

НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК АЗЕРБАЙДЖАНА

ИНСТИТУТ МИКРОБИОЛОГИИ

На правах рукописи

ЗЕЙНАЛОВА ШАЛАЛА КАРАМ КЫЗЫ

**ЕПИЗОТОЛОГИЯ НЬЮКАСЛСКОЙ БОЛЕЗНИ ПТИЦ В
АЗЕРБАЙДЖАНЕ И УСОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ МЕТОДОВ
ДИАГНОСТИКИ**

3109.01-ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология,
микотоксикология с микологией и иммунология

АВТОРЕФЕРАТ

Диссертации на соискание ученой степени
доктора философии по аграрным наукам

БАКУ-2014

Основная часть работы выполнена в Азербайджанском Научно Исследовательском Ветеринарном Институте, а другая часть выполнена в Республиканской Ветеринарной Лаборатории.

Научный руководитель:

Доктор ветеринарных наук, профессор

Э.М.Агаева

Официальные опоненты:

Доктор биологических наук Ф.М. Кулибеков

Доктор сельскохозяйственных наук М.Г.Доундашвили

Ведущая организация: **Азербайджанский Государственный Аграрный Университет, кафедра эпизоотологии, микробиологии и паразитологии**

Защита состоится «_15_» _12_ 2014 года в ____ часов на заседании Диссертационного Совета FD 01.222 при Институте Микробиологии НАН Азербайджанской Республики по адресу: AZ1073, г.Баку, Патамдартское шоссе 40.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института Микробиологии НАН Азербайджана.

Автореферат разослан «__» _____ 2014 г.

Ученый секретарь Диссертационного
Совета FD 01.222, д.ф. по б.

Ф.Х.Гахраманова

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность работы. Птицеводство является одной из основных стратегических линий экономического развития различных стран мира. Однако препятствием на пути его развития является распространение массовых инфекционных болезней. Среди множества нозологических форм инфекционных болезней животных, в том числе и птиц, вирусная патология вышла на первое место, составляя 70% всех заболеваний. Наиболее важным для птицеводства является особо опасные и экономически значимые болезни кур-болезнь ньюкасла (БН), грипп птиц (ГП), инфекционная бурсальная болезнь (ИББ), инфекционный бронхит кур (ИБК), реовирусная инфекция птиц (РВП), инфекционный энцефаломиелит птиц (ИЭП) и др. [Сюрин В.Н. и др., 1998, Гериллов А.П. 2007, Михайлова В.В. и др., 2009, Alexander DJ. 2009].

Рост числа случаев БН, регистрируемый в последние годы во многих странах мира (Европа, Америка, Азия, Африка) в том числе и в Азербайджане выдвинул эту болезнь в ряд актуальнейших проблем [Alexander D.J., 2001, Лимаренко А.А. и др., 2004, Аристов В.А. и др., 2006, Бакулин В.А. 2006, Бессарабов Б. Ф., Воронин А. А. 2007].

Так, по данным МЭБ с июля 2008 по 2009 гг БН зарегистрирована в 87 странах мира [OIE, www.oie.int, 1992]. Удерживается стойкая тенденция к возрастанию количества случаев возникновения БН.

Вследствие огромного экономического ущерба, наносимого БН, ВОЗ относит её к группе наиболее опасных болезней птиц-список А. Гибель птиц при вспышках БН может достигать 100% [Алесгеров З.А и др., 2009, Агаева Э.М., Зейналова Ш.К, 2011, Алиев Е.А. и др., 2013].

БН-высококонтрагиозная вирусная болезнь птиц, проявляющаяся поражением органов дыхания, желудочно-кишечного тракта и центральной нервной системы. Циркулирующий в природе вирус характеризуется различной степенью вирулентности, что затрудняет своевременную диагностику болезни [Abdul-Aziz T.A., 1983, Жаров А.В., Шишков М.С, 2001, Ибрагимов А.А, 2005, Щелканов М.Ю., 2006, Мудрак Н.С. 2008, , Alexander D.J., 2003].

В связи с вышеизложенным проблема своевременного эпизоотологического мониторинга и своевременная диагностика БН является одной из наиболее актуальной в Ветеринарии.

Лабораторная диагностика БН проводится классическими методами и основывается на принципе комплексности, при этом

ведущая роль принадлежит микробиологическим методам, отличающимся специфичностью и чувствительностью. Однако важным является идентифицировать видоизменения патогена (мутации, рекомбинации), степень патогенности, гены устойчивости к противовирусным препаратам, провести филогенетический анализ и своевременно диагностировать болезнь. С целью создания эффективных систем по изучению эпизоотического процесса, проведению эпизоотологического мониторинга и своевременной диагностики болезни ньюкасла, выявлению слабо вирулентных, вакцинных штаммов БН птиц, контролю птицепродуктов международной торговли необходимо внедрить методы молекулярно-генетические исследования.

Следовательно внедрение в практику новейших молекулярно-генетических методов диагностики, основу которых составляет ПЦР является актуальной задачей.

Анализ литературных данных последних лет показывает на недостаточность исследований в этом направлении. Поэтому выбранное направление исследований является актуальным.

Цель и задачи исследований. Цель работы. Изучить эпизоотическую ситуацию по БН птиц в Азербайджане, изучить молекулярно-биологические методы в диагностике БН, установить их эффективность и усовершенствовать методы диагностики. Для достижения указанных целей перед нами были поставлены следующие **задачи**:

-Изучить особенности эпизоотической ситуации по болезни ньюкасла в Азербайджане.

-Провести исследования образцов собранных во время мониторинга.

- В лабораторную диагностику БН внедрить молекулярно-генетические методы (ПЦР).

-Провести сравнительное изучение классических и молекулярно-генетических методов в диагностике БН. Исследовать образцы, собранные из регионов (Барда и Бейлаган) в РЗГА и ELISA тестах.

- Исследовать внутренние органы, клоакальных и трахеальных мазков в ПЦР (экстракция РНК, амплификация и интерпретация).

- Определить в сравнительном аспекте эффективность, специфичность и чувствительность классических методов и ПЦР.

-Провести дифференциальную диагностику БН с другими инфекционными болезнями птиц (птичий грипп, пастерелез, инфекционный бурсит и инфекционный ларинготрахеит).

- Изучить эффективность вакцинации птиц против БН птиц.

Научная новизна. Впервые в Азербайджане с применением современных систем мониторинга изучена эпизоотическая ситуация по БН птиц.

С целью своевременной диагностики БН внедрены молекулярно-генетические методы. Доказана целесообразность применения данного метода в экспресс-диагностики БН в сравнении с классическими методами. Определена высокая специфичность и чувствительность ПЦР в диагностике БН.

Предложен быстрый, простой, чувствительный и специфический метод ELISA (Enzin Linked Immunosorbent Assay), тест для выявления антител в сыворотке крови с целью дифференциальной диагностики БН от других вирусных инфекций, а также поствакцинального титра антител и изучение напряженности иммунитета.

Практическая значимость работы. Сформулированы концептуальные подходы к организации эпизоотического надзора за БН в Азербайджане. Система эпизоотического надзора включает непрерывный сбор, системный анализ, оценку информации и своевременную диагностику БН. Установлен диагностический титр положительно реагирующих проб в РЗГА и РГА. Титр вируса < 1:8 в образцах считается отрицательным, при титре >1:16- положительным.

С помощью программы «СЕН5» разработан скрининг анализ патологических и нормальных титров антител в сыворотке крови птиц ELISA и РЗГА методами.

Установлено, что присутствие высоких титров антител в сыворотке крови птиц свидетельствует о наличие патологических титров в пробах, тогда как при вакцинации 80% проб дают одинаковый титр антител.

Разработана методика проведения ПЦР-анализа в реальном времени, позволяющая проводить быстрое и точное определение возбудителя в течение 3-х часов, контроль эффективности вакцинации птиц против БН, а также идентифицировать велогенные, лентогенные и мезогенные штаммы.

Чувствительность ПЦР анализа составило 100%, специфичность 99%.

Рекомендовано проведение своевременной вакцинации птиц и осуществления контроля напряженности поствакцинального иммунитета.

Разработана наставление по дифференциальной диагностике птичьего гриппа и болезни ньюкасла, которое утверждено на Научно техническом совете Государственной Ветеринарной Службы.

Основные положения диссертации, выносимые на защиту:

1. Особенности эпизоотической ситуации по БН, влияющие на тенденции развития эпизоотий в Азербайджане.
2. Сравнительное изучение и оценка эффективности классических и молекулярно-генетических методов в диагностики БН.
3. Применение молекулярно-генетических методов (ПЦР в реальном времени) в диагностики БН.
4. Оценка эффективности ELISA теста для выявления антител в сыворотке крови больных БН птиц.
5. Проведение дифференциальной диагностики БН птиц от других инфекций.
6. Изучение эффективности вакцинации птиц против БН.

Апробация результатов исследования. Основные результаты доложены на научных конференциях: «Актуальные проблемы Биологической и Химической экологии»(Москва, 2012), научная конференция, посвященная к 90-летию Гейдара Алиева «Форум молодых ученых» (Баку, 2013), Научно-практическая конференция, посвященная к 90-летию Харьковского Ветеринарного Института (Харьков, 2013), Международна научна практична конференция «Achievement of high school - 2013»(Болгария, София, 2013), 5-я Ежегодная Конференция Ассоциации Биологической Безопасности Центральной Азии и Кавказа(Грузия, Тбилиси, 2014), American society for virology scientific program(США, Форт-Коллинс, 2014).

Публикация работы по материалам диссертации опубликовано 8 научных статьей, 6 тезисов и 1 наставление по дифференциальной диагностике птичьего гриппа и болезни ньюкасла утвержденное на Научно техническом совете Государственной Ветеринарной Службы и одобренное к печати.

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 137 страницах и состоит из введения, обзор литературы, 5 глав,

обсуждение полученных результатов, выводов. Текст диссертации иллюстрирован 17 таблицами, 7 рисунком и состоит из 166 источников и приложения.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Исследования проводились в отделе вирусологии 2006-2013 гг, Республиканской Ветеринарной Лаборатории (РВЛ), Азербайджанском Ветеринарном Научно Исследовательском институте, референс лаборатории МЭБ (AHVLA) в Великобритании.

25.02.2006-2013 годы в РВЛ поступили многочисленные материалы, более 20 тысяч, из разных регионов республики. Образцы собирались из 12 Зональных Ветеринарных Лабораторий (ЗВЛ): Товуз, Саян, Габала, Гах, Шамахи, Гёгчай, Гейгель, Бейлакан, Барда, Сабирабад, Куба и Ленкорань. В состав каждого из ЗВЛ входит несколько районов, охватывающих всю республику. Также были собраны образцы диких птиц из Абшеронского национального парка, заповедника «Гызылагадж», «Агзибир» и «Аг-гел».

Исследования в районе Барда была проведена как часть проекта, США Программа Снижения Биологической Угрозы (ПСБУ) в Азербайджане и проекта «Биологический надзор над птичьим гриппом и болезнью ньюкасла в районе Барда».

Для проведения диагностических методов, отбирали пробы из внутренних органов (мозг, легкие, трахея, кишечник) кровь (серум), трахеальных и клоакальных мазков.

Изоляция вируса проводилось на основе стандартного протокола Международной Эпизоотической Бюро (МЕБ) ЕС, 94/2005. Титр антигена определяли в РГА. Изолированный вирус исследовали на наличие возбудителя в реакциях задержки геммаглютинации (РЗГА). Для постановки РЗГА использовали специфичные антигены и сыворотки, полученные из референс лаборатории МЕБ в Падова (Италия).

Реакцию иммунодиффузионной преципитации в агаровом геле – AGID (Assay Gel ImmunoDiffusion) использовали для дифференциальной диагностики БН (по стандартному протоколу МЭБ) от птичьего гриппа типа А, и для обнаружения антигена болезни Гамборро. Тест является специфичным, но обладает ограниченной чувствительностью. AGID применяется на многих птицах (цыплят и

индюшат), за исключением водоплавающих птиц (уток и гусей), из-за отсутствия у них преципитирующих антител.

ИФА (ELISA) применяли для изучения поствакцинального титра антител у птиц, диагностики БН и дифференциации вируса от других инфекционных болезней.

При проведении ИФА применяли набор FLOCKSCREEN НБ - ELISA кит (полученный из Великобритании) и IDEXX (Нидерланды) - быстрый, простой и чувствительный метод для выявления антител в сыворотке крови птиц. Для реакции РЗГА использовали специфический антиген, который получали из референс лаборатории OIE- IzSVE (Радова, Италия). При проведении ELISA использовали набор, производства Нидерланды «Биочек». Наборы предназначены для количественного определения антител (Ab) к заболеваниям в сыворотке домашних птиц. Микропланшеты предварительно покрываются инактивированным антигеном (Ag). Образцы сыворотки птиц разводили и добавляли в лунки планшета, где любые имеющиеся антитела против заболевания связываются и образуют комплекс антиген-антитело (Ag-Ab). Неспецифические антитела и другие сывороточные белки затем отмываются. После этого в лунки добавляли IgG к антителам кур, меченные ферментом щелочной фосфатазой. Они, в свою очередь, соединяются с антителами птиц против НБ, которые образовали комплекс с антигеном. Последующим промыванием удаляют не прореагировавший конъюгат и добавляли субстрат в форме хромогена. Появление желтой окраски свидетельствует о наличии Ab к заболеванию, а интенсивность ее прямо пропорциональна их количеству в образце.

Экстракцию РНК проводили с использованием кита-Qiagen QIAamp Viral RNT (полученного из США). РНК выделяли из разных образцов (внутренние органы и мазки), полученные от павших и инфицированных птиц.

Титры антител в сыворотке крови вакцинированных птиц определяли в РЗГА и ELISA тесте.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Изучение эпизоотической ситуации болезни ньюкасла в Азербайджанской республике. По данным ветеринарной отчетности в 1974 – 2005 гг, официально было зарегистрировано 44 случая болезни ньюкасла среди птиц. Число положительных результатов более -1000 образцов.

Нами согласно национальному плану по чрезвычайному положению совместно с Ветериарной Службой Азербайджанской республики и Республиканской Ветеринарной Лабораторией проведен серомониторинг среди домашних и диких птиц. Сбор проб охватывал 12 ЗВЛ и заповедников. Установлено, что заражение птиц происходило аэрогенно и алиментарно. В естественных условиях и при экспериментальном заражении болезнь Ньюкасла чаще регистрировали у разных видов птиц, также было установлено, неодинаковая степень восприимчивости к заболеванию птицы разных пород и возраста. Наиболее чувствительны к вирусу БН были куры. Чаще болезнь регистрировали у кур породы “лауер”. Иногда наблюдали случаи вспышек БН у цыплят при отсутствии заболевания у взрослой птицы. Индейки менее восприимчивы, чем куры и переносят заражение вирусом без явных клинических признаков болезни. Мы наблюдали случаи заболевания индюшат, содержащихся совместно с курами. При этом было установлено, что находящиеся вместе с ними взрослые индейки не заболевали, что указывало на их приобретенную невосприимчивость.

Нами представлена карта Азербайджанской республики, указывающая зоны проведенных мониторингов и вспышек болезни ньюкасла за 2006 -2013 гг. Как видно из рис. 1. болезнь зарегистрирована во многих регионах Азербайджана: в северной (Исмаилах, Хачмаз, Огуз, Гах), западной (Самух, Тар-тар), южной (Массалах, Салян, Имишлах, Бейлаган, Билесувар, Джелилабад) и в восточной частях (Абшерон, Баку). Болезнь наблюдалась в любое время года, с преимущественной регистрацией в зимнее-осеннее время.

Согласно анализа эпизоотической карты установлено, что общее количество вспышек БН в Бейлаганском районе составляет 40%, в Абшероне 10%, Самухе 8%, Джалилабаде 10%, Сабирабаде 10%, Огузе 5% и т.д. При этом индекс летальности составил 80%, с снижением в последующие годы. Учитывая мировую эпизоотическую ситуацию по БН , в том числе и в Азербайджане за предыдущие годы, вероятность возникновения эпизоотии остается высокой.

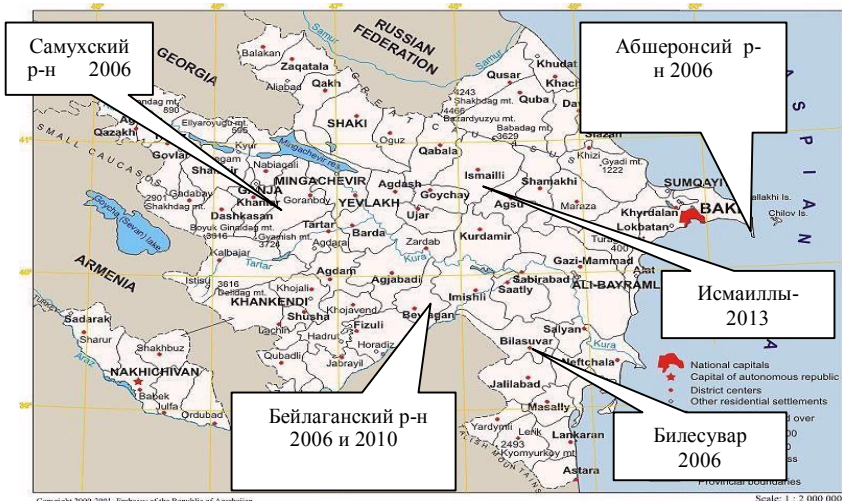


Рис. 1. Карта Азербайджана, указывающая зоны проведенных мониторингов и вспышки заболевания за 2006 -2013 гг.

Результаты исследования патологического материала полученного от больных птиц классическим методом (заражение КЭ, РГА, РЗГА). Изоляция Вируса. Золотой стандарт для выявления вируса болезни ньюкасла заключается в изоляции вируса методом заражения куриных эмбрионов.

Изоляцию выполняли в соответствии с протоколом Международного Эпизоотического Бюро (МЭБ) и Европейскими стандартами (ЕС, 94/2005).

Предварительно овоскопированные 9-11 дневные КЭ из SPF хозяйств заражали надосадочной жидкостью, полученной из трахеальных и клоачных суспензий или гомогенизированного органа в аллантаисную полость. Аллантаисную жидкость проверяли в РГА. При отсутствии гемагглютинации образец считали отрицательным, при положительном результате (наличие гемагглютинации) в последующем определяли титр вируса в РЗГА.

Проведение РЗГА и ELISA в различных популяциях птиц в Барде и Бейлаганском районе с целью выявления патологических титров. Проводили предварительное эпизоотологическое обследование. Из частных хозяйств от кур и индеек получали кровь и проводили РЗГА и ELISA. Результаты рассчитаны программой «GEN5» и отображены в таблице 1.

Сравнение значений полученных результатов и значений в стандартных процедурах РЗГА и ИФА указывают, что большинство проб дали отрицательные титры. Присутствие высоких титров свидетельствовало о наличии патологических титров в оставшихся пробах, а не влияние вакцинации. Так как обычно при вакцинации более 80% проб дают одинаковый титр.

Для контроля качества использованных реакций, проводили трехкратные повторные тесты, изображенные в гистограмме на основе системы Levi-Jeniņqs.

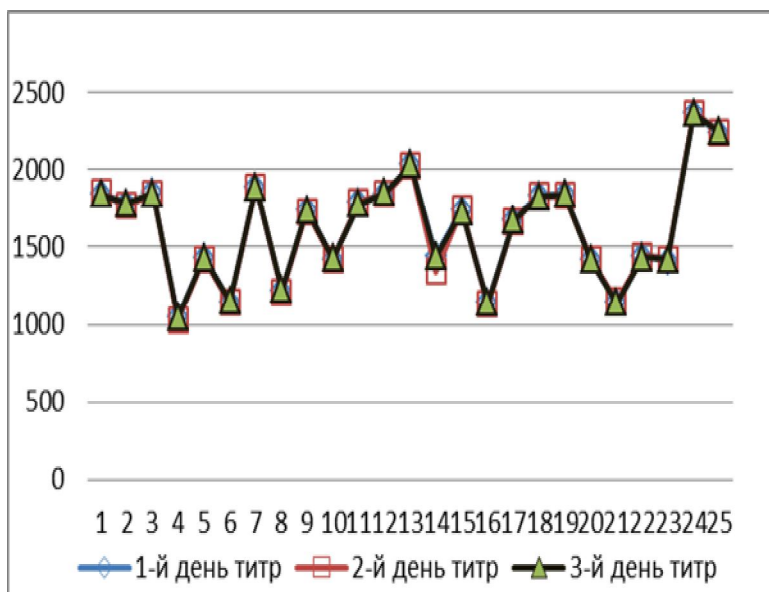


Рис. 2. Система Levi-Jeniņqs.

Как видно из рисунка 2 титры проведенных тестов, полученные в разные дни, показали близкие значения, что доказывает валидность результатов.

Таким образом, в РЗГА и ELISA можно идентифицировать патологические и поствакцинальные титры антител против болезни ньюкасла.

Таблица 1.

Результаты РЗГА и ELISA

Название района	Вид птицы	Количество образцов 500 проб		РЗГА		ELISA		результаты %	
		-	+	(-) титр	(+) титр	(-) титр	(+) титр	-	+
Бейлакан 250 проб	куры	150	20	1:2 1:4 1:8	1:32 1:64	1000 1200	2000	86.4	13.6
	индюшки	66	14	1:4 1:8	1:64	1250	2100		
Барда 250 проб	куры	165	15	1:2 1:4	1:16 1:32 1:128	1000 1350	2000	89.2	6.8
	индюшки	58	12	1:4 1:8	1:16 1:64	1350	2150		

Эффективность ПЦР-анализа в диагностике болезни ньюкасла. Молекулярно-генетические методы, в частности ПЦР, применяли в лабораторной диагностике болезни ньюкасла. С помощью этого метода в течение нескольких часов определили РНК возбудителя даже в малом количестве биологического материала, содержащего 1-10 микроорганизмов.

В ПЦР-диагностике использовали внутренние органы (мозг, легкие, гортань, трахея, кишечник), трахеальные и клоакальные мазки. В ПЦР использовали аллантаисную жидкость в соотношении 1:10. При экстракции РНК-вируса применяли, наборы Qiagen RNeasy кит с использованием Reverse и Forward праймеров.

Таким образом, при при диагностировании БН ПЦР-анализом достигнута более высокая чувствительность в сравнении с классическими методами (рис.3).

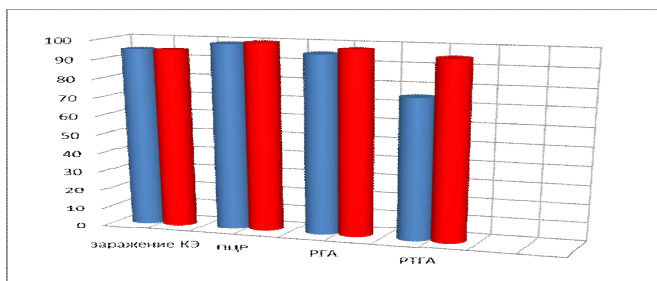


Рис.3. Специфичность и чувствительность разных методов в диагностике ньюкаслской болезни.

■ Специфичность
 ■ Чувствительность

Основываясь на этих данных и с помощью таблицы 2. вывели специфичность, чувствительность, а также положительную прогностическую ценность методов.

С целью оценки чувствительности и специфичности методов использовали метод заражения КЭ.

Из таблицы следует:

Таблица 2.

2 на 2 таблица

		Статус метода Золотой стандарт		Всего
		+	-	
Результат теста	+	79 правильно(a)	5 ложь(b)	84
	-	1 ложь(c)	111 правильно (d)	112
	Всего	80	116	196

Чувствительность теста = $79/80=98\%$

Специфичность теста= $111/116=95\%$

Положительная прогностическая ценность = $a/a+b=94\%$

$P<0.05$

Итак, в диагностике болезни ньюкасла чувствительность ПЦР достигает до 100%. Последующие места занимают РГА-98%, РТГА-95%, заражение КЭ-95%.

Результаты исследований ПЦР метода в диагностике БН. Реальное время РТ-ПЦР (обратная транскрипция) позволяет детектировать РНК-содержащий вирус НБ за короткое время. В ПЦР невозможно амплифицировать РНК, поэтому сначала с помощью обратной транскрипции РНК превращается в ДНК.

Для проведения анализа использовали протокол AVPRO1505.03. Анализ проводили в лаборатории BSL-2.

Используя набор Qiagen Rneasy мини кит проводили экстракцию РНК из суспензии патологического материала и мазков. Во время экстракции: РНК отделяется от остальных компонентов (например: другие органические вещества), ингибиторов, останавливает функцию внутреннего РНК (присутствие в растворе лизиса эфира *quanidin izorodan*). После выделения чистого РНК приготавливали мастер-микс.

Для приготовления мастер-микса использовали следующие праймеры:

M+4100 5' праймер 5'-AGTGATGTGCTCGGACCTTC-3'

M+4169 зонд 5'-FAM-TTCTCTAGCAGTGGGACAGCCTGC[BHQ]-3'

M-4220 3' праймер 5'-CCTGAGGAGAGGCATTTGCTA-3'

F+4829 5' праймер 5'-GGTGAGTCTATCCGGARGATACAAG-3'

F+4894 зонд-1 5'-FAM-
 AAGCGTTTCTGTCTCCTTCCTCCA[BHQ]-3'
 F-4939 3' праймер 5'-AGCTGTTGCAACCCCAAG-3'

В качестве мастер гена APMV-1 in vitro использовали РНК транскриптаза, гибрид гена vNDV (MBXL, Ames, Ayova) и набор Invitrogen TagPlatinum.

На рис. 4 показано реакция четырех проб. Положительные контроли поднялись вверх, а отрицательные контроли идут прямо. Линии, которые поднялись между 25-28 циклами, свидетельствует о наличии возбудителя БН в испытуемом образцах.

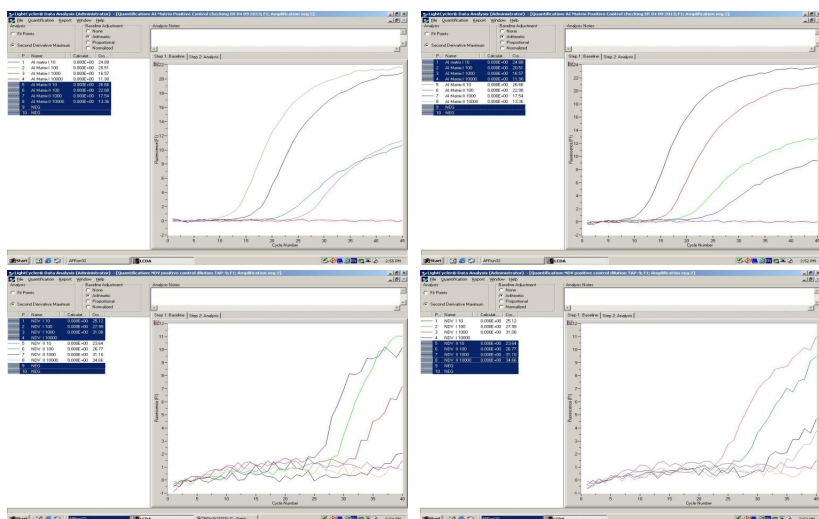


Рисунок 4. Результаты ПЦР.

Дифференциальная диагностика болезни Ньюкасла от других инфекционных болезней птиц. Нами проведена дифференциальная диагностика болезни Ньюкасла от других болезней птиц (инфекционный ларинготрахеит, птичий грипп, инфекционный бурсит, инфекционный бронхит, энцефаломиелит птиц, пастереллез) с применением классических и молекулярно-генетических методов диагностики (таб.4)

Установлено ассоциированное течение болезни Ньюкасла с инфекционным ларинготрахеитом, птичьим гриппом, инфекционным

бурситом, инфекционным бронхитом, энцефаломиелитом птиц, пастерелезом соответственно.

Таким образом несмотря на наличие клинических признаков болезни, без лабораторной диагностики невозможно поставит окончательный диагноз.

Таблица 4.
Результаты чувствительности реакций, использованные при дифференциации инфекционных болезней.

Название болезни	Зараже-ние КЭ	РЗГА	РДП	ELISA	ПЦР	Микро скопия
Болезнь ньюкасла	+	+		+	+	-
Инфекционный ларинготрахеит	+	-	+	+	-	-
Птичий грипп	+	+	+	+	+	-
Инфекционный бурсит	-	-	+	+	-	-
Инфекционный бронхит	+	-	-	+	-	-
Энцефаломиелит птиц	+	-	-	-	-	-
Пастерелез						+

При проведении дифференциальной диагностики золотым стандартом является культуральный метод. Однако ввиду длительности его проведения рекомендуем ELISA тест, как наиболее высокочувствительным и быстрым. ПЦР применяли только в диагностике БН и птичьего гриппа. При других инфекциях невозможность проведения ПЦР объяснялась отсутствием праймеров.

Изучение поствакцинальной напряженности иммунитета при ньюкаслской болезни. Исследования проводили в птицеводческом хозяйстве частного предприятия закрытого типа «Гилези», расположенном в районе Хызы Азербайджанской Республики. Птицы прививались инактивированной вакциной ССЯ-76+ИБК+НБ. Через 17-18 день после вакцинации отбирали и

исследовали сыворотку крови в РЗГА и ИФА для определения уровня специфических антител к вирусу болезни Ньюкасла (рис.5).

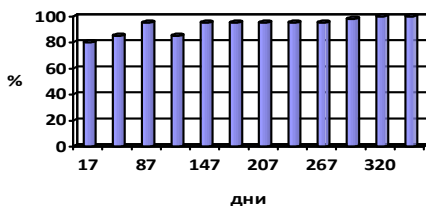


Рисунок 5. Процент уровня антител после вакцинации против болезни Ньюкасла.

Эффективность вакцинации птиц зависит от применяемых вакцин, кратности и метода вакцинации.

Установлено стабильность и возрастание напряженности иммунитета против болезни Ньюкасла с возрастом птицы.

ВЫВОДЫ

1. Впервые в результате мониторингов проведенных среди домашних и диких птиц и тестирования образцов выявлено, что Азербайджанская республика является эндемичной по болезни Ньюкасла. Установлено отсутствие четкой сезонности в распространении болезни Ньюкасла с тенденцией к росту заболеваемости с ноября по январь с пиком в декабре месяцах.
2. Установлена различная степень восприимчивости птиц разных пород и возраста к болезни Ньюкасла. Наиболее чувствительны были куры, менее индейки, утки и гуси соответственно. Переносчиком возбудителя болезни Ньюкасла является перелетные птицы, обуславливающие широкое неуправляемое распространение инфекции.
3. Разработан метод молекулярной диагностики с применением ПЦР и определена чувствительность и специфичность классических и молекулярно-генетических методов: ПЦР-100%, РТГА-75%, РГА-98%, заражение КЭ-98% соответственно.
4. Установлено, что ПЦР является наиболее эффективным методом в ранней диагностике болезни Ньюкасла.

5. Разработан метод ретроспективной диагностики болезни ньюкасла с применением иммуноферментного анализа-ELISA тест, который по чувствительности и специфичности превосходит классические методы диагностики. ИФА является наиболее эффективным, автоматизированным, экономичным и выгодным методом для массовых серологических исследований с целью дифференциальной диагностики БН от других инфекций, а также установления поствакцинального титра антител и изучения напряженности иммунитета.
6. Установлено ассоциированное течение БН с птичьим гриппом и проведена дифференциальная диагностика БН с инфекционным ларинготрахеитом, инфекционным бурситом, инфекционным бронхитом, энцефаломиелитом и пастерелезом птиц.
7. Установлены вариабельные титры антител в сыворотке крови птиц в РЗГА и в ELISA, указывающие на наличие инфекции, тогда как одинаковые титры антител свидетельствует о проводимой вакцинации.
8. Изучена эффективность вакцинации птиц против болезни ньюкасла вакциной «ССЯ-76+ИБК+НБ» и установлена высокая напряженность иммунитета. Определено возрастание напряженности группового иммунитета с возрастом птицы.
9. Составлено наставление по дифференциальной диагностики птичьего гриппа и ньюкаслской болезни.

ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ

1. Для предотвращения и распространения болезни ньюкасла, проводить ежегодный мониторинг в эндемичных зонах.
2. Для ранней диагностики болезни ньюкасла использовать ПЦР метод как подтверждающий тест (на наличие возбудителя).
3. Для создания длительного иммунитета против БН, использовать инактивированную вакцину ССЯ-76+ИБК+НБ.
4. Для дифференциальной диагностики использовать наставление «Дифференциальная диагностика птичьего гриппа и ньюкаслской болезни».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ ОПУБЛИКОВАННЫЕ НА ОСНОВЕ МАТЕРИАЛОВ ДИССЕРТАЦИИ

1. Ağayeva E.M., Zeynalova Ş.K. Болезнь Ньюкасла в Азербайджане (эпизоотология) // *Azərbaycan Aqrar Elmi*», 2011, N2, с.116-118.
2. Ağayeva E.M., Zeynalova Ş.K. Диагностика Ньюкаслской болезни // *AMEA-nın Mikrobiologiya institunun Elmi əsərləri*, 2011, N9, с.9-11.
3. Zeynalova Ş.K., Ağayeva E.M. Сравнительная оценка методов микробиологической диагностики Ньюкаслской болезни // *Известия Аграрной Науки(Грузия)*, 2011, Том 9, №4, с.117-120.
4. Ağayeva E.M., Zeynalova Ş.K. Изучение поствакцинальной напряженности иммунитета при ньюкаслской болезни // *AMEA-nın Mikrobiologiya institunun Elmi əsərləri*, 2012, T.10, №2, с.332-335
5. Ağayeva E.M., Zeynalova Ş.K. Мониторинг по болезни Ньюкасла среди диких и домашних птиц в Азербайджане//*Вестник МГОУ, серия «Естественные науки»*, 2012, №3, с. 5-9.
6. Zeynalova Ş.K., Дифференциальная диагностика болезни ньюкасла с другими инфекционными болезнями птиц //«*Azərbaycan Aqrar Elmi*», Bakı, 2012, N3, с.140-143.
7. Ağayeva E.M., Zeynalova Ş.K. Актуальные проблемы Биологической и Химической экологии // Сборник материалов международной научно-практической конференции, 2012, Москва, с.207-208.
8. Zeynalova Ş.K., Ağayeva E.M., Эффективность пцр-анализа в диагностике Ньюкаслской болезни // *AMEA-nın Mikrobiologiya institunun Elmi əsərləri*, 2012, т.10, N2, с.251-255.
9. Zeynalova Shalala, Abstracts Collection on new challenges in the european area: International Baku // *Forum of Young Scientists Dedicated to the 90-th anniversary of national leader Haydar Aliyev 20-25 may 2013 Baku, Azerbaijan*, p. 185-186.

10. Zeynalova Sh. etc., Biosurveillance of Avian Influenza and Newcastle disease viruses within the Barda region of Azerbaijan // Veterinarnaya Medicina 97, Ukraine, p. 55.
11. Rüstəmovə Sialə, Ağayeva Emma, Zeynalova Şəlalə, Yüksək patogenli quş qripri və nyukasl xəstəliklərinin təfriqi diaqnostikasını üzrə təlimat // Bakı 2012, 35s.
12. Zeynalova Sh., Biological surveillance of avian influenza and newcastle disease in Azerbaijan// Международна научна практична конференция «ACHIEVEMENT OF HIGH SCHOOL-2013», 2013, София: «Бялград», p. 48-49.
13. Zeynalova Sh., Hajiyeva A. Risk factors and implementation of biosafety measures in small poultry farms/Georgia, Tbilisi 5th annual conference of the biosafety association for Central Asia & the Caucasus, p. 46.
14. Zeynalova Sh.K., Agayeva E.M., Comparative study of the indicators of seroconversion during newcastle disease of the birds, tested in conditions of serological reactions/Global Science and Innovation, materials of the international conference USA, Chicago, 2013, Vol.II., p.508-511.
15. Zeynalova Sh. etc., Biosurveillance of avian influenza and newcastle disease viruses within the Barda region of Azerbaijan // American society for virology scientific program. Colorado State University, USA, Colorado, p.271-272.

ŞƏLALƏ KƏRƏM QIZI ZEYNALOVA

AZƏRBAYCANDA NYUKASL XƏSTƏLİYİNİN EPİZOOTOLOGİYASI VƏ DİAQNOSTİK METODLARIN TƏKMİLLƏŞDİRİLMƏSİ

XÜLASƏ

Nyukasl müxtəlif quş populyasiyalarını yoluxduran yüksək patogenli virus xəstəliyidir. Xəstəlik quşlar arasında yüksək ölüm faizi ilə xarakterizə olunur. Yuxarıda göstərilənləri nəzərə alaraq qeyd edilməlidir ki, NX-nin epizootoloji monitorinqinin və diaqnostikasının vaxtında aparılması baytarlığın ən aktual problemlərindən biridir.

Tədqiqat işinin əsas məqsədi Azərbaycanda nyukasl xəstəliyinin epizootologiyasının öyrənilməsi və diaqnostik metodların təkmilləşdirilməsidir. Azərbaycanda NX-nə qarşı epizootik nəzarətin təşkili üçün konseptual yanaşmalar hazırlanmışdır.

Diaqnostik tədqiqatların aparılmasında daxili orqanlardan (beyin, ağciyər, traxea, bağırsaq), qan (zərdab), traxéal və kloakal yaxmalardan istifadə edilmişdir.

Azərbaycanda NX-nə qarşı epizootik nəzarətin təşkili üçün konseptual yanaşmalar hazırlanmışdır. Epizootik nəzarət sisteminə nümunələrin davamlı toplanması, sistemin təhlili, informasiyanın qiymətləndirilməsi və NX-nə vaxtında diaqnoz qoyulması daxildir.

"CEN 5" proqramının köməyi ilə qan serumunda HALR və ELISA müayinəsindən istifadə edilərək anticisimlərin patoloji və normal titrlərinin skriningi aparılmışdır.

NX-nin diaqnostikasında metodların effektivliyi, spesifikliyi və həssaslığı təyin edilmişdir. PZR-in həssaslığı 100%, HAR 98%, TE-yuluxdurma 95% və HALR 95% olmuşdur.

NX-nin diferensial diaqnostikasında və postvaksinal immunitetin öyrənilməsində sadəliyi, spesifikliyi və həssaslığı ilə seçilən ELISA metod təkliif edilmişdir.

Dövlət Baytarlıq Xidmətinin Elmi Texniki şurasında təsdiq edilmiş «Yüksək patogenli quş qripi və nyukasl xəstəliklərinin təcili diaqnostikası üzrə təlimat» tərtib edilmişdir.

SHALALA KARAM ZEYNALOVA

EPIZOOTIOLOGY OF NEWCASTLE DISEASE IN AZERBAIJAN AND IMPROVING OF ITS DIAGNOSTICS

SUMMARY

Newcastle disease (ND) is a highly, virological disease that affects a large number of birds of different populations. ND is characterized by a high percentage of mortality.

Therefore, timely monitoring and diagnostics of ND is one of the most actual problems of the veterinary medicine and epizootology.

The aim of this work is study of the epizootic situation on ND between birds of Azerbaijan, studying of molecular biology techniques in the diagnostics of ND, establishing of their effectiveness and improvement of the diagnostics methods.

For diagnostic methods, sampled from the internal organs (brain, lungs, trachea, intestine) blood (serum), tracheal and cloacae swabs were collected.

The conceptual approaches for epizootic surveillance of ND in Azerbaijan were developed. Epizootic surveillance system includes continuous collection, system analysis, and evaluation of information and timely diagnostics of ND.

The sensitivity and specificity of different diagnostics methods of ND was defined. Thus, the results of sensitivity were presented through: 100% PCR, HE-98%, Inoculation off eggs 95%, HI 95%.

A quick, simple, sensitive and specific ELISA method, test for detection of antibodies in blood serum, for the purpose of differential diagnostics of ND from other viral infections was proposed. The instruction on the differential diagnostics method of Avian Influenza and Newcastle Disease approved by the Scientific-technical Council of the State Veterinary Service was developed.

AZƏRBAYCAN MİLLİ ELMLƏR AKADEMİYASI

MİKROBİOLOGİYA İNSTİTUTU

Əlyazması hüququnda

ŞƏLALƏ KƏRƏM QIZI ZEYNALOVA

**AZƏRBAYCANDA NYUKASL XƏSTƏLİYİNİN
EPİZOOTOLOGİYASI VƏ DİAQNOSTİK METODLARIN
TƏKMİLLƏŞDİRİLMƏSİ**

3109.01-Baytarlıq mikrobiologiyası, virusologiyası, epizootologiyası,
mikotoksikologiya ilə mikologiya və immunologiyası

Aqrar elmləri üzrə fəlsəfə doktoru
elmi dərəcəsi almaq üçün təqdim
edilmiş dissertasiyanın

AVTOREFERATI

BAKI-2014