of the disease, and serological survey in the United States / B. Lucio, K.A. Schat, H.L. Shivaprasad // *Avian Dis.* – 1990. – V. 34. – P. 146-153.

184. Lukert P.D. Infectious bursal disease virus / P.D. Lukert, Y.M. Saif // In: Disease of Poultry, 11<sup>th</sup> ed. Eds. Y.M. Saif, H.J. Barnes, J.R. Glisson, A.M. Fadly, L.R. McDougald and D.E. Swayne. Iowa State University Press, Ames, IA. – 2003. – pp.: 161-179.
185. Markowski-Grimsrud C.J. Development of strain-specific real-time PCR and PT-PCR assays for quantitation of chicken anemia virus / C.J. Markowski-Grimsrud, M.M. Miller, K.A. Schat // J. Virol. Methods. – 2002. – V. 101. – P. 135-147.
186. Markowski-Grimsrud C.J. Infection with chicken anaemia virus impairs the generation of pathogen-specific cytotoxic T lymphocytes / C.J. Markowski-Grimsrud, K.I. Schat. // Immunol. – 2003. – V. 109. – P. 283-294.
187. Mahzounieh M. Serologic evidence of chicken infectious anemia in commercial chicken flocks in Shahrekord, Iran / M. Mahzounieh, I. Karimi, T. Zahraei Salehi // Int. J. Poult. – 2005. – V. 4, N. 7. – P. 500-503.
188. McConnell C.D.C. Effects of chicken anemia virus on macrophage function in chickens / C.D.C. McConnell, B.M. Adair, M.S. McNulty // Avian Dis. – 1993. – V. 37, N. 2. – P. 358-365.
189. McConnell C.D.G. Effects of chicken anemia virus on cell-mediated immune function in chickens exposed to the virus by a natural route / C.D.G. McConnell, B.M. Adair, M.S. McNulty // Avian Dis. – 1993. – V. 37. – P. 366-374.
190. McKenna G.F. Immunopathologic investigations with an attenuated chicken anemia virus in day-old chickens / G.F. McKenna // Avian Dis. – 2003. – V. 47. – P. 1339-1345.
191. McKinley E.T. Attenuated live vaccine usage affects accurate measures of virus diversity and mutation rates in avian coronavirus infectious bronchitis virus / E.T. McKinley, M.W. Jackwood, D.A. Hilt [et al.] // Virus Res. – 2011. – V. 158. – P. 225-234.
192. McIlroy S.G. Economic effects of clinical chicken anemia agent infection on profitable broiler production / S.G. McIlroy, M.S. McNulty, D.W. Bruce [et al.] // Avian Dis. – 1992. – V. 36. – P. 566-574.

193. McNeilly F. Synergism between chicken anemia virus (CAV) and avian reovirus following dual infection of 1-day-old chicks by a natural route / F. McNeilly, J.A. Smyth, B.M. Adair [et al.] // *Avian Dis.* – 1995. – V. 39. – P. 532-537.
194. McNulty M.S. A serological survey of domestic poultry in the United Kingdom for antibody to chicken anaemia / M.S. McNulty, T.J. Connor, F. McNeilly [et al.] // *Avian. Pathol.* – 1988. – V. 17. – P. 315-324.
195. McNulty M.S. Chicken anemia agent in the United States: isolation of the virus and detection of antibody in broiler breeder flocks / M.S. McNulty, T.J. Connor, F. McNeilly [et al.] // *Avian Dis.* – 1989. – V. 33, N 4. – P. 691-694.
196. McNulty M.S. A survey of specific pathogen-free chicken flocks for antibodies to chicken anaemia agent, avian nephritis virus and group A rotavirus / M.S. McNulty, T.J. Connor, F. McNeilly // *Avian. Pathol.* – 1989. – V. 18. – P. 215-220.
197. McNulty M.S. Chicken anemia agent in the United States: Isolation of the virus and detection of antibody in broiler breeder flocks / M.S. McNulty, T.J. Connor, F. McNeilly [et al.] // *Avian Dis.* – 1989. – V. 33. – P. 691-694.
198. McNulty M.S. Chicken anemia agent: An electron microscopic study / M.S. McNulty, W.L. Curran, D. Todd [et al.] // *Avian Dis.* – 1990. – V. 34. – P. 736-743.
199. McNulty M.S. Preliminary characterization of isolates of chicken anemia agent from the United Kingdom / M.S. McNulty, T.J. Connor, F. McNeilly [et al.] // *Avian. Pathol.* – 1990. – V. 19. – P. 67-73.
200. McNulty M.S. Production and characterization of monoclonal antibodies to chicken anemia agent / M.S. McNulty, D.P. Mackie, D.A. Pollock [et al.] // *Avian Dis.* – 1990. – V. 34. – P. 352-358.
201. McNulty M.S. Chicken anaemia agent (CAA): a review / M.S. McNulty // *Avian Pathol.* – 1991. – V. 20. – P. 187-203.
202. McNulty M.S. Economic effects of subclinical chicken anemia agent infection in broiler chickens / M.S. McNulty, S.G. McSlroy, D.W. Bruce [et al.] // *Avian Dis.* – 1991. – V. 35. – N. 2. – P. 263-268.
203. McNulty M.S. Chicken anemia virus / M.S. McNulty, D. Todd // In: *A laboratory manual for the isolation and identification of avian pathogens.* 5<sup>th</sup> ed. Eds.

Zavala, L.D., D.E. Swayne, J.R. Glisson, J.E. Pearson, W.M. Reed, M.W. Jackwood and Woolcock. American Association of Avian Pathologist, Jackonville, FL. 2008, pp. 124-127.

204. McNamee P.T. Development of an experimental model of bacterial chondronecrosis with osteomyelitis in broilers following exposure to *Staphylococcus aureus* by aerosol and inoculation with chicken anemia and infectious bursal disease viruses / P.T. McNamee, J.J. McCullagh, J.D. Rodgers [et al.] // *Avian Pathol.* – 1999. – V. 28. – P. 26-35.

205. Medrano G. Efficient plant-based production of chicken interleukin-12 yields a strong immunostimulatory cytokine / G. Medrano, M.C. Dolan, N.T. Stephens [et al.] // *J. Interferon Cytokine Res.* – 2010. – V. 30. – P. 143-154.

206. Metzger D.W. IL-12 as an adjuvant for the enhancement of protective humoral immunity / D.W. Metzger // *Expert Rev. Vaccine.* – 2009. – V. 8. – P. 515-518.

207. Miles A.M. Coinfection of specific-pathogen-free chickens with Marek's disease virus (MDV) and chicken infectious anemia virus: Effect of MDV pathotype / A.M. Miles, S.M. Reddy, R.W. Morgan // *Avian Dis.* – 2001. – V. 45. – P. 9-18.

208. Miller M. Patterns of chicken infectious anemia virus (CIAV) seroconversion in three Cornell SPF flocks / M. Miller, W.B. Oswald, J. Scarlet [et al.] // *Proc. 2<sup>nd</sup> Int. Symp. Infect. Bursal Dis. Chick. Infect. Anemia*, Rauschholzhausen, Germany, 2001. – P. 410-417.

209. Miller M.M. Detection of chicken anemia virus DNA in embryonal tissues and eggshell membranes / M.M. Miller, A.E. Cati, W.B. Oswald [et al.] // *Avian Dis.* – 2003. – V. 47. – P. 662-671.

210. Miller M.M. Chicken infectious anaemia virus: an example of the ultimate host-parasite relationship / M.M. Miller, K.A. Schat // *Avian Dis.* – 2004. – V. 48. – P. 734-745.

211. Miyata H. Identification of a novel GC-rich 113-nucleotide region to complete the circular, single-stranded DNA genome of TT virus, the first human circovirus / H. Miyata, H. Tsunoda, A. Kazi [et al.] // *J. Virol.* – 1999. – V. 73. – P. 3582-3586.

212. Moeini H. Development of a DNA vaccine against chicken anemia virus by using a bicistronic vector expressing VP1 and VP2 proteins of CAV / H. Moeini, A.R. Omar, R.A. Rahim [et al.] // *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* – 2011. – V. 34., N. 3. – P. 227-236.
213. Moeni H. Improving the potency of DNA vaccine against chicken anemia virus (CAV) by fusing VP1 protein of CAV to Marek's disease virus (MDV) type 1 VP 22 protein / H. Money, A.R. Omar, R.A. Rahim [et al.] // *Virology*. – 2011. – V. 8. – P. 119.
214. Mohamed M.A. Chicken infectious anemia status in commercial broiler chickens flocks in Assiut-upper Egypt: occurrence, molecular analysis using PCR-RELP and apoptosis effect on affected tissues / M.A. Mohamed // *Int. J. Poult. Sci.* – 2010. – V. 9, N. 6. – P. 591-598.
215. Mohammed A. Molecular characterization of chicken anemia virus circulating in chicken flocks in Egypt / A. Mohammed, A.G. Abd El-Razak, Y. Metwally [et al.] // *Advances in Virology*. – 2014. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/797151>
216. Mushahwar I.K. Molecular and biophysical characterization of TT virus: evidence for a new virus family infecting humans / I.K. Mushahwar, J.C. Erker, A.S. Muerhoff [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* – 1999. – V. 96. – P. 3177-3182.
217. Natesan S. Biological and molecular characterization of chicken anaemia virus isolates of Indian origin / S. Natesan, J.M. Kataria, K. Dhama [et al.] // *Virus Res.* – 2006. – V. 118. – N. 1-2. – P. 78-86.
218. Nayabian H. Molecular characterization of the chicken anaemia viruses isolated from broiler farms of west Azerbaijan, Iran / H. Nayabian, K. Mardani // *Avian Pathol.* – 2013. – V. 42, N. 2. – P. 108-113.
219. Nicholas R.A.J. Survey of vaccines and SPF flocks for contamination with chick anaemia agent / R.A.J. Nicholas, B. Westbury, R.D. Goddard [et al.] // *Vet. Rec.* – 1989. – V. 124. – P. 170-171.
220. Noad R. Virus-like particles as immunogens / R. Noad, H.L. Roy // *Trends Microbiol.* – 2003. – V. 11. – P. 438-444.

221. Noteborn M.H.M. Characterization of cloned chicken anemia virus DNA that contains all elements for the infectious replication cycle / M.H.M. Noteborn, G.F. de Boer, D.J. van Roozelaar [et al.] // *J. Virol.* – V. 65. – N. 6. – P. 3131-3139.
222. Noteborn M.H.M. Identification of the promoter region of chicken anemia virus (CAV) containing a novel enhancer – like element / M.H.M. Noteborn, C.A.J. Verschueren, A. Zantema // *Gene.* – 1994. – V. 150, N. 2. – P. 313-318.
223. Noteborn M.H.M. A single chicken anemia virus protein induces apoptosis / M.H.M. Noteborn, D. Todd, C.A.J. Verschueren [et al.] // *J. Virol.* – 1994. – V. 68. – P. 346-351.
224. Noteborn M.H.M. Chicken anemia virus infection: molecular basis of pathogenicity / M.H.M. Noteborn, G. Koch // *Avian Pathol.* – 1995. – V. 24, N. 1. – P. 11-31.
225. Noteborn M.H.M. Simultaneous expression of recombinant baculovirus-encoded chicken anaemia virus (CAV) proteins VP1 and VP2 is required for formation of the CAV-specific neutralizing epitope / M.H.M. Noteborn, C.A.J. Verschueren, G. Koch [et al.] // *J. Gen. Virol.* – 1998. – V. 79, N. 12. – P. 3073-3077.
226. Noteborn M.N. Chicken anemia virus induced apoptosis: underlying molecular mechanisms / M.N. Noteborn // *Vet. Microbiol.* – 2004. – V. 98. – P. 89-94.
227. Oluwayelu D.O. Isolation and preliminary characterization of chicken anemia virus from chickens in Nigeria / D.O. Oluwayelu, D. Todd, N.W. Ball [et al.] // *Avian Dis.* – 2005. – V. 49. – P. 446-450.
228. Oluwayelu D.O. Sequence and phylogenetic analysis of chicken anemia virus obtained from backyard and commercial chickens in Nigeria / D.O. Oluwayelu, D. Todd, O.D. Olaleye // *Onderstepoort. J. Vet. Res.* – 2008. – V. 75. – P. 353-357.
229. Oluwayelu D.O. A monoclonal blocking ELISA to detect chicken anaemia virus antibodies in Nigerian poultry / D.O. Oluwayelu, D. Todd, G. Ohore [et al.] // *Bull. Anim. Health Prod. Afr.* – 2009. – V. 57. – P. 131-141.
230. Oluwaelu D. Diagnosis and epidemiology of chicken infectious anemia in Africa / D. Oluwaelu // *African J. Biotechnol.* – 2010. – V. 9. – P. 2043-2049.

231. Otaki Y. Isolation of chicken anemia agent and Marek's disease virus from chickens vaccinated with turkey herpesvirus and lesions induced in chickens by inoculating both agents / Y. Otaki, T. Nunoya, M. Tajima // *Avian Pathol.* – 1987. – V. 16. – P. 291-306.
232. Otaki Y. Depression of vaccinal immunity to Marek's disease by infection with chicken anaemia agent / Y. Otaki, T. Nunoya, M. Tajima [et al.] // *Avian Pathol.* – 1988. – V. 13. – P. 333-347.
233. Otaki Y. Immune response of chicks inoculated with chicken anaemia agent alone or in combination with Marek's disease virus or turkey herpesvirus / Y. Otaki, M. Tajima, K. Saito [et al.] // *Jpn. J. Vet. Sci.* – 1988. – V. 50, N. 10. – P. 10-17.
234. Owoade A.A. Serologic evidence of chicken infectious anemia in commercial chicken flocks in southwest Nigeria / A.A. Owoade, D.O. Oluwayelu, O.A. Fagbohun [et al.] // *Avian Dis.* – 2004. – V. 48, N. 1. – P. 202-205.
235. Owoade A.A. Report of mixed infection of infectious bursal disease and chicken infectious anemia viruses / A.A. Owoade, S.H. Iyiola, O.O. Oni // *J. Nat. Sci., Engineering and Technology.* – 2010. – V. 9, N. 1. – P. 1-5.
236. Pages-Monte A. Experimental evaluation of an inactivated vaccine against chicken anaemia virus / A. Pages-Monte, N. Saubi, C. Artigas [et al.] // *Avian Pathol.* – 1997. – V. 26. – P. 721-729.
237. Peters M.A. Chicken anemia virus VP2 is a novel dual specificity protein phosphatase / M.A. Peters, D.C. Jackson, B.S. Crabb [et al.] // *J. Biol. Chemistry.* – 2002. – V. 277, N. 42. – P. 39566-39573.
238. Peters M.A. Mutation of chicken anemia virus VP2 differentially affects serine/threonine and tyrosin protein phosphatase activities / M.A. Peters, D.C. Jackson, B.S. Crabb [et al.] // *J. Gen. Virol.* – 2005. – V. 86. – P. 623-630.
239. Peters M.A. Site-directed mutagenesis of the VP2 gene of chicken anemia virus affects virus replication cytopathology and host-cell MHC class I expression / M.A. Peters, B.S. Crabb, E.A. Washington [et al.] // *J. Gen. Virol.* – 2006. – V. 87. – P. 823-831.

240. Peters M.A. Attenuation of chicken anemia virus by site-directed mutagenesis of VP2 / M.A. Peters, B.S. Crabb, K.A. Tivendale [et al.] // *J. Gen. Virol.* – 2007. – V. 88. – P. 2168-2175.
241. Phenix K.V. Transcriptional analysis and genome expression of chicken anaemia virus / K.V. Phenix, B.M. Meehan, D. Todd [et al.] // *J. Gen. Virol.* – 1994. – V. 75. – P. 905-909.
242. Picault J.-P. Reproduction experimentale de l'anemie infectieuse ariaire et mice en evidence du virus en France a partir de prelevements de poulets presentant la «maladie des ailes bleues» / J.-P. Picault, D. Toquin, G. Plassiart [et al.] // *Rec. Med. Vet.* – 1992.- V. 168. – P. 815-822.
243. Pope C.R. Chicken anemia agent / C.R. Pope // *Vet. Immunol. – Immunopathol.* – 1991. – V. 30. – P. 51-65.
244. Prasetyo A.A. Replication of chicken anemia virus (CAV) requires apoptin and is complemented by VP3 of human torque teno virus (TTV) / A.A. Prasetyo, T. Kamahora, A. Kuroishi [et al.] // *Virol.* – 2009. – V. 385. – P. 85-92.
245. Pringl C.R. Virus taxonomy at the XI<sup>th</sup> international congress of virology, Sydney, Australia, 1999 / C.R. Pringl // *Arch. Virol.* – 1999. – V. 144. – P. 2065-2070.
246. Randall C.J. Multiple infections in young broilers / C.J. Randall, W.G. Siller, A.S. Wallis [et al.] // *Vet. Rec.* – 1984. – V. 114. – P. 270-271.
247. Ramadan G. Biochemical and hematological characterization of chicken anemia virus (CAV) / G. Ramadan, H. El-Hussini, A. Bekhit // *Assuit. Vet. Med. J.* – 1998. – V. 38, N. 76. – P. 209-222.
248. Rautenschlein S. Immunosuppressive viral disease in poultry / S. Rautenschlein // *European Poultry Conference, Bremen, September, 6-10, 2002.*
249. Rengajan J. Transcriptional regulation of Th1/Th2 polarization / J. Rengarajan, S.J. Szabo, L.H. Glimcher // *Immunol. Today.* – 2000. – V. 21. – P. 479.
250. Renshaw R.W. A hyper variable region in VP1 of chicken infectious anemia virus mediates rate of spread and cell tropism in tissue culture / R.W. Renshaw, C. Soine, T. Weinkle [et al.] // *J. Virol.* – 1996. – V. 70. – P. 8872-8878.

251. Rodenberg J. Flow cytometric analysis of B cell and T cell subpopulations in specific-pathogen-free chickens infected with infectious bursal disease virus / J. Rodenberg, J.M. Sharma, S.W. Belzer [et al.] // *Avian Dis.* – 1994. – V. 38. – P. 16-21.
252. Rodgers J. The anti-nuclease humoral immune response of broiler chickens exposed to *Staphylococcus aureus*, infectious bursal disease virus and chicken anaemia virus in an experimental model for bacterial chondronecrosis and osteomyelitis / J. Rodgers // *Avian Pathol.* – 2006. – V. 35, N. 4. – P. 302-308.
253. Rosario K. Revisiting the taxonomy of the family Circoviridae: establishment of the genus Cyclovirus and removal of the genus Gyrovirus / K. Rosario, M. Breitbart, B. Harrach [et al.] // *Arch. Virol.* – 2017. – V. 162. – P. 1447-1463.
254. Rosenberger J.K. The isolation and characterization of chicken anemia agent (CAA) from broilers in the United States / J.K. Rosenberger, S.S. Cloud // *Avian Dis.* – 1989. – V. 33. – P. 707-713.
255. Roussan D.A. Serological survey on the prevalence of chicken infectious anemia virus in commercial broiler chicken flocks in Northern Jordan / D.A. Roussan // *Int. J. Poult. Sci.* – 2006. – V. 5. – P. 544-546.
256. Saini N.S. Diagnosis and molecular characterization of chicken anaemia virus / N.S. Saini, A. Dandapat // *Vet. World.* – 2009. – V. 2, N. 4. – P. 156-160.
257. Salem M. Gangrenous dermatitis, «Blue Wing» in Delmarva broilers / M. Salem, C. Pope, J. Rosenberger [et al.] // *Proc. Western Poult. Dis. Conf.* – Davis, Calif., 1992. – P. 6-7.
258. Sandhya N. Chicken anemia virus an economically important poultry virus / N. Sandhya, D.V.R. SaiGopal // *Int. J. Rec. Sci. Res.* – 2019. – V. 10. – P. 32065-32070.
259. Sawant P.M. Development of a DNA vaccine for chicken infectious anemia and its immunogenicity group box 1 protein as a novel immunoadjuvant indicated induction of promising protective immune responses / P.M. Sawant, K. Dhama, D.B. Rawool [et al.] // *Vaccine.* – 2015. – V. 33. – P. 333-340.

260. Schrier C.C. Chick anemia vaccine agent. United States Patent N 5.728.569[45], Mar.17.1998. <http://www.patents.com/us-5728569.html>
261. Schat K.A. Immune responses to Marek's disease virus infection / K.A. Schat, C.J. Markowski-Grimsrud // *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* - 2001. – V. 255. – P. 91-120.
262. Schat K.A. Marek's disease immunosuppression. In *Marek's Disease: An Evolving Problem* (eds. F. Davison and V. Nair) / Elsevier Academic Press, London. – 2004. - pp. 142-155.
263. Schat K.A. Chicken anemia virus / K.A. Schat // *Contemp. Top. Microbiol. Immunol.* – 2009. – V. 331. – P. 151-184.
264. Schat K.A. Chicken anemia virus. In: *TT viruses. The still elusive human pathogens*. Eds. E.-M. de Villiers, H. zur Hausen. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2009, pp. 151-184. ISBN 978-3-540-70971-8. DOI: 10.1007/978-3-540-70972-5.
265. Schat K.A. Immune complex vaccines for chicken infectious anemia virus / K.A. Schat, N.R. Martins, P.H. O'Connell [et al.] // *Avian Dis.* – 2011. – V. 55. – N. 1. – P. 90-96.
266. Schat K.A. Chicken infectious anemia / K.A. Schat, V.L. van Santen // In *Diseases of Poultry*, 13<sup>th</sup> ed. (eds. D.E. Swayne, J.R. Glisson, L.R. McDougald, L.K. Nolan, D.L. Suarez, V. Nair). John Willey&Sons, Inc.: Hoboken, NJ, USA, 2013, pp. 248-264.
267. Schat K.A. Avian immunosuppressive diseases and immune evasion / K.A. Schat, M.A. Skinner // In: *Avian Immunology*, 2<sup>th</sup> ed. Eds. K.A. Schat, B. Kaspers, P. Kaiser. Academic Press Copyright, 2013, pp. 275-297. – ISBN: 978-0-12-396965-1.
268. Shao H. Rapid PCR approach for detecting the contamination of chicken anemia virus in avian live vaccine / H. Shao, P. Wang, M. Wu [et al.] // *China Poult.* – 2012. – V. 21. – article 10.
269. Sharma J.M. Infectious bursal disease virus of chickens: pathogenesis and immunosuppression / J.M. Sharma, I.J. Kim, S. Rautenschlein [et al.] // *Dev. Comp. Immunol.* – 2000. – V. 24. – P. 223-235.

270. Simionatto S. Characterization and phylogenetic analysis of Brazilian chicken anaemia virus / S. Simionatto, C.A. Lima-Rosa, E. Binneck [et al.] // *Virus Genes*. – 2006. – V. 33. – P. 5-10.
271. Simeonov K.B. Serological survey on the prevalence of chicken anemia virus in backyard poultry flocks in Bulgaria / K.V. Simeonov, G.V. Goujgoulova, N.D. Oreshkova // *Bulg. J. Vet. Med.* – 2009. – V. 12, N 4. – P. 254-259.
272. Smyth J.A. A sequential histopathologic and immunocytochemical study of chicken anemia virus infection at one day of age / J.A. Smyth, D.A. Moffett, M.S. McNulty [et al.] // *Avian. Dis.* – 1993. – V. 37. – P. 324-338.
273. Smyth J.A. Chicken anaemia virus inoculated by the oral route causes lymphocyte depletion in the thymus in 3-week-old and 6-week-old chickens / J.A. Smyth, D.A. Moffett, T.J. Connor [et al.] // *Avian. Pathol.* – 2006. – V. 35. - N. 3. – P. 254-259.
274. Smyth J.A. Virus-induced immunosuppression: Chicken infectious anemia / J.A. Smyth, K.A. Schat // In: *Immunosuppressive disease of poultry*. Eds. Gimeno, I.M. Grupo Asis Biomedica, Zazagoza, 2013, pp. 91-114.
275. Snoech C.J. Epidemiology of chicken anemia virus in Central African Republic and Cameroon / C.J. Snoech, G.F. Komoyo, B.R. Mbee [et al.] // *Virol. J.* – 2012. – V. 9. – P. 189. – doi:10.1186/1743-422X-9-189.
276. Spackman E. Comparison of a putative second serotype of chicken infectious anemia virus with a prototypical isolate I. Pathogenesis / E. Spackman, S.S. Cloud, C.R. Pope [et al.] // *Avian Dis.* – 2002. – V. 46. – P. 945-955.
277. Spackman E. Comparison of a putative second serotype of chicken infectious anemia virus with a prototypical isolate II. Antigenic and physiochemical characteristics / E. Spackman, S.S. Cloud, J.K. Rosenberger // *Avian Dis.* – 2002. – V. 46. – P. 956-963.
278. Stanislawek W.L. Isolation of chicken anaemia virus from broiler chickens in New Zealand / W.L. Stanislawek, J. Howell // *N. Z. Vet. J.* – 1994. – V. 42. – P. 58-62.

279. Su B.S. Production of biologically active chicken interleukin (IL)-12 and IL-18 synthesized by the recombinant fowlpox virus / B.S. Su, H.S. Yin, J.H. Shein [et al.] // *Process Biochem.* – 2010. – V. 45. – P. 1057-1064.
280. Su B.S. Adjuvant active of chicken interleukin-12 co-administrated with infectious bursal disease virus recombinant VP2 antigen in chickens / B.S. Su, H.H. Chiu, C.C. Lin [et al.] // *Vet. Immunol. Immunopathol.* – 2011. – V. 139. – P. 167-175.
281. Taniguchi T. Hematopathological changes in dead and moribund chicks induced by chicken anemia agent / T. Taniguchi, N. Yuasa, M. Moeda [et al.] // *Nati. Inst. Anim. Health Q. (Jpn.)*. – 1982. – V. 22. – P. 61-69.
282. Taniguchi T. Chronological observation on hemato-pathological changes in chicks inoculated with chicken anemia agent / T. Taniguchi, N. Yuasa, M. Maeda [et al.] // *Natl. Inst. Anim. Health Q. (Jpn.)*. – 1983. – V. 23. – P. 1-12.
283. Tham K. Polymerase chain reaction amplification for direct detection of chicken anemia virus DNA in tissues and sera / K. Tham, W.L. Stanislawek // *Avian Dis.* – 1992. – V. 36. – P. 1000-1006.
284. Todd D. Purification and biochemical characterization of chicken anaemia agent / D. Todd, J.L. Creelan, D.P. Mackie [et al.] // *J. Gen. Virol.* – 1990. – V. 71. – P. 819-823.
285. Todd D. Detection and differentiation of chicken anemia virus isolatesw by using the polymerase chain reaction / D. Todd, K.A. Mawhinney, M.S. McNulty // *J. Clin. Microbiol.* – 1992. – V. 30. – P. 1661-1666.
286. Todd D. Characterization of chicken anaemia virus / D. Todd, A.J. Douglas, K.V. Phenix [et al.] // *Proc. Intern. Symp. on Infect. Bursal Dis. and Chicken Infect. Anaemia.* – Germany, Rauischholzhausen. – 1994. – P. 349-363.
287. Todd D. Molecular cloning of an attenuated chicken anaemia virus isolate following repeated cell culture passage / D. Todd, T.J. Connor, V.M. Calvert [et al.] // *Avian Pathol.* – 1995. – V. 24. – P. 173-187.
288. Todd D. Circoviruses: immunosuppressive threats to avian species: a review / D. Todd // *Avian Pathol.* – 2000. – V. 29. – P. 373-394.

289. Todd D. Genome sequence determinations and analyses of novel circoviruses from goose and pidge / D. Todd, J.H. Weston, D. Soik [et al.] // *Virology*. – 2001. – V. 286. – P. 254-262.
290. Todd D. Investigation of the unstable attenuation exhibited by a chicken anaemia virus isolate / D. Todd, J.L. Creelan, T.J. Connor [et al.] // *Avian Pathology*. – 2003. – V. 32. – P. 375-382.
291. Todd D. Avian circovirus diseases: lessons for the study of PMWS / D. Todd // *Veterinary Microbiology*. – 2004. – V. 98. – P. 169-174.
292. Toro H. Chicken anemia in Chile: Viral detection by immunohistochemistry / H. Toro, M.S. McNulty, C. Gozales // *Proc. Int. Symp. Infect. Bursal Dis. Chick Infect. Anaemia*, Rauschholzhausen, Germany, 1994. – P. 434-437.
293. Toro H. Detection of chicken anemia virus antibodies in four poultry operations in Chile / H. Toro, M.S. McNulty, H. Hidalgo [et al.] // *Prev. Vet. Med.* – 1994. – V. 21. – P. 103-106.
294. Toro H. Chicken anemia virus and fowl adenoviruses: association to induce the inclusion body hepatitis/hydropericardium syndrome / H. Toro, C. Gonzalez, L. Cerda, M. Hess [et al.] // *Avian Dis.* – 2000. – V. 44, N. 1. – P. 215-222.
295. Toro H. Serological evidence of chicken infectious anemia virus in the United States at least since 1959 // H. Toro, S. Ewald, F.J. Hoerr // *Avian Dis.* – 2006. – V. 44. – P. 51-58.
296. Toro H. Epidemiological and experimental evidence for immunodeficiency affecting avian infectious bronchitis / H. Toro, V.L. van Santen, L. Li [et al.] // *Avian Pathology*. – 2006. – V. 35. – P. 455-464.
297. Toro H. Effects of chicken anaemia virus and infectious bursal disease virus in commercial chickens / H. Toro, V.L. van Santen, F.J. Hoerr [et al.] // *Avian Dis.* – 2009. – V. 53, N. 1. – P. 94-102.
298. Tseng T.-Y. Preparation of chicken anemia virus (CAV) virus-like particles and chicken interleukin-12 for vaccine development using a Baculovirus expression system / T.-Y. Tseng, Y.-C. Liu, Y.-C. Hsu [et al.] // *Pathogens*. – 2019. – V. 8. – P. 262-274. – DOI: 10.3390/pathogens8040262

299. Umar S. Chicken infectious anaemia, an immunosuppressive disease of poultry birds / S. Umar, S. Ullah, M. Yaqoob [et al.] // *World's Poult. Sci. J.* – 2014. – V. 70. – P. 759-766. – DOI:10.1017/S0043933914000828
300. Van Santen V.L. Genetic characterization of chicken anemia virus from commercial broiler chickens in Alabama / V.L. Van Santen, L. Li, F.L. Hoerr [et al.] // *Avian Dis.* – 2001.- V. 45. – P. 373-388.
301. Van Santen V.L. Biological characteristics of chicken anemia virus regenerated from clinical specimen by PCR / V.L. van Santen, H. Noro, F.J. Hoerr // *Avian Dis.* – 2007. – V. 51. – P. 66-77.
302. Vaziry A. chicken infectious anaemia vaccinal strain persists in the spleen and thymus of young chicks and induces thymic lymphoid cell disorders / A. Vaziry, A. Silim, C. Bleau [et al.] // *Avian Pathol.* – 2011. – V. 40, N. 4. – P. 377-385.
303. Vielits E. Anemia – dermatitis of broilers: field observations on its occurrence, transmission and prevention / E. Vielits, H. Landgraf // *Avian Pathol.* – 1988. – V. 17. – P. 113-120.
304. Wani M.Y. Molecular detection and epidemiology of chicken infectious anaemia virus in India / M.Y. Wani, K. Dhama, R. Barathidsan // *South Asian J. Exp. Biol.* – 2013. – V. 3, N. 4. – P. 145-151.
305. Wicht J.V. Chicken anaemia agent in South Africa / J.V. Wicht, S.B. Maharaj // *Vet. Rec.* – 1993. – V. 133. – P. 147-148.
306. Withers D.R. Infectious bursal disease virus – induced immunosuppression in the chick is associated with the presence of undifferentiated follicles in the recovering bursa / D.R. Withers, J.R. Young, T.F. Davison // *Viral Immunol.* – 2005. – V. 18. – P. 127-137.
307. Withers D.R. Diversified bursal medullary B cells survive and expand independently after depletion following neonatal infectious bursal disease virus infection / D.R. Withers, T.F. Davison, J.R. Young // *Immunol.* – 2006. – V. 117. – P. 558-565.
308. Witter R.L. Retroviral in sectional mutagenesis of a herpesvirus: a Marek's disease virus mutant attenuated for oncogenicity but not for immunosuppression

or in vivo replication / R.L. Witter, D. Lio, D. Jones [et al.] // *Avian Dis.* – 1997. – V. 41. – P. 407-421.

309. Witter R.L. Marek's disease / R.L. Witter, K.A. Schat // In: *Disease of Poultry*, 11<sup>th</sup> ed. Eds. Y.M. Saif, H.J. Barnes, J.R. Glisson, A.M. Fadly, L.R. McDougald and D.E. Swayne. Iowa State University Press, Ames, IA. – 2003. – pp. 407-464.

310. Yamaguchi S. Identification of a genetic determinant of pathogenicity in chicken anaemia virus / S Yamaguchi, T. Imada, N. Kaji [et al.] // *J. Gen. Virol.* – 2001. – V. 82. – P. 1233-1238.

311. Yuasa N. Isolation and some characteristics of an agent inducing anemia in chicks / N. Yuasa, T. Taniguchi, I. Yoshida // *Avian Dis.* – 1979. – V. 23. – P. 366-385.

312. Yuasa N. Survey of antibody against chicken anaemia agent (CAA) by an indirect immunofluorescent antibody technique in breeder flocks in Japan / N. Yuasa, K. Imai, H. Tezuka // *Avian Pathol.* – 1985. – V. 14. – P. 521-530.

313. Yuasa N. Pathogenicity and antigenicity of eleven isolates of chicken anaemia agent (CAA) / N. Yuasa, K. Imai // *Avian Pathol.* – 1986. – V. 15. – P. 639-645.

314. Yuasa N. Etiological examination of an outbreak of haemorrhagic syndrome in a broiler flock in Japan / N. Yuasa, K. Imai, K. Watanabe [et al.] // *Avian Pathol.* – 1987. – V. 16. – P. 521-526.

315. Yuasa N. Efficacy of Marek's disease vaccine, herpesvirus of turkeys, in chickens infected with chicken anemia agent / N. Yuasa, K. Imai // in S. Kato, T. Hirinski, T. Mikami, and K. Hirai (eds.). *Advances in Marek's Disease Research*, Japanese Association on Marek's Disease, Osaka, Japan. – 1988. – P. 358-363.

316. Yuasa N. Pathogenicity of chicken anaemia agent in bursectomised chickens / N. Yuasa, K. Imai, K. Nakamura // *Avian Pathol.* – 1988. – V. 17. – P. 363-369.

317. Yuasa N. Survey of antibody to chicken anemia agent in sera from foreign countries / N. Yuasa // *Bull. Natl. Inst. Anim. Health Q. (Jpn)*. – 1990. – V.95. – P. 9-10.

318. Yuasa N. Effect of chemicals on the infectivity of chicken anaemia virus / N. Yuasa // *Avian Pathol.* – 1992. – V. 21. – P. 315-319. – DOI:10.1637/9347-032910-ResNote.1
319. Zbrahim A.I. Effect of chicken anemia virus (CAV) infection on chicken coccidiosis / A.I. Zbrahim // *Assuit. Vet. Med. J.* – 1997. – V. 37, N. 74. – P. 125-135.
320. Zeng S. The changes of T-lymphocytes subpopulation in immune organs and tissues of chick infected with chicken anemia virus post vaccination La-Sota vaccine / S. Zeng, X. Gao, Z. Liu // *Acta Vet. Zootech. Sinca.* – 2004. – V. 35, N. 2. – P. 213-216.
321. Zhang Y.H. Activation of the tumor-specific death effector apoptin and its kinase by an N-terminal determinant of simian virus 40 large T antigen / Y.H. Zhang, K. Kooistra, A. Pietersen // *J. Virol.* – 2004. – V. 78. – P. 9965-9976.
322. Zhang X. Assessing the efficacy of an inactivated chicken anemia virus vaccine / X. Zhang, B. Wu, Y. Liu [et al.] // *Vaccine.* – 2015. – V. 33. – P. 1916-1922.
323. Zhuang S.-M. Apoptin, a protein encoded by chicken anemia virus, induces cell death in various human hematologic malignant cells in vitro / S.-M. Zhuang, J.E. Landergent, C.A.J. Verschueren [et al.] // *Leukemia.* – 1995. – V. 9. – P. 118-120.
324. Zhuang S.-M. Apoptin, a protein encoded by chicken anemia virus, induces p53 – independent apoptosis in human osteosarcoma cells / S.-M. Zhuang, A. Shvarts, H. van Ormondt [et al.] // *Cancer Res.* – 1995. – V. 55. – P. 486-489.

**ПРИЛОЖЕНИЯ**

Министерство высшего образования и науки  
Федеральное государственное бюджетное научное учреждение  
Федеральный научный центр «Всероссийский научно-исследовательский и  
технологический институт птицеводства» Российской академии наук  
(ФНЦ «ВНИТИП» РАН)  
филиал  
«Всероссийский научно-исследовательский ветеринарный институт  
птицеводства» (ВНИВИП)

**УТВЕРЖДАЮ**

Директор ФНЦ «ВНИТИП» РАН

Д.Н. Ефимов

*02.* 2021 г.



**ДИАГНОСТИКА И ПРОФИЛАКТИКА  
ИНФЕКЦИОННОЙ АНЕМИИ ЦЫПЛЯТ В ПТИЦЕВОДЧЕСКИХ  
ХОЗЯЙСТВАХ ПРОМЫШЛЕННОГО ТИПА  
(методические положения)**

Санкт-Петербург, 2021

В методических положениях «Диагностика и профилактика инфекционной анемии цыплят в птицеводческих хозяйствах промышленного типа» изложены основные сведения о болезни, рекомендации по отбору проб патологического материала, методы диагностики и способы профилактики инфекционной анемии цыплят в условиях промышленного птицеводства. Методические положения предназначены для ветеринарных специалистов промышленных птицеводческих предприятий, студентов ВУЗов ветеринарного и биологического профиля, региональных ветеринарных лабораторий.

**Методические положения разработали:**

**Балендор Евгений Валентинович** - начальник департамента ветеринарии министерства сельского хозяйства Калининградской области, аспирант ВНИВИП - филиала ФНЦ «ВНИТИП» РАН;

**Дмитриева Маргарита Евгеньевна** – кандидат ветеринарных наук, советник генерального директора по биологической безопасности ПАО «Птицефабрика «Боровская» им. А.А. Созонова;

**Дубовой Александр Сергеевич** – старший научный сотрудник отдела вирусологии и опухолевых болезней птиц ВНИВИП - филиала ФНЦ «ВНИТИП» РАН;

**Дмитриев Константин Юрьевич** – младший научный сотрудник отдела диагностики и эпизоотологического анализа ВНИВИП – филиала ФНЦ «ВНИТИП» РАН.

**Рецензенты:**

**Сухинин Александр Александрович** – зав. кафедрой микробиологии, вирусологии и иммунологии ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет ветеринарной медицины», доктор биологических наук, профессор.

**Терлецкий Валерий Павлович** – главный научный сотрудник Всероссийского научно-исследовательского института генетики и разведения животных, доктор биологических наук.

Методические положения рассмотрены и одобрены на Методическом Совете ВНИВИП (26 февраля 2021 г., протокол № 1).

**СОДЕРЖАНИЕ**

1.	Инфекционная анемия цыплят.....	4
1.1.	Общие сведения о болезни.....	4
1.2.	Биологические и физико-химические свойства вируса.....	7
1.3.	Патогенез.....	9
1.4.	Клинические признаки и течение ИАЦ.....	11
1.5.	Патоморфологические изменения.....	12
2.	Диагностика инфекционной анемии цыплят.....	14
2.1.	Отбор проб для проведения диагностических исследований.....	14
2.2.	Детекция и изоляция вируса ИАЦ.....	16
2.3.	Молекулярно-биологические методы исследований.....	18
2.4.	Серологические методы исследований.....	19
2.5.	Гематологические исследования.....	20
2.6.	Гистологическое исследование.....	21
2.7.	Электронно-микроскопическое исследование.....	21
2.8.	Дифференциальная диагностика ИАЦ.....	22
3.	Профилактика инфекционной анемии цыплят.....	26
3.1.	Иммунитет.....	26
3.2.	Неспецифическая профилактика ИАЦ.....	28
3.3.	Специфическая профилактика ИАЦ.....	29

## 1. ИНФЕКЦИОННАЯ АНЕМИЯ ЦЫПЛЯТ

### 1.1. Общие сведения о болезни

Инфекционная анемия цыплят, Infectious chicken anaemia (ИАЦ, вирусная анемия цыплят, гангренозный дерматит, «синее крыло») – вирусная, иммунодефицитная болезнь, характеризующаяся отставанием в росте и развитии, апластической анемией, дерматитами, повышенной восприимчивостью к возбудителям инфекционных болезней различной этиологии, а также снижением эффективности вакцинаций против ньюкаслской болезни, инфекционного бронхита кур, инфекционной бурсальной болезни, болезни Марека и др. Впервые болезнь была зарегистрирована в Японии в 1979 году. С инфекционной анемией связаны геморрагический синдром, гангренозный дерматит и болезнь «синего крыла».

Инфекционная анемия цыплят распространена в странах с развитым промышленным птицеводством, в том числе в Российской Федерации. В настоящее время болезнь регистрируется в промышленных птицеводческих хозяйствах как мясного, так и яичного направления выращивания. Экономический ущерб от ИАЦ выражается повышенной смертностью (до 10-60%), снижением продуктивности и эффективности специфической профилактики против других инфекций, повышением затрат на антибактериальные и антипаразитарные препараты в связи с повышенной чувствительностью к патогенам бактериальной этиологии (*Streptococcus spp.*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium spp.*, *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*), а также к эймериозам, вызываемым *Eimeria tenella* и инфекциям, вызываемым *Cryptosporidium baileyi*, фузобактериями.

Куры являются естественными хозяевами вируса инфекционной анемии цыплят (ВАЦ), однако вирус был выделен от индеек, мышей, кошек, собак и человека. Антитела к ВАЦ были выявлены у японских перепелов и домашних воробьев.

Заражаются куры всех возрастов, но наиболее восприимчивы к вирусу цыпльата мясных пород 1-8-суточного возраста. Болезнь чаще возникает у цыплят-бройлеров в возрасте 14-21 сутки. С возрастом восприимчивость к заражению

снижается. Цыплята старше 3-недельного возраста устойчивы к заражению или переболевают субклинически. При любой форме течения, вирус оказывает на организм цыплят значительное иммунодепрессивное воздействие, приводящее к снижению продуктивности и сохранности. У кур-несушек ИАЦ протекает в виде латентной инфекции. При этом у кур-несушек отсутствует клиническое проявление болезни. Показатели сохранности, продуктивности, а также оплодотворяемости и выводимости инкубационных яиц сохраняются на высоком уровне. Однако в отдельных случаях течение ИАЦ может сопровождаться повышенным отходом птицы и депрессией поствакцинального иммунитета к прививаемым инфекциям. До сих пор механизм естественного инфицирования ВАЦ полностью не изучен.

Источником инфекции являются больные и переболевшие птицы. Передача вируса осуществляется горизонтальным и вертикальным (трансовариальным) путями. Возможно пожизненное носительство вируса ИАЦ. Циркуляция и возможность вертикальной передачи вируса среди иммунной птицы создает значительные трудности при ликвидации болезни. Трансовариальный путь передачи является наиболее значимым в распространении ИАЦ. Установлено, что при наличии у родителей титров вируснейтрализующих антител менее  $4,0 \log_2$ , передача вируса потомству составляет 100%. При уровне антител  $5,0-7,0 \log_2$ , передача вируса составляет 20-40%. Только титр вируснейтрализующих антител более  $8,0 \log_2$  предотвращает вертикальную передачу ВАЦ и защищает цыплят от клинической и субклинической форм болезни. Однако материнские антитела, которые сохраняются до 7-20-суточного возраста, защищают цыплят от экспериментального или естественного заражения при условии отсутствия признаков иммуносупрессии, вызванной воздействием других вирусных агентов (вирусов болезни Марека, инфекционной бурсальной болезни, реовирусов и др.). Инкубационное яйцо, полученное от инфицированных родительских стад, является источником возбудителя инфекции на протяжении 3-6 недель. При вертикальной передаче у цыплят, выведенных из инфицированного яйца, наблюдается анемия костного мозга в возрасте 5-8 суток. Источником инфекции также является сперма

инфицированных петухов. Горизонтальная передача вируса осуществляется при непосредственном контакте, оральным путем, через инфицированные корм и воду, а также воздушно-капельным путем.

Вирус ИАЦ обладает высокой устойчивостью к дезинфектантам и способен длительно сохраняться в окружающей среде. После заражения ВАЦ выделяется с пометом в высоких концентрациях. Сероконверсия у большинства птиц, при естественном заражении отмечается через 2-4 недели. Но у части (10% и более) переболевшей птицы антитела к ВАЦ могут отсутствовать. Данный феномен объясняется тем, что часть птицы в стаде обладает иммунологической толерантностью к данному возбудителю, отсутствием инфицирования или элиминацией антител.

Первый пик смертности у цыплят-бройлеров, обусловленный трансвариальной передачей, может наблюдаться в возрасте 12-14 суток. В этот период наблюдается резкое расслоение цыплят. Обычно в 12-14 дней бройлеров иммунизируют против ньюкаслской болезни, поэтому расслоение птицы и повышение падежа связывают с поствакцинальной реакцией. Следующий пик смертности отмечается в возрасте 22-26 суток. Он сопровождается проявлением бактериальных инфекций. В возрасте 32-36 суток также может регистрироваться повышенный отход цыплят, в основном с признаками колибактериоза.

У птицы старше 6-7-недельного возраста клинические признаки не выражены. Однако в возрасте 10-12 недель у молодняка кур-несушек и ремонтного молодняка племенных стад иногда наблюдается повышенный отход с признаками ИАЦ. В результате иммунодепрессивного воздействия ВАЦ, в этот период могут возникать локальные вспышки кокцидиоза, инфекционного бронхита кур, болезни Марека на иммунизированном против данных болезней поголовье. У кур-несушек в продуктивный период ИАЦ может сопровождаться побледнением гребня и сережек, а также повышенным падежом птицы с признаками колибактериоза.

Кроме указанных способов передачи вируса ИАЦ, необходимо отметить вероятность распространения возбудителя через контаминированные ВАЦ вакцины.

## 1.2. Биологические и физико-химические свойства вируса

Возбудитель инфекционной анемии цыплят – ДНК-содержащий вирус. Вирус ИАЦ в 1993 году на пленарной сессии Международного комитета по таксономии вирусов (ICTV) был отнесен к семейству *Circoviridae* роду *Circovirus*. В 1999 году ВАЦ был выделен в отдельный род *Gyrovirus*. Геном возбудителя ИАЦ отличается от других вирусов, принадлежащих семейству *Circoviridae*, отсутствием репликативного белка. В 2015 году на сессии ICTV вирус инфекционной анемии цыплят был отнесен к семейству *Anelloviridae*. Величина вируса составляет от 18 до 26,5 нм. Вирус обладает кубическим типом симметрии и представляет собой правильный Т-3 икосаэдр, капсид которого включает 32 капсомера. Вирус содержит однонитчатую циркулярную минус-ДНК размером 2,3 тысячи оснований нуклеотидов и один основной полипептид с молекулярной массой 50-51,6 кДа (VP1). Вирус содержит вирусные белки VP2, молекулярная масса которого составляет 24-30 кДа, и VP3 с молекулярной массой 13,6-16 кДа. Установлено, что белок VP2 связан с вирионами, но до настоящего времени его функция полностью не изучена. Считается, что VP2 выполняет связующую функцию в процессе сборки вирионов и необходим для достижения белка VP1 определенной конформации и, как и VP1, незаменим для репликации вируса. Белок VP3 (апоптин) имеет связь с инфицированными клетками, является сильным индуктором апоптоза Т-лимфоцитов, что имеет ведущее значение в патогенезе ИАЦ.

Вероятно, ВАЦ у кур реплицируется в гемоцитобластах в костном мозге, предшественниках Т-клеток коркового вещества тимуса и вызывает их гибель в результате апоптоза. Вирус также реплицируется в CD8-клетках в селезенке. В процессе репликации вируса в цитоплазме или ядре эритробластоидных клеток костного мозга и лимфоидных клеток коркового вещества тимуса образуются полиморфные включения, которые служат участками синтеза структурных компонентов вируса или формирования вирионов. Репликативная двухцепочечная форма ДНК вируса ИАЦ обладает инфекционной активностью. Генерализация ИАЦ подавляет пролиферацию лимфоцитов в селезенке, продукцию Т-клеток

фактора роста, выработку интерферона спленоцитами и некоторые функции макрофагов.

В настоящее время клонирован полный геном вируса ИАЦ и установлена высокая идентичность всех полевых изолятов с клонированной прототипной ДНК, т.е. все штаммы ИАЦ по антигенной структуре не имеют каких-либо отличий и относятся к одному серотипу, но есть штаммы, которые различаются по вирулентности.

При репродукции в куриных эмбрионах (КЭ) вирус ИАЦ не вызывает у них патологических изменений и гибели. У инфицированных цыплят на 7-е сутки появляются признаки анемии, а на 10-15 сутки наблюдается их гибель. Вирус также репродуцируется в культурах лимфобластоидных клеточных линий Т-клеток MDCC-MSB1, MDCC-JP2 и других лимфобластоидных клеточных линиях Т-клеток и В-клеток, вызывая цитопатогенное действие (ЦПД), а также в суточных цыплятах, не имеющих пассивных антител. Реакция на инфицирование ВАЦ усиливается при одновременной инокуляции вирусов болезни Марека или вируса инфекционной бурсальной болезни, а также при использовании бурсаэктомированных цыплят.

Для воспроизведения экспериментальной инфекции СПФ-цыплят заражают гомогенатом печени от больных или погибших от ИАЦ птиц. Инфицированные цыплята отстают в росте, в лимфоидных органах отмечаются признаки апластической анемии и атрофии. При заражении суточных СПФ-цыплят анемия и патологоанатомические изменения во внутренних органах отмечаются в 100% случаев. Смертность цыплят при этом составляет от 20 до 70%.

Аттенуированные штаммы вируса ИАЦ не стабильны и способны реверсировать к исходной патогенности в процессе нескольких пассажей (начиная от 10 пассажей) на маленьких цыплятах.

При экспериментальном заражении ВАЦ появляется в крови в течение первых суток и на протяжении 5 недель после инокуляции вирус выделяется практически из всех тканей и экскретов инфицированных птиц. Наиболее высокая

концентрация вируса отмечается с 7 по 21 сутки после заражения, с максимальным пиком на 6-7 сутки.

Вирус не обладает гемагглютинирующей активностью. В организме птиц возбудитель индуцирует выработку вируснейтрализующих антител.

Вирус ИАЦ очень устойчив во внешней среде, термостабилен, а также устойчив к действию эфира, хлороформа, этилового и метилового спирта, 5% раствор фенола вызывает гибель в течение 2-х часов. ВАЦ стабилен при pH 3 в течение 3-х часов и не инактивируется 90%-м ацетоном в течение 24 часов. Вирус ИАЦ сохраняет биологическую активность после нагревания в течение 5 минут при 70°C. Инактивируется при 80°C в течение 30 минут, при 100°C в течение 10-15 минут. Формальдегид в 5% концентрации при комнатной температуре инактивирует вирус в течение 24 часов, а фумигация формальдегидом в течение 24 часов не инактивирует полностью ВАЦ. Вирус ИАЦ выдерживает в течение 2-х часов при температуре 37°C воздействие 5%-ных растворов коммерческих дезинфектантов, в том числе четвертичных соединений аммония, поверхностно-активных веществ, ортохлорбензола. Многократное замораживание и оттаивание ВАЦ не оказывают влияния на его биологическую активность. Инактивация ВАЦ *in vitro* наступает в результате воздействия 1% раствора глутарового альдегида через 10 минут и гипохлорида натрия через 24 часа при комнатной температуре, 10% раствора органического йода через 2 часа при температуре 37°C, 0,5% β-пропиолактона через 24 часа при температуре 4°C. Вирус ИАЦ может сохранять жизнеспособность до 28 суток, в содержимом прямой кишки – более 49 суток. У кур в состоянии иммунодепрессии персистенция вируса более длительная.

### 1.3. Патогенез

С помощью гистопатологических, ультраструктурных и иммуноцитохимических исследований был установлен патогенез инфекционной анемии цыплят. Результаты этих последовательных исследований показывают, что через 6-8 суток после инокуляции на раннем цитолитическом этапе инфекции первыми в патологический процесс вовлекаются гемоцитобласты костного мозга и лимфобласты коркового вещества тимуса. В результате апоптоза происходит

гибель тимоцитов коркового слоя. На 6-7 сутки после инфицирования уровень пораженных клеток в тимусе и костном мозге достигает максимума. Процесс продолжается в течение 10-12 суток.

В костном мозге появляются увеличенные проэритробласты, кроветворные клетки в состоянии дегенерации, макрофаги с дегенерировавшими кроветворными клетками. Через 10-12 суток после инокуляции происходит истощение лимфоидных клеток вплоть до некроза в фабрициевой сумке, селезенке и других органах, где присутствует лимфоидная ткань.

Распад эритроидных стволовых клеток в костном мозге приводит к тяжелой форме анемии и уменьшению количества гранулоцитов и тромбоцитов. В результате распада предшественников Т-клеток в корковом слое тимуса уменьшается количество зрелых Т-киллеров и Т-хелперов, что способствует развитию иммуносупрессии.

Появление вновь в тимусе лимфоцитов и проэритробластов, промиелоцитов в костном мозге, восстановление кроветворной функции происходит, начиная с 16-х суток после заражения одновременно с началом образования антител. В результате развития данных процессов наступает полное выздоровление к 32-36 суткам.

Репликация вируса в основном происходит в макрофагах и моноцитах, вызывая при этом, подавление функции иммунной системы. Репликация ВАЦ также происходит в лимфобластах коркового слоя тимуса, интрасиноидальных и экстрасиноидальных гемоцитобластах и ретикулярных клетках, что было выявлено при проведении иммуноцитохимических исследований. Кроме этого, антигены вируса были выявлены в зрелых Т-лимфоцитах и селезенке, а также в лимфоидных тканях других органов.

Тромбоцитопения, возникающая при заражении вирусом ИАЦ, играет ключевую роль в патогенезе возникновения предрасположенности инфицированной птицы к другим патогенам, вероятность проникновения, которых повышается вследствие нарушения целостности стенок сосудов.

#### 1.4. Клинические признаки и течение ИАЦ

На интенсивность проявления болезни влияет ряд факторов: возраст птицы, доза вируса, вирулентность возбудителя, маршрут инфицирования, наличие материнских антител и сопутствующих инфекций, возможное воздействие различных стресс-факторов, состояние иммунной системы и общей резистентности организма и др. Продолжительность инкубационного периода обычно составляет 10-12 дней. Смертность варьирует от 5 до 60%.

Болезнь у цыплят проявляется депрессией, снижением аппетита, прироста живой массы, отставанием в развитии, бледностью гребня, сережек, видимых слизистых оболочек. В некоторых случаях болезнь может проявляться дерматитами различной интенсивности в области крыльев или других частей тела, кратковременной диареей. Иногда при ИАЦ может наблюдаться усиление пигментации, что проявляется желтизной нижних конечностей, клюва, гребня и оперения. Нередко наблюдается гангренозный дерматит в области основания хвоста, на спине и на концах крыльев, а также в области грудной клетки, живота, бедер и голени. Дерматиты сопровождаются трещинами кожи, из которых вытекает серозный экссудат с примесью крови. При ИАЦ могут иметь место подкожные, внутрикожные и внутримышечные кровоизлияния различной формы и размеров, с признаками отеков в области груди, бедра, голени, брюшины и на внутренней стороне крыльев. Иногда наблюдаются подкожные кровотечения и язвенно-некротические поражения на плюсне и подошве нижних конечностей.

Специфическим симптомом инфицирования вирусом ИАЦ является анемия, которая характеризуется снижением уровня гематокрита до 6-27%, замедление свертываемости крови.

В естественных условиях процесс восстановления очень часто затягивается вследствие осложнений, связанных с возникновением вторичных вирусных и бактериальных инфекций, вызываемыми *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens*, *Escherichia coli* и др. Вторичные инфекции при этом характеризуются более выраженными клиническими симптомами и повышенной смертностью.

Уровень заболеваемости и смертности значительно возрастает при одновременном инфицировании птицы вирусами болезни Марека (БМ), инфекционной бурсальной болезни (ИББ), ретикулоэндотелиоза, которые вызывают иммуносупрессию, а также вирусом инфекционного гепатита и реовирусами. Иммунодепрессивное воздействие ВАЦ усиливается при ассоциированном течении ИАЦ и аденовирусной инфекции. Одновременное инфицирование вирусами ИАЦ и ИББ приводит к клиническому проявлению инфекционной анемии, в то время как ИАЦ, как моноинфекцию, птицы переносят достаточно легко и быстро выздоравливают. Ассоциированное течение ИАЦ с ИББ и/или БМ вызывает тяжелое иммунодепрессивное состояние, сопровождающееся значительным повышением смертности, восприимчивости птицы к секундарным инфекциям, резким снижением экономических показателей и угрозой возникновения инфекционных болезней, прежде всего ньюкаслской болезни (НБ). На фоне течения инфекционной анемии цыплят часто происходит депрессия иммунитета против НБ, БМ, ИББ, инфекционного бронхита кур, инфекционного ларинготрахеита, кокцидиоза.

### **1.5. Патоморфологические изменения**

При патологоанатомическом вскрытии обычно выявляют истощение трупов, бледность кожных покровов.

Характерными макроскопическими признаками ИАЦ являются атрофия и апоплазия костного мозга и тимуса. Костный мозг бедренной кости имеет желтоватый, розоватый, а иногда темно-красный цвет. Атрофические процессы в тимусе могут привести к регрессии органа. При этом тимус приобретает темно-красно-бурый цвет. Поражения фабрициевой сумки могут быть представлены уменьшением размеров бурсы, наличием в бурсе экссудата молочно-белого цвета, кровоизлияний различной интенсивности. Часто при ИАЦ наружная стенка фабрициевой сумки становится полупрозрачной и через нее хорошо видны складки, расположенные внутри органа. Печень, почки и селезенка могут быть увеличены, бледные. Кроме этого, наблюдаются внутримышечные и подкожные кровоизлияния на слизистой оболочке железистого желудка, на сердце, реже в

других органах. Подкожные кровотечения на плюсне и в нижней части нижних конечностей могут провоцировать образование язв. Инфицированные вирусом ИАЦ цыплята предрасположены к развитию пододерматитов.

Также выявляются обширные подкожные темно-синие серозные инфильтраты, особенно в области крыльев («синее крыло»), которые могут распространяться на грудную клетку и брюшную стенку. В некоторых случаях инфильтраты в области живота имеют студневидную консистенцию и цвет, который варьирует от соломенно-желтого до буро-зеленоватого. Пораженная печень увеличена, бледная, с точечными кровоизлияниями и очагами некроза сероватого цвета. При ИАЦ могут наблюдаться такие симптомы как «круглое сердце» и дерматиты, интенсивность которых, вероятно, связана с осложнениями, вызванными клостридиями, стафилококками, адено- и реовирусами. В брюшной полости часто обнаруживают соломенно-желтый студневидный инфильтрат, а также нарушение структуры мышечной ткани («вареное мясо») в области бедра.

Анемия, которая возникает при заражении ВАЦ, обусловлена не процессами гемолиза или прямого вирусного лизиса, а замедлением процесса формирования красных кровяных телец клетками костного мозга.

Гистологические изменения характеризуются генерализованной лимфоидной атрофией и тяжелым поражением костного мозга с тотальным нарушением кроветворения (панмиелофтизом). При инфицировании ВАЦ наблюдается деструкция эритробластоидных клеток и истощение популяции кортикальных тимоцитов. Кроме этого, отмечается атрофия и интенсивная лимфоидная гипоплазия тимуса и деплеция популяции Т и В-клеток. В корковом слое тимуса выявляется истощение различной степени лимфоидных элементов, с последующим заполнением атрофированных долей ретикулярными и капиллярными клетками, а также капиллярной соединительной тканью. Иногда имеет место очаговая инфильтрация лимфоцитов в печени, сердце и почках.

Поражения фабрициевой сумки представлены атрофией лимфоидных ячеек, с небольшими очагами некроза, образованием складок на эпителии, отежной эпителиальной дегенерацией и пролиферацией ретикулярных клеток. Кроме этого,

патоморфологические изменения характеризуются уменьшением размеров корковой зоны лимфоидных узелков, снижением плотности расположенных в ней лимфоцитов, появлением на месте разрушенных узелков микроцист и псевдожелезистых структур, активизацией регенерационных процессов с появлением новообразованных лимфоидных фолликулов.

При ИАЦ в печени, почках, легких, железистом желудке, двенадцатиперстной кишке и лимфоидных бляшках слепой кишки образование лимфоидных очагов приводит к истощению клеток, уменьшению их размеров и снижению плотности.

При ИАЦ кровь пораженных цыплят может иметь более или менее выраженную водянистую структуру, бледную плазму, более продолжительное время свертывания по сравнению с нормой. Состав крови восстанавливается у выздоравливающих цыплят только к 40-суточному возрасту.

## **2. ДИАГНОСТИКА ИНФЕКЦИОННОЙ АНЕМИИ ЦЫПЛЯТ**

### **2.1. Отбор проб для проведения диагностических исследований**

#### *Для серологического исследования*

пробы сыворотки крови отбирают в момент и через 14-21 сутки после проявления первых клинических симптомов. По возможности следует отбирать парные сыворотки. Кровь отбирают обычно из подкрыльцовой вены, но можно брать из сердца или яремной вены в количестве не менее 25 проб от партии птицы. При получении сыворотки кровь прогревают в течение 10-20 минут в термостате или на водяной бане при 37°C, обводят ступок стеклянной палочкой, отделяя его от стенок пробирки, отстаивают 3-4 часа в бытовом холодильнике при температуре 4-8°C, после чего полуавтоматической пипеткой отбирают сыворотку в пробирки типа эппендорф.

Из сердца (техника отбора – см. отбор проб для гематологического исследования) кровь отбирают одноразовыми шприцами, которые укладывают под наклоном иглой вверх и помещают в холодильник на 3-4 часа. Затем сыворотку крови сливают в пробирки типа эппендорф.

#### *Для гематологического исследования*

от цыплят с клиническими признаками ИАЦ отбирают пробы цельной крови. Забор крови производят путем пункции левого желудочка сердца или тотально в количестве 5 мл от каждой особи. Перед забором крови из сердца цыплят фиксируют на столе на спине. Прокол делают слева в V-образной вырезке грудной кости с направлением иглы под углом 45° к стенке грудной клетки, вперед. Для стабилизации цельной крови в пробирку вносят антикоагулянт – 4% раствор цитрата натрия из расчета 0,1 мл на 1 мл крови или 2-3 капли на 20 мл крови 1% раствора гепарина.

***Для вирусологического исследования***

отбирают от нескольких особей (не менее 5) пробы печени, костный мозг, селезенку, тимус, фабрициеву сумку. Материал следует отбирать от свежих трупов, так как может произойти инактивация возбудителя при проявлении неспецифических посмертных изменений в результате аутолитических процессов или от вынужденно убитой птицы с клиническими признаками болезни. Материал отбирают с соблюдением правил асептики. Патологический материал хранят при температуре минус 20°С.

***Для молекулярно-биологических исследований***

отбирают либо кусочки лимфоидных органов как для вирусологического исследования, либо делают отпечатки на флэш-карты. Для создания групповой пробы на 1 флэш-карту можно наносить отпечатки от нескольких особей (не менее 5). Так как вирус ИАЦ длительное время выделяется с пометом, то для молекулярно-биологических исследований можно использовать пробы помета. С помощью полимеразно-цепной реакции (ПЦР) вирус ИАЦ можно выделить из различных образцов (гомогенатов, лимфоидных органов, клеточных культур, помета и др.) свежих или замороженных, в том числе из образцов органов, фиксированных формалином и тканей, фиксированных парафином.

***Для гистологического и гистохимического исследования***

материал отбирают от свежих трупов или вынужденно убитых больных птиц. Материалом для исследования на ИАЦ служат костный мозг, печень, тимус, селезенка, фабрициева сумка. Материал отбирают из патологически измененных

участков органа с захватом приграничных участков неизменной ткани в виде тонких пластинок не более 1-2 см длиной. В качестве фиксирующей жидкости используют чаще всего 10% раствор нейтрального формалина или 90%-ный этанол. Рекомендуется выдержать патматериал сначала в 5%-ном растворе нейтрального формалина в течение 12-18 часов, затем перенести в 10%-ный раствор формалина. Объем фиксирующей жидкости должен превышать объем патологического материала в 10 раз. Через сутки ее заменяют. Материал фиксируют в стеклянной посуде, которую тщательно укупоривают и крышку заливают парафином или менделеевской замазкой.

### *Для электронно-микроскопического исследования*

независимо от способа забора материала существенное значение имеет то, что образцы тканей необходимо отбирать и фиксировать как можно скорее, чтобы предотвратить в них посмертные изменения. Поэтому лучше отбирать материал от вынужденно убитых птиц с клиническими признаками болезни. В качестве фиксирующих растворов используют водные растворы альдегидов (глутаровый альдегид, формальдегид) с рН 7,3-7,4. Глутаровый альдегид используют в концентрации 0,1-4%, формальдегид – 0,5-4%. Объем кусочков ткани должен составлять 1 мм<sup>3</sup>. Объем фиксатора должен превышать объем ткани в 1000 раз.

Образцы тканей или органов можно замораживать при температуре минус 20-22°C и ниже и доставлять в лабораторию в замороженном виде.

## **2.2. Детекция и изоляция вируса ИАЦ**

Диагностика ИАЦ общепринятыми методами затруднена. Однако для постановки окончательного диагноза необходимо выделить и идентифицировать возбудителя. Вирус ИАЦ можно выделить практически из всех органов, а также из помета инфицированной птицы. Максимальный титр вируса выявляется на 7-ой день после заражения. Лучшим источником ВАЦ является печень, так как в печени установлено наиболее устойчивое высокое содержание вируса.

Для первичного выделения ВАЦ используют суточных цыплят, не имеющих антител к ВАЦ, которым внутримышечно или внутрибрюшинно инокулируют гомогенат печени. Также можно использовать суспензии селезенки и лейкоцитов.

На 14-16 или 14-21 сутки проводят гематологическое исследование зараженных цыплят с целью определения уровня гематокрита. В случае развития болезни наблюдается падение гематокрита ниже 27% или атрофия костного мозга. Биопроба на чувствительных суточных цыплятах является наиболее специфичным и достаточным методом для постановки окончательного диагноза.

При экспериментальном заражении цыплят гомогенатом печени, отобранной от павших с признаками ИАЦ птиц, наблюдается отставание в росте, развитие в течение 10-ти суток апластической анемии, сопровождающейся снижением эритроцитов, лейкоцитов и тромбоцитов, общая атрофия лимфоидных органов. Гибель инфицированных цыплят в период с 12 по 24 сутки может достигать 50%.

Для биопробы также могут быть использованы 4-5-суточные СПФ-куриные эмбрионы. Заражение развивающихся куриных эмбрионов производят в желточный мешок. Вирус накапливается во всех тканях эмбриона. Пик накопления отмечается на 14-е сутки после инокуляции. Наибольшая концентрация вируса отмечается в соматической ткани эмбриона, в желточном мешке (желтке), печени, хориоаллантоисной оболочке. Изменения у эмбрионов в большинстве случаев отсутствуют. Поэтому уровень накопления вируса определяют путем титрации эмбрионального вирусосодержащего материала на культуре лимфобластоидных клеток MDCC-MSB1 или на суточных СПФ-цыплятах.

Для выделения вируса ИАЦ *in vitro* и титрования предпочтительно использовать клеточные культуры MDCC-MSB1. Также можно использовать клеточные культуры MDCC-JP2 и другие лимфобластоидные линии Т-клеток и В-клеток. Состояние зараженных культур MDCC-MSB1 контролируют под микроскопом по наличию морфологических изменений в клетках. Специфическое цитопатическое действие проявляется разрушением ядра и деградацией клеток.

Для выделения ВАЦ можно использовать СПФ-куриные эмбрионы 5-6 суточного возраста, с последующей инкубацией до 19-20 суточного возраста. От погибших и живых эмбрионов отбирают пробы печени. Для дальнейшего выделения изолятов вируса используют перевиваемую культуру MDCC-MSB1.

Сотрудниками ВНИВИП разработаны «Методические рекомендации по культивированию вируса инфекционной анемии цыплят в перевиваемой линии культуры клеток MDCC-MSB1 и СПФ-куриных эмбрионах».

Еще одним способом подтверждения диагноза является определение наличия антигенов вируса или вирусспецифической ДНК в тимусе и костном мозге. Определение можно проводить посредством *in situ* гибридизации с использованием биотинизированного ДНК-зонда. Данным методом можно выявлять антиген ВАЦ в фиксированных формалином срезах.

### **2.3. Молекулярно-биологические методы исследований**

Наиболее чувствительным, доступным и легко воспроизводимым для выявления вируса ИАЦ по сравнению с другими существующими методами является метод с использованием полимеразно-цепной реакции (ПЦР).

С помощью ПЦР устанавливают факт репликации ВАЦ в культуральной среде и в культуре клеток. При исследовании культуральной жидкости с помощью ПЦР, проводят типирование вирусного изолята при наличии ЦПД в культуре клеток. ПЦР также позволяет выявлять возбудителя в патологическом материале, отобранном от павших или вынужденно убитых птиц (в замороженном или зафиксированном), в тканях и жидкостях инфицированных эмбрионов, в помете и др. Количественную ПЦР используют для контроля за накоплением ВАЦ в биологических системах при проведении вирусологических исследований и при производстве биопрепаратов.

Идентификацию выделенных изолятов вируса ИАЦ осуществляют посредством геномного секвенирования.

### **2.4. Серологические методы исследований**

Для серологической диагностики инфекционной анемии цыплят используют реакцию нейтрализации (РН), реакцию непрямой иммунофлуоресценции (РНИФ), реакцию диффузионной преципитации (РДП) и иммуноферментный анализ (ИФА).

Для постановки РН пробы сыворотки крови (или экстракты яичного желтка), разведенные путем двукратных серийных разведений смешиваются с равными частями суспензий ВАЦ, содержащих 200-500 50%-х тканевых культуральных

инфекционных доз в 0,1 мл. Смеси выдерживаются в течение 60 минут при температуре 37°C или при температуре 4°C в течение ночи перед выполнением анализа в культуре клеток MSB1. Для завершения анализа может потребоваться до 5-ти недель и 8-9 субкультур. Ускорить проведение анализа можно за счет увеличения концентрации вируса в смеси до 105,0-105,5 50%-х культуральных инфекционных доз в 0,1 мл. При этом субкультуры не требуются и через 2-3 суток инокулированные культуры клеток исследуют микроскопически на наличие цитопатического эффекта, характерного для ИАЦ.

Инфицированные ВАЦ клетки MSB1 собираются для постановки непрямой РИФ непосредственно перед началом исследования. Исследование проводят через 36-42 часа после инокуляции клеточной культуры. Инфицированные клетки (антиген) помещают на предметное стекло и закрепляют ацетоном. Сначала добавляют тестовую сыворотку для исследования, а затем антивидовую сыворотку, помеченную флуоресцеином. Наличие антител в контрольной сыворотке определяют по наличию ярко-зеленого флуоресцентного свечения в ядрах и цитоплазме клеток.

В реакции диффузионной преципитации можно выявлять как антитела к ВАЦ, так и антиген вируса инфекционной анемии цыплят.

Для определения наличия и уровня антител против вируса ИАЦ в сыворотке крови кур разработаны различные методы твердофазного иммуноферментного анализа. Иммуноферментный анализ является более чувствительным методом, чем реакция нейтрализации и РИФ. В коммерческих наборах для выявления антител к ВАЦ в качестве антигена-мишени используют либо моноклональные антитела, которые захватывают ВАЦ, частично очищенный от инфицированных клеточных культур MSB1, либо частично очищенный вирус наносят непосредственно на поверхность плашек. Перспективным является метод ИФА на основе рекомбинантного антигена VP1 вируса инфекционной анемии цыплят.

При исследовании сывороток крови в ИФА необходимо учитывать феномен иммунологической толерантности, характерный для ИАЦ. В случае выявления отрицательных значений титров антител к ВАЦ после клинического переболевания

птицы, необходимо 20-25 голов от исследуемой партии оставить для передержки на срок от 14 до 21 суток и затем провести повторное исследование.

### **2.5. Гематологическое исследование**

Гематологическое исследование крови – доступный метод исследований, на основании результатов которого можно поставить предварительный диагноз на ИАЦ. Снижение значений гематокрита от 6 до 27% при клиническом исследовании крови в совокупности с изменениями в костном мозге (желтоватый или серовато-розовый цвет) и атрофией тимуса может указывать на инфицирование птицы ВАЦ. В зависимости от стадии болезни в мазках крови выявляют лейкопению или панцитопению (низкое содержание всех форменных элементов крови). При ИАЦ отмечается снижение уровня гемоглобина и количества эритроцитов, что приводит к уменьшению объема кислорода в крови и, как следствие, к гипоксии.

### **2.6. Гистологическое исследование**

Быстро воспроизводимым и достаточно информативным методом диагностики ИАЦ является гистологическое исследование. Еще одним диагностическим методом считается иммуногистологический анализ тимуса.

Для диагностики ИАЦ также можно использовать иммуногистохимический анализ. Это метод морфологической диагностики, в основе которого лежит визуализация и оценка с помощью микроскопа результатов реакции антиген-антитело в срезах биопсированной ткани. В качестве антигена выступают компоненты клеточных структур или межклеточного вещества ткани. Исследуемую ткань обычно обрабатывают антителами к антигену, который хотят в ней выявить. Затем обрабатывают антителами к диагностическим антителам. Эти антитела содержат либо краситель, либо фермент, которые затем могут быть легко выявлены. Ценность метода иммуногистохимии заключается в том, что он базируется на строго специфических реакциях между диагностическими антителами и комплементарными им антигенами.

### **2.7. Электронно-микроскопическое исследование**

Для детекции и идентификации вируса ИАЦ можно использовать электронную микроскопию. Электронная микроскопия позволяет изучать

биологические объекты, размеры которых менее 0,2 мкм, т.е. находятся за пределами разрешающей способности светового микроскопа. В настоящее время электронная микроскопия позволяет изучать не только строение, но и функции структурных элементов, например, вирусов.

Для обнаружения вируса ИАЦ при электронно-микроскопическом исследовании используют метод негативного контрастирования.

Метод негативного контрастирования (или «окрашивания») позволяет проводить диагностику инфекций различной этиологии и контроль биопрепаратов на контаминацию. Негативное контрастирование обеспечивает получение более высокого разрешения при исследовании объемных биологических объектов, чем при использовании ультратонких срезов. Биологический объект при исследовании данным методом погружен в электронно-плотное вещество, которое не окрашивает его, а создает вокруг него темный фон. Контрастным веществом может быть, к примеру, фосфорно-вольфрамовая кислота при нейтральном значении рН или урановая соль муравьиной кислоты, при использовании которой достигается более высокое разрешение. Для негативного окрашивания также могут быть использованы уранилформиат, молибденацетат, фосфорно-вольфрамовокислые натрий и калий, кремниевольфрамовокислый натрий.

Гомогенат печени зараженных цыплят концентрируют, очищают с применением раствора сульфата аммония и центрифугируют. Затем осадок ресуспендируют в 0,01 молярном фосфатно-буферном растворе с рН 7,2-7,4, экстрагируют хлороформом, с последующей обработкой вируса 0,5% раствором додецилсульфата натрия. Осаждение вируса проводят центрифугированием при 45000 об/мин в течение 4 часов. Осадок ресуспендируют 1/500 исходного объема гомогената.

Вирусные частицы возбудителя ИАЦ с помощью электронной микроскопии можно обнаружить только в сильно очищенных препаратах инфицированных клеточных культур. В ультратонких срезах инфицированных клеточных культур или тканях кур выявить и идентифицировать вирусные частицы очень трудно. В

настоящее время разработан метод иммуноэлектронной микроскопии для обнаружения вируса ИАЦ.

### **2.8. Дифференциальная диагностика ИАЦ**

Инфекционную анемию цыплят необходимо дифференцировать от болезней, которые сопровождаются иммунодепрессивным состоянием и анемией, таких как инфекционная бурсальная болезнь, апластическая анемия при вирусных болезнях (лимфоидный лейкоз, миелоидный лейкоз, эритроидный лейкоз, болезнь Марека), аденовирусная инфекция, гиповитаминоз В<sub>12</sub>, фолиеводефицитная и железодефицитная анемии, афлотоксикоз, отравления сульфаниламидами.

Инфекционная анемия цыплят и ИББ имеют сходные клинические и патологоанатомические признаки, такие как отставание в росте и развитии, депрессия, взъерошенность оперения, кровоизлияния в мышцах и на границе мышечного и железистого желудков, наличие экссудата и кровоизлияний в бурсе, повышенная смертность, которые могут проявляться как при инфицировании цыплят высоковирулентными вирусами ИАЦ и ИББ в виде моноинфекции, так и при коинфекции ИАЦ и ИББ. При ИББ основные патоморфологические изменения развиваются в фабрициевой сумке. При субклинической форме ИББ или ассоциированной форме течения ИАЦ и ИББ видимые патологические изменения в бурсе не имеют характерных признаков, поэтому установить диагноз можно только при проведении лабораторных исследований.

Для лимфоидного лейкоза характерно образование саловидных лимфоидных опухолей в селезенке, легких, железистом желудке, кишечнике, печени, почках, фабрициевой сумке. Болезнь проявляется у половозрелой птицы. В ассоциации с лимфоидным лейкозом может протекать остеопетроз (возбудитель – вирус лейкоза), который сопровождается иммунодепрессией, апластической анемией, атрофией фабрициевой сумки и тимуса. Отличительной особенностью при остеопетрозе является поражение костной ткани тазовых конечностей.

При миелоидном лейкозе (миелобластозе) фабрициева сумка и тимус обычно не имеют поражений. Опухоли, сформированные из клеток миелоидного ряда, формируются в печени, селезенке, почках, яичниках, в сердце, на серозных

покровах, в коже. Костный мозг при миелобластозе имеет водянистую структуру и светло-красный цвет. Болеют преимущественно взрослые куры.

При эритроидном лейкозе, в зависимости от формы течения, отмечают такие признаки как разжижение и бледность костного мозга, анемию печени, почек, селезенки, а также асциты со студневидным выпотом, кровоизлияния во внутренних органах или под кожей. Отличительной особенностью является увеличение селезенки, печени и почек в 3-5 раз. В мазках крови, костном мозге и во внутренних органах обнаруживают большое количество незрелых форм эритроцитов.

Иммуносупрессия при болезни Марека подразделяется на раннюю фазу, во время которой происходит разрушение лимфоцитов в лимфоидных органах и развитие выраженной атрофии фабрициевой сумки и тимуса и позднюю фазу – фазу реактивации вируса из латентного состояния и развития опухолей различной формы и размеров в легких, половых органах, печени, почках, сердце, железистом желудке и в других органах. В зависимости от формы течения болезни, при БМ выявляют: утолщение плечевого, пояснично-крестцового нервных сплетений, седалищных и др. нервов в 1,5-2 раза, размягчение и изменение окраски нервных стволов, приводящие к хромоте, парезам и параличам конечностей, шеи, хвоста; поражение перьевых фолликулов и образование опухолей на коже в виде наростов чаще в области груди и голени; сероватое окрашивание радужной оболочки глаз и деформацию зрачка.

Аденовирусная инфекция благодаря широкой антигенной вариабельности возбудителя характеризуется многообразием клинических и патоморфологических признаков. Наиболее актуальной и распространенной формой аденовирусной инфекции является аденовирусный гепатит с тельцами включениями-гидроперикардит. Патологоанатомические изменения представлены анемией, желтушностью кожных покровов и подкожной клетчатки, наличием геморрагий в мышцах и подкожной клетчатке, атрофией бурсы и других лимфоидных органов, при сопутствующих инфекциях может развиваться гангренозный дерматит. Отличительными патоморфологическими признаками являются гепатит (печень

увеличена, желтушная, дряблая с гемorragиями и очагами некроза), гидроперикардит с наличием прозрачного транссудата в сердечной сорочке и обнаружение внутриядерных телец-включений в гепатоцитах.

При гиповитаминозе В<sub>12</sub> и фолиеводефицитной анемии отмечается выраженная эритропения, при которой количество эритроцитов снижается в 3-4 раза. При В<sub>12</sub>-гиповитаминозе выявляют «синий» костный мозг, что связано с нарушением эритропоэза и процесса дифференциации клеток эритроидного ряда. У молодняка развивается злокачественная анемия, происходит задержка роста и развития, отмечается воспаление слизистой оболочки мышечного желудка, плохая оперяемость, дерматиты в области шеи и головы, повышается восприимчивость к инфекционным болезням. Также наблюдается васкуляризация роговицы («кровоной» глаз), скрючивание пальцев, у кур-несушек - снижение яйценоскости.

Железодефицитная анемия характеризуется снижением уровня эритроцитов, гемоглобина и гематокрита. При этом содержание лейкоцитов и тромбоцитов обычно находится в пределах нормы.

Клинические симптомы при афлатоксикозе характеризуются отставанием в росте, анорексией, бледностью кожных покровов и видимых слизистых оболочек («синдром бледной птицы»), проблемами с нижними конечностями, снижением яичной продуктивности. Также отмечается повышенная чувствительность к бактериальным инфекциям и стрессам. При патологоанатомическом вскрытии обнаруживают специфические висцеральные гемorragии, кровоподтеки, возникающие вследствие повышения хрупкости капилляров и снижения уровня протромбина. Наличие гемorragий и кровоподтеков значительно снижает категориальность тушек у бройлеров. Также выявляют жировое перерождение и некроз печени, гиперплазию желчных протоков.

Передозировка или длительное применение сульфаниламидных препаратов могут вызывать гемorragический диатез, угнетение процессов кроветворения в костном мозге, тромбоцитопению, иммунодепрессию. В костном мозге, селезенке, печени, почках могут наблюдаться явления гемосидероза, гиалинизации и аномального разрастания соединительной ткани (фиброплазии).

### 3. ПРОФИЛАКТИКА ИНФЕКЦИОННОЙ АНЕМИИ ЦЫПЛЯТ

#### 3.1. Иммуниетет

Как клиническая, так и субклиническая формы инфекционной анемии цыплят являются иммунодепрессивными. На фоне заражения ВАЦ имеет место угнетение поствакцинального иммунитета против вирусов болезни Марека, ньюкаслской болезни, инфекционной бурсальной болезни, инфекционного бронхита кур и герпесвируса индеек, против возбудителей эймериозов. Так вакцинация суточных цыплят, инфицированных вирусом ИАЦ, вакциной против НБ из штамма «Ла-Сота» сопровождается поствакцинальными осложнениями в виде угнетения, конъюнктивита, нарушения дыхания, взъерошенности оперения и повышения смертности до 30%. Причиной поражений при этом являются функциональные нарушения цитотоксических Т-лимфоцитов и естественных киллеров. Установлено, что в хозяйствах, неблагополучных по ИАЦ, уровень иммунного ответа на живую вакцину против ньюкаслской болезни из штамма «Ла-Сота» может снижаться до 40%, на инактивированную вакцину против НБ до  $4,6 \log_2$  по сравнению с иммунным ответом у здоровых цыплят.

Многочисленными исследованиями доказано, что у кур на фоне иммуносупрессии, обусловленной ИАЦ, наблюдается повышенная чувствительность к инфекциям вирусной, бактериальной и грибковой этиологии. При одновременном заражении цыплят вирусом ИАЦ и аденовирусом, или реовирусом, или вирусом ньюкаслской болезни происходит усиление патогенности перечисленных возбудителей.

Вирус ИАЦ вызывает специфические поражения лимфоидной ткани, вследствие чего образуются дефекты в иммунной функции организма. Даже при субклиническом течении ИАЦ, когда заражение цыплят происходит после снижения уровня материнских антител, происходит угнетение иммунной функции, вследствие селективного инфицирования клеток-предшественников первичных лимфоидных органов. Результатами многочисленных исследований было подтверждено, что ВАЦ при репликации повреждает и разрушает лимфоциты кортикальной области тимуса, т.е. ВАЦ инфицирует Т-клетки предшественники.

T-лимфоциты кортикальной области тимуса отвечают за выработку клеточного иммунитета, который важен для защиты против целого ряда болезней, в том числе против болезни Марека и кокцидиоза.

При разрушении клеток костного мозга развивается анемия и происходит уменьшение числа циркулирующих лейкоцитов. При инфицировании вирус вызывает деструктивные изменения миелоидных T-предшественников в костном мозге, увеличивающих число моноцитов, а также негативно влияет на функцию макрофагов. У инфицированных цыплят макрофаги теряют способность продуцировать интерлейкин-1, играющий главную роль в индукции противовоспалительного ответа. Угнетение продукции интерлейкина-1, а также уменьшение Fc-рецепторов и фагоцитарной активности значительно снижает способность инфицированных цыплят продуцировать эффективный иммунный ответ на заражение и, как следствие, провоцирует возникновение вторичных бактериальных инфекций.

Пассивный иммунитет защищает цыплят от заражения ВАЦ, в том числе и от экспериментального, в течение 2-3-х недель. Однако данное утверждение верно только в том случае, если отсутствуют какие-либо факторы, негативно влияющие на состояние иммунной системы цыпленка. Активно иммунизированные куры родительских стад являются источником вируса ИАЦ и передают его трансвариально.

При экспериментальном заражении цыплят ВАЦ в течение первых восьми суток после вакцинации против БМ в суточном возрасте, инфекция, вызванная ВАЦ, вызывает подавление выработки иммунитета против болезни Марека до 14-суточного возраста. При инфицировании ВАЦ также возможно ослабление реакции организма на введение инактивированной вакцины против НБ, ИБК и ИББ и, как следствие, низкий уровень гуморального иммунитета против данных инфекций. Одновременное инфицирование цыплят (как вакцинированных против БМ, так и зараженных герпесвирусом индеек) в возрасте 14-21 сутки вирусами ИАЦ и ИББ провоцирует проявление у цыплят синдрома внезапной смерти и значительно угнетает поствакцинальный иммунный ответ против герпесвируса

индеек. При совместном инфицировании ВАЦ и вирусом ИББ наблюдается усиление патогенности вируса ИББ, что увеличивает иммунодепрессивное воздействие на организм птицы. Также при одновременном заражении цыплят вирусами ИАЦ и ИББ, имеет место значительное уменьшение Т-клеток и популяции макрофагов в тимусе и селезенке, по сравнению с моноинфекцией ИАЦ.

Негативное влияние ВАЦ на выработку иммунного ответа происходит за счет повреждения гемопоэтической и лимфопоэтической систем с последующим генерализованным истощением лимфоцитов, а также в результате временного снижения функции макрофагов и уменьшения выработки цитокинов. Пониженная активность лимфоцитов и угнетение процесса формирования антител проявляется неадекватной реакцией на введение какой-либо вакцины, низким уровнем иммунного ответа, повышением чувствительности к различным раздражителям, прежде всего к патогенной и условно-патогенной микрофлоре, попадающей в организм птицы через респираторный тракт. Подавление иммунитета у цыплят, вероятно, сопряжено с присутствием явных патоморфологических признаков генерализованной атрофии лимфоидных органов и тканей.

### **3.2. Неспецифическая профилактика ИАЦ**

Неспецифическая профилактика инфекционной анемии цыплят включает:

- завоз племенного и гибридного молодняка и яйца из благополучных по инфекционной анемии цыплят хозяйств или от вакцинированных родителей/прародителей;
- повышение уровня биологической защиты, выполнение ветеринарно-санитарных требований, предъявляемых к птицеводческим хозяйствам закрытого типа;
- создание благоприятных условий содержания и кормления;
- профилактика стрессов различной этиологии;
- предотвращение коинфекции ИАЦ и ИББ, ИАЦ и болезни Марека и с другими иммунодепрессивными болезнями;

- применение пробиотиков, пребиотиков, фитобиотиков, сокращение применения антибактериальных средств, оказывающих иммунодепрессивный эффект;
- максимально возможная замена живых вакцин на инактивированные или генно-инженерные/рекомбинантные вакцины;
- разработка схем поддержки иммунной системы с использованием комплексных витаминных препаратов, иммуномодуляторов, препаратов растительного происхождения и др., обладающих иммуностимулирующим/иммуномодулирующим эффектом.

### **3.3. Специфическая профилактика ИАЦ**

Для предотвращения вертикальной передачи вируса ИАЦ необходимы иммунизация птицы родительских стад до начала яйцекладки и мониторинг на наличие у нее антител к ВАЦ в период выращивания.

В некоторых странах в не контаминированные вирусом ИАЦ помещения помещают подстилку или добавляют в питьевую воду гомогенат тканей, полученных от зараженных цыплят с целью инфицирования и формирования антител у птицы родительского стада до начала периода яйцекладки, что уменьшает риск трансвариальной передачи ВАЦ. Однако данный способ специфической профилактики несет риск заражения и возникновения синергетического эффекта с другими иммунодепрессивными вирусами, а также формирует высокий уровень вируса в популяции птиц.

При иммунизации против ИАЦ имеет значение возраст птицы. К примеру, при использовании аттенуированного штамма вируса ИАЦ для иммунизации суточных СПФ-цыплят наблюдались снижение гематокрита, анемия и патоморфологические изменения в органах гемопоэза и лимфоидных органах (деплегия и апоптоз тимоцитов в тимусе и лимфоцитов в селезенке). Поэтому была разработана вакцина на основе мутантного штамма «E116G» вируса ИАЦ для иммунизации цыплят суточного возраста. Применение инактивированной вакцины против ИАЦ в суточном возрасте не вызывает формирования гуморального

иммунного ответа в связи с неполной структурной организацией вторичных лимфоидных органов у цыплят раннего возраста.

При проведении специфической профилактики ИАЦ живыми вакцинами следует учитывать тот факт, что вакцинный вирус ИАЦ, как и полевой, передается трансвариально и горизонтально. Авирулентные и аттенуированные вакцинные штаммы вируса ИАЦ, который обладает выраженными иммуносупрессорными свойствами, могут обладать остаточной патогенностью, что сопровождается осложнениями в виде возникновения бактериальных инфекций, а также могут вызывать проявление клинических признаков у молодых цыплят. Установлено, что аттенуированные штаммы ИАЦ не стабильны и способны реверсировать к исходной патогенности через несколько пассажей на маленьких цыплятах.

Репликация вакцинного штамма вируса в тимусе и его персистенция в организме некоторых птиц вызывают расстройства тимопоэза, такие же как у птиц, инфицированных патогенными вирусами ИАЦ. Некоторые аттенуированные штаммы вируса ИАЦ могут вызывать субклинические инфекции, которые не сопровождаются анемией или какими-либо существенными поражениями.

У иммунизированных в раннем возрасте живыми вакцинами против ИАЦ цыплят отмечается длительная персистенция вакцинного ВАЦ в организме и его негативное воздействие на лимфоидную ткань, что потенциально может играть важную роль в развитии субклинических инфекций и влиять на уровень чувствительности к другим патогенам.

В настоящее время проводятся исследования по созданию иммунокомплексных вакцин против ИАЦ. Иммунокомплексная вакцина в своем составе содержит вирус и специфические антитела. Иммунокомплексная вакцина вводится цыплятам в суточном возрасте или *in ovo* и работает по принципу симультанной иммунизации. Однако для создания коммерческих иммунокомплексных вакцин необходимы дополнительные исследования.

Проблемой живых аттенуированных вакцин против ИАЦ является вероятность неполной аттенуации вакцинного вируса ИАЦ. Поэтому в мире предпринимаются попытки создания субъединичных вакцин. Для получения

рекомбинантного белка VP1 используют *E.coli* и системы растений. Однако трудности, связанные с экспрессией гена VP1, до настоящего времени не позволяют разработать безопасную и эффективную вакцину против ВАЦ.

В последние годы ведутся разработки по конструированию ДНК-вакцин против ИАЦ. ДНК-вакцины являются безопасными, стабильными и способны индуцировать как гуморальный, так и клеточный иммунный ответ. Вируснейтрализующие антитела против ВАЦ индуцируются при инокуляции ДНК-вакцинами на основе плазмид, содержащих в векторе белки VP1 и VP2 одновременно.

Разработаны инактивированные вакцины против ИАЦ. Чтобы инактивированная вакцина была эффективной, необходимо, чтобы она содержала антиген вируса ИАЦ имеющий до инактивации титр вируса выше  $10^{7,5}$  TCID<sub>50</sub> в дозе, предпочтительнее выше, чем  $10^{8,0}$  TCID<sub>50</sub> или  $10^{9,0}$  TCID<sub>50</sub>. Однако достичь высокого титра вируса для производства эффективной инактивированной вакцины является проблемой и данные вакцины не представлены на рынке. Установлено, что титры антител у кур выше 1:5000 в ИФА защищают потомство от ВАЦ в течение первых 4-х недель жизни.

В последнее время ведутся широкие исследования по созданию генно-инженерных вакцин против инфекционной анемии цыплят, но эффективных коммерческих вакцин до сих пор не представлено.

Проводятся исследования по разработке вакцин с использованием различных стимуляторов иммуногенеза, таких как куриный IL-12, цитокины и др., которые способны повысить эффективность вакцины за счет повышения иммуногенности антигенов посредством стимуляции гуморального или клеточного иммунного ответа. Такая вакцина может обеспечить эффективную защиту против ИАЦ, исключая недостатки живых аттенуированных вакцин.

Специфическую профилактику против инфекционной анемии цыплят в птицеводческих хозяйствах проводят с использованием живых коммерческих вакцин. Вакцинируют серонегативный ремонтный молодняк родительских стад и молодняк промышленных стад кур-несушек, начиная с 6-недельного возраста, но

не позднее, чем за 6 недель до начала яйцекладки. В РФ применяются живая эмбриональная вирус вакцина из штамма «Сух-1» производства немецкой компании «TAD Animal Health» и культуральная вирусвакцина из штамма «26P4» производства компании «MSD Animal Health» (США) «Nobilis CAV P4». Вакцину применяют, в зависимости от производителя, различными методами, такими как: выпаивание с питьевой водой, подкожно, внутримышечно или в перепонку крыла.

Не рекомендуется проводить вакцинацию ремонтного молодняка против ИАЦ при наличии в сыворотках крови антител к данному возбудителю в результате естественного инфицирования, так как происходит элиминация вакцинного вируса антителами. Вакцинацию следует проводить в неблагополучных по ИАЦ хозяйствах до появления в сыворотке крови антител к вирусу ИАЦ.

На уровень иммунного ответа оказывает влияние уровень аттенуации вакцинного вируса и метод введения вакцины. Многими исследованиями установлено, что средний титр антител к вирусу ИАЦ в ИФА при использовании вакцин из слабо аттенуированных штаммов вируса ИАЦ (Сух-1 strain) методом выпаивания независимо от возраста выше, чем при иммунизации птицы вакцинами, содержащими высоко аттенуированные штаммы вируса ИАЦ методом внутримышечного введения. При внутримышечном введении средний титр антител снижается с увеличением возраста иммунизируемой птицы. Уровень материнских антител (МАТ) у цыплят, полученных от родителей, вакцинированных методом выпаивания также выше по сравнению с уровнем МАТ у цыплят, полученных от родителей, вакцинированных внутримышечно.

Нарушение технологии вакцинации, вакцинация неполной дозой или отсутствие вакцинации родительских стад приводит к получению серонегативного потомства, восприимчивого к вирусу ИАЦ и переболеванию птицы в клинической или субклинической форме. Иммунизация полной дозой вакцины методом выпаивания вызывает выработку специфических антител в высоких титрах и обеспечивает их передачу потомству.

В настоящее время ученым удалось расшифрованный геном вируса ИАЦ встроить в плазмидный вектор, способный репродуцироваться в культуре клеток, а

также разработать технологию получения рекомбинантных вирусных антигенов VP1 и VP3. Антигены VP1, VP2, VP3 отвечают за патогенность и персистенцию вируса в организме птицы. В Японии получена аттенуированная вакцина из штамма ВАЦ с заменой 394 пары нуклеотидов в белке VP1. В Нидерландах разработаны и проходят испытания серии рекомбинантных субъединичных вакцин с использованием бакуловируса в качестве векторов генов VP1, VP2, VP3.

Вследствие того, что патогенность ВАЦ усиливается при коинфекции с вирусом инфекционной бурсальной болезни, то профилактика инфекционной бурсальной болезни является составляющей частью профилактики ИАЦ.

При ассоциированном течении ИББ и ИАЦ птица находится в состоянии глубокой иммунодепрессии, что приводит к неадекватному иммунному ответу на вакцинацию и резко увеличивает количество случаев поражения птицы секундарными инфекциями, прежде всего колибактериозом.

Стабилизировать эпизоотическую ситуацию при ассоциированном течении ИББ и ИАЦ можно путем замены живой вакцины против ИББ на инактивированную или векторную вакцину. Вакцинацию проводят в суточном возрасте, при условии однородного материнского иммунитета, с уровнем антител, достаточным для защиты цыпленка до 15-ти суточного возраста, т.е. не ниже 1:2000 в ИФА.

## РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



## ПАТЕНТ

НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

№ 2646116

**ШТАММ ВИРУСА ИНФЕКЦИОННОЙ АНЕМИИ  
ЦЫПЛЯТ "МЕ-77" ДЛЯ ПРОИЗВОДСТВА  
ИНАКТИВИРОВАННЫХ СОРБИРОВАННЫХ И  
ЭМУЛЬГИРОВАННЫХ ВАКЦИН И ДИАГНОСТИКУМОВ**

Патентообладатель: *Федеральное государственное бюджетное научное учреждение Федеральный научный центр "Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт птицеводства" Российской академии наук (RU)*

Авторы: *Дмитриева Маргарита Евгеньевна (RU),  
Балендор Евгений Валентинович (RU)*

Заявка № 2016152775

Приоритет изобретения 30 декабря 2016 г.

Дата государственной регистрации в

Государственном реестре изобретений

Российской Федерации 01 марта 2018 г.

Срок действия исключительного права

на изобретение истекает 30 декабря 2036 г.

*Руководитель Федеральной службы  
по интеллектуальной собственности*

*Г.П. Нелыев*

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

(19) **RU** (11) **2 646 116**<sup>(13)</sup> **C1**(51) МПК  
C12N 7/00 (2006.01)  
A61K 39/12 (2006.01)ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК  
C12N 7/00 (2006.01); A61K 39/12 (2006.01)

(21)(22) Заявка: 2016152775, 30.12.2016

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
30.12.2016Дата регистрации:  
01.03.2018

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 30.12.2016

(45) Опубликовано: 01.03.2018 Бюл. № 7

Адрес для переписки:

188515, Ленинградская обл., Ломоносовский р-он, д. Келози, 7, кв. 29, Дмитриевой Маргарите Евгеньевне

(72) Автор(ы):

Дмитриева Маргарита Евгеньевна (RU),  
Балендор Евгений Валентинович (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Федеральное государственное бюджетное  
научное учреждение Федеральный научный  
центр "Всероссийский  
научно-исследовательский и  
технологический институт птицеводства"  
Российской академии наук (RU)(56) Список документов, цитированных в отчете  
о поиске: RU 2489487 C1, 10.08.2013. EP  
1132466 A1, 12.09.2001. ZHANG X. ET AL.  
Assessing the efficacy of an inactivated chicken  
anemia virus vaccine. VACCINE. 2015, V.33,  
P.1916-1922.(54) ШТАММ ВИРУСА ИНФЕКЦИОННОЙ АНЕМИИ ЦЫПЛЯТ "МЕ-77" ДЛЯ ПРОИЗВОДСТВА  
ИНАКТИВИРОВАННЫХ СОРБИРОВАННЫХ И ЭМУЛЬГИРОВАННЫХ ВАКЦИН И  
ДИАГНОСТИКУМОВ

(57) Реферат:

Настоящее изобретение относится к вирусологии и ветеринарии. Предложен штамм вируса инфекционной анемии цыплят «МЕ-77», выделенный из печени клинически больных цыплят-бройлеров из промышленного птицеводческого хозяйства ООО «Торгово-птицеводческая компания «Балтптицепром» (г. Калининград) и депонированный в Государственную коллекцию вирусов НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского ФГБУ «ФНИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава

России 20 декабря 2016 года под регистрационным номером 2837. Предложенный штамм «МЕ-77» обладает стабильной вирулентностью для восприимчивой птицы, выраженной антигенной и иммуногенной активностью, пригоден для использования в производстве инактивированных сорбированных и эмульгированных вакцин и средств для лабораторной диагностики инфекционной анемии цыплят. 2 пр.

RU 2 646 116 C 1

RU 2 646 116 C 1



**ООО «ТПК «БАЛТПТИЦПРОМ»**

## **СПРАВКА**

В ООО ТПК «Балтптицепром» в 2016 году внедрена система профилактики инфекционной анемии цыплят, разработанная Балендором Е.В. в период его работы на птицефабрике в должности Главный Ветеринарный Врач. Внедрение системы, позволило существенно снизить количество случаев клинического проявления инфекционной анемии цыплят, улучшить показатели выращивания и качество выпускаемой мясной продукции. Разработанная система профилактики инфекционной анемии цыплят применяется при выращивании цыплят-бройлеров по настоящее время.

28.06.2021 год

Генеральный директор



А.Л.Шевченко