

**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)**

На правах рукописи

**АБГАРЯН
СУСАННА РАФИКОВНА**

**ЭПИЗОТОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ
МЕТАПНЕВМОВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ ПТИЦ
У КУР-НЕСУШЕК**

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

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени
кандидата ветеринарных наук

Научный руководитель:
доктор ветеринарных наук,
профессор, академик РАН
Джавадов Эдуард Джавадович

Санкт-Петербург, 2020

ОГЛАВЛЕНИЕ

стр.

ВВЕДЕНИЕ	4
ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ.....	10
1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	10
1.1. Метапневмовирусная инфекция птиц: распространение и экономический ущерб.....	10
1.2. Характеристика рода <i>Metapneumovirus</i> семейства <i>Paramyxoviridae</i>	12
1.3. Эпизоотологические особенности метапневмовирусной инфекции птиц.....	14
1.4. Иммунопатогенез болезни.....	16
1.5. Патогенез, клинические и патоморфологические признаки болезни.....	18
1.6. Диагностика метапневмовирусной инфекции птиц.....	22
1.7. Современные методы диагностики метапневмовирусной инфекции птиц.....	28
1.7.1. Иммуноферментный анализ.....	28
1.7.2. Молекулярно-биологические методы диагностики.....	29
1.8. Дифференциальная диагностика метапневмовирусной инфекции птиц.....	31
1.9. Профилактика и меры борьбы с метапневмовирусной инфекцией птиц.....	32
1.10. Заключение по обзору литературы.....	34
2. СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	37
2.1. Материалы и методы исследования.....	37
2.2. Результаты собственных исследований.....	46
2.2.1. Характеристика ЗАО «Птицефабрика Синявинская».....	46
2.2.2. Изучение эпизоотологической ситуации в ЗАО «Птицефабрика Синявинская» по метапневмовирусной инфекции птиц.....	48
2.2.3. Выделение метапневмовируса птиц в различных биологических системах.....	54
2.2.3.1. Отбор проб и обработка патологического материала.....	54
2.2.3.2. Выделение вируса на развивающихся куриных эмбрионах.....	54
2.2.3.3. Выделение вируса в клеточных культурах.....	55

2.2.3.4. Обнаружение метапневмовируса с помощью обратной транскрипции – полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР)	56
2.2.4. Гистологические исследования.....	65
2.2.5. Клинические признаки и патологоанатомические изменения у кур-несушек при метапневмовирусной инфекции птиц.....	66
2.2.6. Бактериологические исследования патологического материала при метапневмовирусной инфекции птиц.....	71
2.2.7. Разработка схемы специфической профилактики метапневмовирусной инфекции птиц.....	76
2.2.7.1. Определение сроков иммунизации молодняка промышленных кур-несушек против метапневмовирусной инфекции птиц.....	76
2.2.7.2. Изучение поствакцинального иммунного ответа у молодняка промышленных кур-несушек в производственных условиях.....	78
2.2.8. Разработка лечебно-профилактических мероприятий при возникновении вторичных бактериальных инфекций на фоне метапневмовирусной инфекции птиц	81
3. ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	84
3.1. Обсуждение результатов исследований.....	84
3.2. Выводы.....	94
3.3. Практические предложения.....	96
3.4. Перспектива дальнейшей разработки темы.....	96
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	97
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	99
ПРИЛОЖЕНИЯ.....	118

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования. Промышленное птицеводство характеризуется высокой степенью концентрации птицепоголовья на ограниченной территории и интенсивностью производства. В этих условиях в геометрической прогрессии увеличивается обсемененность микроорганизмами производственных помещений и территории вокруг них, многократно возрастает потенциальная опасность возникновения инфекций, вызываемых условно-патогенной микрофлорой. Создаются условия для появления новых болезней вирусной этиологии и для развития ассоциированного течения вирусных, бактериальных и инвазионных болезней, при которых изменяются динамика возрастной восприимчивости, клинические признаки и характер патологоанатомической картины [2, 97]. В связи с этим, несвоевременная диагностика болезни, неправильно поставленный диагноз снижают эффективность профилактических и противоэпизоотических мероприятий и, как следствие, приводят к ощутимому экономическому ущербу. Одной из болезней, возникновение которой в птицеводческом хозяйстве приводит к значительным экономическим потерям, относится метапневмовирусная инфекция птиц.

Метапневмовирусная инфекция птиц – характеризуется респираторными симптомами, вызывающее у цыплят воспалительные процессы верхних дыхательных путей (носовых ходов, трахеи), инфраорбитальных синусов, сопровождается затрудненным дыханием, ринитами, чиханием, конъюнктивитами. Болезнь зарегистрирована во многих регионах мира, как у индеек, так и у кур всех возрастов [4, 10, 25, 118]. Репликация метапневмовируса (МПВ) в присутствии возбудителей вторичных инфекций и в условиях нарушения технологии содержания приводит к развитию у птиц респираторных клинических признаков, поскольку этот вирус обладает тропностью к верхним дыхательным путям. Взрывная диссеминация вируса может повысить уровень заболеваемости до 100%, при этом смертность может достигать 30%. Кроме того, МПВ может воспроизводиться в половых путях, что приводит к снижению яичной продуктивности птицы и ухудшению качества яиц [83, 86].

Многообразие подтипов возбудителя (А, В, С, D) и варибельность вирулентных свойств штаммов метапневмовируса создают значительные сложности в эффективном использовании вакцин, затрудняют диагностику, влияют на продолжительность и тяжесть течения болезни [83].

Таким образом, изучение эпизоотологических особенностей метапневмовирусной инфекции у кур-несушек и разработка эффективных мер профилактики, в том числе специфической, является своевременным и актуальным.

Степень разработанности темы исследования. Большинство методов, позволяющих выявить вирус в организме птицы, основано на полимеразно-цепной реакции (ПЦР) и иммуноферментном анализе (ИФА) [32, 37, 120].

Достаточно короткий период персистенции и ограниченный тропизм вируса в организме птицы создает определенные трудности при проведении диагностических исследований [58, 116]. Выделение возбудителя и его серотипирование позволяет правильно поставить диагноз и дает возможность разработки эффективной системы мероприятий по борьбе с болезнью.

Цель и задачи исследований. Цель работы – изучить эпизоотологические особенности метапневмовирусной инфекции у промышленных кур-несушек и разработать эффективную схему специфической профилактики для птицеводческого хозяйства яичного направления.

Для осуществления поставленной цели были определены следующие задачи:

- Изучить эпизоотологическую ситуацию по метапневмовирусной инфекции в ЗАО «Птицефабрика Синявинская»;
- изучить клинические и патоморфологические признаки метапневмовирусной инфекции птиц в условиях ЗАО «Птицефабрика Синявинская»;
- провести серологические исследования сывороток крови птиц методом иммуноферментного анализа;
- провести вирусологические исследования патологического материала;

- разработать праймеры для идентификации метапневмовируса и проведения серотипирования возбудителя методом электрофоретической детекции и секвенирования, основанных на полимеразно-цепной реакции;
- провести бактериологические исследования патологического материала;
- разработать схему специфической профилактики метапневмовирусной инфекции птиц и оценить ее эффективность;
- разработать схему лечебно-профилактических мероприятий при возникновении вторичных бактериальных инфекций.

Научная новизна. Впервые на территории Ленинградской области в условиях ЗАО «Птицефабрика Синявинская» установлена циркуляция метапневмовируса птиц подтипа В, который вызывал тяжелые поствакцинальные реакции у молодняка после применения живой вакцины против инфекционного ларинготрахеита птиц и снижение яйценоскости у промышленных кур-несушек.

Разработаны праймеры, позволяющие идентифицировать возбудителя метапневмовирусной инфекции птиц, провести его серотипирование методом электрофоретической детекции и секвенирования, основанных на полимеразно-цепной реакции.

Проведены вирусологические и молекулярно-биологические исследования патологического материала, выделен и идентифицирован метапневмовирус птиц подтипа В.

Установлена высокая специфичность разработанных праймеров, которые могут быть успешно использованы в ветеринарных лабораториях для диагностики метапневмовирусной инфекции птиц.

Теоретическая и практическая значимость работы.

Разработана и внедрена в ЗАО «Птицефабрика Синявинская» схема специфической профилактики метапневмовирусной инфекции птиц, включающая вакцинацию цыплят в возрасте 15 и 45 суток живой аттенуированной вакциной против метапневмовирусной инфекции птиц производства ВНИВИП с последующей ревакцинацией в возрасте 110 суток инактивированной эмульсионной вакциной производства ВНИВИП, оценена ее эффективность.

Предложена схема проведения лечебно-профилактических мероприятий при метапневмовирусной инфекции у молодняка промышленных кур-несушек,

включающая применение комплексных витаминных препаратов и антибактериальных лекарственных средств широкого спектра действия.

В результате проведенных исследований разработаны Методические положения «Выявление и серотипирование возбудителя метапневмовирусной инфекции птиц молекулярно-биологическими методами» от 15.10.2019г., протокол № 4.

Методология и методы исследования. Методология проведенных исследований включала анализ научной литературы, поисковые исследования, основанные на стандартных процедурах с использованием различных материалов. В работе использовали серологические, вирусологические, микробиологические, молекулярно-биологические и статистические методы исследований.

Положения, выносимые на защиту:

- эпизоотологические особенности течения метапневмовирусной инфекции у молодняка кур и у промышленных кур-несушек в ЗАО «Птицефабрика Синявинская»;
- диагностическая ценность разработанных праймеров, которые позволяют идентифицировать возбудителя метапневмовирусной инфекции птиц и провести его серотипирование методом электрофоретической детекции и секвенирования, основанных на ПЦР;
- спектр бактериальной микрофлоры при метапневмовирусной инфекции у промышленных кур-несушек в ЗАО «Птицефабрика Синявинская»;
- разработка схемы специфической профилактики метапневмовирусной инфекции для ЗАО «Птицефабрика Синявинская»;
- разработка схемы лечебно-профилактических мероприятий при возникновении вторичных бактериальных инфекций у молодняка промышленных кур-несушек в период вспышки метапневмовирусной инфекции птиц.

Степень достоверности и апробация результатов.

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. Результаты исследований по теме диссертации доложены и обсуждены на заседаниях Методического совета отдела вирусологии и ОБП и Ученого совета ВНИВИП (2017-2019), Международной научно-практической конференции «Ветеринарная наука в промышленном птицеводстве», посвященной 50-летию ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский ветеринарный институт птицеводства» (Санкт-Петербург, 2014); Научно-практической конференции: «Современные подходы и перспективы решения актуальных зооветеринарных проблем в промышленном птицеводстве» (Санкт-Петербург, 2018).

Публикации. Основные положения диссертационной работы опубликованы в 4 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.

Структура диссертации. Диссертация изложена на 131 странице компьютерного текста и состоит из следующих разделов: введение; обзор литературы; собственные исследования, включающие материалы и методы исследований, результаты исследований; обсуждение результатов исследований; выводы; практические предложения; список литературы, список сокращений и приложение. Диссертация иллюстрирована 13 таблицами и 19 рисунками. Список литературы включает 175 источников, из которых 121 зарубежный.

Список статей по теме диссертации

1. Никитина, Н. В. Выделение метапневмовируса птиц на различных биологических системах / Н.В. Никитина, **С.Р. Абгарян** // Вопросы нормативно-правового регулирования в ветеринарии. – 2019. – № 2. – С. 34-36.

2. Новикова, О.Б. Микробиологический спектр возбудителей при метапневмовирусной инфекции у кур-несушек / О.Б. Новикова, **С.Р. Абгарян**,

Н.В. Никитина // Национальная ассоциация ученых (НАУ). – 2019. – № 45. - Часть 1. – С. 5-7.

3. **Абгарян, С.Р.** Молекулярно-биологическая диагностика респираторных болезней птиц / С.Р. Абгарян, Н.В. Никитина, А.Н. Семина // Международный вестник ветеринарии. – 2019. – № 3. – С.11-15.

4. Дмитриева, М.Е. Молекулярно-биологическая диагностика метапневмовируса птиц / М.Е. Дмитриева, **С.Р. Абгарян**, А.Н. Семина // Материалы XIX Международной конференции. «Мировые и российские тренды развития птицеводства: реалии и вызовы будущего», Сергеев Посад, 2018. – С. 597-600.

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Метапневмовирусная инфекция птиц: распространение и экономический ущерб

Метапневмовирусная инфекция птиц (МПВИ) – респираторная болезнь, характеризующаяся воспалительными процессами верхних дыхательных путей (носовых ходов, трахеи), инфраорбитальных синусов, сопровождается затрудненным дыханием, хрипами, ринитами, чиханием, выделениями из носа [8, 117].

У разных видов птиц метапневмовирусная инфекция проявляется в виде двух респираторных синдромов: у индеек – ринотрахеит (turkey rhinotracheitis - TRT), у цыплят и кур – синдром опухшей головы (swollen head syndrome - SHS) [4, 86].

Впервые синдром опухшей головы был зарегистрирован в 1971 году у цыплят-бройлеров в Южной Африке. В пробых патматериала были обнаружены *Escherichia coli* и короновирс, идентифицированный как вирус инфекционного бронхита кур. Впервые описание метапневмовирусной инфекции было сделано также Южной Африке [27].

Выделить вирус удалось лишь в 1987 году во время вспышки болезни, сопровождающейся синдромом опухшей головы у кур [66, 127, 136, 140, 151, 152, 153]. С того момента болезнь непрерывно развивается, появляются новые случаи заболевания во всем мире как у птицы родительских стад, промышленных кур-несушек [59, 108, 128], индеек [61, 114, 117], так и среди цыплят-бройлеров [78, 130, 137, 148]. В настоящее время метапневмовирус выявляют по всему миру [117]. Метапневмовирусная инфекция получила широкое распространение во многих странах с развитым промышленным птицеводством [116], таких как Франция, Великобритания, Италия, Венгрия, Испания, Нидерланды, Германия, Израиль, Бразилия, США [8], а также в Российской Федерации [24, 25].

На протяжении многих лет выявляли только один серотип метапневмовируса, внутри которого находятся подгруппы А и В, которые были обнаружены в Великобритании и в Европе. Эти подгруппы были дифференцированы с помощью молекулярно-биологических исследований путем секвенирования гликопротеина G и в реакции нейтрализации с моноклональными антителами. Между изолятами метапневмовируса, принадлежащих к подтипам А и В, наблюдалась полная нейтрализация [43].

Изолят метапневмовируса, выделенный в США, в штатах Колорадо и Миннесота от индеек, антигенно и генетически [43, 89, 156, 157] отличается от европейских изолятов, которые вызывают SHS у кур и TRT у индеек. Заболеваемость у индеек в коммерческих стадах ежегодно достигает до 55 %, а экономические потери составляют около 15 млн. долларов в год [82, 99, 105, 106, 159]. Подтип С (aMPV-C), впервые выделенный в США в 1996 году, по сравнению с метапневмовирусами подтипов А, В и D имеет наибольшее сродство с метапневмовирусом человека [94, 98, 103, 167, 175]. Серьезные вспышки болезни были зарегистрированы в 2004 году в штатах Висконсин, Айова, Северная Дакота и Огайо [64].

Во Франции был выделен подтип метапневмовируса, который отличается от подгрупп А и В, а также от изолята *Colorado*, что свидетельствует о высокой вероятности появления новых антигенных и генотипных вариантов метапневмовируса [43]. В настоящее время существует 4 подгруппы метапневмовируса: aMPV/A, aMPV/B, aMPV/C, aMPV/D [43, 86].

Установлено, что различные штаммы метапневмовируса отличаются по вирулентности по отношению к курам и индейкам, что необходимо учитывать при проведении исследований с использованием экспериментального заражения [82].

Следует отметить, что подтипы метапневмовируса также отличаются по способности инфицировать другие виды животных и птиц и способности передаваться от дикой птицы домашней в период миграции. Роль синантропной и дикой птицы в передаче метапневмовируса подтипов А и В не ясна в отличие от

подтипа С. Метапневмовирус подтипа С и антитела к нему были выявлены у американских воронов, канадских гусей, цапель, голубей, синекрылых чирков, диких гусей, диких уток, крякв, воробьев, страусов и крупного рогатого скота. Вспышки метапневмовирусной инфекции в США совпадают с периодом миграции диких и синантропных птиц [63, 64, 65, 94, 142, 162, 165, 169, 173]. Последние исследования указывают на важность водоплавающих птиц для выживания и эволюции метапневмовирусов различных подтипов в окружающей среде [94].

В России на протяжении последних десятилетий метапневмовирусную инфекцию птиц регистрировали в различных регионах страны и чаще всего в бройлерных хозяйствах, преимущественно у кур родительских стад и цыплят-бройлеров. Однако в последние годы увеличивается число случаев обнаружения антител к метапневмовирусу у кур яичного направления выращивания [8, 10, 17, 18, 24, 25, 32, 37, 42, 47, 48].

Результаты молекулярно-генетического анализа изолятов метапневмовируса, выделенных из птицеводческих хозяйств Российской Федерации, показывают, что в 92-95% случаев выявляются полевые изоляты метапневмовируса, относящиеся к подтипу В и только 5-8% случаев – к подтипу А [39].

1.2. Характеристика рода *Metapneumovirus* семейства *Paramyxoviridae*

Пневмовирусы птиц являются РНК-содержащими вирусами, относящимися к семейству *Paramyxoviridae* подсемейству *Pneumovirinae* роду *Metapneumovirus* [112, 122, 129].

Вирус имеет сферическую форму, покрыт липопротеидной оболочкой, его размер составляет 80-200 нм. Также встречаются полиморфные вирионы в диаметре 150-200 нм. и длиной 1000-10000 нм. Поверхностные выступы на оболочке вириона длиной 13-15 нм, представляющие собой шипы шириной 2-3 нм у осноу основания, напоминают бахрому. Вирус не обладает

гемагглютинирующей активностью по отношению к эритроцитам цыплят, уток, индеек, морских свинок, свиней и крупного рогатого скота [2, 8, 141].

Молекулярная масса генома составляет 0,5% от веса вириона и варьирует у рода *Pneumovirus* в пределах 17-20 kb. Геном обычно мономерный и содержит единичную линейную молекулу одноцепочечной рибонуклеиновой кислоты (РНК). Установлено, что полная последовательность РНК генома составляет 15200-15900 нуклеотидов [8].

Вследствие различной генной организации и низкого уровня (40%) идентичности последовательностей по сравнению с пневмовирусом млекопитающих пневмовирус птиц был отнесен к новому роду *Metapneumovirus* в подсемействе *Pneumovirinae* [28, 87, 88, 124, 125, 154].

Около 75-80 % от веса вирусной частицы составляют протеины. Вирусный геном кодирует структурные и неструктурные образования. Вирионы содержат 7 структурных белков, находящихся в нуклеокапсиде, оболочке, мембране и матриксе. Вирусная оболочка включает два встроенных протеина мембраны.

Поверхностный протеин объединения F выполняет функции прикрепления. Расщепление F-белка на крупный белок F1 и мелкий белок F2 предопределяет слияние клеток, что необходимо для распространения вируса [74]. Вероятно, аминокотерминальная часть F1 вовлекается в мембранное слияние и является высококонсервативным участком среди трех типов А, В и С пневмовируса птиц [119, 123, 156, 157].

Подтипы А, В, D метапневмовируса, циркулирующие в Европе, имеют сопоставимые размеры G-белков и вызывают сопоставимые по степени тяжести симптомы болезни, включая патологические изменения в ресничках слизистой оболочки носовых раковин и развитие синдрома опухшей головы у кур [149, 159, 171]. Это родство было подтверждено анализом последовательности гена F-белка [161] и более консервативного M-гена [55, 155, 174]. Хотя различные изоляты МПВ были антигенно схожими, но серологически могли разделяться на две отдельные группы [73, 78]. Эта разница в вирусных белках объясняется

различиями, обнаруживаемыми при использовании для серологических исследований разных антигенов [158].

Вирионы метапневмовируса по весу состоят на 20-25% из липидов [8].

Метапневмовирус слабо устойчив к воздействию факторов внешней среды. На различных поверхностях вирус выживает до 72 часов, на деревянных поверхностях и картонных прокладках для яиц сохраняется до 6-ти суток [2, 8]. Дезинфицирующие растворы в рекомендуемых концентрациях при температуре 20°C инактивируют вирус в течение 15-20 минут [8]. Лиофилизированный вирус при комнатной температуре сохраняет жизнеспособность в течение 7 суток и способен реплицироваться в клетках Vero, при 4°C метапневмовирус выживает до 20 недель, при температуре от минус 20°C до 70°C – более 58 недель [114, 168].

1.3. Эпизоотологические особенности метапневмовирусной инфекции птиц

Наибольшее количество вспышек метапневмовирусной инфекции среди птиц регистрируются преимущественно в весенний и осенний периоды. В США около 80% случаев проявления метапневмовирусной инфекции у индеек наблюдалось весной (март – май) и осенью (октябрь – ноябрь), что совпадает с миграцией диких птиц [10, 46, 64, 104, 117, 160, 161, 162]. Поэтому впервые РНК метапневмовируса была выделена из носовых ходов воробьев, гусей, ласточек и скворцов, отловленных в Северной части центрального района США [100, 101, 102, 159]. Однако по данным R.C. Jones [118], роль диких птиц в распространении возбудителя болезни не установлена.

Носителями метапневмовируса птиц в природе независимо от возраста являются индейки и куры [26]. К болезни с проявлением клинических признаков восприимчивы индейки, куры, фазаны [68, 112], цесарки [150], страусы [67], гуси [60, 65], утки [165]. Пневмовирус был выделен у канадских казарок (*Branta canadensis*) и синекрылых чирков (*Anas discors*) [63].

Естественным резервуаром возбудителя метапневмовирусной инфекции является дикая птица (гуси, утки), гнездящаяся на территории, расположенной в

непосредственной близости от мест содержания домашней птицы [63, 64, 82, 83, 160]. Обнаружение РНК метапневмовируса в клетках эпителия носовых ходов воробьев, ласточек и скворцов подтверждает участие в передаче метапневмовируса синантропной птицы в период миграции [46].

Источником инфекции является больная птица. Болезнь распространяется среди восприимчивой птицы быстро и за 2-3-е суток птичник может быть полностью инфицированным. Возбудитель передается от больной птицы воздушно-капельным путем [107, 131] и при непосредственном контакте с восприимчивой птицей [57, 77], а также через поврежденные кожные покровы [134]. У кур-несушек наблюдались клинические признаки (нервные явления, синдром опухшей головы), похожие на некоторые из описанных клинических симптомов у племенных кур в условиях полевой инфекции [13].

Факторами переноса метапневмовируса могут быть обслуживающий персонал, инвентарь, транспорт, оборотная тара, инфицированные корм и вода, помет, грызуны и кровососущие насекомые. Также не исключается возможность вертикальной передачи возбудителя метапневмовирусной инфекции через инкубационное яйцо [46, 57].

Восприимчивость птиц к метапневмовирусу может варьировать в зависимости от возраста и породной принадлежности. Наиболее тяжелое течение метапневмовирусной инфекции отмечается у молодняка птиц до 6-недельного возраста. У цыплят-бройлеров болезнь чаще проявляется в возрасте 4-6 недель, а у взрослых кур-несушек – в возрасте 25-35 недель. С увеличением возраста птицы восприимчивость к болезни уменьшается, но в то же время отмечается персистенция возбудителя инфекции в стаде в течение всего периода эксплуатации птицы [46, 152, 153].

Бактериальные респираторные патогены такие как, *Bordetella avium*, *Pasteurella* [77], *Mycoplasma gallisepticum* [135] и *Escherichia coli* [56, 134] осложняют клиническое течение метапневмовирусной инфекции у индеек и кур и способствуют увеличению продолжительности болезни.

В результате исследований установлено, что метапневмовирус, выделенный от одного вида птицы обладает патогенными свойствами по отношению к другому виду птицы [29].

Предрасполагающими факторами для возникновения метапневмовирусной инфекции птиц в хозяйствах являются скученное содержание и недостаточная вентиляция помещений, неудовлетворительное кормление, особенно недостаток в кормах витамина А и витаминов группы В, а также несоблюдение необходимого санитарно-гигиенического режима кормления и содержания [13].

Инкубационный период при метапневмовирусной инфекции у цыплят и кур обычно составляет 5-7 суток, заболеваемость от 10 до 100%. Смертность может составлять 1-10%, но чаще всего не более 2% [70].

При неосложненной метапневмовирусной инфекции выздоровление происходит в течение 10-14 суток. В восприимчивых невакцинированных стадах смертность может достигать 15% [83].

1.4. Иммунопатогенез болезни

У индеек и кур метапневмовирус вызывает инфекцию верхних дыхательных путей, где его персистенция обычно продолжается не более чем 10 суток. В этот период его можно выделить в трахеальных органных культурах [8, 146].

При воспроизведении метапневмовирусной инфекции, проникновение метапневмовируса в верхние дыхательные пути (в основном в клетки носовой полости, трахеи, соединительных оболочек и носовых пазух) сопровождается повреждением клеток реснитчатого эпителия и блокировкой функции механического защитного барьера. Это способствует проникновению бактерий, вирусов через эпителий респираторного тракта и приводит к увеличению срока персистенции метапневмовируса в организме птицы и его более глубокому проникновению в ткани [17, 86].

Методом полимеразной цепной реакции наличие вирусной РНК обнаруживали на протяжении 17-19 суток после инфицирования у индюшат, особенно за 2 недели до регистрации пиковых титров антител [87, 113]. Для

диагностики эти данные имеют огромное значение, но не раскрывают механизмы распространения метапневмовирусной инфекции птиц, поскольку обнаруженная, таким способом, вирусная РНК не инфекционна. Долговременная персистенция инфекционного вируса не установлена, хотя высокие титры антител обнаруживали много недель спустя после экспериментальной инфекции взрослых индеек [117, 138].

Другим важным местом репликации метапневмовируса у индеек и кур является эпителий зрелого яйцевода, что приводит к снижению яйцекладки и ухудшению качества яиц [25, 30].

Механизм ответных иммунных реакций на инфицирование метапневмовирусом у индеек и кур пока полностью не установлен. Вслед за инфицированием в сыворотке крови появляются антитела, которые могут быть обнаружены в реакции непрямой иммунофлюоресценции [115, 170], реакции нейтрализации и в иммуноферментном анализе [71, 120, 109]. Впрочем, корреляция между наличием антител и защитой респираторного тракта кажется весьма слабой, поскольку вакцинированные бурсоэктомированные химическим методом индюшата, которые были неспособны к сероконверсии, по-прежнему, были защищены от заражения вирулентным вирусом [117, 138]. Это, вероятно, связано с тем, что клеточно-опосредованный иммунитет является более важным при респираторной инфекции и эта область исследований заслуживает дальнейшего изучения.

Локальное формирование антител в верхних дыхательных путях происходит довольно быстро, что имеет большое значение при проведении мероприятий по профилактике и ликвидации болезни. Высокий уровень вируснейтрализующих антител содержится в слезном секрете, что очень важно для процесса выздоровления. Протективный уровень антител нарастает значительно медленнее, чем при иммунной реакции на другие вирусы, вызывающие респираторные болезни, особенно у цыплят. Поэтому они не имеют значения для защиты молодняка от полевого вируса, но имеют значение для

предотвращения поражения яйцевода в период яйцекладки. Клеточно-опосредованный иммунитет также влияет на удаление вируса из организма [27].

Относительно влияния других респираторных патогенов на возникновение и развитие метапневмовирусной инфекции исследований относительно немного. Было показано, что метапневмовирусная инфекция нередко протекает в ассоциации с инфекциями, вызываемыми *Bordetella avium*, *Pasteurella*-подобными микроорганизмами [77], *Ornithobacterium rhinotracheale*, *Mycoplasma gallisepticum* [135], *Escherichia coli* [56, 91, 172], которые осложняют клиническое проявление болезни и удлиняют ее продолжительность. Есть основания полагать, что метапневмовирус выступает в роли первичного возбудителя, который посредством негативного воздействия на эпителий органов респираторного тракта создает условия для колонизации микроорганизмов, прежде всего бактериальной этиологии [2, 17, 46, 48].

В полевых условиях, метапневмовирусная инфекция кур иногда существует совместно с другими респираторными вирусами, такими как вирус инфекционного бронхита кур (ИБК), инфекционного ларинготрахеита птиц (ИЛТ) или ньюкаслской болезни (НБ) [48]. Влияние этих вирусов, микоплазм и иммуносупрессивных патогенов заслуживает детального исследования.

Парамиксовирусы обладают способностью индуцировать иммуносупрессию. Пневмовирусы влияют на функционирование макрофагов и могут стимулировать их на повышенное продуцирование факторов некроза опухолей (TNF)- α , которые трансформируются в фактор роста β и оксид азота (NO). Иммуносупрессивное действие парамиксовирусов также выражается в повышении чувствительности к другим патогенам и снижением способности животных адекватно реагировать на введение вакцин [31, 70].

1.5. Патогенез, клинические и патоморфологические признаки болезни

Репликация метапневмовируса в организме птицы происходит в эпителии дыхательных путей и в эпителиальных клетках яйцевода. Поэтому в начале заболевания метапневмовирус вызывает лишь респираторные симптомы, а затем

может приводить к снижению яичной продуктивности. Метапневмовирусы поражают верхние дыхательные пути и редко обнаруживаются в легких [97, 117]. На степень проявления клинических признаков, главным образом, влияет присутствие вторичных патогенов, прежде всего бактериальной этиологии. При назальной инокуляции индеек метапневмовирусом, спустя 96 часов, наступал цилиостаз эпителия трахеи. Болезнь сопровождалась кашлем, чиханием, выделением экссудата из носовых ходов и опуханием инфраорбитальных синусов [117].

Репликация метапневмовируса в присутствии возбудителей вторичных бактериальных инфекций приводит к развитию у птиц респираторных клинических признаков, поскольку этот вирус обладает тропностью к верхним дыхательным путям. Взрывная диссеминация метапневмовируса может повысить уровень заболеваемости до 100 %, при этом смертность может достигать 30 % в зависимости от присутствия возбудителей вторичных инфекций. Наиболее важной особенностью метапневмовируса является его способность парализовывать активность ресничек эпителия, блокируя их важную функцию очищения органоидов, что значительно повышает восприимчивость птицы к патогенным микроорганизмам вирусной и бактериальной этиологии [86].

Однако многочисленными исследованиями установлено, что заражение в экспериментальных условиях метапневмовирусом, а также одновременная инокуляция метапневмовируса и *Escherihia coli*, независимо от способа введения, не вызывала синдром опухшей головы [56].

Первичное инфицирование метапневмовирусом вызывает воспаление слизистой оболочки носовых ходов и кашель. Обострение этих симптомов связано с комплексным воздействием других вирусных и бактериальных патогенов, которые могут вызывать синдром опухшей головы. Падеж птицы при МПВИ довольно часто обусловлен сепсисом, вызываемым кишечной палочкой. Метапневмовирус может играть роль как первичного возбудителя болезни и «пускового клапана» для возникновения вторичных бактериальных и вирусных

инфекций, так и иметь вторичное значение по отношению к другим болезнетворным факторам [27].

Метапневмовирус обладает сильными цитоостатическими свойствами, что значительно увеличивает восприимчивость птицы к респираторным заболеваниям, вызываемым другими патогенами, прежде всего бактериальными, такими как *Mycoplasma gallisepticum*, *Ornithobacterium rhinotracheale* и *Escherichia coli*, которые при ассоциации дают синергитический эффект. При одновременном инфицировании вирусом ИБК и метапневмовирусом, вирус инфекционного бронхита кур гораздо быстрее реплицируется в верхних дыхательных путях и очень сильно тормозит репликацию метапневмовируса, а также замедляет образование антител к метапневмовирусу [27].

Болезнь клинически проявляется такими признаками как опухание инфраорбитальных и периорбитальных синусов, искривление шеи, дезориентация и депрессия. Болезнь сопровождается также чиханием, кашлем, ринитами, конъюнктивитами. При затяжном течении болезни появляется синдром «узкоглазой птицы» [13]. Характерным признаком является наличие в глазной щели пенистого экссудата [31, 58]. Помимо опухания инфраорбитальных синусов нередко наблюдается отек соединительной ткани в подчелюстном пространстве [58, 101, 162]. Также отмечают фибриновые выделения из ушных проходов, истощение, задержку роста и анемию [58, 95]. У кур-несушек метапневмовирусная инфекция сопровождается снижением яичной продуктивности. У коричневых кроссов наблюдается обесцвечивание скорлупы [43]. Также может ухудшаться качество яйца (мягкая скорлупа, водянистое сожержимое, снижение выводимости) [5].

Одним из клинических признаков проявления метапневмовирусной инфекции является появление «спящей птицы» [5].

В птичниках с хорошим микроклиматом болезнь может проявляться только в виде слабо выраженных конъюнктивитов и серозных ринитов или в субклинической форме без проявления клинических признаков, в том числе без снижения яйценоскости [43].

Наиболее тяжело метапневмовирусная инфекция протекает у цыплят-бройлеров. С развитием эпизоотического процесса изменяется возрастная восприимчивость цыплят к метапневмовирусной инфекции. Если в начале распространения инфекции среди цыплят клинические признаки проявляются, начиная с 30-суточного возраста, то в последующем они могут проявляться с 14-15-суточного возраста [43].

При патологоанатомическом вскрытии отмечают конъюнктивиты, наличие катарального экссудата в просвете трахеи [2, 4, 46], отечность соединительной ткани в области головы, серозно-слизистое и фибринозное воспаление носовых ходов и синусов, энтериты, аэросаккулиты, перитониты и оварииты [31].

Иногда наблюдаются застойные явления в легких или отек легких, скопление мочекислых солей в мочеточечниках. В некоторых случаях выявляют мелкие некротические очаги в печени. Нередко находят изменения, характерные для колибактериоза – перикардит и перигепатит [31].

У кур-несушек, пораженных метапневмовирусом, по результатам исследований ряда ученых [121], в 20% случаев выявляется атрофия яйцевода.

При патоморфологическом исследовании в легких обнаруживают застойную гиперемию, обусловленную переполнением капилляров форменными элементами крови. В интерстициальной ткани и в просвете отдельных трубочек отмечается наличие отечной жидкости. Большая часть воздухоносных трубочек заполнена разрушенными эритроцитами. В результате экстравазкулярного разрушения эритроцитов образуется пигмент гемосидерин, который также присутствует в содержимом воздухоносных трубочек. В отечных подглазничных синусах содержится большое количество псевдоэозинофилов, которые частично находятся в состоянии распада по типу рексиса. На течение воспалительного процесса в синусах указывает наличие нитей фибрина. В печени больных птиц находят признаки серозного гепатита (светлые пространства Диссе) и лимфоидный инфильтрат по ходу сосудов. Мочевые каналцы имеют нечетко выраженную структуру, большинство ядер находится в состоянии пикноза и рексиса. Цитоплазма эпителия мочевых каналцев характеризуется зернистой

дистрофией. В тимусе отмечается сглаживание границ коркового и мозгового вещества, активное образование телец Гассалья в результате активной деструкции тимоцитов. В селезенке выявляют застойную гиперемия, уменьшение лимфоидных клеток в лимфатических фолликулах и преобладание в них макрофагов. В фабрициевой сумке наблюдается присутствие большого количества жировых клеток в междольковой соединительной ткани. Значительное количество клеток мозгового вещества лимфоидных фолликулов в состоянии пикноза и рексиса. Отмечается формирование микрокист в слизистой оболочке, что говорит о редукции фабрициевой сумки [31, 57, 68].

При гистологическом исследовании яйцеводов кур, инфицированных метапневмовирусом, выявляют повреждение эпителия или его полную деструкцию [72].

По данным некоторых исследователей в стаде у половины кур-несушек через 4-11 суток после заражения метапневмовирусом наблюдали диарею зеленовато-коричневого цвета. Кроме того, у больной птицы отмечали нервные явления в виде шаткой походки [31, 95, 116]. У цыплят-бройлеров в возрасте 32-33 суток также наряду с респираторным синдромом может развиваться диарея с выделением зеленовато-коричневых помета. В этих случаях падеж резко возрастает, и болезнь затягивается на несколько недель. При бактериологическом исследовании выделяют *Escherichia coli* [43].

Степень распространения метапневмовирусной инфекции птиц внутри стада или между стадами и тяжесть течения болезни зависят от плотности посадки птицы и качества вентиляции. Сопутствующие инфекции, вызываемые такими патогенами, как *Escherichia coli*, *Bordetella avium*, *Pasteurella*, *Ornithobacterium rhinotracheale*, вирус инфекционного бронхита кур и вирус ньюкаслской болезни, осложняют течение болезни и существенно увеличивают экономические потери.

Кроме того, повреждение метапневмовирусом реснитчатого эпителия респираторного тракта, делает птицу весьма чувствительной к вирусу инфекционного бронхита кур и возбудителю ньюкаслской болезни [56, 91].

1.6. Диагностика метапневмовирусной инфекции птиц

Диагноз на метапневмовирусную инфекцию птиц устанавливают комплексно с учетом эпизоотологических данных, клинических признаков, патологоанатомических изменений и на основании результатов лабораторных исследований с использованием методов ранней и ретроспективной диагностики.

Попытки выделения метапневмовируса с использованием общепринятых методов из проб полевого материала затруднены в связи с очень коротким периодом присутствия возбудителя в организме птиц с момента инфицирования, а также трудоемкостью и длительностью исследований [8].

Патологический материал для вирусовыделения следует отбирать в момент начала проявления клинических признаков, так как период накопления метапневмовируса в высоких титрах составляет всего 3-5 дней [7, 147].

Клинические признаки метапневмовирусной инфекции (МПВИ) у индеек и цыплят не являются патогномоничными и поэтому необходимо использовать методы ранней и ретроспективной диагностики [9, 43].

Ранняя диагностика метапневмовирусной инфекции основана: на выделении вируса на 6-7-суточных СПФ-куриных эмбрионах с заражением в желточный мешок; выделении возбудителя на культурах клеток с идентификацией в реакции нейтрализации с типоспецифическими сыворотками [12, 14, 15, 18, 19, 24, 32, 51, 76, 86, 104, 119, 137]; на обнаружении РНК метапневмовируса в тканях и секретах органов респираторного тракта в полимеразно-цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) с использованием типоспецифических праймеров [7, 8, 15, 54, 62, 82, 85, 87, 88, 113, 149] и обнаружение антигена метапневмовируса в «сэндвич» варианте иммуноферментного анализа [32, 35, 36].

Ретроспективную диагностику проводят с использованием таких методов как: выявление специфических антител в пробах сыворотки крови, полученных от больных или переболевших птиц в иммуноферментном анализе или в реакции нейтрализации [6, 12, 14, 15, 18, 19, 24, 68, 79, 92, 96, 107, 117]; обнаружение метапневмовируса в реакции иммунофлуоресценции [46, 84]; определение

подтипа метапневмовируса в реакции перекрестной нейтрализации [12, 15, 19, 52, 133].

Подтверждением диагноза является доказательство присутствия вируса в клиническом материале и вирусспецифических антител в сыворотке крови больной и переболевшей птицы. Как правило, выделение вируса было гораздо более затруднительным от цыплят, чем от индеек и причина этого непонятна [68, 117]. Хотя имеется сообщение из Тайваня [128] о выделении вируса от цыплят с синдромом опухшей головы.

Наилучшими полевыми пробами для вирусологических исследований считаются целая голова с шеей и трахеей. Пробы патматериала при МПВИ должны перевозиться очень быстро – на льду или в замороженном виде. Для молекулярно-биологических исследований используют пробы слизи из трахеи или хоан от больных птиц [43].

Для первичного выделения вируса из полевого материала, как от индеек, так и от кур используют развивающиеся эмбрионы, инокулируемые в желточный мешок [143] или же трахеальные органные культуры (ТОК) из эмбрионов кур и индеек [85, 86, 137]. Для выделения и репродукции метапневмовируса можно использовать клеточные культуры: клетки Vero или фибробласты куриных эмбрионов (ФЭК) [49, 50, 51, 143]; перевиваемые клеточные линии BGM-70, LMN, MA-104 [39, 90], QT-35 (клеточная линия, происходящая от перепелок), DF-1 (клеточная линия куриного происхождения), VcCoу и ВНЛ-21 (клеточные линии, полученные от мыши и хомяка соответственно), TEF (первичные фибробласты эмбрионов индеек) [90]. Наиболее чувствительными к заражению метапневмовирусом оказались культуры клеток куриных фибробластов и клетки Vero [39].

S.M. Goyal et al. [101] выделили метапневмовирус подтип С первоначально в культуре ФЭК, а затем адаптировали изолят метапневмовируса к клеткам Vero.

Системой для выделения метапневмовируса является трахеальная органная культура, которую обычно готовят из СПФ-куриных эмбрионов или эмбрионов индеек, обладающих равной чувствительностью [85, 137]. Возможны затруднения

при выделении вируса через 6-7 дней после инфицирования, так как вирусосодержащий материал может быть контаминирован, и возбудитель может быть окончательно идентифицирован другими методами, такими как реакция нейтрализации, иммунофлуоресцентное окрашивание или полимеразно-цепная реакция [34, 40, 44, 54, 62].

При экспериментальной инфекции может быть использовано прямое или непрямое иммунофлуоресцентное (ИФ) окрашивание срезов трахеи или носовых ходов, но эта методика не подходит для исследований полевого материала.

R.C. Jones et al. [117] показали, что ИФ окрашивание является более чувствительным методом, чем выделение вируса от индеек, и обеспечивает более быстрое получение результатов [116, 131]. При проведении исследований на обнаружение метапневмовируса у зараженных СПФ-цыплят E. Catelli et al. [68] сравнили выделение вируса с иммунопероксидазным (ИП) окрашиванием и установили его преимущество.

Иммунохимические методы (непрямое иммунофлуоресцентное и иммунопероксидазное окрашивание) применимы для выявления антигена метапневмовируса в репродуктивном тракте птиц после экспериментального заражения индеек [117] и кур-несушек [84].

Сывороточные антитела к МПВ птиц могут быть обнаружены в реакции непрямой иммунофлуоресценции [115], в реакции нейтрализации (РН) [52] и в иммуноферментном анализе [14, 19, 37, 71].

Непрямая иммунофлуоресценция с сывороткой крови от птиц-реконвалесцентов была использована перед тем, как вирус мог быть изолирован при пассировании в ТОК. Реакция нейтрализации является трудоемким и требующим длительного времени тестом. Ее использовали для сравнения штаммов метапневмовируса в перекрестной реакции нейтрализации [12, 15] или для исследования сыворотка крови различных видов птиц, к которым не имелось антиглобулинов [166]. В настоящее время проведение таких тестов вытеснено методикой ELISA [14, 19, 37, 96, 163, 164]. Реакция нейтрализации используется

для диагностики метапневмовирусной инфекции птиц, но гораздо реже, чем иммуноферментный анализ.

На важность выбора антигена для ELISA в своих исследованиях обратили внимание N. Eterradossi et al. [93], так как использование антигена, не отвечающего требованиям может способствовать получению ложно отрицательного результата исследований или исказить результаты исследований в отношении иммуногенности вакцины.

При разработке наборов необходимо ориентироваться на их способность обнаруживать антитела ко всем штаммам, или в качестве альтернативы, к различным подтипам метапневмовируса. Необходимо помнить, что полученные результаты по определению антител в иммуноферментном анализе могут быть недостоверными показателями иммунитета птицы к возбудителю болезни. Но до тех пор, пока не будут разработаны методики определения клеточно-опосредованного иммунитета, которые будут в равной степени просты для исполнения, придется использовать для определения иммунного статуса иммуноферментный анализ.

В настоящее время доступны, по крайней мере, два различных типа коммерческих ELISA наборов. Первый тип предполагает использование планшет с сорбированным неочищенным или очищенным вирусом. Второй тип – это блокирующий вариант ELISA, посредством которого тестируемая сыворотка крови конкурирует с моноклональными антителами, полученными на мышах, за эпитоп вируса, сорбированного на планшете. Теоретически, непрямой метод является более чувствительным. Однако блокирующий вариант ELISA имеет более высокую специфичность, поскольку данный метод не зависит от специфического конъюгата, адаптированного к какому-либо из видов птиц. Возможно, поэтому именно этот вариант является более подходящим для тестирования сыворотки крови от различных видов птиц [132].

При использовании трех разных штаммов метапневмовируса в качестве антигена в ELISA тесте E. Houadfi et al. [111] показали, что не все антигены

выявляли антитела к метапневмовирусу во всех сыворотках крови. Эти данные были подтверждены в реакции нейтрализации [52, 108].

N. Etteradossi et al. [92] обнаружили, что антиген был более эффективен для выявления антител в сыворотках крови, полученных от птиц из различных географических областей, при гомологии с антигеном, используемом в ELISA. Исследователи предположили, что несоответствующий выбор антигена для ELISA может препятствовать диагностике метапневмовирусной инфекции птиц [93]. Аналогичную ситуацию установили авторы при определении уровня антител в ELISA в сыворотках крови вакцинированной птицы, если в качестве антигена использовали гетерологичный штамм по отношению к вакцинному штамму вируса [24, 164].

Таким образом, при интерпретации результатов ELISA возникают разногласия, так как использование различных антигенов в коммерческих наборах обуславливает значимую разницу в интенсивности взаимодействия гомологичных и гетерологичных антигенов и антител.

Обнаружение антител к метапневмовирусу методом иммуноферментного анализа в настоящее время является наиболее часто используемым способом диагностики метапневмовирусной инфекции, как у кур, так и у индеек. Исследование парных сывороток и сравнительные исследования проб сывороток крови от больных и здоровых птиц в ИФА с последующим обнаружением генома метапневмовируса с использованием молекулярно-биологических методов позволяют поставить диагноз на метапневмовирусную инфекцию птиц [43].

В последнее время в вирусологии широко используют полимеразную цепную реакцию в различных ее модификациях, которая основана на обнаружении генома вируса с последующим рестрикционным анализом или секвенированием, а также дифференциацией с помощью типоспецифических праймеров [69, 82, 87, 113, 126].

Для выявления МПВ в респираторном тракте у цыплят J.K.A. Cook et al. [85] сравнили эффективность вирусовыделения и гнездовую реверсивную транскриптазно-полимеразную цепную реакцию (РТ-ПЦР). Исследователи

показали, что обе методики одинаково успешны. Однако ПЦР обеспечивает быстрое получение результата в течение 1 суток, а вирусывыделение – в течение 3 недель и более.

Полимеразно-цепную реакцию с использованием праймеров из гена нуклеотидного белка метапневмовируса применяли для детекции различных подтипов вирусов [62].

J.C. Pedersen et al. [148] проводили оценку чувствительности и специфичности традиционной гнездовой полимеразно-цепной реакции и ревертазной ПЦР (Tag-Man-вариант) при выявлении и идентификации подтипов метапневмовируса птиц в сравнении с методами его изоляции и установили их высокую эффективность.

Идентификация метапневмовируса может быть подтверждена электронной микроскопией [43].

Для постановки диагноза на метапневмовирусную инфекцию также можно использовать иммуногистохимическое окрашивание. Срезы конъюнктивы, подглазничных синусов, носовых раковин, воздухоносных мешков, феоабрициевой сумки и фолликул слепой кишки, зафиксированные в формалине, окрашивают иммунопероксидазой в течение 24-36 часов с целью обнаружения антигена метапневмовируса [115, 116].

1.7. Современные методы диагностики инфекционных болезней птиц

1.7.1. Иммуноферментный анализ

В течение последних десятилетий в диагностике инфекционных болезней птиц особенно широко применяется иммуноферментный анализ, в котором инфекционный агент выявляется на первой фазе взаимодействия антиген-антитело и при последующей фермент-субстратной реакции, что определяет высокую чувствительность данного метода [23]. Быстрота получения результатов и их автоматизированный учет, воспроизводимость и возможность

стандартизации условий постановки анализа делают иммуноферментный анализ наиболее удобным и эффективным методом для мониторинговых исследований при изучении эпизоотологической ситуации по инфекционным болезням в птицеводческих хозяйствах, ретроспективной диагностики инфекционных болезней животных и определения их иммунологического статуса.

Предложено большое количество различных модификаций иммуноферментного анализа, которые различаются либо по числу используемых компонентов иммунологического анализа, либо по природе фермента и способу получения конъюгата.

Твердофазный непрямой вариант ИФА является одним из самых распространенных методов для оценки уровня антител в сыворотке крови против вирусных болезней птиц [19, 33, 110]. Исследования многих авторов [52, 96], при сравнении результатов, полученных с использованием иммуноферментного анализа и в реакции нейтрализации, показали значительные преимущества иммуноферментного анализа.

Иммуноферментный анализ не занимает много времени, результаты легко вводятся в компьютерные программы, с помощью которых можно разработать эффективные схемы вакцинации птицы против инфекционных болезней. В настоящее время некоторые исследователи используют кинетический метод иммуноферментного анализа, основанный на кинетике ферментной реакции, с целью количественного определения антител к патогенам вирусной этиологии у вакцинированной птицы. Этот метод определяет титр антител к вирусным антигенам в одном разведении сыворотки крови на основе данных компьютеризованного анализа [109].

На основе твердофазного варианта иммуноферментного анализа разработаны, утверждены и зарегистрированы иммуноферментные тест-системы практически ко всем вирусным болезням. Тест-системы отечественного производства - ООО «НПП «Авивак» и ФГБНУ «ВНИИЗЖ». Также в Российской Федерации зарегистрированы тест-системы для проведения иммуноферментного

анализа фирм IDEXX (США), BioChek (Голландия) и др., которые широко используются в промышленном птицеводстве.

1.7.2. Молекулярно-биологические методы диагностики

В последние годы активно используется метод полимеразной цепной реакции, высокочувствительный метод молекулярно-генетической диагностики, основанный на многократном увеличении числа копий специфического участка дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) [37, 44].

Полимеразно-цепная реакция была открыта Кэри Мюллісом в 1983 году, за что он был удостоен Нобелевской премии. Метод основан на принципе естественной репликации ДНК, включающем расплетение двойной спирали ДНК, расхождение нитей ДНК и комплементарное достраивание обеих нитей в определенных стартовых блоках. Для создания стартовых блоков в заданных участках ДНК используют две олигонуклеотидные генетические затравки, называемые праймерами. Праймеры комплементарны последовательностям ДНК на левой и на правой границах специфического фрагмента и ориентированы так, что синтез протекает только между ними, удваивая количество копий этого фрагмента [34].

Широко распространенным методом идентификации возбудителя является обратнo-транскриптазная полимеразная цепная реакция (ОТ-ПЦР) [174].

Этот метод позволяет обнаружить вирус без предварительной изоляции и адаптации к клеточным культурам. В основе метода ОТ-ПЦР лежит три основных этапа: экстракция нуклеиновой кислоты, транскрипция РНК вируса в кДНК, амплификация участка кДНК в полимеразно-цепной реакции. Два последних этапа требуют подбора олигонуклеотидных праймерных последовательностей, комплементарных интересующему участку ДНК. В зависимости от выбранных праймеров можно амплифицировать различные участки генома, кодирующего капсидный антиген любого вируса.

Преимущества метода ПЦР для диагностики вирусных болезней – это прямое определение наличия возбудителя, высокая специфичность,

обусловленная выявлением уникального, характерного только для данного возбудителя фрагмента РНК, высокая чувствительность, высокая скорость получения результатов анализа [11].

Для проведения ПЦР-анализа не требуется выделения и выращивания культуры возбудителя, что занимает большое количество времени. Унифицированный метод обработки биоматериала и детекции продуктов реакции, а также автоматизация процесса амплификации дают возможность провести полный анализ за 4-4,5 часа и возможность диагностики не только острого, но и субклинического течения болезни [20, 126].

Использование метода ПЦР для диагностики инфекционных болезней вирусной природы имеет колоссальное значение для решения многих проблем эпизоотологии. Применение этого метода также способствует развитию фундаментальных исследований в области изучения возбудителей малоизученных инфекционных болезней животных.

1.8. Дифференциальная диагностика метапневмовирусной инфекции

Метапневмовирусная инфекция нередко протекает в виде ассоциированных инфекций, характеризующихся поражением респираторного тракта. Ассоциированное течение может быть обусловлено как бактериальными, так и вирусными патогенами [2, 17, 18, 41, 48].

Метапневмовирусную инфекцию дифференцируют от гриппа птиц, ньюкаслской болезни, инфекционного бронхита кур, инфекционного ларинготрахеита, парамиксовирусной инфекции 2-го серотипа, а также от бактериальных инфекций, вызываемых возбудителями, относящимися к родам *Mycoplasma*, *Pasteurella*, *Bordetella*, *Escherichia*, *Ornithobacterium*, *Haemophilus* [46].

Грипп птиц характеризуется сверхострым и острым течением, высокой смертностью, резким снижением и прекращением яйцекладки, депрессией, цианозом гребня, сережек и слизистых оболочек, диареей, редко признаками поражения органов дыхания [2, 4, 45].

При ньюкаслской болезни выявляют кровоизлияния на границе железистого и мышечного желудков (или на апикальной части сосочков в железистом желудке) и илеоцекального соединения, на пейеровых бляшках, на слизистой оболочке прямой кишки. Также выявляют трахеиты, пневмонии, отек легких, снижение яйценоскости и обесцвечивание скорлупы яиц у коричневых кроссов кур [2, 4, 45, 46, 57].

Яйценоскость при инфекционном бронхите кур отличается снесением деформированных яиц, пилообразной кривой яичной продуктивности. При патологоанатомическом исследовании выявляют катаральную пневмонию, аэросаккулиты, нефрозо-нефриты, деформацию яичных фолликулов [46].

Течение инфекционного ларинготрахеита птиц характеризуется клиническими симптомами, геморрагическим воспалением гортани, трахеи с наличием в просвете геморрагических тяжей и гибелью птицы от удушья [2, 4, 45, 46].

1.9. Профилактика и меры борьбы с метапневмовирусной инфекцией птиц

Основным подходом к контролю метапневмовирусной инфекции птиц является использование аттенуированных вакцин для иммунизации молодняка индеек и кур и инактивированных вакцин перед началом яйцекладки у промышленных несушек и птицы родительского поголовья. Были разработаны аттенуированные вакцины, которые обеспечивали защиту поголовья с различной эффективностью в полевых условиях. Все вакцины были получены методом повторных пассажей вирулентного вируса в культуральной системе до достижения различной степени аттенуации [75, 76, 105].

Циркуляция одновременно двух типов метапневмовируса птиц, вызвала пересмотр процесса вакцинации. J.K.A. Cook et al. [80, 81] показали, что вакцины содержащие вирус типа А обеспечивали защиту и кур, и индеек от экспериментального заражения как вирусом типа А, так и вирусом типа В. Данных о защите при применении вакцины, содержащей вирус типа В от

заражения вирусами типа А не было опубликовано. Лучшая защита от метапневмовируса достигается при использовании вакцин из гомологичных подтипов.

Многочисленными исследованиями также подтверждено возникновение перекрестного иммунитета между подтипами А, В и С. Однако обратной реакции не возникает [27].

В США для снижения экономических потерь, вызываемых метапневмовирусной инфекцией у индеек, проводят иммунизацию поголовья [76, 83, 84]. С этой целью были признаны безопасными и эффективными две живые аттенуированные вакцины, изготовленные из метапневмовируса подтипа С [144, 145]. Одна из вакцин была получена посредством серийной репродукции вирулентного штамма метапневмовируса в клеточных культурах и получила обозначение Р63-APV [144]. Другая аттенуированная вакцина была получена методом холодной адаптации и названа са-APV [145]. Накопление вирусосодержащего материала вакцинных штаммов Р-63 и са-APV для изготовления живых аттенуированных вакцин проводили в клеточных культурах Vero [146].

Ф.Е. Jirjis et al. [115] сообщили о результатах применения культуральной вакцины против метапневмовирусной инфекции на 4-недельных индюшатах окулярным методом.

Коммерческие живые вакцины, применяемые в Европе и США, индуцируют низкий гуморальный иммунный ответ, но при этом вакцинированная птица защищена от заражения полевым вирусом. В связи с этим обсуждается роль клеточно-опосредованного иммунитета при метапневмовирусной инфекции птиц [65].

Современные аттенуированные штаммы метапневмовируса обладают ограниченной способностью к репликации, но при этом стимулируют те элементы иммунной системы, которые обеспечивают защиту от полевого вируса. Эффективность живых вакцин основана на стимуляции выработки иммуноглобулинов и развитии клеточно-опосредованных иммунных реакций в

тканях организма, имеющих большое значение для защиты от метапневмовируса [8].

А. Б. Сарбасов с соавт. [42], И. А. Борисова [6, 9], И. А. Борисова, А. В. Борисов [10], Э.Д. Джавадов с соавт. [16] вакцинировали цыплят инактивированной вакциной против метапневмовируса, независимо от иммунного фона, и установили высокий уровень специфических антител в сыворотке крови птиц.

В настоящее время разработана и внедрена в промышленное птицеводство ассоциированная инактивированная вакцина против метапневмовирусной инфекции и ньюкаслской болезни позволяющая получать иммунный ответ одновременно к двум возбудителям, защищающий птицу в течение всего периода эксплуатации [6, 9, 16, 21, 22, 38]. В промышленном птицеводстве применяются и другие коммерческие ассоциированные инактивированные вакцины как российских, так и зарубежных производителей [46]. Гуморальный иммунитет играет важную роль в достижении длительной защиты птицы от полевого вируса.

При применении живой вакцины в сочетании с инактивированной вакциной иммунный ответ достигает более высокого уровня и обеспечивает более эффективную защиту по сравнению с применением только инактивированных вакцин.

Метапневмовирус широко распространен в природе, в связи с этим контроль над болезнью основан, главным образом, на специфической профилактике с использованием коммерческих живых аттенуированных и инактивированных вакцин. Вопрос о применении рекомбинантных аналогов находится в стадии разработки [46].

1.10. Заключение по обзору литературы

Метапневмовирусная инфекция – респираторное заболевание, характеризующееся воспалительными процессами верхних дыхательных путей (носовых ходов, трахеи), инфраорбитальных синусов и сопровождающееся затрудненным дыханием, чиханием, хрипами, выделениями из носа.

Метапневмовирус птиц, является причиной серьезной патологии у индеек (ринотрахеит) и «синдрома опухшей головы» у кур и цыплят. В США это заболевание актуально только для индейководства, где циркулирует метапневмовирус подтипа С, в то время как в Европе доминируют подтипы А и В, причем заболевание регистрируется у индеек, кур и фазанов.

В Российской Федерации метапневмовирусную инфекцию птиц регистрируют на протяжении последних двадцати лет в хозяйствах как мясного, так и яичного направлений продуктивности. Болезнь не вызывает высокой летальности, по сравнению с болезнями, вызываемыми другими представителями семейства (например, вирус ньюкаслской болезни), однако имеет большое эпизоотологическое и экономическое значение в промышленном птицеводстве.

Экономический ущерб от метапневмовирусной инфекции обусловлен снижением прироста живой массы и яичной продуктивности, повышением выбраковки некондиционной птицы, затратами на лечение при осложнении бактериальными инфекциями и ликвидацию болезни.

Многообразие подтипов А, В, С, D возбудителя и различия вирулентных свойств метапневмовируса создают сложности как при профилактике данного заболевания, так и при его диагностике.

Метапневмовирус птиц репродуцируется в тканях верхней части респираторного тракта (носовые полости, гортань, трахея) и конъюнктивы в течение 7-10 суток после инфицирования. Вирус может вызвать временную супрессию клеточно-опосредованного иммунного ответа. Метапневмовирус увеличивает восприимчивость птиц к вторичным бактериальным и вирусным инфекциям, в результате чего болезнь протекает со сложной симптоматикой. Отмечается сложное взаимодействие метапневмовируса с вирусом инфекционного бронхита кур, обладающим способностью быстрее и интенсивнее, чем метапневмовирус (при их одновременном инфицировании) реплицироваться в эпителии верхних дыхательных путей птиц. При этом происходит задержка (торможение) репликации метапневмовируса. Более того, вирус ИБК замедляет скорость формирования антител к метапневмовирусу.

Эпизоотологический анализ, клинические признаки болезни, патологоанатомические изменения не позволяют поставить точный диагноз из-за схожести признаков с признаками других вирусных и бактериальных болезней, поэтому основная роль в постановке диагноза принадлежит лабораторным исследованиям.

Диагностика метапневмовирусной инфекции птиц проводится серологическим методом исследования парных проб сыворотки крови от больных и здоровых кур с использованием иммуноферментного анализа и молекулярно-биологическими методами детекции генома вируса в патологическом материале, а также с помощью вирусологических методов исследований. Комплекс данных исследований позволяет правильно поставить диагноз и дает возможность разработки эффективной системы ветеринарных мероприятий по профилактике и борьбе с метапневмовирусной инфекцией птиц.

2. СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Материалы и методы исследований

Работа выполнена за период с 2014-2017 гг. в отделе диагностики и эпизоотологического анализа Всероссийского научно – исследовательского ветеринарного института птицеводства (ВНИВИП) в соответствии с научно-технической программой НИР № 0599-2014-0221.

При выполнении работы использовали:

Пробы патологического материала (головы и трахеи, слизь из трахеи и хоан) для выделения изолята метапневмовируса птиц отбирали от павших и вынужденно убитых промышленных кур-несушек и от цыплят яичного направления выращивания 15-40-суточного возраста из ЗАО «Птицефабрика Синявинская».

Патматериал от цыплят (мазки из трахеи и носовых ходов) отбирали с интервалом в 3 дня начиная с 15-суточного возраста. Пробы отбирали от 10 голов цыплят каждого возраста и формировали общую пробу. Всего было сформировано 9 общих проб.

Патматериал хранили при температуре минус 18-22 °С до проведения вирусологических исследований и ПЦР.

Суспензию из патологического материала готовили по общепринятым методикам [3].

Выделение вируса проводили путем перемежающихся пассажей на развивающихся СПФ-куриных эмбрионах 5-6 – суточного возраста, в культурах клеток или методом последовательных пассажей на клетках Vero и методом полимеразной цепной реакции [45].

Сыворотка крови, тестировали в непрямом варианте иммуноферментного анализа. В сыворотке крови цыплят и промышленных кур-несушек определяли наличие антител к возбудителю метапневмовирусной инфекции птиц методом иммуноферментного анализа. Для этого отбирали по 23 проб сыворотки крови от каждой группы птиц.

Исследовали образцы сыворотки крови цыплят и кур, не содержащие макроскопических признаков бактериальной и грибковой контаминации.

Для бактериологического исследования патологический материал отбирали от промышленных кур-несушек 28-29 недельного возраста с клиническими признаками метапневмовирусной инфекции. Для исследования брали соскобы с трахеи, синусов, внутренние органы (сердце, печень), пробы тонкого кишечника (двенадцатиперстной кишки).

При разработке схемы специфической профилактики метапневмовирусной инфекции птиц в опытной группе молодняк промышленных кур-несушек вакцинировали против метапневмовирусной инфекции птиц в возрасте 15 и 45 суток живой вакциной производства ВНИВИП с последующей ревакцинацией в возрасте 110 суток инактивированной эмульсионной вакциной производства ВНИВИП. Эффективность вакцинации оценивали по уровню антител к метапневмовирусу в пробах сыворотки крови иммунизированных цыплят через 21 сутки после 2-кратной вакцинации живой вакциной, перед вакцинацией инактивированной вакциной и через 6 недель после применения инактивированной вакцины.

Диагностикумы:

- набор для обнаружения антител к возбудителю метапневмовирусной инфекции птиц «Avian Rhinotracheitis Antibody Test Kit» производства фирмы BioChek (Нидерланды);
- набор для обнаружения антител к возбудителю инфекционного бронхита кур «Infectious Bronchitis Antibody Test Kit» производства фирмы BioChek (Нидерланды);
- набор для обнаружения антител к возбудителю ньюкаслской болезни «Newcastle Disease Antibody Test Kit» производства фирмы BioChek (Нидерланды);
- набор для выделения РНК «Рибо сорб», производства ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, г. Москва;

- набор для выделения ДНК «ДНК сорб», производства ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, г. Москва;
- набор реагентов для электрофоретической детекции в агарозном геле «ЭФ», производства ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, г. Москва;
- набор для проведения амплификации ScreenMix, производства ЗАО «Евроген», г. Москва;
- набор «Реверта-L», для получения кДНК на матрице РНК, производства ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, г. Москва;
- реакционная смесь для проведения ПЦР-РВ, компания Синтол, г. Москва;
- тест-система «Мик гал» для выявления возбудителя микоплазма *M. gallisepticum* методом полимеразной цепной реакции;
- тест-система «Мик-син» для выявления возбудителя микоплазма *M. synoviae* методом полимеразной цепной реакции.

Инкубационные яйца и цыплята:

- яйца СПФ–кур, полученные из фирмы «Lohmann Tierzucht» (Германия), 200 штук;
- цыплята, инкубированные из СПФ-яиц фирмы «Lohmann Tierzucht» в условиях ВНИВИП, 50 голов.

Культуры клеток:

- первично-трипсинизированная культура клеток СПФ-куриных эмбрионов (ККЭ);
- перевиваемая культура клеток почки африканской зеленой мартышки, клетки Vero (институт гриппа АМН, Санкт-Петербург).

Питательные среды, сыворотки, растворы и реактивы:

- питательная среда Игла MEM или DMEM, жидкая, с L-глутамином;
- питательная среда 199, жидкая, с L-глутамином;
- питательная среда DMEM/F12 с Neres, жидкая;
- сыворотка крови крупного рогатого скота, неконсервированная для культур клеток;
- сыворотка крови плодов коровы;

- трипсина раствор, 0,25% фирмы «US BIO»;
- версена раствор, 0,02%;
- Хенкса раствор фирмы «Nuclone»;
- питательные среды и растворы из полнокомпонентной смеси фирмы «Nuclone», производства ООО «Биолот»;
- микробиологические среды: мясо-пептонный бульон (МПБ), мясо-пептонный агар (МПА), мясо-пептонный печеночный бульон под вазелиновым маслом (среда Китта-Тароцци), агар Сабуро, производства ВНИВИП.

Материалы и оборудование, используемые в иммунологических тестах:

- набор одноканальных лабораторных дозаторов по ГОСТ 28311, с варьируемыми объемами доз 0,5-10 мм³, 10-100 мм³, 20-200 мм³, 100-1000 мм³, 2-20 мм³, (Thermo Labsystems), РФ.
- стерильный ламинарный шкаф «БАВп-01-Ламинар-С» -1,2», Россия;
- программируемый твердотельный термостат «Гном», производства «ДНК-Технология», Россия;
- персональная мини-центрифуга для пробирок Microspin 12, Biosan, Латвия;
- микроцентрифуга-вортекс, микро-спин FV-2400 Biosan, Латвия;
- амплификатор программируемый четырехканальный для микропробирок вместимостью 0,5 см³ «Терцик», производства ООО «НПО ДНК-Технология», Россия;
- ДТ-322-ДНК-амплификатор с нагревающейся крышкой термоблока производства ООО «НПО ДНК-Технология» сертифицирован в соответствии со стандартами ГОСТ Р 51318.22-99 кл. А и ГОСТ 12.2.025-76;
- амплификатор в режиме «реального времени» (FRT) Rotor Gene Q, производства QIAGEN, Германия;
- ПЦР-бокс с ультрафиолетовым рециркулятором АВп-01-Ламинар-С» -1,2», ламинарной системы, Россия.
- микроцентрифуга-вортекс, микро-спин FV-2400 Biosan, Латвия;
- отсасыватель вакуумный медицинский с колбой ловушкой «ОМ-1»;
- камера для горизонтального электрофореза SE -2, «НПФ Биоклон», Россия;

- источник постоянного тока с напряжением 150-460 В «Эльф 4», производства ДНК-Технология, Россия;
- ультрафиолетовый трансиллюминатор с кабинетом для просмотра гелей, Vilber Lourman, Франция;
- видеосистема с цифровой видеокамерой и программного обеспечения «In Lab» для регистрации результатов;
- микроволновая печь для плавления агарозы мощностью не менее 800 Вт, соответствующую требованиям ГОСТ ИЕС 60335-2-25;
- насос вакуумный (медицинский отсасыватель) с колбой ловушкой с емкостью для сбора жидкостей ОМ-1, Россия;
- холодильник бытовой с температурными режимами +4°C, Атлант, Белоруссия;
- морозильник бытовой, с температурным режимом минус 23 °С, Samsung;
- автоматический секвенатор MegaBACE, GE Healthcare Bio-Sciences, Sweden;
- весы электронные II класса точности ЕК-12Ki, A&D, Япония.

При проведении испытаний оборудование обслуживали в соответствии с инструкциями производителя и требованиям ГОСТ Р ИСО/МЭК 17025-2006.

Реактивы для молекулярно-генетических исследований:

- набор реагентов для выделения РНК («Рибо-Сорб», ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии, Роспотребнадзора, Россия), включающий лизирующий раствор, сорбент универсальный, растворы для отмывки 1, 3 и 4, РНК буфер;
- набор реагентов для выделения ДНК («ДНК-Сорб», ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии, Роспотребнадзора, Россия), включающий раствор для лизиса, сорбент универсальный, растворы для отмывки 1 и 2, ТЕ-буфер;
- набор реагентов для обратной транскрипции «Реверта-L», включающий транскриптазу обратную рекомбинантную, модифицированную из вируса лейкемии мышей MMLV-ревертазу, реагенты «RT-mix» и «RT-G-mix-2»,

содержащие гексануклеотидные праймеры со случайной последовательностью нуклеотидов;

- растворы прямых и обратных праймеров, молярной массой по 10 пкмоль/мкл, зондов, молярной массой по 5 пкмоль/мкл позволяющих амплифицировать соответствующие фрагменты геномов вируса;
- 2,5х реакционную-смесь для проведения ПЦР-РВ, содержащую 2,5х ПЦР буфер Б (KCl, TrisHCl (pH8,8), 6,25мМ MgCl₂), SynTaq ДНК-полимеразу, дезоксинуклеозидтрифосфаты, глицерол, Tween 20;
- ПЦР-смесь ScreenMix, содержащую высокопроцессивная Taq ДНК-полимеразу, длительного хранения, многократного замораживания-размораживания, смесь нуклеотидтрифосфатов концентрацией 0,2 мМ каждого нуклеотида, 2 мМ Mg²⁺, красный и желтый красители, не влияющие на работу полимеразы, и компоненты, увеличивающие плотность пробы для удобства нанесения на гель;
- вода деионизованная, свободная от рибонуклеаз, дезоксирибонуклеаз, неорганических и органических примесей компания Синтол, г. Москва;
- трис-боратный буфер (ТБЕ) концентрированный с бромидом этидия (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии, Роспотребнадзора, Россия);
- агароза для электрофореза ДНК (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии, Роспотребнадзора, Россия);
- маркер молекулярных масс ДНК, состоящий из фрагментов двухцепочечной ДНК, длиной от 100 п.н. до 5000 п.н., производства Thermo scientific; масло вазелиновое медицинское по ГОСТ 3164 -78
- реагент для очистки продуктов ПЦР «ExoSap-IT» USB Products Affymetrix, Inc. USA
- спирт этиловый 96°С - ГОСТ 5962-2013;
- ацетат аммония по ГОСТ 3117-78;
- реагент для секвенирования ДНК «DYEnamic ET terminator kit».

Материалы, используемые в бактериологических исследованиях:

Плотные селективные и дифференциально-диагностические питательные среды:

- среда Эндо и XLD-агар для выделения кишечной микрофлоры;
- стафилококковый агар для выделения стафилококков;
- полимиксиновая среда для выделения энтерококков;
- кровяной агар для выявления гемолизом микроорганизмов;
- среда Вильсона-Блера (в пробирках) для выделения клостридий;
- мясо-пептонный агар.

Методы бактериологических исследований. Большинство посевов культивировали в обычных условиях в течение 24 часов, стафилококковый агар 48 часов при температуре 37,5°C. Учёт и идентификацию колоний проводили при помощи биохимических, микроскопических и серологических методов исследований. Пересев энтеробактерий проводили на трёхсахарный агар Олькеницкого, среды Клигlera и Ресселя, среду Симмонса.

Окраску мазков проводили по Граму. Родовую и видовую идентификацию культур сальмонелл осуществляли при помощи реакции агглютинации на стекле с поливалентными и моновалентными сальмонеллзными сыворотками.

Чувствительность доминирующих видов микроорганизмов к антибактериальным препаратам изучали диско-диффузным методом (метод дисков) на среде Мюллер-Хинтона. Использовали диски, изготовленные промышленным способом.

Культура клеток. Первично-трипсинизированную культуру клеток готовили из кожно-мышечной ткани 10-суточных СПФ-куриных эмбрионов по методике R. Dulbecco & M. Vogt в модификации J.S Younger [45].

В качестве ростовой питательной среды использовали среду Игла MEM/DMEM и среду 199 в соотношении 2:1 с добавлением 10% нормальной сыворотки крупного рогатого скота и антибиотиков: бензинпенициллина 100 ЕД/см³ и стрептомицина сульфата – 100 мкг/см³. Ткани диспергировали

раствором, состоящим из 0,25% раствора трипсина, 0,02% раствора версена и раствора Хенкса в соотношении 1:2:2. Диспергирование проводили на магнитной мешалке при температуре 36-37 °С в течение 10-15 мин до полного расщепления фрагментов ткани на отдельные клетки. По истечении указанного времени клеточную взвесь фильтровали через 4-х слойный марлевый фильтр во флаконы с охлажденной смесью сыворотки крови крупного рогатого скота до 10% и среды Игла (соотношение 1:1) с целью остановки действия трипсина.

Суспензию клеток центрифугировали при 900-1000 об/мин в течение 15-20 минут. Осадок клеточной массы ресуспендировали и готовили суспензию клеток в ростовой питательной среде Игла с содержанием 650-750 тыс. кл. /см³.

Клеточную суспензию разливали в пробирки и матрасы по 2 и 220 см³ соответственно и инкубировали в стационарных условиях при температуре (37,0±0,5) °С. В течение 48 часов на поверхности стекла формировался клеточный монослой.

Клетки Vero пересеивали с интервалом 5-6 суток бесцентрифужным методом. Для снятия монослоя клеток со стекла использовали растворы трипсина 0,25% и версена 0,02% в соотношении 1:9. Монослой клеток дважды отмывали раствором Хенкса, затем в матрас добавляли смесь растворов трипсина и версена, прогретую до 37 °С и инкубировали в термостате в течение 5-10 минут до начала отделения клеток от стекла.

Раствор версена с трипсином сливали, а клетки ресуспендировали в определенном объеме питательной среды. Клетки подсчитывали в камере Горяева и разводили питательной ростовой средой (среда ДМЕМ/F12 с Нерес, до 10% фетальной сыворотки и антибиотиков) до концентрации 200-250 тыс.кл. /см³. Разливали в пробирки по 1,0 см³ и культивировали в стационарных условиях при температуре (37,0±0,5) °С.

Титрование вируса на культуре клеток по цитопатогенному действию (ЦПД) проводили в чувствительной клеточной культуре (ККЭ, клетки Vero) методом десятикратных разведений и с соответствующими контролями. Из

культуральной вирусосодержащей жидкости готовили 10-кратные разведения 10^{-1} - 10^{-8} на поддерживающей среде без добавления сыворотки.

Каждым разведением вируса заражали 4 пробирки с культурой клеток. Время контакта вируса с клеточным монослоем составляло 30 минут при комнатной температуре. Затем во все пробирки добавляли по $1,8 \text{ см}^3$ поддерживающей среды Игла MEM. Зараженные и контрольные культуры инкубировали при температуре 38°C . Ежедневно в течение 5-7 суток проводили учет цитопатогенного действия, выражая его по 4-крестовой системе.

Величину титра вычисляли по методу L.J. Reed & H. Muench [44] и выражали в $\lg \text{ТЦД}_{50}$ в $1,0 \text{ см}^3$ (тканевая цитопатогенная доза).

Гистологические исследования. Пробы патматериала (трахеи) отбирали от вынужденно убитых здоровых и клинически больных (с видимыми респираторными признаками) промышленных кур-несушек.

Для фиксации трахей применяли щадящий метод. Материал выдерживали в 5%-ном растворе нейтрального формалина в течение 12-ти часов, а затем помещали в 10%-ный раствор формалина. Через сутки раствор заменяли на свежий. Объем фиксирующей жидкости превышал объем материала не менее чем в 10 раз. Срезы изготавливали на микротоме. Полученные срезы окрашивали по Ниссию (гематоксилин+эозин). Для микроскопического исследования гистологических срезов применяли световой микроскоп Nikon E 200 (Япония), увеличение 40×10 .

Статистическая обработка данных. Все полученные результаты обработаны статистически. При обработке результатов пользовались методами вариационной статистики, изложенные в соответствующих руководствах [1,53].

2.2. Результаты собственных исследований

В последнее десятилетие в промышленных птицеводческих хозяйствах Российской Федерации возросло количество случаев проявления метапневмовирусной инфекции птиц, в том числе в промышленных стадах кур-несушек.

Такому широкому распространению МПВИ птиц способствует многообразие подтипов возбудителя (А, В, С, D) и различие вирулентных свойств метапневмовируса, способность к персистенции и циркуляции возбудителя среди синантропной и перелетной птицы, использование племенного материала без учета эпизоотической ситуации в хозяйстве, высокая концентрация разновозрастной птицы на ограниченной территории и несоблюдение технологии выращивания (параметры микроклимата, плотность посадки, кормление, ветеринарно-санитарные требования). Течение инфекционного процесса, вызванного метапневмовирусом птиц, часто осложняется вторичными бактериальными и вирусными инфекциями, в результате чего болезнь протекает со сложной симптоматикой. Диагностика при этом затруднена.

2.2.1. Характеристика ЗАО «Птицефабрика Синявинская»

Общество учреждено Ленинградским областным Комитетом по управлению государственным имуществом распоряжением от 30.11.1992 г. путем реорганизации государственного предприятия ПО «Синявинское» имени 60-летия Союза ССР в соответствии с Постановлением Правительства РФ от 04.09.1992 г. № 708 «О порядке приватизации и реорганизации предприятий и организаций агропромышленного комплекса» и письмом Государственного Комитета РФ по управлению государственным имуществом от 15.10.1992 г. № ПМ-9/75-07, другими законодательными актами РФ.

Предприятие расположено в Кировском районе Ленинградской области, пос. Приладожский.

Основными видами деятельности являются:

- производство, хранение, переработка, реализация сельскохозяйственной продукции;
- производство и реализация пищевых и товарных яиц;
- промышленная переработка и реализация мяса птицы и мясопродуктов из мяса птицы;
- производство и реализация продуктов глубокой переработки яиц;
- иные виды деятельности, не запрещенные законодательством РФ.

Птицефабрика работает по принципу предприятия закрытого типа с полным циклом производства, который включает: завоз племенного суточного молодняка из Голландии, выращивание племенного молодняка, содержание родительского стада, инкубирование племенного яйца и вывод суточного гибридного молодняка, выращивание молодняка для промышленного стада кур-несушек, содержание промышленной несушки, получение, переработка и реализация яичной и мясной продукции.

Кросс птицы – Ломан белый классик.

Поголовье кур-несушек составляет более 5,5 млн. голов, объем производства товарного яйца – более 1,3 млрд. штук в год.

Кормление птицы осуществляется полнорационными кормами. Рецепты комбикормов составлены в соответствии с рекомендациями по выращиванию кросса, с возрастом птицы и фазой продуктивности птицы.

Параметры микроклимата, плотность посадки, световые режимы разработаны на основе рекомендаций производителя кросса.

Подготовка птицеводческих помещений, посадка и убой птицы осуществляется в соответствии с графиками.

Ветеринарное обслуживание поголовья проводится на основании разработанных графиков и схем проведения ветеринарно-санитарных, лечебно-профилактических и противоэпизоотических мероприятий.

Рекомендуемые показатели яичной продуктивности кур-несушек (финальный гибрид) с учетом генетического потенциала кросса представлены в таблице 1.

Рекомендуемые показатели яичной продуктивности для кур-несушек
(финальный гибрид)

Возраст, неделя	Продуктивность на среднюю несушку, %	Возраст, неделя	Продуктивность на среднюю несушку, %
19	10,0	47	93,2
20	40,0	48	92,9
21	60,0	49	92,6
22	75,1	50	92,3
23	85,2	51	92,0
24	90,4	52	91,6
25	92,5	53	91,3
26	93,6	54	90,9
27	94,1	55	90,5
28	94,4	56	90,2
29	94,7	57	89,7
30	94,9	58	89,3
31	95,0	59	88,9
32	95,1	60	88,4
33	95,2	61	87,9
34	95,2	62	87,4
35	95,2	63	86,9
36	95,2	64	86,4
37	95,1	65	85,8
38	95,0	66	85,3
39	94,9	67	84,7
40	94,8	68	84,1
41	94,6	69	83,5
42	94,4	70	82,9
43	94,2	71	82,3
44	94,0	72	81,7
45	93,8	73	81,3
46	93,5	74	80,4

**2.2.2. Изучение эпизоотологической ситуации в ЗАО «Птицефабрика
Синявинская» по метапневмовирусной инфекции птиц**

В ЗАО «Птицефабрика Синявинская» работает ветеринарная лаборатория, в которой на постоянной основе проводятся мониторинговые и диагностические серологические исследования по широкому спектру инфекционных болезней. По данным серологического мониторинга на наличие поствакцинальных антител в соответствии с планом профилактических и противоэпизоотических

мероприятий, было установлено, что птицеводческое хозяйство благополучно по острым инфекционным болезням. Серологические исследования также проводились в отделе диагностики и эпизоотологического анализа ВНИВИП и в Федеральном государственном бюджетном учреждении «Ленинградская межобластная ветеринарная лаборатория» (ФГБУ «Ленинградская МВЛ»).

На птицефабрике птицу вакцинировали против ньюкаслской болезни, инфекционного бронхита кур, инфекционной бурсальной болезни (ИББ), инфекционного энцефаломиелита птиц (ИЭП), инфекционного ларинготрахеита и синдрома снижения яйценоскости (ССЯ-76). Хозяйство было благополучно по микопlasма-галисептикум инфекции, колибактериозу, что позволяло иммунизировать птицу против ИЛТ аэрозольным методом. Для вакцинации использовали живую аттенуированную вакцину из штамма «ВНИИБП» производства ВНИВИП.

В 2015 году на одном из птичников на 3-4 сутки после проведения вакцинации против ИЛТ в возрасте 30-33-х суток у цыплят отмечались массовые конъюнктивиты с выделением серозного и серозно-фибринозного экссудата, опухание подглазничных синусов, хрипы, кашель, затрудненное дыхание. Также наблюдалось снижение поедаемости корма, угнетенное состояние и повышенный отход.

При патологоанатомическом вскрытии были выявлены конъюнктивиты, трахеиты с наличием в просвете трахеи серозного или серозно-фибринозного экссудата и фибринозных пробок, цианоз гребешка, сережек и видимых слизистых оболочек, застойные явления в легких.

Через 3-5 суток у цыплят при патологоанатомическом вскрытии стали выявлять признаки бактериальных инфекций – пневмонии, перикардиты, перигепатиты. При вскрытии подглазничных синусов обнаруживали сгустки фибрина.

Для установления причины возникновения повышенной поствакцинальной реакции были отобраны образцы вакцины против инфекционного ларинготрахеита птиц и направлены на исследование во ВНИВИП. Кроме этого,

были отобраны сыворотки крови от цыплят. Повторный отбор проб сыворотки крови от цыплят был произведен через 21 сутки после появления клинических симптомов. Пробы сыворотки крови исследовали в ИФА с использованием наборов Biocheck на наличие антител к возбудителям, инфекционного бронхита кур и метапневмовирусной инфекции. Сыворотки крови на наличие антител к ньюкаслской болезни исследовали в реакции задержки гемагглютинации (РЗГА). Результаты исследований проб сыворотки крови цыплят на наличие антител к вирусам ньюкаслской болезни, инфекционного бронхита кур и метапневмовирусу представлены в таблице 2.

Таблица 2

Результаты серологических исследований сыворотки крови цыплят (n=23)

Наименование болезни	Средний титр антител / обратные значения				
	Кол-во проб	При выявлении клинических симптомов (возраст 35 суток)	КВ, %	Через 21 сутки после выявления клинических симптомов (возраст 56 суток)	КВ, %
Инфекционный бронхит кур	23	1:2235 (1:909 – 1:3056)	54	1:2286 (1:1238 – 1:4661)	49
Метапневмовирусная инфекция	23	1:583 (1:252 – 1:1126)	52	1:16608 (1:11073 – 1:21090)	14
Ньюкаслская болезнь, РЗГА	23	1:8 – 1:128	-	1:16 – 1:128	-

Из данных таблицы 2 видно, что значения титров антител к вирусу ньюкаслской болезни через 21 сутки после проявления клинических симптомов практически не изменились. Средний титр антител к вирусу инфекционного бронхита кур также не имел диагностически значимых отличий. Средний титр антител к метапневмовирусу в момент проявления клинических симптомов составлял 1:583 (от 1:252 до 1:1126) с коэффициентом вариации (КВ) 52%. Все пробы сыворотки крови были серонегативными. Через 21 сутки после выявления клинических симптомов средний титр антител к метапневмовирусу составил 1:16608 (от 1:11073 до 1:21090) с коэффициентом вариации 14%. Все пробы были положительными, имели высокие значения титров антител к метапневмовирусу и низкий коэффициент вариации, что в отсутствие вакцинации свидетельствует о переболевании цыплят метапневмовирусной инфекцией птиц.

В период проведения исследования отобранных образцов вакцины против ИЛТ на одном из птичников промышленного цеха у кур-несушек в возрасте 28 недель (196 суток) было отмечено снижение уровня яичной продуктивности до 90,5%, что ниже рекомендуемых показателей для кросса на 3,7%, с прогрессирующей динамикой. Максимальное снижение яичной продуктивности составило 16,8% от рекомендуемых показателей. Данные по динамике яичной продуктивности кур-несушек промышленного стада представлены на рисунке 1.

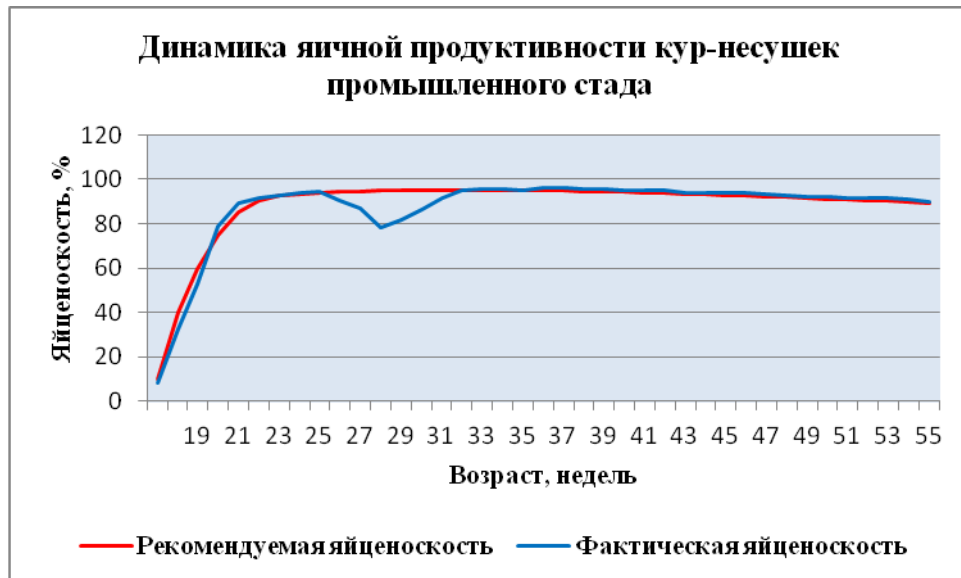


Рисунок 1 - Динамика яичной продуктивности промышленных кур-несушек, неблагополучного по метапневмовирусной инфекции стада

На рисунке видно, что в возрасте 28 недель уровень яйценоскости был ниже рекомендуемых показателей на 3,7%. В возрасте 29, 30, 31, 32 и 33 недели показатели продуктивности также были ниже рекомендуемых на 8,0, 16,8, 13,3, 9,0, и 3,6 % соответственно. В возрасте 35 недель яичная продуктивность составила 95,4%, т.е. выше рекомендуемых показателей на 0,2%, что свидетельствует о восстановлении яичной продуктивности.

В связи со снижением яйценоскости были отобраны сыворотки крови от кур неблагополучного стада в момент снижения яйценоскости в возрасте 196 суток и через 21 сутки после этого в возрасте 217 суток. От павших и от вынужденно убитых кур-несушек с клиническими симптомами были отобраны пробы патологического материала (трахеи, слизь из носовых ходов, хоан, трахеи) для

проведения вирусологических, молекулярно-биологических и гистологических исследований.

Серологические исследования проб сыворотки крови птиц на наличие специфических антител проводили не только к метапневмовирусу, но и к возбудителям ньюкаслской болезни, инфекционного бронхита кур, инфекционного энцефаломиелита птиц и синдрома снижения яйценоскости, так как при возникновении данных болезней наблюдается выраженное снижение яйценоскости у кур-несушек. Результаты исследований представлены в таблице 3.

Таблица 3

Результаты серологических исследований проб сыворотки крови
промышленных кур-несушек (n=23)

Наименование болезни	Средний титр антител / обратные значения				
	Кол-во проб	При выявлении клинических симптомов (возраст 196 суток)	КВ,%	Через 21 сутки после выявления клинических симптомов (возраст 217 суток)	КВ,%
Ньюкаслская болезнь	23	1:19058 (1:13422 – 1:21967)	43	1:18954 (1:12531 – 1:22185)	45
Инфекционный бронхит кур	23	1:9516 (1:4693 – 1:14742)	36	1:9085 (1:4577 – 1:15549)	45
Инфекционный энцефаломиелит птиц	23	1:6648 (1:3325 – 1:8960)	37	1:6081 (1:2685 – 1:8581)	41
Метапневмовирусная инфекция	23	1:1361 (1:219 – 1:5748)	129	1:21572 (1:10957 – 1:28997)	19

Результаты исследований, приведенные в таблице 3, показывают, что результаты исследований в возрасте 196 и 217 суток на наличие антител к вирусу ньюкаслской болезни, инфекционного бронхита кур, инфекционного энцефаломиелита птиц не имеют какой-либо достоверной разницы в отношении среднего значения титров антител. Патологические значения титров антител к вирусам НБ, ИБК и ИЭП в результате проведенных исследований выявлены не были. В возрасте 196 суток средний титр антител к метапневмовирусу составил 1:1361 (от 1:219 до 1:5748) с коэффициентом вариации 129%. Через 21 сутки после выявления клинических симптомов средний титр антител к

метапневмовирусу составил 1:21572 (от 1:10957 до 1: 28997) с коэффициентом вариации 19%.

Таким образом, значительный рост уровня титров антител и снижение коэффициента вариации был установлен к метапневмовирусу, что в отсутствие вакцинации свидетельствует о переболевании птицы.

Результаты исследования сывороток крови на наличие антител к возбудителю синдрома снижения яйценоскости представлены в таблице 4.

Таблица 4

Результаты серологических исследований проб сыворотки крови на наличие антител к вирусу синдрома снижения яйценоскости (n=23)

Возраст птицы, суток	Кол-во проб	Титры антител										
		0	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	1:1024
196	23				1	2	6	7	5	2		
217	23				1	3	5	8	5	1		

Из результатов исследований, представленных в таблице 4, видно, что в пробах сыворотки крови кур-несушек в возрасте 217 суток не отмечен прирост титров антител к вирусу синдрома снижения яйценоскости. Это свидетельствует, что снижение яичной продуктивности не связано с инфицированием птицы вирусом ССЯ-76.

Выявление специфических антител к метапневмовирусу в пробах сыворотки крови промышленных кур-несушек послужила основанием для изучения эпизоотологической ситуации на птицефабрике с использованием вирусологических (выделение и идентификация вируса) и молекулярно-биологических методов исследования.

Исследование образцов вакцины против инфекционного ларинготрахеита птиц, применяемой в птицеводческом хозяйстве, показало соответствие иммунологического препарата СТО (стандарту организации), техническим условиям, требованиям безопасности, показателям антигенной активности и безвредности. При проведении молекулярно-биологических исследований контаминации вакцины посторонними агентами установлено не было.

2.2.3. Выделение метапневмовируса птиц в различных биологических системах

2.2.3.1. Отбор проб и обработка патологического материала

Для проведения вирусологических исследований брали смывы и соскобы из инфраорбитальных синусов, слизистых оболочек неба и трахеи. Для выделения вируса готовили суспензии на растворе Хенкса или на физиологическом растворе, содержащем антибиотики в 1,0 см³: бензилпенициллина 100 ЕД, 100 мкг. стрептомицина сульфата, 25 мкг амфотерицина В, и выдерживали при комнатной температуре в течение 1-2 часов. Суспензию центрифугировали при 3000 об/мин в течение 10 минут. Контроль на стерильность суспензии проводили посевами на мясо-пептонный бульон, мясо-пептонный агар, среду Китт-Тароцци и агар Сабуро, наблюдение вели в течение 10 суток при температуре 37°С.

2.2.3.2. Выделение вируса на развивающихся куриных эмбрионах

Для выделения метапневмовируса птиц использовали развивающиеся СПФ-куриные эмбрионы 5-6-суточного возраста. Перед заражением эмбрионы овоскопировали и отбирали подвижные с хорошо развитой сосудистой системой.

Заражение проводили в желточный мешок суспензией патологического материала в объеме 0,1-0,2 см³. Для каждого вида патологического материала использовали не менее 10 эмбрионов, контролем служили 10 незараженных эмбрионов. Эмбрионы инкубировали в течение 5-6 суток при температуре 37,5°С и относительной влажности 55-60% и ежедневно овоскопировали. Погибшие в течение 48 часов эмбрионы выбраковывали, а эмбрионы, павшие в последующие сутки наблюдения и оставшиеся живыми после 6 суток инкубации охлаждали при 4-6°С и вскрывали.

От каждого эмбриона стерильно отбирали экстраэмбриональную жидкость и оболочки желточного мешка. Для контроля стерильности делали посеvy на МПА, МПБ и агар Сабуро.

Нами было установлено присутствие вируса по наличию следующих изменений в эмбрионе: гиперемия зародыша различной степени, инъекция сосудов и гиперемия желточного мешка. Проводили 2-3 пассажа на куриных эмбрионах. При этом изменения в зародыше оставались слабо выраженными. Поэтому дальнейшую работу по выделению вируса проводили в культурах клеток.

2.2.3.3. Выделение вируса в клеточных культурах

Для выделения метапневмовируса птиц использовали первично-трипсинизированную культуру клеток, полученную из СПФ-куриных эмбрионов 10-11 – суточного возраста и перевиваемые клетки Vero.

Первично-трипсинизированную культуру клеток готовили из кожно-мышечной ткани куриных эмбрионов путем диспергирования в 0,25% растворе трипсина. Культуру выращивали в стационарных условиях в течение 2-3 суток до формирования ровного плотного монослоя в ростовой среде Игла MEM и среде 199 в соотношении 2:1 с содержанием 10% сыворотки крови крупного рогатого скота.

Перед заражением пробирочные культуры клеток освобождали от ростовой среды, отмывали поддерживающей средой без сыворотки крови, вносили суспензию из патологического материала в объеме 0,2 см³ и оставляли культуру при (37,5±0,5) °С в течение 30-60 минут для адсорбции вируса. Затем в пробирки с инфицированной культурой вносили 1,0 см³ поддерживающей среды.

Зараженные культуры инкубировали в течение 5-7 суток при температуре 37,5°С до появления выраженного цитопатогенного действия вируса.

По мере проведения последовательных пассажей, мы отметили усиливающийся цитопатический эффект в монослое культуры, который выражался округлением клеток в ограниченных участках монослоя, появлением в них цитоплазматической зернистости на 3-4 сутки после заражения. Дегенерацию клеток на 70-80% отмечали на 6-7 сутки, затем в отдельных участках наблюдали

образование синцития, как характерный признак ЦПД для метапневмовируса птиц (рисунок 2).

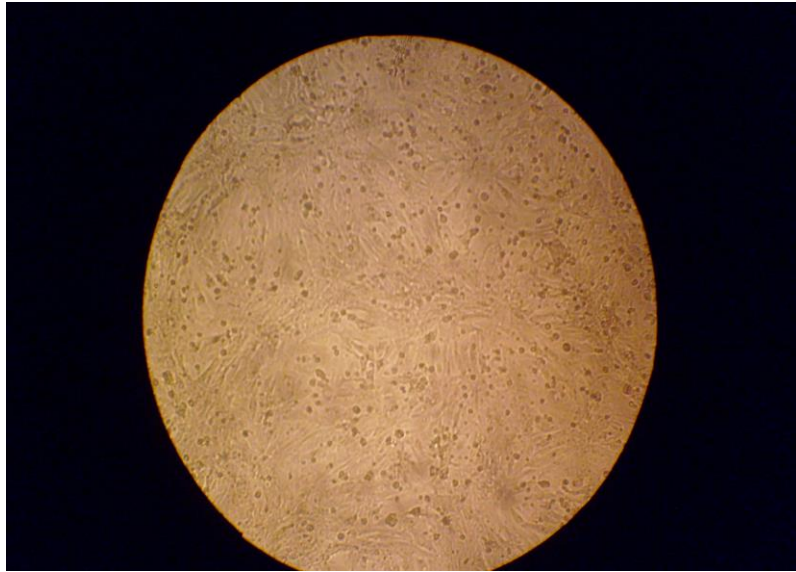


Рисунок 2 - Клетки Vero, зараженные метапневмовирусом подтипа В через 72 часа инкубации

Таким образом, при вирусологическом исследовании из патматериала (трахеи, слизь из хоан), отобранного от вынужденно убитой и павшей птицы, в клетках Vero и фибробластах куриных эмбрионов был выделен метапневмовирус птиц.

2.2.3.4. Обнаружение метапневмовируса с помощью обратной транскрипции – полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР)

Вирусосодержащий материал, полученный при заражении клеточных культур, исследовали на обнаружение метапневмовируса с помощью ОТ-ПЦР.

Выделение РНК проводили из мазков, сделанных со слизистой хоан и 20% суспензии из измельченных трахей. Лизирующий раствор и раствор для отмывки 1 прогревали при температуре от 60 °С до 65 °С до полного растворения кристаллов. В каждую пробирку со 100 мкл исследуемой пробы вносили по 450 мкл лизирующего раствора, используя наконечники с фильтром. Далее пробирки плотно закрытые тщательно перемешивали на вортексе и 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 РНК на носитель.

Очистку адсорбированной РНК проводили поэтапно с использованием раствора для отмывки 1, раствора для отмывки 3 и раствора для отмывки 4. Каждый раз тщательно ресуспендировали сорбент на вортексе, центрифугировали 30 секунд при 10000 об/мин на микроцентрифуге и надосадочную жидкость удаляли вакуумным отсасывателем и отдельным наконечником. После чего, пробирки помещали в твердотельный термостат и высушивали сорбент при 65 °С в течение 5 минут. После высушивания в пробирки добавляли по 50 мкл РНК-буфера для элюции РНК из сорбента в раствор, перемешивали на вортексе и центрифугировали на микроцентрифуге при 13 000 об/мин в течение 1 минуты. Получили надосадочная жидкость, содержащая очищенную от ингибиторов РНК.

Обратную транскрипцию проводили с помощью набора Реверта-L. Все реактивы сначала размораживали и встряхивали с помощью микроцентрифуги. Для проведения одного анализа реактивы смешивали в пропорциях, указанных в таблице 5.

Таблица 5

Пропорциональные объемы реагентов для получения кДНК на матрице РНК

Реактивы	Объем, мкл.
RT-G-mix-1	10,0
RT-mix	0,4
Ревертаза (MMlv)	0,5
Проба	20,0

Затем пробирки ставили в амплификатор (термостат) и инкубировали 30 минут при температуре 37 °С. В реакции обратной транскрипции, нами была получена кДНК. Для последующей постановки полимеразной цепной реакции кДНК разводили в 2 раза ДНК-буфером (к 20 мкл кДНК отдельным наконечником

с аэрозольным барьером добавляли 20 мкл ДНК-буфера, аккуратно перемешивали пипетированием 10 раз).

Срок хранения готового препарата кДНК при температуре не выше минус 16 °С в течение 7 дней, или при температуре не выше минус 68 °С в течение 1 года.

Аmplификация фрагментов генома метапневмовируса птиц с электрофоретической детекцией продуктов амплификации

В реакции использовали видоспецифические праймеры для выявления метапневмовируса подтипа А (APVB F и APVB R) с размером 501 п.н. и подтипа В (APVA F и APVA R), размером 291 п.н.

Праймеры были нами подобраны на основе литературных данных и анализа нуклеотидных последовательностей в международной базе данных Genbank. Анализ вариабельности нуклеотидных последовательностей и поиск консервативных участков, необходимых для выбора праймеров проводили с помощью программы Vector NTI Advance 11.5.4.

Специфичность выбранных праймеров определяли с использованием алгоритма Blast в базе данных ncbi.nlm.nih.gov. Выбранные праймеры имеют 100 % гомологию только с последовательностями МПВ подтипа А и подтипа В. Результаты исследований представлены в таблице 6.

Таблица 6

Последовательности праймеров для выявления метапневмовируса птиц

Ген	Праймеры	Последовательность праймеров	Позиция в референтной последовательности	Референтная последовательность	Размер ампликона п.н.
МПВ подтипа А					
Ген G	APVA F APVA R	F-CCGGGACAAGTATCTCTATGG R-CCACACTTGAAAGATCTACCC	6097-6118 6598-6578	MF093139.1	501
МПВ подтипа В					
Ген G	APVB F APVB R	F-GGCTTGACGCTCACTAGCAC R-GAGCCAATAAGCCCAAACAA	6125-6144 6416-6397	AB548428.1	291

ПЦР проводили в реакционной смеси, содержащей 5 мкл ПЦР-смеси ScreenMix, с Taq ДНК-полимеразой, смесь нуклеотидтрифосфатов с концентрацией 0,2 мМ каждого нуклеотида, 2 мМ Mg², красный и желтый красители, по 1 мкл прямого и обратного праймера и 9 мкл деионизированной воды.

В микропробирки объемом 0,6 см³ вносили по 15 мкл приготовленной реакционной смеси. Затем в одну пробирку вносили 10 мкл отрицательного контрольного образца, в другую пробирку положительного контрольного образца, в остальные по 10 мкл кДНК. Запускали на амплификаторе следующий протокол амплификации. Протокол амплификации представлен в таблице 7.

Таблица 7

Протокол амплификации

Температура, °С	Время, сек	Число циклов
95°С	300	1
95°С	10	40
55°С	20	
72°С	10	
72°С	60	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 см³ трисборатного буфера концентрированного с бромидом этидия и объем доводили дистиллированной водой до 500 см³, тщательно перемешивали. Затем в стеклянную термостойкую колбу на 250 см³ вносили 1,8 г агарозы, наливали 100 см³ 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 °С. 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, отбирали из-под слоя масла по 10–15 мкл проб 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».

Учет результатов ПЦР. Для предотвращения получения ложноположительных и ложноотрицательных результатов с этапа выделения РНК использовали отрицательный и положительный контроль реакции. В качестве положительного контроля использовали вакцинные штаммы 8544 и VC-03 метапневмовируса птиц. В качестве отрицательного контроля стерильный физиологический раствор.

В результате проведенной полимеразно-цепной реакции с исследуемым вирусосодержащим материалом, был зарегистрирован фрагмент длиной 291 п.н., что свидетельствует о наличии метапневмовируса подтипа В. Результаты исследований представлены на рисунке 3.

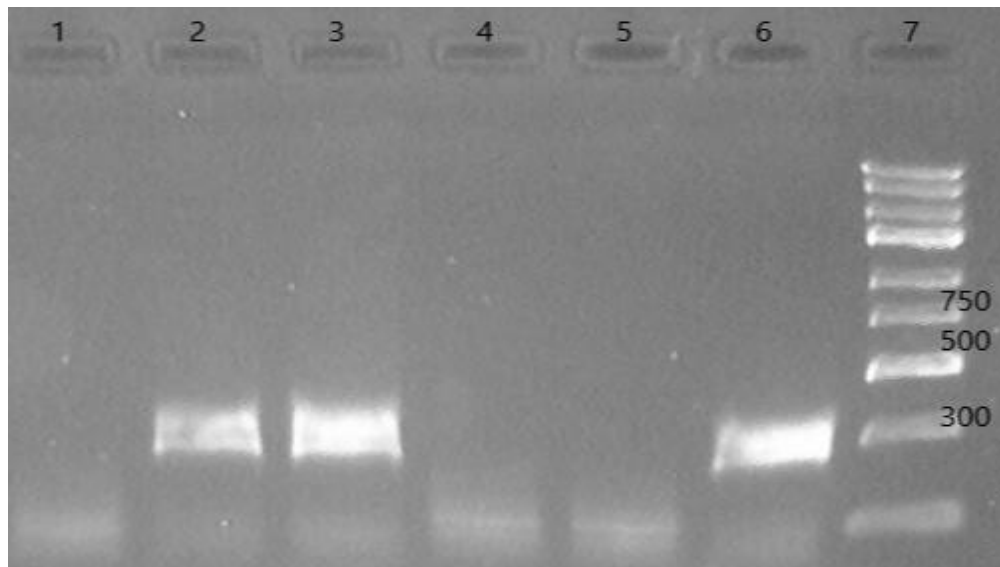


Рисунок 3 - Результаты электрофореза продуктов амплификации фрагмента генома метапневмовируса подтипа В в вирусосодержащем материале:

1- отрицательный контроль выделения; 2,3 - положительные пробы; 4,5 - отрицательные пробы; 6 - вакцинный штамм VC-03 МПВ птиц; 7 - маркер молекулярной массы

Фрагмент ДНК длиной 501 п.н., характерный для метапневмовируса подтипа А, в конечном продукте ПЦР не регистрировался, что свидетельствует об отсутствии его в исследуемом материале. Результаты исследования представлены на рисунке 4.

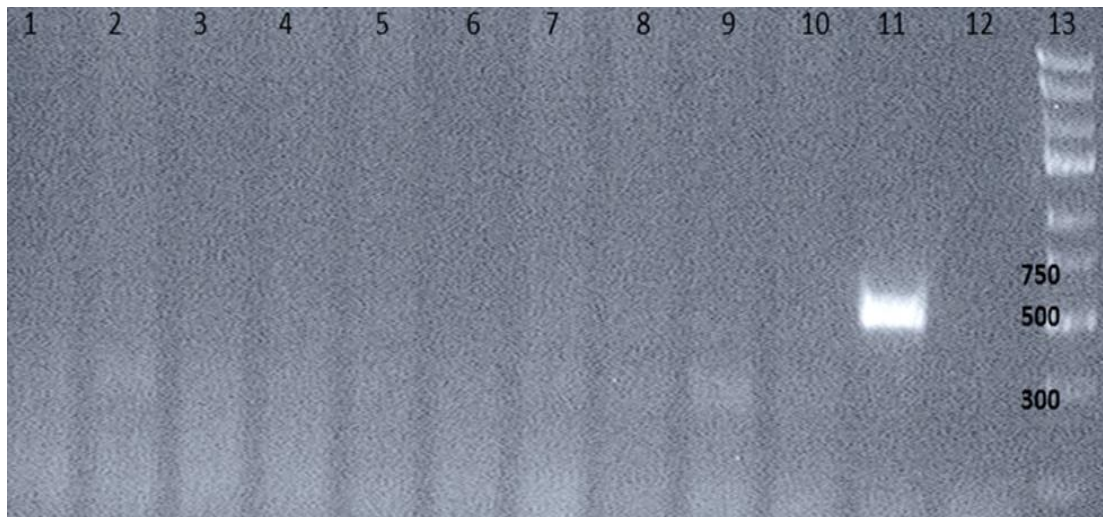


Рисунок 4 - Результаты электрофореза продуктов амплификации фрагмента генома метапневмовируса подтипа А в вируссодержащем материале:

9- отрицательный контроль выделения; 2-7 - отрицательные пробы; 8 - вакцинный штамм 8544 МПВ птиц; 1,10 - маркер молекулярной массы

Образование данных фрагментов было строго специфично и не наблюдалось никаких фрагментов при добавлении к ДНК метапневмовируса подтипа А к праймерам подобранным к метапневмовирусу подтипа В и наоборот.

Для подтверждения специфичности праймеров определяли нуклеотидную последовательность ампликонов, полученных в ПЦР, и сравнивали их с гомологичными последовательностями в NCBI BLAST. Нуклеотидную последовательность определяли с использованием набора «DYEnamic ET terminator kit».

В камеру для электрофореза заливали гель толщиной 8 мм, использовали гребенку с шириной зубца 10 мм. Выделяли фрагмент нуклеиновой кислоты (НК) из геля следующим образом: 50 мм³ смеси, полученная в реакции ПЦР вносили в лунки. Проводили электрофорез. На трансиллюминаторе располагали гель, при помощи скальпеля вырезали фрагмент геля, содержащий целевой продукт ПЦР. Кусочки геля с НК помещали в заранее приготовленные колонки со стекловолокнистым фильтром. Убирали колонки с гелем на минус 70 °С на 30-40 мин. Затем колонки с гелем доставали из морозильника и центрифугировали

колонки при 4000-5000 об./мин в течение 5-10 мин. Раствор, оказавшийся в нижней пробирке, смешивали с 0,25 объемом ацетата аммония, четырьмя объемами 96% этанола и помещали на минус 20 °С на 30 мин. Центрифугировали пробирки при 10000 об./мин 15 мин. Сливали супернатант, промывали осадок 80% спиртом, высушивали и растворить в 10 мкл. деионизированной воды.

Очищенные ПЦР-продукты секвенировали с использованием прямого и обратного праймера. Для проведения реакции в тонкостенные пробирки вместимостью 0,2 см³ вносили очищенный ПЦР-продукт (5-20 нг)-1 мкл., праймер молярной концентрацией 5 пмоль/мкл.-1мкл, реакционная смесь для секвенирования (из набора)-2 мкл. воды деионизированной-1 мкл. Общий объем реакционной смеси должен быть 5 мкл. Сиквенсовую реакцию проводили на амплификаторе с термостатируемой крышкой, соблюдая режим термостастирования, представленный в таблице 8.

Таблица 8

Протокол сиквенсовой реакции

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

Полученные после сиквенсовой реакции реакционную смесь объемом 5 мкл. - очищали от избытка дНТФ, флуоресцентно-меченых дидезоксирибонуклеозидтрифосфата (ддНТФ), секвенирующего праймера. Для этого в каждую пробирку по 1 мкл. 7,5 М уксусно кислого аммония 18 мкл. 96% этанола. Центрифугировали 20 мин при 10000 об./мин. сливали супернатант, промывали осадок 100 мкл. 80% этанола, высушивали и растворяли осадок в буфере для нанесения.

Подготовленные анализируемые пробы, содержащие продукты секвенирования, разделяли методом капиллярного электрофореза с детекцией сигнала флюоресценции с помощью автоматического секвенатора MegaBase 1000. Результаты исследований представлены на рисунке 5.

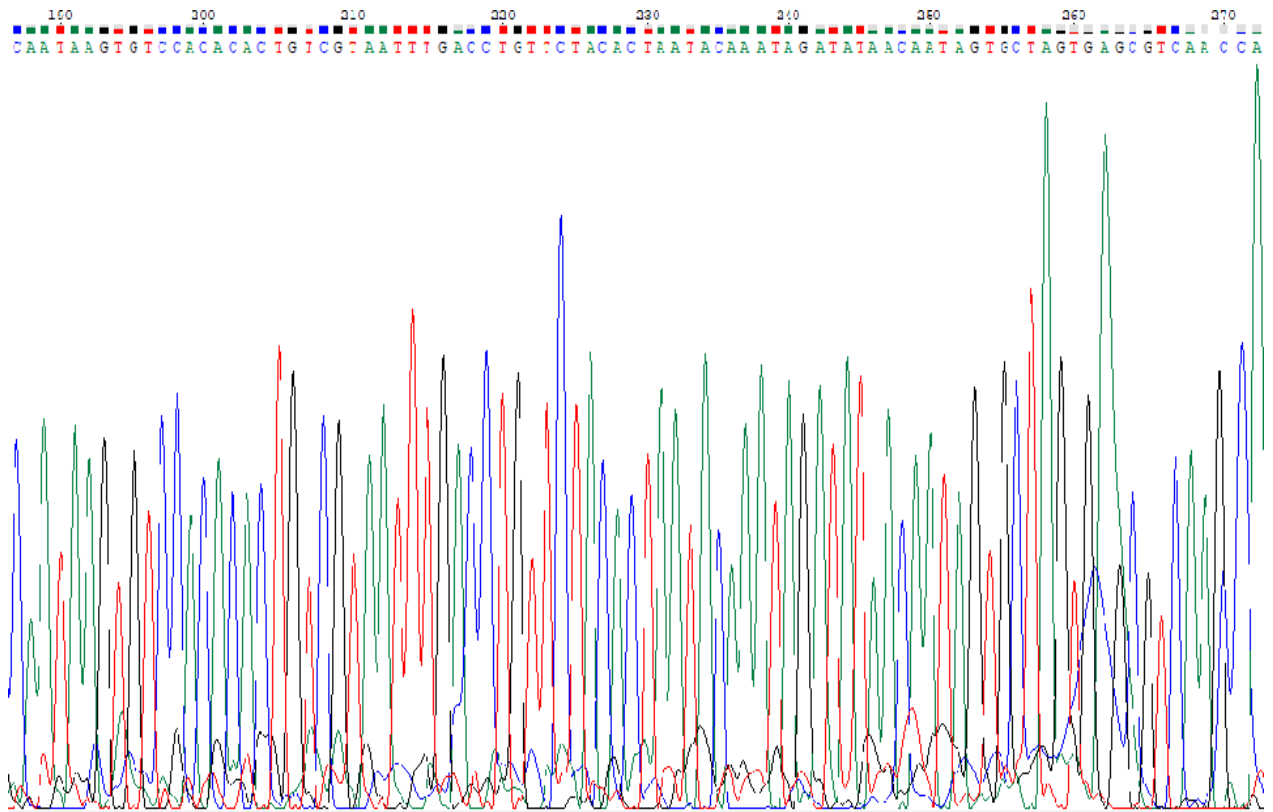


Рисунок 5 - Фрагмент хроматограммы при идентификации метапневмовируса

При анализе последовательности фрагмента гена G образца изолята, выделенного от цыплят, была обнаружена гомология 96% со штаммом GB 1407/06 метапневмовируса подтипа В.

Таким образом, разработанные нами праймеры для постановки полимеразно-цепной реакции позволили идентифицировать возбудителя метапневмовирусной инфекции птиц и провести серотипирование метапневмовируса птиц методами электрофоретической детекции и секвенирования.

2.2.4. Гистологические исследования

С целью изучения воздействия метапневмоируса на реснитчатый эпителий трахеи были проведены гистологические исследования. Для гистологического исследования были отобраны трахеи от здоровой и клинически больной птицы. Кусочки трахеи фиксировали в формалине по щадящей методике. Зафиксированный материал в плотно укупоренной стеклянной посуде направляли для проведения гистологического исследования. Результаты исследований состояния реснитчатого эпителия трахеи представлены на рисунках 6 и 7.

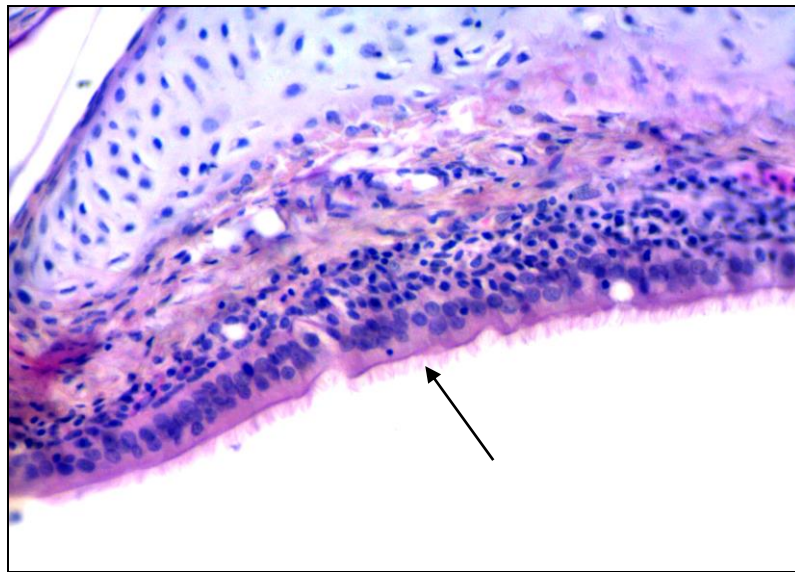


Рисунок 6 - Активный реснитчатый эпителий слизистой оболочки трахеи. Окраска гематоксилин-эозином. Увеличение x400

На рисунке 6 видны слизистая оболочка, которая без четкой границы переходит в подслизистый слой и гиалиновый хрящ. Внутреннюю поверхность трахеи выстилает однослойный многорядный столбчатый респираторный эпителий. На его поверхности имеются многочисленные реснички, а также видны бокаловидные клетки. Эпителиальные клетки лежат на базальной мембране. Видны ядра, расположенные в несколько рядов.

Слизь, выделяемая бокаловидными клетками и реснички, препятствуют проникновению чужеродных частиц различной этиологии (в том числе бактериальной и вирусной природы) сквозь поверхность слизистой оболочки. В

результате дегенеративных изменений реснитчатого эпителия блокируется функция механического защитного барьера, что способствует проникновению патогенных микроорганизмов в респираторный тракт птиц.

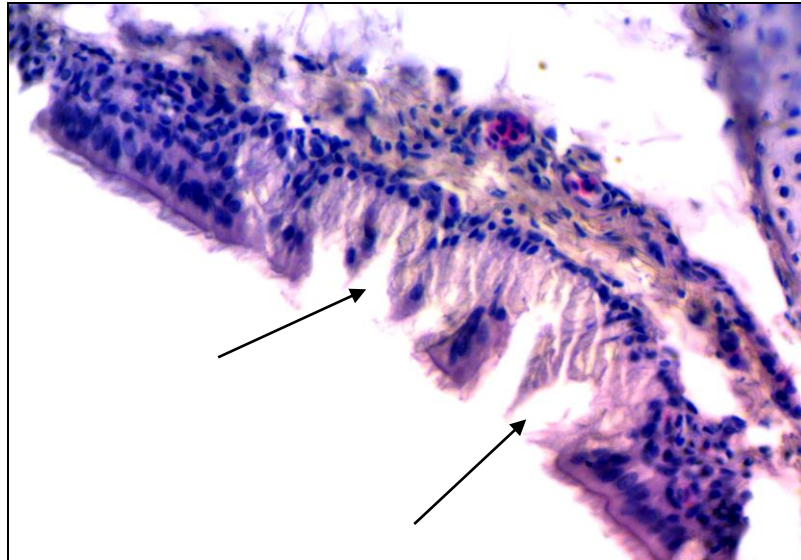


Рисунок 7 - Дегенерация реснитчатого эпителия трахеи при МПВИ. Окраска гематоксилин-эозином. Увеличение x400

На рисунке 7 видно, что при метапневмовирусной инфекции на некоторых участках вплоть до базальной мембраны происходит разрушение однослойного многорядного столбчатого реснитчатого эпителия и бокаловидных клеток, что приводит к снижению защитной функции слизистой оболочки трахеи и способствует проникновению патогенной микрофлоры бактериальной и вирусной этиологии.

2.2.5. Клинические признаки и патологоанатомические изменения

у кур-несушек при метапневмовирусной инфекции

По результатам анализа эпизоотической ситуации было установлено, что факторами, которые способствовали возникновению метапневмовирусной инфекции, являлись сезонность, большая концентрация поголовья на ограниченной территории и в птичниках, завоз племенного поголовья из-за

рубежа, факторы окружающей среды (наличие на территории дикой птицы и др.). Условия содержания и кормления соответствовали нормативным показателям, действующим в птицеводческом хозяйстве.

При клиническом осмотре поголовья промышленных кур-несушек неблагополучного стада были выявлены следующие признаки: снижение яйценоскости ниже рекомендуемых показателей на 3,7 - 16,8%; у отдельных особей конъюнктивиты с наличием пенистого экссудата на конъюнктиве глаз и в носовых ходах. У некоторых особей отмечался отек в области подчелюстного пространства, подглазничных или инфраорбитальных синусов различной степени выраженности. Также выявлялась «спящая» и «узкоглазая» птица. Клинические признаки представлены на рисунках 8-11.



Рисунок 8 - «Спящая» птица



Рисунок 9 - Опухание инфраорбитальных синусов, «спящая» птица



Рисунок 10 – Сужение глазной щели («узкоглазая» птица)



Рисунок 11 – Опухание инфраорбитальных синусов

При патологоанатомическом вскрытии павшей птицы из неблагополучного птичника регистрировали следующие патологоанатомические изменения: синуситы, отечность соединительной ткани головы, скопление слизи в хоанах и серозно-слизистого экссудата в трахее, гиперемия трахеи разной степени выраженности, желточные перитониты. У единичных особей встречались признаки гемосидероза. Гемосидероз обусловлен выпотеванием крови или фибрина в подкожную клетчатку, что придает голове зеленовато-синеватый цвет. Патологоанатомические признаки, обнаруженные при вскрытии павшей птицы из неблагополучного птичника, представлены на рисунках 12-15.



Рисунок 12 – Пенистый экссудат в носовых ходах



Рисунок 13 – Скопление слизистого экссудата в хоанах



Рисунок 14 – Гиперемия трахеи. Скопление серозно-слизистого экссудата в трахее



Рисунок 15– Желточный перитонит

При осложнении метапневмовирусной инфекции бактериальной флорой (*E.coli*) при патологоанатомическом вскрытии обнаруживали перигепатиты, перикардиты, аэросаккулиты (рисунок 16).



Рисунок 16 – Фибринозный перикардит, перигепатит и аэросаккулит

2.2.6. Бактериологические исследования патологического материала при метапневмовирусной инфекции

На птицефабрике «Синявинская» было проведено 4 тура бактериологических исследований патматериала от промышленных кур-несушек 28-29-недельного возраста в период вспышки метапневмовирусной инфекции.

Клинически больных и павших промышленных кур-несушек из неблагополучного птичника исследовали на наличие патогенной бактериальной флоры. Для проведения бактериологических исследований использовали соскобы с трахеи, синусов, внутренние органы (сердце, печень), пробы тонкого кишечника (двенадцатиперстной кишки).

Первичные посевы из внутренних органов производили стерильными одноразовыми пастеровскими пипетками в пробирки с мясопептонным бульоном или транспортной средой (тиогликолевая среда) при необходимости транспортировки материала, средой для накопления сальмонелл (магниевый бульон). Соскобы с трахеи отбирали скальпелем или стерильными ватными палочками в транспортную систему со средой Стюарта (при необходимости транспортировки).

Посев проб с трахеи производили на плотную питательную среду в чашках Петри - колумбийский агар с кровью барана и антибиотиком гентамицин. Посевы инкубировали в термостате в микроаэрофильных условиях при температуре +37,5°C в течение суток. Из первичных посевов из органов после 24-часовой инкубации в термостате при температуре 37,5°C делали пересевы на плотные селективные и дифференциально-диагностические питательные среды в чашках Петри.

В результате исследований из внутренних органов кур в 60% случаев (из сердца, печени, двенадцатиперстной кишки) были выделены культуры кишечной палочки *Escherichia coli*.

При бактериологическом исследовании из поражённых трахей кур (30%) выделены культуры кокковой микрофлоры - гемолитического и негемолитического стафилококков, белого стафилококка *Staphylococcus epidermidis*. Из одной пробы была выделена культура орнитобактерии *Ornithobacterium rhinotracheale*. От трёх кур (из печени, лёгких, инфраорбитальных синусов) были выделены культуры *Salmonella Gallinarum*.

Культуры клостридий из проб кишечника не были выделены ни в одной пробе. Спектр бактериальной флоры, выделенной в ЗАО «Птицефабрика Сиявинская» представлен на рисунке 17.

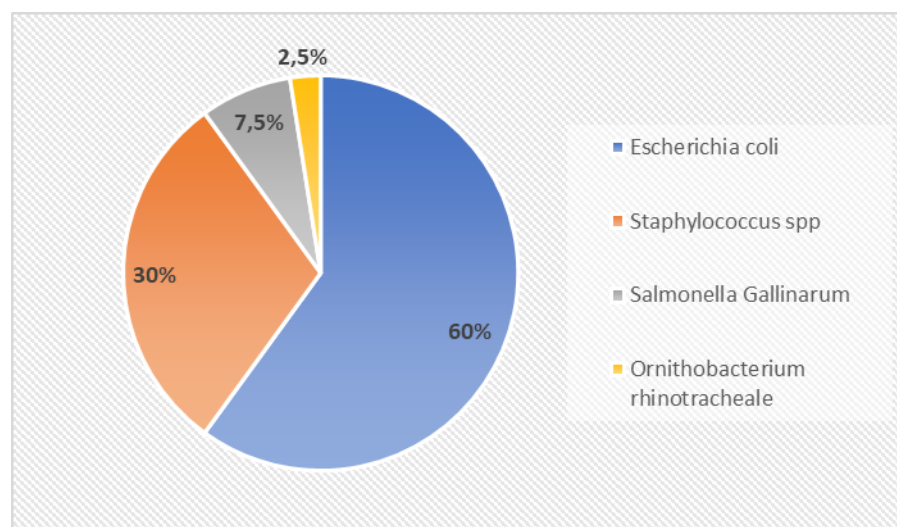


Рисунок 17 - Спектр бактериальной микрофлоры, выделенной в ЗАО «Птицефабрика Сиявинская»

У доминирующих видов выделенных микроорганизмов методом дисков была изучена чувствительность к антибактериальным препаратам разных групп: антибиотикам пенициллинового ряда, цефалоспорином, тетрациклинам, макролидам, аминогликозидам, полипептидам, фторхинолонам, амфениколам, сульфаниламидам, нитрофуранам. Результаты бактериологических исследований представлены в таблицах 9 – 12.

Таблица 9

Чувствительность выделенной микрофлоры к антибактериальным препаратам групп пенициллины, макролиды и тетрациклины

Вид микроорганизма	Диаметр зоны задержки роста в мм					
	Амоксициллин НИИЭМ 12/13-16/17	Азитромицин НИТА-ФАРМ 12/14-17/18	Тилозин ГОСТ 13/14-20/21	Эритромицин ГОСТ 15/16-21/22	Тетрациклин ГОСТ 14/15-17/18	Доксициклин НИИЭМ 15/16-18/19
<i>E. coli</i> 1 сердце	0	16	0	7	16	0
<i>E. coli</i> 4 печень	0	10	0	9	11	9
<i>E. coli</i> 5 сердце	0	10	12	10	0	8
<i>Staph. spp</i> 6 печень	0	15	10	10	25	21
<i>Salm. Gallinarum</i> 6 печень	0	18	0	0	21	16
<i>E. coli</i> 10 сердце	0	17	0	0	13	8
<i>O. rhinotracheale</i> 11 трахея	0	15	18	10	17	20

Таблица 10

Чувствительность выделенной микрофлоры к антибактериальным препаратам
группы аминогликозиды, полипептиды (полимиксины)

Вид микро организма	Диаметр зоны задержки роста в мм				
	Гентамицин ГОСТ 14/15-16/17	Канамицин ГОСТ 14/15-18/19	Неомицин ГОСТ 12/13-16/17	Колистин Белфармаком 11/12-14/15	Колистин Каренкол Каризоо 11/12-14/15
E. coli 1 сердце	20	17	16	16	16
E. coli 4 печень	10	10	16	16	16
E. coli 5 сердце	13	17	11	17	17
Staph. spp 6 печень	15	10	15	10	10
S. Gallinarum 6 печень	19	17	18	16	16
E. coli 10 сердце	13	17	14	17	17
O.rhinotracheale 11 трахея	13	14	12	16	16

Таблица 11

Чувствительность выделенной микрофлоры к антибактериальным препаратам
групп хинолоны/фторхинолоны

Вид микро организма	Диаметр зоны задержки роста в мм				
	Левифлоксацин ГОСТ 13/14-16/17	Энрофлоксацин ГОСТ 17/18-21/22	Ципрофлоксацин ГОСТ 15/16-20/21	Ципрофлоксацин Белфармаком 15/16-20/21	Флубактин Ветпром
E. coli 1 сердце	12	12	18	15	0
E. coli 4 печень	19	17	22	19	9
E. coli 5 сердце	19	19	21	18	13
Staph. spp 6 печень	14	13	12	10	0
S.Gallinarum 6 печень	13	11	13	10	13
E. coli 10 сердце	21	19	23	23	15
O.rhinotracheale 11 трахея	15	12	14	18	15

Амфениколы, ансамицины, плевромутилины, цефалоспорины,
сульфаниламиды, нитрофураны

Вид микро- организма	Диаметр зоны задержки роста в мм					
	Левомицетин ГОСТ 15/16- 18/19	Флороксанол Флорфеникол НИТА- ФАРМ 14/15- 18/19	Пневмотил Тилмикозин НИТА- ФАРМ 10/11 13/14	Цефтозит Цефтиофурил НИТА-ФАРМ 17/18- 20/21	Котримоксазол ГОСТ 10/11- 15/16	Фурадонин ГОСТ 15/16- 18/19
<i>E. coli</i> 1 сердце	9	18	11	9	0	18
<i>E. coli</i> 4 печень	11	17	11	21	7	23
<i>E. coli</i> 5 сердце	12	23	10	11	0	13
<i>Staph. spp</i> 6 печень	21	21	13	13	7	16
<i>Salm. Gallinarum</i> 6 печень	24	22	13	24	9	20
<i>E. coli</i> 10 сердце	20	21	10	18	0	15
<i>O.rhinotracheale</i> 11 трахея	11	22	18	15	9	9

При изучении чувствительности выделенных культур кишечной палочки к антибактериальным препаратам установлена их чувствительность, в т.ч. высокая к фторхинолонам (левофлоксацину, энрофлоксацину), ансамицинам (флорфениколу), аминогликозидам (гентамицину, неомицину), полипептидам (колистину).

Культуры стафилококков показали чувствительность, в т.ч. высокую к тетрациклиновой группе препаратов (тетрациклину, доксициклину), ансамицинам (флорфениколу), полипептидам (колистину), макролидам (тилмикозину).

Культуры сальмонелл были чувствительны к ансамицинам (флорфениколу), тетрациклинам (тетрациклину, доксициклину), полипептидам (колистину), аминогликозидам (гентамицину, неомицину), макролидам (азитромицину).

Культуры орнитобактерии были чувствительны к ансамицинам (флорфениколу), тетрациклинам (доксциклину), макролидам (тилмикозину)

Таким образом, обобщая результаты бактериологических исследований поражённых органов кур родительского стада при метапневмовирусной инфекции, следует отметить, что выявлена инфицированность кур кишечной палочкой, гемолитическим и негемолитическим стафилококком. От некоторых птиц были выделены культуры сальмонелл и орнитобактерий. Культуры клостридий не были выделены ни в одной пробе. Полученные данные свидетельствуют о том, что метапневмовирусная инфекция в хозяйстве протекает в ассоциации с возбудителями бактериальных инфекций.

На основании результатов проведенных исследований было принято решение о введении в систему лечебно-профилактических мероприятий антимикробные препараты в соответствии выявленной чувствительностью.

2.2.7. Разработка схемы специфической профилактики метапневмовирусной инфекции птиц

2.2.7.1. Определение сроков иммунизации молодняка промышленных кур-несушек против метапневмовирусной инфекции птиц

Известно, что наиболее эффективным методом борьбы против метапневмовируса птиц является вакцинация. С целью определения возраста инфицирования птицы полевым метапневмовирусом в одном из птичников на выращивании молодняка промышленных кур-несушек у цыплят отбирали мазки из трахеи с интервалом 3 суток. Пробы отбирали, начиная с 15-суточного возраста до 40 суточного возраста, не менее чем от 10 цыплят каждого возраста. Пробы от цыплят одного возраста объединяли в общий пул. Всего было сформировано 9 общих проб, которые были исследованы в ПЦР на наличие метапневмовируса.

В ходе проведения молекулярно-биологических исследований метапневмовирус выявляли, начиная с 27-суточного возраста. При иммунизации птицы против метапневмовирусной инфекции необходимо строгое соблюдение

интервалов между применением вакцин против респираторных инфекций, прежде всего против инфекционного ларинготрахеита птиц.

В связи с установлением факта циркуляции метапневмовируса среди цыплят промышленного стада, а также в связи со вспышкой метапневмовирусной инфекции у промышленных кур-несушек, было принято решение о введении в схему специфической профилактики птицефабрики вакцинации против метапневмовирусной инфекции птиц.

На основании результатов исследований по определению возраста инфицирования цыплят полевым метапневмовирусом, с учетом проводимых в хозяйстве вакцинаций и сроков применения вакцины против МПВИ нами было рекомендовано иммунизировать цыплят живой вакциной, содержащей подтип В метапневмовируса в возрасте 15 и 45 суток с последующей ревакцинацией инактивированной вакциной, содержащей подтип В в возрасте 110 суток.

При проведении специфической профилактики метапневмовирусной инфекции с использованием живых вакцин следует учитывать, что ведущую роль в защите молодняка от метапневмовируса играет клеточно-опосредованный иммунитет. Поэтому в хозяйстве была применена живая культуральная вакцина производства ВНИВИП против метапневмовирусной инфекции из штамма «Крон-2» (подтип В) спрей-методом. Для защиты птицы от метапневмовируса в продуктивный период важно создать высокий и продолжительный иммунитет. С этой целью в схему специфической профилактики была включена инактивированная масляная вакцина против метапневмовирусной инфекции подтипа В производства ВНИВИП методом подкожного введения в области шеи в дозе 0,5 см³. Вакцинации проводились в соответствии с инструкциями по применению.

2.2.7.2. Изучение поствакцинального иммунного ответа у молодняка промышленных кур-несушек в производственных условиях

Изучение формирования поствакцинального иммунитета у молодняка промышленных кур-несушек в производственных условиях проводили путем серологического исследования проб сыворотки крови цыплят промышленного стада, полученных из ЗАО «Птицефабрика Синявинская».

Для исследования были взяты:

- сыворотки крови цыплят перед вакцинацией живой вакциной в возрасте 14 суток - 23 пробы;
- сыворотки крови цыплят через 21 сутки после 1-й вакцинации - 23 пробы;
- сыворотки крови цыплят через 21 сутки после 2-ой вакцинации живой вакциной - 23 пробы;
- сыворотки крови цыплят перед вакцинацией инактивированной вакциной в возрасте 109 суток – 23 пробы;
- через 6 недель после вакцинации инактивированной вакциной в возрасте 152 суток – 23 пробы.

Сыворотки крови тестировали в ИФА с применением набора Biocheck. Результаты исследований представлены в таблице 13 и рисунке 18.

Данные, представленные в таблице 13 и на рисунке 18 показывают, что специфические антитела в сыворотке крови цыплят до вакцинации отсутствовали. Через 21 сутки после 1-й вакцинации живой вакциной средний титр антител к метапневмовирусу составил 1:375 (1:70 – 1:1558), при этом число положительно реагирующих проб составило 34,8%. Через 21 сутки после 2-ой вакцинации живой вакциной средний титр антител составил 1:2669 (1:348 – 1:5619), а число положительно реагирующих проб было 60,9%. Перед вакцинацией инактивированной вакциной в возрасте 109 суток средний титр антител составлял 1:2362 (1:483 – 1:6427), количество положительных проб составило – 78,3%. После вакцинации инактивированной вакциной против МПВИ птиц подтипа В наблюдали значительное увеличение уровня специфических антител в сыворотке крови промышленных кур-несушек. Средний титр антител составил 1:13432

(1:3709 – 1:17759), при коэффициенте вариации 48%, а число положительно реагирующих проб было 100%.

Таблица 13

Динамика формирования антител у вакцинированных цыплят промышленного стада живой и инактивированной вакциной против метапневмоирусной инфекции птиц подтипа В (n=23)

	Наименования групп	Титр антител, обратные значения			КВ, %	Число (ПР), %
		Мин.	Макс.	Средний		
1.	Сыворотки крови цыплят перед вакцинацией живой вакциной в возрасте 14 суток	1:53	1:401	1:208	55	0,0
2.	Сыворотки крови цыплят через 21 сутки после 1-й вакцинации живой вакциной	1:70	1:1558	1:375	101	34,8
3.	Сыворотки крови цыплят через 21 сутки после 2-й вакцинации живой вакциной	1:348	1:5619	1:2669	73	60,9
4.	Сыворотки крови цыплят перед вакцинацией инактивированной вакциной в возрасте 109 суток	1:483	1:6427	1:2362	69	78,3
5.	Сыворотки крови от кур-несушек через 6 недель после вакцинации инактивированной вакциной	1:3709	1:17759	1:13432	48	100,0

В

В результате исследований патологических значений титров антител выявлено не было. Все средние значения титров антител находились в ожидаемом диапазоне (не выше 1:2000 – 1:5000 – после 2-кратной вакцинации живой вакциной; 1:7000 – 1:25000 – после 2-кратной вакцинации живой вакциной и 1-кратной вакцинации инактивированной вакциной). При использовании живой вакцины против МПВИ спрей-методом наличие в пробах сыворотки крови отрицательных значений титров антител не свидетельствует об отсутствии защиты птицы от полевого вируса.

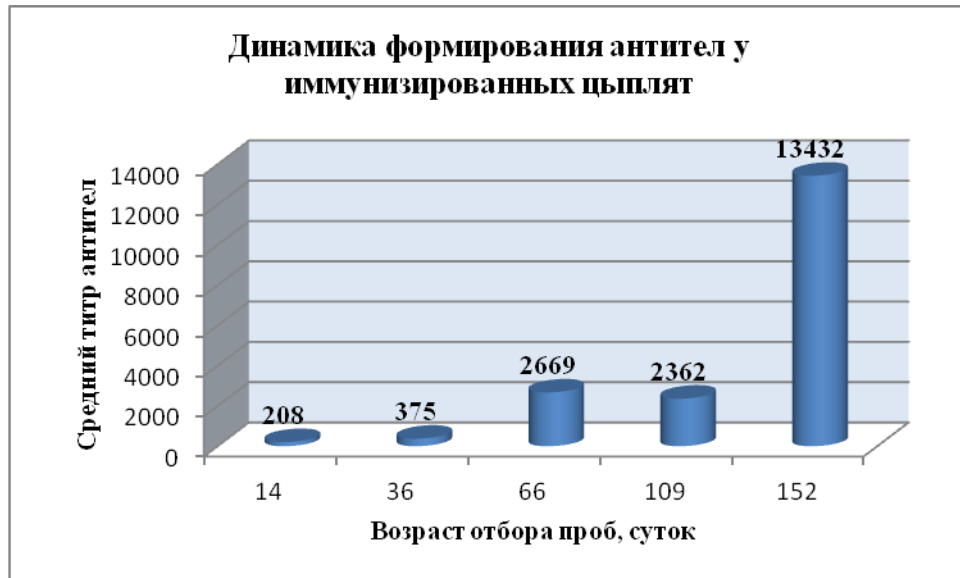


Рисунок 18 - Динамика формирования поствакцинального иммунитета у цыплят, привитых живой и инактивированной вакциной против метапневмовирусной инфекции птиц подтипа В.

Гуморальные материнские антитела не защищают молодняк от заражения полевым метапневмовирусом, поэтому иммунизацию молодняка промышленного стада было рекомендовано проводить живой вакциной по разработанной схеме независимо от уровня материнских антител.

На протяжении периода выращивания каких-либо клинических признаков респираторных инфекций у цыплят не наблюдались. Также не наблюдалось выраженной поствакцинальной реакции после применения вакцины против инфекционного ларинготрахеита птиц.

В период эксплуатации птиц промышленного стада, вакцинированных против метапневмовирусной инфекции, признаков метапневмовирусной инфекции и снижения яичной продуктивности не установлено. Таким образом, праймирование живой вакциной против метапневмовирусной инфекции подтипа В и ревакцинация инактивированной эмульсионной вакциной подтипа В защищает кур-несушек от респираторного и репродуктивного синдрома в течение всего продуктивного периода.

2.2.8. Разработка лечебно-профилактических мероприятий при возникновении вторичных бактериальных инфекций на фоне метапневмовирусной инфекции птиц

Течение метапневмовирусной инфекции часто сопровождается развитием осложнений, обусловленных бактериальной флорой. Бактериальная флора имеет ведущее значение в патогенезе синдрома опухшей головы.

При проведении бактериологических исследований от кур-несушек, инфицированных метапневмовирусом, были выделены следующие бактериальные патогены: *Escherichia coli* (60%), *Staphylococcus spp.* (30%), *Salmonella Gallinarum* (7,5%), *Ornithobacterium rhinotracheale* (2,5%).

При подборе антимикробных препаратов мы учитывали чувствительность всего спектра выделенной микрофлоры к тому или иному препарату. Результаты подбора антимикробных препаратов по чувствительности к выделенной в процессе исследований бактериальной флоре представлены на рисунке 19.

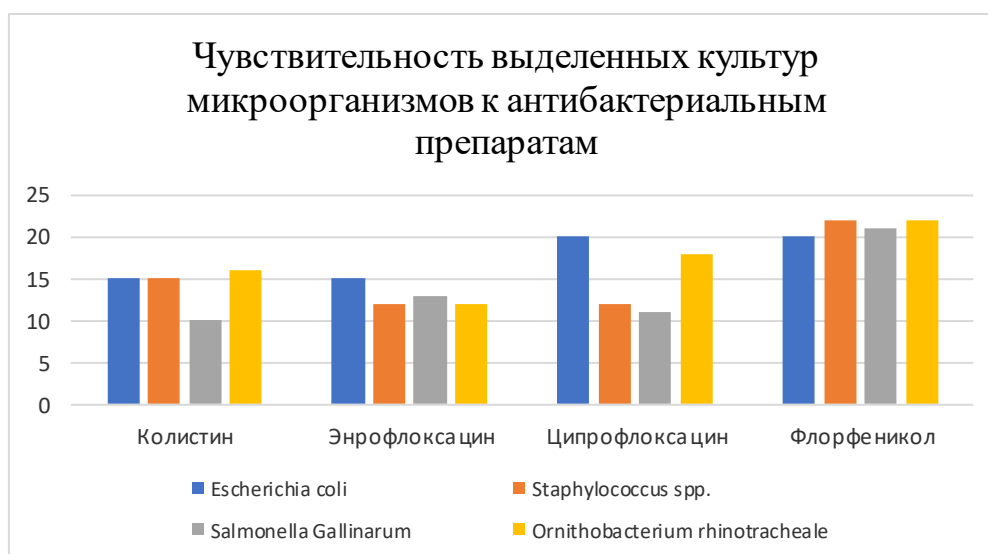


Рисунок 19 - Чувствительность выделенных культур микроорганизмов к антибактериальным препаратам (по вертикальной оси зона задержки роста, мм)

Учитывая спектр выделенной микрофлоры и ее чувствительность антибактериальным препаратам для лечения бактериальных инфекций были рассмотрены такие препараты как Флорфеникол ВС 10 (производство компании

«Агроветзащита», Россия), Ципровет (10% раствор для орального применения, Производство компании «Агроветзащита», Россия), Энроколи (производство компании «СП Ветеринария», Испания).

Флорфеникол ВС 10 обладает широким спектром бактериостатического действия. Применяется с лечебной и лечебно-профилактической целью при колисептицемии, пастереллезе, стафилококкозе и др. респираторных болезнях птиц бактериальной этиологии, в т.ч. вызываемых *Ornithobacterium rhinotracheale*. Флорфеникол, связываясь в протоплазме бактериальной клетки с рибосомальной субъединицей 50S, блокирует фермент пептидилтрансферазу вследствие чего происходит торможение синтеза белка у чувствительной бактериальной флоры на уровне рибосом. При пероральном применении флорфеникол быстро всасывается из желудочно-кишечного тракта в кровь, достигая максимальной концентрации через 1-1,5 часа. Его терапевтическая концентрация в сыворотке крови сохраняется в течение 24 часов.

Ципровет содержит в своем составе ципрофлоксацин и вспомогательное вещество лактулозу – пребиотик, относится к дисахаридам. Действующее вещество ципрофлоксацин обладает широким спектром антибактериального действия в отношении грамположительных и грамотрицательных бактерий. Препарат применяется при колибактериозе, сальмонеллезе, хронических респираторных болезнях, стрептококкозе, микоплазмозе, гемофилезе, и смешанных инфекциях.

В состав Энроколи входят энрофлоксацин и колистин (полимиксин), препараты, которые в сочетании друг с другом, обладают синергитическим антимикробным эффектом. Препарат подавляет бактериальную микрофлору, как в латентной фазе, так и в период деления клеток. Энрофлоксацин обладает антибактериальной активностью в отношении широкого спектра бактериальной флоры: стафилококков, стрептококков, микоплазм, пастерелл, псевдомонад, клостридий, энтеробактерий, спирохет, кампилобактерий, трипонем и др.

После применения на протяжении 24 часов содержание энрофлоксацина в легких превышает минимально ингибирующую для большинства бактерий и

микоплазм концентрацию. Снижение действия энрофлоксацина компенсируется совместным с ним применением колистина, к которому у бактерий практически не вырабатывается резистентность. Энроколи наиболее эффективен при лечении колибактериоза и микоплазмоза. В связи с тем, что в спектре выделенной на птицефабрике микрофлоры *E. coli* составляет 60% от всех случаев выделения бактериальной микрофлоры и наносит наиболее ощутимый ущерб, учитывая уровень чувствительности кишечной палочки, было принято решение для лечения молодняка в случае возникновения осложненного течения метапневмовирусной инфекции рекомендовать использование препаратов Флорфеникол ВС 10, Ципровет и Энроколи.

У молодняка метапневмовирусная инфекция наиболее часто проявляется в возрасте 30-35 суток. Поэтому в этом возрасте было рекомендовано применение данных препаратов. В качестве поддерживающей терапии в раннем возрасте, а также в период течения метапневмовирусной инфекции было рекомендовано применение комплексных витаминных или витаминно-минеральных препаратов. Мы включили в схему лечебно-профилактических обработок препарат Гидрорексвитал аминокислоты (или аналоги). Витамины, входящие в состав препарата, являются катализаторами обменных процессов. Аминокислоты являются структурными единицами тканевых белков, ферментов, пептидных гормонов и других биологически активных соединений. Препарат оказывает комплексное общеукрепляющее и антистрессовое действие, а также способствует повышению усвояемости кормов и увеличению продуктивности сельскохозяйственных птиц. Относится к малотоксичным для животных и птиц препаратам. Применение антибактериальных препаратов и комплексного препарата Гидрорексвитал аминокислоты в период течения на молодняке промышленных кур-несушек метапневмовирусной инфекции в отсутствие вакцинации позволили значительно снизить количество падежа и количество выбракованной птицы, а также не допустить снижения живой массы ниже рекомендуемых показателей.

3. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

3.1. Обсуждение результатов исследований

Метапневмоирусная инфекция птиц - респираторная болезнь, характеризующаяся воспалительными процессами верхних дыхательных путей (носовых ходов, трахеи), инфраорбитальных синусов, сопровождается затрудненным дыханием, хрипами, чиханием, выделениями из носа [8, 117].

Метапневмовирусная инфекция получила широкое распространение во многих странах с развитым промышленным птицеводством [116], таких как Франция, Великобритания, Италия, Венгрия, Испания, Нидерланды, Германия, Израиль, Бразилия, США [8], а также в Российской Федерации [24, 25].

Целью нашей работы было изучение эпизоотологических особенностей течения метапневмовирусной инфекции у промышленных кур-несушек и разработка эффективной схемы специфической профилактики болезни для птицеводческого хозяйства яичного направления выращивания, а именно в ЗАО «Птицефабрика Синявинская» Ленинградской области, где наблюдалась повышенная поствакцинальная реакция на введение вакцины против инфекционного ларинготрахеита птиц у молодняка и снижение яичной продуктивности на 3,7 - 16,8% у промышленных кур-несушек.

Известно, что первостепенную роль в возникновении, распространении и проявлении болезней, связанных с присутствием метапневмовируса птиц в организме, принадлежит факторам окружающей среды (плохое содержание, плохая гигиена кормления и поения, неустойчивая влажность или плохая вентиляция, содержание многочисленного и разновозрастного поголовья птицы на площадке, присутствие вторичных инфекций) [13]. Кроме этого, имеет значение сезонность [10, 46, 64, 104, 117, 160, 161, 162] и присутствие на близлежащей территории других видов синантропной и дикой птицы, восприимчивой к метапневмовирусу [46, 63, 64, 82, 83, 160].

ЗАО «Птицефабрика Синявинская» на момент проведения исследований являлась крупнейшим промышленным предприятием яичного направления в

Российской Федерации с развитой системой логистики поставок яичной продукции, как в регионы РФ, так и в зарубежные страны. На ее территории размещено огромное поголовье птицы разного возраста, производится завоз племенного молодняка из другого хозяйства. Птицефабрика окружена лесным массивом, поэтому не исключено проникновение дикой и синантропной птицы на территорию промышленных цехов. В связи с этим соблюдение ветеринарно-санитарных правил является основой биобезопасности хозяйства.

Система мероприятий по борьбе с метапневмовирусной инфекцией птиц включает комплекс мер, направленных на своевременную диагностику болезни, проведение ветеринарно-санитарных, лечебно-профилактических и противоэпизоотических мероприятий, в том числе специфической профилактики. Успех борьбы с болезнью во многом зависит от своевременной и правильной постановки диагноза. Диагностика болезни осуществляется на основании эпизоотологических данных, клинических симптомов, патологоанатомических изменений у павшей птицы и лабораторных исследований. Для диагностики широко используют иммуноферментный анализ [12,21,46,59,63] и молекулярно-биологические методы детекции генома вируса [29,31,41], а также вирусологические и бактериологические исследования.

Для постановки диагноза мы, прежде всего, отобрали в динамике сыворотки крови у молодняка и промышленных кур-несушек из неблагополучных птичников для проведения серологических исследований с использованием ИФА. Иммуноферментный анализ позволяет в короткие сроки обследовать поголовье птиц для выяснения эпизоотической ситуации в хозяйстве. Известно, что выраженное снижение яйценоскости у кур-несушек вызывают ньюкаслская болезнь, инфекционный бронхит кур, инфекционный энцефаломиелит птиц и синдром снижения яйценоскости-76. Поэтому серологические исследования проб сыворотки крови птиц на наличие специфических антител были проведены не только к метапневмовирусу, но и к возбудителям ньюкаслской болезни, инфекционного бронхита кур, инфекционного энцефаломиелита птиц и синдрома снижения яйценоскости. Сыворотки крови молодняка кур исследовали в возрасте

35 и 56 суток, сыворотки крови промышленных кур-несушек в возрасте 196 и 217 суток. В результате проведенных исследований в пробах сыворотки крови молодняка кур не было выявлено патологических значений титров антител к возбудителям ньюкаслской болезни и инфекционного бронхита кур. Результаты исследований проб сыворотки крови промышленных кур-несушек показали, что пробы сыворотки крови не имели патологических значений титров антител к возбудителям ньюкаслской болезни, инфекционному бронхиту кур, инфекционному энцефаломиелиту и синдрому снижения яйценоскости. Против НБ, ИБК, ИЭП и ССЯ-76 в хозяйстве проводится плановая иммунизация поголовья птицы.

В пробах сыворотки крови молодняка и промышленных кур-несушек были выявлены высокие значения титров антител к метапневмовирусу птиц с низким коэффициентом вариации. Средний титр антител к МПВ у молодняка через 21 сутки после появления клинических признаков составил 1:16608 (1:11073 - 1:21090) с КВ 14%, у промышленных кур-несушек – 1:21572 (1:10957 - 1:28997) с КВ 19%. Выявление в динамике положительных проб сыворотки крови с высокими значениями титров антител к метапневмовирусу и низким коэффициентом вариации свидетельствует о переболевании птицы метапневмовирусной инфекцией.

Регистрация специфических антител к метапневмовирусу в сыворотке крови птиц послужила основанием для изучения эпизоотической ситуации на данной птицефабрике, используя вирусологические, молекулярно-биологические (выделение и идентификация вируса) и бактериологические методы исследований.

Учитывая достаточно короткий период персистенции и ограниченный тропизм вируса в организме птицы [47,95,124], патматериал для выделения метапневмовируса брали у цыплят и кур-несушек с менее выраженными клиническими признаками болезни.

Первичное выделение МПВ птиц проводили на развивающихся СПФ-куриных эмбрионах 5-6-суточного возраста. Для выделения метапневмовируса

брали смывы и соскобы со слизистых инфраорбитальных синусов, неба и трахеи. Проводили 2-3 пассажа на куриных эмбрионах. При вскрытии эмбрионов наблюдали слабо выраженные изменения, характерные для метапневмовируса птиц. Поэтому дальнейшую работу по выделению вируса проводили в культурах клеток.

Для выделения МПВ птиц использовали первично-трипсинизированную культуру клеток, полученную из 10-11 – суточного возраста СПФ-куриных эмбрионов и перевиваемые клетки Vero.

По мере проведения последовательных пассажей отмечали усиливающийся цитопатический эффект в монослое культуры, который выражался округлением клеток в ограниченных участках монослоя, появлением в них цитоплазматической зернистости на 3-4 сутки после заражения. Дегенерацию клеток на 70-80 % отмечали на 6-7 сутки, затем в отдельных участках наблюдали образование синцития, как характерный признак ЦПД для метапневмовируса птиц.

Таким образом, при вирусологическом исследовании из патматериала (пораженные головы, трахеи, слизь из трахеи и хоан) павшей и вынужденно убитой птицы в клетках Vero и фибробластах куриных эмбрионов был выделен метапневмовирус птиц, что согласуется с данными других авторов, которые выделяли метапневмовирус из патматериала павшей птицы в клетках Vero [5,34,37,127].

Широко распространенным методом идентификации возбудителя является обратнo-транскриптазная полимеразная цепная реакция [174].

Этот метод позволяет обнаружить вирус без предварительной изоляции и адаптации к клеточным культурам. В основе метода ОТ- ПЦР лежит три основных этапа: экстракция нуклеиновой кислоты, транскрипция РНК вируса в кДНК, амплификация участка кДНК в полимеразно-цепной реакции. Два последних этапа требуют подбора олигонуклеотидных праймерных последовательностей, комплементарных интересующему участку ДНК. В зависимости от выбранных

праймеров можно амплифицировать различные участки генома, кодирующего капсидный антиген любого вируса.

Преимущества метода ПЦР для диагностики вирусных болезней – это прямое определение наличия возбудителя, высокая специфичность, обусловленная выявлением уникального, характерного только для данного возбудителя фрагмента РНК, высокая чувствительность, высокая скорость получения результатов анализа [11].

Для проведения молекулярно-биологических исследований нами были разработаны праймеры для идентификации метапневмовируса и проведения серотипирования возбудителя методом электрофоретической детекции и секвенирования, основанных на полимеразно-цепной реакции.

При исследовании патологического материала (смывы из хоан, инфраорбитальных синусов и трахеи) методом полимеразной цепной реакции был обнаружен геном метапневмовируса птиц и с помощью типоспецифических праймеров дифференцирован как метапневмовирус подтипа В.

В России на протяжении последних десятилетий метапневмовирусную инфекцию птиц регистрировали в различных регионах страны и чаще всего в бройлерных хозяйствах, преимущественно у кур родительских стад и цыплят-бройлеров. Однако в последние годы увеличивается число случаев обнаружения антител к метапневмовирусу у кур яичного направления выращивания [8, 10, 17, 18, 24, 25, 32, 37, 42, 47, 48].

Результаты молекулярно-генетического анализа изолятов метапневмовируса, выделенных из птицеводческих хозяйств Российской Федерации, показывают, что в 92-95% случаев выявляются полевые изоляты метапневмовируса, относящиеся к подтипу В и только 5-8% случаев – к подтипу А [39].

В результате наших исследований из проб патологического материала, отобранного от молодняка и промышленных кур-несушек из птицеводческого хозяйства яичного направления выращивания был выделен метапневмовирус подтипа В, полевые изоляты которого имеют наибольшее распространение в РФ.

По литературным данным метапневмовирусная инфекция клинически проявляется опуханием инфраорбитальных и периорбитальных синусов, искривлением шеи, дезориентацией и депрессией. Болезнь сопровождается чиханием, кашлем, ринитами, конъюнктивитами. При затяжном течении болезни появляется синдром «узкоглазой птицы» [13]. Характерным признаком является наличие в глазной щели пенистого экссудата [31, 58]. Нередко наблюдается отек соединительной ткани подчелюстного пространства [58, 101, 162]. Также отмечают фибриновые выделения из ушных проходов, истощение, задержку роста и анемию [58, 95]. У кур-несушек метапневмовирусная инфекция сопровождается снижением яичной продуктивности. У коричневых кроссов наблюдается обесцвечивание скорлупы [46]. Также может ухудшаться качество яйца (мягкая скорлупа, водянистое содержимое, снижение выводимости) [5]. Одним из клинических признаков проявления метапневмовирусной инфекции является появление «спящей птицы» [5].

При клиническом осмотре поголовья кур-несушек неблагополучного стада промышленных кур-несушек нами были выявлены следующие признаки: снижение яйценоскости ниже рекомендуемых показателей на 3,7 - 16,8%; у отдельных особей конъюнктивиты с наличием пенистого экссудата на конъюнктиве глаз и в носовых ходах. Также у некоторых особей отмечался отек в области подчелюстного пространства, подглазничных или инфраорбитальных синусов различной степени выраженности. Также выявлялась «спящая» и «узкоглазая» птица.

Исследователи при патологоанатомическом вскрытии птицы отмечают конъюнктивиты, наличие катарального экссудата в просвете трахеи [2, 4, 46], отечность соединительной ткани в области головы, серозно-слизистое и фибриновое воспаление носовых ходов и синусов, энтериты, аэросаккулиты, перитониты и оварииты [31], иногда застойные явления в легких или отек легких, скопление мочекислых солей в мочеточечниках, мелкие некротические очаги в печени. Нередко находят изменения, характерные для колибактериоза – перикардит и перигепатит [31]. У кур-несушек, пораженных метапневмовирусом,

по результатам исследований ряда ученых [121], в 20% случаев выявляется атрофия яйцевода.

При патологоанатомическом вскрытии павшей птицы из неблагополучного птичника мы регистрировали следующие патологоанатомические изменения: синуситы, отечность соединительной ткани головы, скопление слизи в хоанах и серозно-слизистого экссудата в трахее, гиперемия трахеи разной степени выраженности, желточные перитониты. У единичных особей встречались признаки гемосидероза. Также отмечались признаки бактериальных инфекций (перигепатиты, перикардиты, аэросаккулиты).

Репликация метапневмовируса в организме птицы происходит в эпителии дыхательных путей и в эпителиальных клетках яйцевода. Метапневмовирусы поражают верхние дыхательные пути и редко обнаруживаются в легких [97, 117].

Проникновение метапневмовируса в верхние дыхательные пути (в основном в клетки носовой полости, трахеи, соединительных оболочек и носовых пазух) сопровождается повреждением клеток реснитчатого эпителия и блокировкой функции механического защитного барьера. Это способствует проникновению бактерий, вирусов через эпителий респираторного тракта и приводит к увеличению срока персистенции метапневмовируса в организме птицы и его более глубокому проникновению в ткани [17, 86].

При гистологическом исследовании образцов трахеи, отобранных от больной птицы на некоторых участках слизистой оболочки трахеи вплоть до базальной мембраны, выявляли разрушение однослойного многорядного столбчатого реснитчатого эпителия и бокаловидных клеток. Это приводит к снижению защитной функции слизистой оболочки трахеи и способствует проникновению патогенных возбудителей бактериальной и вирусной этиологии.

Следует подчеркнуть, что изучение особенностей возникновения и течения МПВИ птиц и её ассоциированных форм является наиболее важным вопросом при разработке лечебно-профилактических мероприятий против данной болезни в условиях птицеводческих хозяйств. Нередко в птицеводческих хозяйствах одновременно регистрируются две и более инфекций. Ассоциированное течение

инфекций накладывает отпечаток на характер проявления болезни, ее тяжесть и продолжительность течения. Об ассоциированном течении SHS цыплят с инфекционным бронхитом и ньюкаслской болезнью сообщали Banet-Noach et al. [61].

Влияние *Escherichia coli* на течение метапневмовирусной инфекции у бройлеров изучили Al-Ankari et al. [56] и показали синергизм во взаимодействии обоих патогенов.

Проведенные нами бактериологические исследования проб, отобранных из поражённых органов (трахеи, сердца, лёгких, печени, двенадцатиперстной кишки) кур-несушек показали инфицированность кур кишечной палочкой, гемолитическим и негемолитическим стафилококком. От некоторых птиц выделены культуры сальмонелл и орнитобактерий. Культуры клостридий не были выделены ни в одной пробе. Полученные результаты подтверждают ассоциированное течение метапневмовирусной инфекции птиц с бактериальными болезнями, что ведет к высокой заболеваемости и смертности, о чем говорят работы и других авторов [6,16,23, 36,44].

При изучении чувствительности выделенных культур кишечной палочки, культур стафилококков и культур сальмонелл к антибактериальным препаратам установлена их высокая чувствительность к отдельным классам антибиотиков. Нами была установлена чувствительность выделенных культур бактериальной флоры к флорфениколу, ципрофлоксацину, энрофлоксацину и колистину.

Полученные данные свидетельствуют о том, что целесообразно ввести в систему лечебно-профилактических мероприятий на молодняке промышленных кур-несушек антимикробные препараты в соответствии с выявленной чувствительностью при возникновении признаков метапневмовирусной инфекции на невакцинированных партиях птицы.

Лечебно-профилактические мероприятия в ЗАО «Птицефабрика Синявинская» проводили с применением препаратов Гидрорексвитал-аминокислоты в возрасте 2-5, 30-35 суток и Ципровета (Флорфеникола ВС10, Энроколи) в возрасте 30-35 суток. В результате применения рекомендованных

антимикробных препаратов при проявлении респираторных признаков на невакцинированном против МПВИ поголовье птицы отмечалось значительное снижение случаев выявления признаков бактериальных инфекций, а также уменьшение количества павшей и выбракованной птицы. Следует отметить, что при назначении антибактериальных препаратов в первые 1-3 суток после появления респираторных признаков, у цыплят не отмечалось опухания инфраорбитальных синусов, что свидетельствовало об эффективности применяемых антибактериальных средств.

Известно, что наиболее эффективным методом борьбы с МПВИ птиц является вакцинация [1,5,6,14,45]. При этом J.K.A. Cook et al. [80, 81] показали, что лучшая защита от метапневмовируса достигается при использовании вакцин из гомологичных подтипов.

Данные сведения мы использовали при разработке схемы специфической профилактики метапневмовирусной инфекции. В хозяйстве была применена живая культуральная вакцина ВНИВИП против метапневмовирусной инфекции, содержащая в качестве антигена метапневмовирус подтипа В методом спрей, согласно наставлению по применению.

Результаты исследований проб сыворотки крови цыплят в ИФА показали, что после 1-й вакцинации средний титр специфических антител к метапневмовирусу в сыворотке крови цыплят через 21 сутки составил 1:375 (1:70 – 1:1558), КВ - 101%, количество положительных проб - 34,8%. Через 21 сутки после ревакцинации живой вакциной средний титр антител составил 1:2669 (1:348 – 1:5619), КВ - 73%, количество положительных проб – 60,9%. Низкие значения титров антител, высокий коэффициент вариации и количество положительных проб ниже 70% не является основанием считать иммунизацию не эффективной, так как при защите от заражения метапневмовирусом приоритетное значение принадлежит клеточно-опосредованному иммунитету [65].

Аттенуированные штаммы метапневмовируса обладают ограниченной способностью к репликации, но при этом стимулируют те элементы иммунной системы, которые обеспечивают защиту от полевого вируса. Эффективность живых вакцин основана на стимуляции выработки иммуноглобулинов и развитии

клеточно-опосредованных иммунных реакций в тканях организма, имеющих большое значение для защиты от метапневмовируса [8].

Учитывая, что куры-несушки наиболее чувствительны к МПВИ в момент пика яйцекладки, для защиты птицы от полевого вируса в продуктивный период в хозяйстве была применена инактивированная эмульгированная вакцина против метапневмовирусной инфекции подтипа В производства ВНИВИП в возрасте 110 суток.

После вакцинации молодняка инактивированной вакциной против МПВИ подтипа В у промышленных кур-несушек через 6 недель наблюдали значительное увеличение уровня специфических антител в сыворотке крови, который составлял 1:13432 (1:3709 – 1:17759), при коэффициенте вариации 48%, число положительно реагирующих проб - 100%.

В результате исследований патологических значений титров антител выявлено не было. Все средние значения титров антител находились в ожидаемом диапазоне (не выше 1:2000 – 1:5000 – после 2-кратной вакцинации живой вакциной; 1:7000 – 1:25000 – после 2-кратной вакцинации живой вакциной и 1-кратной вакцинации инактивированной вакциной). При использовании живой вакцины против МПВИ спрей-методом наличие в пробах сыворотки крови отрицательных значений титров антител не свидетельствует об отсутствии защиты птицы от полевого вируса.

На вакцинированных по рекомендованной схеме специфической профилактики метапневмовирусной инфекции партиях птицы на протяжении всего периода выращивания и продуктивности каких-либо признаков МПВИ выявлено не было.

Таким образом, 2-кратная вакцинация живой вакциной и ревакцинация инактивированной вакциной, содержащих подтип вакцинного штамма метапневмовируса, гомологичный подтипу выделенного полевого изолята метапневмовируса обеспечивает эффективную защиту поголовья птицы на протяжении всего продуктивного периода от метапневмовирусной инфекции птиц.

3.2. ВЫВОДЫ

1. Изучена эпизоотологическая ситуация по метапневмовирусной инфекции в ЗАО «Птицефабрика Синявинская» Ленинградской области. Установлена циркуляция метапневмовируса у промышленных кур-несушек и у цыплят промышленного стада.

2. Изучены клинические и патоморфологические признаки метапневмовирусной инфекции птиц в условиях ЗАО «Птицефабрика Синявинская». Течение болезни сопровождалось на молодняке выраженной поствакцинальной реакцией на введение вакцины против инфекционного ларинготрахеита птиц, на промышленных курах-несушках – снижением яичной продуктивности до 3,7 - 16,8%, сонливостью, конъюнктивитами, ринитами, опуханием инфраорбитальных синусов. Патоморфологические признаки были представлены трахеитами, желточными перитонитами, дегенерацией эпителия слизистой оболочки трахеи. Также отмечались признаки бактериальных инфекций.

3. В результате проведения серологических исследований проб сыворотки крови, полученных от неблагополучных партий молодняка и промышленных кур-несушек с использованием метода ИФА, через 21 сутки после проявления симптомов установлено наличие антител к метапневмовирусу в высоких титрах с низким коэффициентом вариации. Средний титр антител у молодняка составил 1:16608 (1:11073 – 1:21090), КВ 14%, у кур-несушек - 1:21572 (1:10957 – 1:28997), КВ 19%. В условиях отсутствия вакцинации против МПВИ все положительные пробы являются патологическими и свидетельствуют о переболевании птицы. При исследовании проб сыворотки крови на наличие антител к возбудителям НБ, ИБК, ИЭП, ССЯ-76 прироста антител, снижения коэффициента вариации, а также патологических значений титров антител не установлено.

4. Проведены вирусологические исследования патологического материала на куриных эмбрионах и в клеточных культурах. Изменения при

заражении куриных эмбрионов были слабо выражены. При заражении клеток Vero на 6-7 сутки выявляли дегенерацию 70-80% клеток и на отдельных участках образование синцития, характерного признака ЦПД для метапневмовируса птиц.

5. Разработаны праймеры для идентификации метапневмовируса птиц и проведения серотипирования возбудителя методом электрофоретической детекции и секвенирования, основанных на полимеразной цепной реакции. Установлено, что выделенный метапневмовирус относится к подтипу В.

6. В результате проведения бактериологических исследований из патологического материала, отобранного от кур-несушек неблагополучного стада были выделены культуры *Escherichia coli* (60%), *Staphylococcus spp.* (30%), *Salmonella Gallinarum* (7,5%), *Ornithobacterium rhinotracheale* (2,5%). Наибольшая чувствительность выделенных культур установлена к флорфениколу, ципрофлоксацину, энрофлоксацину, колистину.

7. На основании результатов проведенных исследований разработана схема специфической профилактики метапневмовирусной инфекции птиц. Рекомендовано иммунизировать молодняк промышленных кур-несушек в возрасте 15 и 45 суток живой вакциной, содержащей подтип В и ревакцинировать в возрасте 110 суток инактивированной вакциной, содержащей подтип В. В результате иммунизации птицы по предложенной схеме формируется иммунный ответ, достаточный для защиты поголовья от полевого вируса в течение всего продуктивного периода.

8. Разработана схема лечебно-профилактических мероприятий с использованием антимикробных препаратов широкого спектра действия и комплексных витаминных препаратов для лечения вторичных бактериальных инфекций и повышения резистентности организма птиц.

3.3. ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ

В результате проведенных исследований нами предложены методические положения «Выявление и типирование возбудителя метапневмовирусной инфекции птиц молекулярно-биологическими методами» положения предназначены для ветврачей-вирусологов региональных, областных, зональных и специализированных лабораторий и научно-исследовательских учреждений ветеринарного и биологического профиля.

Материалы, изложенные в диссертации, используются в учебном процессе ВУЗов биологического и ветеринарного профиля и на курсах повышения квалификации ветеринарных специалистов.

3.4. ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

Планируется разработка мультиплексной тест-системы в режиме реального времени с целью выявления МПВ типов А и В.

Планируется разработка праймеров для обнаружения и изучения МПВ типа С, с дальнейшим культивированием на перевиваемых культурах клеток. с целью получения аттенуированных штаммов вируса для изготовления вакцин.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- АЭЭИ - аминоэтилэтиленимин
- ВСМ - вируссодержащий материал
- ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота
- дНТФ-дезоксирибонуклеозидтрифосфат
- ддНТФ -дидезоксирибонуклеозидтрифосфат
- ИБК – инфекционный бронхит птиц
- ИЛТ – инфекционный ларинготрахеит
- ИП - иммунопероксидазный
- ИФ - иммунофлуоресцентный
- ИФА - иммуноферментный анализ
- ИЭП – инфекционный энцефаломиелит птиц
- ККЭ – культура клеток эмбрионов кур
- КЭ - куриные эмбрионы
- МПА – мясо-пептонный агар
- МПБ – мясо-пептонный бульон
- МПВ - метапневмовирус
- МПВИ - метапневмовирусная инфекция птиц
- НБ – ньюкаслская болезнь
- НК-нуклеиновая кислота
- ОТ-ПЦР - полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией
- ПЦР - полимеразная цепная реакция
- РН - реакция нейтрализации
- РНК – рибонуклеиновая кислота
- РТ-ПЦР – реверсивная транскриптазно-полимеразная цепная реакция
- СПФ - свободные от патогенной флоры
- ССЯ-76 – синдром снижения яйценоскости 76
- ТБЕ – трис-боратный буфер
- ТОК – трахеальная органная культура
- ТЦД - тканевая цитопатогенная доза

ТЦД_{50/см³} - 50% тканевая цитопатогенная доза

ФЭК - фибробласты эмбрионов кур

ЦПД – цитопатогенное действие

AMPV - avian metapneumovirus (метапневмовирус птиц)

APV - avian pneumovirus (пневмовирус птиц)

ART - avian rhinotracheitis (ринотрахеит птиц)

ELISA - enzyme-linked immunosorbent assay (твердофазный иммуноферментный анализ)

Ig - логарифм по основанию 10

SHS - swollen head syndrome (синдром опухшей головы)

TRT - turkey rhinotracheitis (ринотрахеит индеек)

Vero - перевиваемая линия клеток почки зеленой мартышк

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ашмарин, И.П. Быстрые методы статистической обработки и планирование экспериментов / И.П. Ашмарин, Н.Н. Васильев, В.А. Амбросов. - Л.: Изд-во ЛГУ, 1975. - 78с.
2. Бакулин, В.А. Болезни птиц. – СПб: Искусство России, 2006. – 688 с.: ил.
3. Белоусова Р. В. Практикум по ветеринарной вирусологии: 3-е изд., перераб. и доп. / Р.В. Белоусова, Н.И. Троценко, Э. А. Преображенская. – М.: Колос, 2013. – С. 248.
4. Бессарабов Б. Ф. Болезни птиц / Б.Ф. Бессарабов, И.И. Мельникова, Н.К. Сушкова [и др.]. – Лань: СПб, 2007. – 445с.
5. Бессарабов Б. Методы борьбы с пневмовирусной инфекцией / Б. Бессарабов, А. Киселев, Н. Сушкова // Животноводство России. – 2013. - № 11. – С. 11-12.
6. Борисова, И.А. Антигенная активность экспериментальной инактивированной эмульсионной вакцины против ньюкаслской болезни и пневмовирусной инфекции птиц / И.А. Борисова // Ветеринарная патология. - 2006. – №4 (19). - С. 144-146.
7. Борисова, И.А. Пневмовирусная инфекция птиц / И.А. Борисова, С.К. Старов // Тр. Федер. центра охраны здоровья животных. – Владимир, 2006. – Т.4. – С. 281-296.
8. Борисова, О.А. Метапневмовирусная инфекция птиц / О.А. Борисова, И.А. Борисова // Обзор литературы. – Владимир ФГУ «ВНИИЗЖ», 2007. – 77с.
9. Борисова, И.А. Разработка технологии изготовления и контроля инактивированной вакцины против ньюкаслской болезни и метапневмовирусной инфекции птиц: дисс... канд. биол. наук: 03.02.02 / Борисова Ирина Александровна. – Владимир, 2008. – 167с.
10. Борисова, И.А. Метапневмовирусная инфекция птиц / И.А. Борисова, А.В. Борисов // РацВетИнформ. - 2009. - № 12. - С. 9-11.

11. Борисов, А.В. Штаммовая дифференциация вируса ИББ на основе ПЦР и прямого секвенирования / А.В. Борисов, Л.О. Щербакова, В.В. Дрыгин [и др.] // Современные аспекты ветеринарной патологии животных, Владимир. - 1998. - С. 203-215.
12. Бочкарев, В.С. Иммунобиологические свойства вакцинных штаммов метапневмовируса птиц: автореф. дис. ... канд. вет, наук: 06.02.02 / Бочкарев Владимир Сергеевич. – СПб, 2013. – 21с.
13. Виноходов, В.О. Синдром «опухшая голова» или введение в отоларингологию птиц / В.О. Виноходов // Ветеринария в птицеводстве. - 2003. - №1 (7). – С. 14-27.
14. Волкова, М.А. Непрямой вариант иммуноферментного метода для определения антител к пневмовирусу птиц / М.А. Волкова, Г.В. Батченко, Н.С. Мудрак // Актуальные проблемы инфекционной патологии животных: матер. Междунар. науч. конф., посвящен. 45-летию ФГУ «ВНИИЗЖ». - Владимир, 2003. - С. 358-361.
15. Данко, Л.Ю. Культуральные и антигенные свойства метапневмовируса птиц: автореф. дис. ... канд. вет. наук: 06.02.02 / Данко Леонид Юрьевич. – СПб., 2011. – 21с.
16. Джавадов, Э.Д. Профилактика болезней птиц инактивированными вакцинами серии «Авикрон» / Э.Д. Джавадов, И.Н. Вихрева, М.Е. Дмитриева [и др.] // Матер. Междунар. конф., СПб, 2009. - С. 30-31.
17. Дмитриев, Д.В. Ассоциированное течение пневмовирусной инфекции птиц / Д.В. Дмитриев // Ветеринарная медицина - теория, практика и обучение: матер. 2 всерос. научно-практ. конф., 1-2 ноября 2007 г., СПб, 2007. – С. 23-25.
18. Дмитриев, Д.В. Серологический мониторинг на метапневмовирусную инфекцию птиц с применением ИФА / Д.В. Дмитриев // Ветеринарная практика. - 2010. - № 2 (49). - С. 20-22.

19. Дмитриев, Д.В. Непрямой метод иммуноферментного анализа в диагностике метапневмовирусной инфекции птиц: автореф, дис. ... канд. вет. наук: 06.02.02 / Дмитриев Денис Валерьевич. – СПб., 2010. – 21с.

20. Дрыгин, В.В. Молекулярная эпизоотология некоторых вирусных болезней птиц на территории Российской Федерации: на примере болезней Гамборо, Ньюкасла, ССЯ 76 и инфекционного бронхита кур / В.В. Дрыгин, В.В. Борисов, С.К. Старов [и др.] // Состояние, проблемы и перспективы развития ветеринарной науки России. - М., 1999. - Т. 2. - С. 220-224.

21. Дубовой, А.С. Ассоциированные инактивированные вакцины в птицеводстве / А.С. Дубовой // Матер. науч.-практ. конф., посвящ. 190-летию высш. вет. образования в России и 100-летию вет. науки. - СПб, 1998. - Ч. 1. - С. 74-75.

22. Дудников, А.И. Перспективы использования адъювантов в противоящурных вакцинах / А.И. Дудников // Материалы семинара специалистов стран-членов СЭВ: «Разработка и использование новых адъювантов для биотехнологических целей», Владимир, 1990. - С. 3-6.

23. Егоров, А.М. Теория и практика иммуноферментного анализа / А.М. Егоров, А.П. Осипов, Б.Б. Дзантиев [и др.]. - М.: Высшая школа, 1991. – 288с.

24. Ирза, В.Н. Серологический мониторинг по птичьему пневмовирусу (Avian Pneumovirus - APV) в России / В.Н. Ирза, Т.В. Оковытая, В.В. Борисов [и др.] // Материалы конференции по птицеводству. - Зеленоград, 2003. - С. 222-223.

25. Ирза, В.Н. Проблемы респираторных заболеваний в современном птицеводстве / В.Н. Ирза, А.В. Борисов, В.В. Дрыгин [и др.] // Материалы 1-го Междунар. ветеринарного конгресса по птицеводству. - М., 2005. - С.14-22.

26. Капустин, В.Н. Диагностика и профилактика пневмовируса у кур-несушек / В.Н. Капустин, В.Г. Лысый // Ветеринария и кормление - 2005. - № 5. - С. 3.

27. Каргилл П.В. Современные взгляды на инфекционное воспаление носа и трахеи птицы / П.В. Каргилл // БИО. – 2004. - № 2. – С. 7-8.

28. Каспарьянц, С. Пневмовирусы птицы / С. Каспарьянц, А. Столяр // РацВетИнформ. – 2009. - № 11. - С. 8-10.
29. Кожемяка, Н.В. Ветеринарная защита при выращивании бройлеров / Н.В. Кожемяка, Л.Ф. Самойлова // Ветеринария. – 2003. - № 3. – С. 10-13.
30. Корелла, Х.С. Проблемы с метапневмовирусом в стадах кур-несушек / Х.С. Корелла, В.В. Сафаров // БИО. – № 5. – 2013. – С. 29-31.
31. Лазуткина Е.А. Особенности проявления синдрома опухшей головы у цыплят-бройлеров / Е.А. Лазуткина, Б.Ф. Бессарабов, И.И. Мельникова // БИО. – 2007. - № 6. – С. 31-32.
32. Лисенкова, А.С. Экспресс-метод диагностики метапневмовирусной инфекции птиц на основе иммуноферментного анализа: автореф. дис. ... канд. вет. наук: 06.02.02 / Лисенкова Анастасия Сергеевна. – СПб., 2013. – 23 с.
33. Макарян, Э. А. Биотехнологические экспресс-методы в микробиологии и вирусологии: Автореферат дис. докт. биол. наук: 03.01.06 / Макарян Эдуард Артемович. - Тверь, 2011. - 19с.
34. Нестеренко, Л.Н. Руководство по диагностике инфекционных заболеваний методом полимеразной цепной реакции [под ред. А.Л. Гинцбурга] / Л.Н. Нестеренко, Н.А. Зигангирова, О.В. Попова. - М.: 1998. – 26с.
35. Никитина, Н.В. Влияние физико-химических факторов на чувствительность и специфичность иммуноферментного анализа / Н.В. Никитина, Б.Б. Трефилов, А.С. Лисенкова // Ветеринарная практика. – 2012. - № 2 (57). – С. 36-39.
36. Никитина Н.В. Применение «сэндвич» варианта ИФА при метапневмовирусной инфекции птиц / Н.В. Никитина, Б.Б. Трефилов, А.С. Лисенкова // Перспективы развития АПК России в условиях членства в ВТО: мат. междунар. конгр. – СПб, 2013. – С. 226.
37. Никонова, З.Б. Разработка и применение методов диагностики метапневмовирусной инфекции птиц: автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.02.02 / Никонова Зоя Борисовна. - Владимир, 2012. – 25с.

38. Пронин, А.С. Обоснование выбора подтипа пневмовируса птиц в качестве антигена инактивированной вакцины / А.С. Пронин, Н.И. Герасимова, М.А. Волкова [и др.] // Труды Федерального центра охраны здоровья животных. – Владимир, 2006. – Т. 4. – С. 323-328.

39. Раменская Д.В. Изучение чувствительности различных культур клеток к полевому изоляту метапневмовируса птиц подтипа В / Д.В. Раменская, Т.Б. Манин // Ветеринария и кормление. – 2010. - №. 6. – С. 42-44.

40. Ройт, А. Иммунология / А. Ройт, Д. Бростофф, Д. Мейл. - М.: Мир, 2000. - С. 592.

41. Самусева Г.Н. Диагностика ассоциированного течения метапневмовирусной и парамиксовирусной инфекции 2-го серотипа / Г.Н. Самусева, М.Е. Дмитриева, А.С. Лисенкова [и др.] // Матер. XVII междунар. конф. ВНАП. – Сергиев посад, 2012. – С. 604-606.

42. Сарбасов, А.Б. Изучение антигенных свойств пневмовируса птиц на цыплятах / А.Б. Сарбасов, С.К. Старов, А.В. Борисов // Актуальные проблемы инфекционной патологии животных: матер. Междунар. науч. конф., посвящен. 45-летию ФГУ «ВНИИЗЖ». - Владимир, 2003. - С. 354-356.

43. Старов С.К. Пневмовирусная инфекция птиц и ее диагностика / С.К. Старов // Россветинфо. – 2007. - № 1. – С. 13-14.

44. Сухинин А.А. Лабораторная диагностика вирусных болезней: учебн. Пособие /А.А. Сухинин -СПб.: Санкт-Петербургская академия ветеринарной медицины, 2019.-124 с.

45. Сюрин В.Н. Вирусные болезни животных: учеб. пособие / Сюрин В.Н. - М.: ВНИТИБП, 1998. - С. 17-20.

46. Трефилов Б.Б. Диагностика и профилактика метапневмовирусной инфекции птиц / Б. Трефилов, Н. Никитина, В. Бочкарев. – LAP LAMBERT Academic Publishong, 2016. – 62с.

47. Трефилов, Б.Б. Пневмовирусная инфекция птиц (эпизоотология, диагностика) / Б.Б. Трефилов, Н.В. Никитина, Н.В. Денисов // Актуальные проблемы ветеринарной медицины: научно-практ. конф., 24-25 августа 2007. – СПб, 2007. - С. 210-211.

48. Трефилов, Б.Б. Ассоциированное течение респираторных вирусных болезней птиц / Б.Б. Трефилов, Н.В. Никитина, Л.Ю. Данко [и др.] // Материалы международного конгресса, СПб., 2009. - С. 41-42.

49. Трефилов, Б.Б. Репродукция метапневмовируса в клеточных культурах / Б.Б. Трефилов, Н.В. Никитина, Д.В. Дмитриев // Актуальные проблемы ветеринарии и животноводства: матер. межрегион. научно-практ. конф. - Самара, 2010. - С. 316-320.

50. Трефилов, Б.Б. Чувствительность клеточных культур к метапневмовирусу птиц / Б.Б. Трефилов, Л.Ю. Данко // Вопросы нормативно-правового регулирования в ветеринарии. – 2010. - № 1. - С. 44-46.

51. Трефилов, Б.Б. Способность метапневмовируса птиц к репродукции в культурах клеток / Б.Б. Трефилов, Н.В. Никитина, Л.Ю. Данко [и др.] // Ветеринария и кормление. – 2011. - № 5. – С. 14.

52. Трефилов, Б.Б. Антигенная специфичность и степень нейтрализации вакцинных штаммов метапневмовируса птиц / Б.Б. Трефилов, Л.Ю. Данко, В.С. Бочкарев [и др.] // Ветеринарная практика. - 2011. - № 1. – С. 35-37.

53. Троценко, Н.И. Практикум по ветеринарной вирусологии / Н.И. Троценко, Р.В. Белоусова, Э.А. Преображенская. - М.: «Колос», 2000. - С. 272.

54. Хлебовец, З.Б. Изучение особенностей персистенции и тропизма пневмовируса птиц подтипа А с помощью полимеразной цепной реакции / З.Б. Хлебовец, Л.О. Щербакова, Т.Б. Манин [и др.] // Материалы I-го международного ветеринарного конгресса по птицеводству (18-22 апреля 2005 г.). – М., 2005. – С. 93-97.

55. Ahmadian G. Detection and characterization of Processing encoded by the second ORF of the M2 gene of pneumoviruses / G. Ahmadian, P. Chambers, A.J.

Easton // J. Gen. Virol. - 1999. - V .80. - P. 2011-2016.

56. Al-Ankari A.R. Avian pneumovirus infection in broiler chicks inoculated with *Escherichia coli* at different time intervals / A.R. Al-Ankari, J.M. Bradbury, C.R. Naylor, [et al.] // Avian Pathol. - 2001. - Vol. 30. - P. 257-267.

57. Alexander D.J. Newcastle disease and other avian paramyxoviridae infections. In: Diseases of Poultry. - 10th ed. Ames, Iowa, 1997. - P.541-569.

58. Alkhalaf A.N. Pathogenicity, transmissibility, and tissue distribution of avian pneumovirus in turkey poults / A.N. Alkhalaf, L.A. Ward, R.N. Dearth, [et all.] // Avian Dis. - 2002. - V. 46. - P. 650-659.

59. Arns C.W. Swollen head syndrome in poultry flocks in Brazil / C.W. Arns, H.M. Hafez // Proc. 41st Western Poultry Dis. Conf. - Sacramento, California, 1992. - P. 81-83.

60. Banet-Noach C. Direct (non-vector) transmission of West Nile virus in geese / C. Banet-Noach, L. Simanov, M. Malkinson // Avian Pathol. - 2003. - V. 32. - P. 489-494.

61. Banet-Noach C. Characterization of Israeli avian metapneumovirus strains in turkeys and chickens / C. Banet-Noach, L. Simanov, S. Perk // Avian Pathol. - 2005. - V. 34. - P. 220-226.

62. Băyon-Auboyer M. H. Comparison of F-, G- and N-based RT-PCR protocols with conventional virological procedures for the detection and typing of turkey rhinotracheitis virus / M.N. Băyon-Auboyer, V. Jestin, D. Toquin, [et all.] // Arch. Virol. - 1999. - V. 144. - P. 1091-1109.

63. Bennett R.S. Detection of avian pneumovirus in wild Canada geese (*Branta canadensis*) and blue-winged teal (*Anas discors*) / R.S. Bennett, B. McComb, H.J. Shin, [et all.] // Avian Dis. - 2002. - V. 46. - P. 1025-1029.

64. Bennett R.S. Evidence of avian pneumovirus spread among wild birds and domestic turkeys in central North America / R.S. Bennett, J. Nezworski, B.T. Velayudhan. [et all.] // Avian Dis – 2004. – V. 48. – P. 902-908.

65. Bennett R.S. A wild goose metapneumovirus containing a large attachment

of glycoprotein is avirulent but immunoprotective in domestic turkeys / R.S. Bennett, R. La Rue, D. Shaw, [et al.] // *J. Virol.* - 2005. - V. 79. - P. 14834-14842.

66. Buys S.B. A preliminary report on the isolations of a virus causing sinusitis in turkeys in South Africa and attempts to attenuate the virus / S.B. Buys, J.H. Du Preez // *Turkeys.* - 1980. - V. 28. - P. 36.

67. Cadman H.F. A serosurvey using enzyme-linked immunosorbent assay for antibodies against poultry pathogens in Ostriches (*Struthio camelus*) from Zimbabwe / H.F. Cadman P.J. Kelly, R. Zhou, [et al.] // *Avian Dis.* - 1994. - V. 38. - P. 621- 625.

68. Catelli E. The use of virus isolation, histopathology and immunoperoxidase techniques to study the dissemination of a chicken isolate of avian pneumovirus in chickens / E. Catelli, J.K.A. Cook, J. Chesher, S.J. [et al.] // *Avian Pathol.* - 1998. - V. 27. - P. 632-640.

69. Cavanagh D. Innovation and discovery: the application of nucleic acidbased technology to avian virus detection and characterization / D. Cavanagh // *Avian Pathol.* - 1999. - Vol. 30. - P. 581-598.

70. Chary P. Pathogenic and immunosuppressive effects of avian pneumovirus in turkeys / P. Chary, S. Rautenschlein, M.K. Njenga [et al.] // *Avian Dis.* - 2002. - V. 40. - N. 1. - P. 153-161.

71. Chiang S.J. A modified enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of avian pneumovirus antibodies / S.J. Chiang, A.M. Dar, S.M. Goyal [et al.] // *J. Vet. Diagn. Invest.* - 2000. - Vol. 12. - P. 381-384.

72. Collins M.S. Characterisation of a virus associated with turkey rhinotracheitis / M.S. Collins, R.E. Gough // *J. Gen. Virol.* - 1988. - V. 69. - P. 909-916.

73. Collins M.S. Antigenic differentiation of avian pneumovirus isolates using polyclonal antisera and mouse monoclonal antibodies / M.S. Collins, W.J. Cox, N.J. Gettle // *Avian Pathol.* - 1993. - V. 22. - P. 469-479.

74. Collins M.S. Respiratory syncytial virus / M.S. Collins, K. McIntosh, R.M. Chanock // *Fields Virology: 3th ed.* Philadelphia. - 1996. - P. 1313-1351.

75. Cook J.K.A. A live attenuated turkey rhinotracheitis virus vaccine. 2. The use of the attenuated strain as an experimental vaccine / J.K.A. Cook, H.C. Holmes, P.M. Finney [et al.] // *Avian Pathol.* – 1989b. – V. 18. – P. 523-534.

76. Cook J.K.A. Attenuation of turkey rhinotracheitis virus by alternative passage in embryonated chicken eggs and tracheal organ cultures / J.K.A. Cook, M.M. Ellis // *Avian Pathol.* - 1990. - V. 19. - P. 181-185.

77. Cook J.K.A. The pathogenesis of turkey rhinotracheitis in turkey poultlets inoculated with the virus alone or together with two strains of bacteria / J.K.A. Cook, M.M. Ellis, M.B. Huggins // *Avian Pathol.* - 1991. - V. 19. - P. 181-185.

78. Cook J.K.A. In vitro and in vivo studies in chickens and turkeys on strains of turkey rhinotracheitis virus isolated from the two species / J.K.A. Cook, S. Kinloch, M.M. Ellis // *Avian Pathol.* – 1993. - V. 22. - P. 157-170.

79. Cook J.K.A. Antigenic differentiation of strains of turkey rhinotracheitis virus using monoclonal antibodies / J.K.A. Cook, B.V. Jones, M.M. Ellis [et al.] // *Avian Pathol.* – 1993b. – V. 22. – P. 257-273.

80. Cook J.K.A. Protection provided by a commercially available vaccine against different strains of turkey rhinotracheitis virus / J.K.A. Cook, M.B. Huggins, M.A. Woods [et al.] // *Vet. Rec.* - 1995. - V. 136. - P. 392-395.

81. Cook J.K.A. An experimental turkey rhinotracheitis (TRT) infection in breeding turkeys and the prevention of its clinical effects using live attenuated and inactivated TRT vaccines / J.K.A. Cook, S.J. Orbell, S. Orbell [et al.] // *Avian Pathol.* - 1996. - V. 25. - P. 231-243.

82. Cook J.K.A. Preliminary antigenic characterisation of an avian pneumovirus isolated from commercial turkeys in Colorado, USA / J.K.A. Cook, M.B. Huggins, S.J. Orbell [et al.] // *Avian Pathol.* - 1999. - V. 28. - P. 607-617.

83. Cook J.K.A. Avian rhinotracheitis / J.K.A. Cook // *Revue Scientifique et Technique, Office International des Epizooties.* - 2000. - V. 19. - P. 602-613.

84. Cook J.K.A. Avian pneumovirus infection of laying hens: experimental studies / J.K.A. Cook, J. Chesher, F. Orthel // *Avian Pathol.* - 2000. - V. 29. - P. 545-

556.

85. Cook J.K.A. Infectious bronchitis virus vaccine interferes with the replication of avian pneumovirus vaccine in domestic fowl / J.K.A. Cook, M.B. Huggins, S.J. Orbell [et all.] // *Avian Pathol.* - 2001. - V. 30, № 3. - P. 233-242.

86. Cook J.K.A. Detection and differentiation of avian pneumoviruses (metapneumoviruses) / J.K.A. Cook, D. Cavanagh // *Avian Pathol.* - 2002 - V. 31 - P. 117-119.

87. D'Arce R.C.F. Subtyping of new Brazilian avian metapneumovirus isolates from chickens and turkeys by reverse transcriptase - nested - polymerase chain reaction. / R.C.F. D'Arce, L.T. Coswing, R.S. Almeida [et all.] // *Avian Pathol.* - 2005. - V. 34. - P. 133-136.

88. Dani M.A. Molecular characterization of Brazilian avian pneumovirus isolates: comparison between immunochemiluminescent Southern blot and nested PCR / M.A. Dani, E.L. Durigon, C.W. Arns // *J. Virol. Methods.* - 1999. - V. 79. - P. 237-241.

89. Dar A.M. Sequence analysis of the nucleocapsid and phosphoprotein genes of avian pneumovirus circulating in the US / A.M. Dar, S. Munir, S.M. Goyal [et all.] // *Virus Res.* – 2001. - V. 79. - P. 15-25.

90. Devi P.P. Growth of vaccine strains of avian pneumovirus in different cell lines / P.P. Devi, A. Niwari, S.M. Goyal // *Avian Pathol.* – 2005. – V. 34 (2). – P. 123-126.

91. Droual R. Swollen head syndrome associated with E. coli and infectious bronchitis virus in the Central Valley of California / R. Droual, P.R. Woolcock // *Avian Pathol.* - 1994. - V. 23 - P. 733-742.

92. Etteradossi N. Discrepancies in turkey rhinotracheitis ELISA results using different antigens / N. Etteradossi, D. Toquin, M. Guittet [et all.] // *Vet. Rec.* - 1992. - V. 131. - P. 563-564.

93. Etteradossi N. Evaluation of different turkey rhinotracheitis viruses used as antigens for serological testing following live vaccination and challenge / N.

Etteradossi, D. Toquin, M. Guittet [et all.] // *Vet. Med.* - 1995. - V. 42. - P. 175-186.

94. Felipe P.A. Detection of and phylogenetic studies with avian metapneumovirus recovered from feral pigeons and wild birds in Brazil / P.A. Felipe, L.H.A. da Silva, M.B. Santos [et al.] // *Avian Pathol.* – 2011. – V. 40. – N. 5. – P. 445-452.

95. Ganapathy K. Avian metapneumovirus: diagnosis and prevention (2) / K. Ganapathy // *World Poultry.* - 2007. - V. 23, № 5. - P. 35-37.

96. Gerrard C. Avian rhinotracheitis diagnostic kit / C. Gerrard, A. Whitworth, N. Chettle [et all.] // *Vet. Rec.* – 1990. - V. 126. - P. 342.

97. Gough R.E. Avian Pneumoviruses. In: *Avian Diseases*. Iowa: Iowa State University Press. – 2004. - P. 92-99.

98. Govidanrajan D. Analysis of the complete genome sequence of avian metapneumovirus subtype C indicates that it possesses the longest genome among metapneumoviruses / D. Govidanrajan, S.K. Samal // *Virus Genes.* – 2005. – V. 30. – P. 331-333.

99. Goyal S.M. Seroprevalence of avian pneumovirus in Minnesota turkeys / S.M. Goyal, D. Lauer, K. Friendshuh [et all.] // *Avian Dis.* - 1999. - V. 47. - P. 244-250.

100. Goyal S.M. Isolation of avian pneumovirus in from an outbreak of respiratory illness in Minnesota turkeys / S.M. Goyal, S.J. Chiang, A.M. Dar [et all.] // *J. Vet. Diagn. Invest.* - 2000. - V. 12. - P. 166-168.

101. Goyal S.M. Isolation of avian pneumovirus in US turkey flocks / S.M. Goyal, S.J. Chiang, A.M. Dar [et al.] // *J. Vet. Diagn. Invest.* - 2000. - V. 12. - P. 116-118.

102. Goyal S.M. Seroprevalence of avian pneumovirus in Minnesota turkeys / S.M. Goyal, D. Lauer, K. Friendshuh [et all.] // *Avian Dis.* - 2003. - V. 47. - P. 700-706.

103. Graaf M. Evolutionary dynamics of human and avian metapneumoviruses / M. Graaf, A.D.M.E. Osterhaus, R.A.M. Fouchier [et al.] // *J. Gen. Virol.* – 2008. – V. 89. – P. 2933-2942.

104. Graham D.A. Isolation of ortho- and paramyxovirus from wild birds in

Northern Ireland during the 1997 Newcastle epizootic / D.A. Graham, A. German, D. Abernethy [et all.] // *Vet. Rec.* - 1999. - V. 145. - P. 20-21.

105. Gulati B.R. Detection of antibodies to US isolates of avian pneumovirus by a recombinant nucleocapsid protein-based sandwich enzyme-linked immunosorbent assay / B.R. Gulati, S. Munir, D.P. Patnayak [et all.] // *Journal of Clinical Microbiology.* – 2001a. - V. 39. - P. 2967-2970.

106. Gulati B.R. Protective efficacy of high-passaged avian pneumovirus (APV/MN/turkey/1-a/97) in in. keys / B.R. Gulati, D.P. Patnayak, A.M. Sheikh [et all.] // *Avian Dis.* – 2001b. - V. 45. - P. 593-597.

107. Hafez H.M. Comparative investigation of turkey rhinotracheitis (TRT) virus isolates from different countries / H.M. Hafez // *Dtsch. Tierarztl Wochenschr.* - 1992. - V. 99. - P. 489-488.

108. Hafez H.M. Presence of avian pneumovirus type A in continental Europe during the 1980s / H.M. Hafez, M. Hess, C. Prusas [et all.] // *J. Vet. Med. B.* - 2000. - V. 47 - P. 29-33.

109. Hassan M.K. Comparison between antigen capture ELISA and conventional methods used for titration of infectious bursal disease virus / M.K. Hassan, Y.M. Saif, S. Shawky // *Avian Dis.* - 1996. - V. 40. – N. 3. - P. 562 - 566.

110. Horvath E. Potency test of inactivated Newcastle disease vaccines by monoclonal antibody blocking ELISA / E. Horvath, G. Czifra, E. Nagy // *Vaccine.* - 1999. - V. 17, № 23-24. - P. 2969-2973.

111. Houadfi E. Swollen head syndrome in broiler chicken in Morocco / E. Houadfi, M. Hamam, J. Vanmarche [et all.] // *Proc. 40th Western Poultry Dis. Conf. Acapulco, Mexico* - 1991. - P. 126-127.

112. Ishiguro N. High genetic diversity of the attachment (G) protein of human metapneumovirus / N. Ishiguro, T. Ebihara, R. Endo [et all.] // *J. Clin. Microbiol.* - 2004. - V. 42. - P. 3406-3414.

113. Jing L. Detection of turkey rhinotracheitis virus in turkeys using the polymerase chain reaction / L. Jing, J.K.A. Cook, T. David [et all.] // *Avian Pathol.* -

1993. - V. 22. - P. 771-783.

114. Jirjis F.E. Avian pneumovirus infection in Minnesota turkeys: experimental reproduction of the disease / F.E. Jirjis, S.L. Noll, D.A. Halvorson [et all.] // *Avian Dis.* - 2000. - V. 44. - P. 222-226.

115. Jirjis F.E. Immunohistochemical detection of avian pneumovirus in formalin-fixed tissues / F.E. Jirjis, S.L. Noll, D.A. Halvorson [et all.] // *J. Vet. Diagn. Invest.* - 2001. - V. 13. - P. 13-16.

116. Jirjis F.E. Pathogenesis of avian pneumovirus infection in turkeys / F.E. Jirjis, S.L. Noll, D.A. Halvorson [et all.] // *Vet. Pathol.* - 2002. - V. 39. - N. 2. - P. 300-310.

117. Jones R.C. Avian pneumovirus infections: questions still unanswered / R.C. Jones // *Avian Pathol.* - 1996. - V. 23. - P. 639-648.

118. Jones R.C. Respiratory viral diseases - lessons to be learned? / R.C. Jones // *Int. Poultry Prod.* - 2004. - V. 12. - P. 11-15.

119. Kapczynski D.R. Immunization of turkeys with a DNA vaccine expressing either the F or N gene of avian metapneumovirus / D.R. Kapczynski, H.S. Sellers // *Avian Dis.* - 2003. - V. 47. - P. 1376-1383.

120. Kardi V. Use of ELISA procedures for the detection of Derzsy's disease virus of geese and of antibodies produced against it / V. Kardi, E. Szegletes // *Avian Pathol.* - 1996. - № 25. - P. 25-34.

121. Khehra R.S. In vitro studies on the pathogenicity of avian metapneumovirus for chicken oviclut / R.S. Khehra, R.S. Jones // *Avian Pathol.* - 1999. - V. 28. - N. 3. - P. 257-262.

122. Lamb R.A. Paramyxoviridae / R.A. Lamb, P.L. Collins, D. Kolacofsky // *Acad. Pres., N.Y.* - 2000. - P. 835-849.

123. Li J. Sequence of the nucleocapsid protein gene of subgroup A and B avian pneumoviruses / J. Li, R. Ling, J.S. Randhawa [et al.] // *Virus Res.* - 1996. - V. 41. - P. 185-191.

124. Ling R. Turkey rhinotracheitis virus: in vivo and in vitro polypeptide

synthesis / R. Ling, C.R. Pringle // *J. Gen. Virol.* – 1988. - V. 69. - P. 917-923.

125. Ling R. Sequence analysis of the 22K, SH and G genes of turkey rhinotracheitis virus and their intergenic regions reveals a gene order different from that of other pneumoviruses / R. Ling, A.J. Easton, C.R. Pringle // *J. Gen. Virol.* - 1992. - V. 73. - P. 1709-1715.

126. Liu H. J. Tissue print hybridization and reverse transcriptase PCR in the detection of infectious bursal disease viruses in bursal tissues / H.J. Liu // *Res. in veter. Sc.* - 2000. - V. 68. – N. 1. - P. 99 -101.

127. Lowda R.N. Swollen head syndrome in poultry / R.N. Lowda // *Poultry Adviser.* -1993. -V. 26. - P. 21-23.

128. Lu Y.S. Swollen head syndrome in Taiwan-isolation of an avian pneumovirus and serological survey / Y.S. Lu, Y.S. Skien, H.J. Tsai // *Exp. Rep. Tprian.* – 1994a. –V. 30. - P. 103-108.

129. Lwamba H.C. Comparison of the full-length genome sequence of avian metapneumovirus subtype C with other paramyxoviruses / H.C. Lwamba, R. Alvarez, M.G. Wise [et all.] // *Virus Res.* - 2005. - V. 107. - P. 83-92.

130. Maharaj S.B. Isolation of an avian pneumovirus-like agent from broiler breeder chickens in South Africa / S.B. Maharaj // *Vet. Rec.* - 1994. - V. 134. - P. 525-526.

131. Majo N. A sequential histopathologic and immunocytochemical study of chickens, turkey poults and broiler breeders experimentally infected with turkey rhinotracheitis virus / N. Majo, G.M. Allan, C.J. O'Loan [et all.] // *Avian Dis.* -1995. - V. 39. - P. 887-896.

132. McFarlane-Toms I.P. A comparison of three commercially available ELISA tests for detecting antibodies to turkey rhinotracheitis (TRTV) / I.P. McFarlane-Toms, R.J.H. Jackson // In E. Kaleta & U. Heffels-Redmann (Eds.). *Proceedings of the International Symposium on Infectious Bronchitis and Pneumovirus Infections in Poultry* Rauschholzhausen, Germany. - 1998. - P. 26-37.

133. Mekkes D.R. Comparison of three commercial ELISA kits for the detection of turkey rhinotracheitis virus antibodies / D.R. Mekkes, J.J. de Wit // *Avian Pathol.* – 1999. – V. 27. – P. 301-305.

134. Nakamura K. Attempts to reproduce swollen head syndrome in specific pathogen free chickens by inoculating with *Escherichia coli* and/or turkey rhinotracheitis virus / K. Nakamura, M. Mase, N. Tanimura [et all.] // *Avian Pathol.* – 1998. - V. 27. - P. 21-27.

135. Naylor C.J. Exacerbation of *Mycoplasma gallisepticum* infection in turkeys by rhinotracheitis virus / C.J. Naylor, A.R. Al-Ankari, A.L. Al-Afaleq [et all.] // *Avian Pathol.* - 1992. - V. 21. - P. 295-305.

136. Naylor, C.J. Turkey rhinotracheitis: a review / C.J. Naylor, R.C. Jones // *Vet. Bull.* - 1993. - V. 63. - P. 339-349.

137. Naylor C.J. Demonstration of a virulent subpopulation in a prototype live attenuated turkey rhinotracheitis vaccine / C.J. Naylor, R.C. Jones // *Vaccine.* - 1994. - V. 12. - P. 1225-1230.

138. Naylor C.J. Failure of maternal antibodies to protect young turkey poults against challenge with turkey rhinotracheitis virus / C.J. Naylor, K.J. Worthington, R.C. Jones // *Avian Dis.* - 1997. - V. 41. - P. 968-971.

139. Naylor C.J. The ectodomains but not the transmembrane domains of the fusion proteins of subtypes A and B avian pneumovirus are conserved to a similar extent as those of human respiratory syncytial virus / C.J. Naylor, P. Britton, D. Cavanagh // *J. Gen. Virol.* - 1998. - V. 79. - P. 1393-1398.

140. O'Brien J.D.P. Swollen head syndrome in broiler breeders / J.P.D. O'Brien // *Vet. Rec.* - 1985. - V. 117. - P. 619-620.

141. O'Loan C.J. Immunogold labelling of turkey rhinotracheitis virus / C.J. O'Loan, W.L. Curran, M.S. McNulty // *J. Vet. Med., series B.* - 1992. - V. 39. - P. 459-466.

142. Padhi A. Population dynamics and rates of molecular evolution of a recently emerged paramyxovirus, avian metapneumovirus subtype C / A. Padhi, M. Poss // J. Virol. – 2009. – V. 83. – P. 2015-2019.

143. Panigrahy B. Experimental and serologic observations on avian pneumovirus (APV /turkey /Colorado/97) infection in turkeys / B. Panigrahy, D.A. Senne, J.C. Pedersen [et all.] // Avian Dis. - 2000. - V. 44. - P. 17-22.

144. Patnayak D.P. Experimental and field evaluation of a live vaccine against avian pneumovirus / D.P. Patnayak, A.M. Sheikh, B.R. Gulati [et all.] // Avian Pathol. - 2002. - V.31. - P.377-382.

145. Patnayak D.P. Cold - adapted avian pneumovirus for use as live, attenuated vaccine in turkeys / D.P. Patnayak, B.R. Gulati, A.M. Sheikh [et all.] // Vaccine. - 2003. - V. 21. - P. 1371-1374.

146. Patnayak D.P. Growth of vaccine strains of avian pneumovirus in different cell lines / D.P. Patnayak, A. Tiwari, S.M. Goyal // Avian Pathol. - 2005. - V. 34. - P. 123-126.

147. Pattison M. Observations on swollen head syndrome in broiler and broiler breeder chickens / M. Pattison, N. Chettle // Vet. Rec. – 1989. – V. 1235. – P. 229-231.

148. Pedersen J.C. The sensitivity and specificity of a reverse transcription – polymerase chain reaction assay for the avian pneumovirus (Colorado strain) / J.C. Pedersen, D.L. Reynolds, A. Ali // Avian Dis. - 2000. - V. 44. - P. 681-685.

149. Pedersen J.C. Detection of avian pneumovirus in tissues and swab specimens from infected turkeys / J.C. Pedersen, D.A. Senne, B. Pannigrahy [et all.] // Avian Dis. - 2001. - V. 45, № 3. - P. 581-592.

150. Peret T.C. Characterization of human metapneumoviruses isolated from patients in North America / N.C. Peret, G. Boivin, Y. Li [et all.] // J. Infect. Dis. - 2002. - V. 185. - P. 1660-1663.

151. Picault J.P. Syndrome infectieux de gonflement de la tete (S.I.G.T.): bilan actuel des recherches etiologiques / J.P. Picault, P. Drouin, J. Lamande // L'Aviculteur. – 1986. – V. 467 - P. 43.

152. Picault J.P. Isolation of a TRT-like virus from chickens with swollen-head syndrome/ J.P. Picault, P. Giraud, P. Drouin [et all.] // *Vet. Rec.* - 1987a. - V. 121. - P. 135.

153. Picault J.P. Une etiologie commune avec la rhinotracheite infectieuse de la dinde / J.P. Picault, P. Giraud, P. Drouin // *L'Aviculteur.* - 1987b. - V. 481. - P. 74.

154. Pringle C.R. Virus taxonomy / C.R. Pringle // *Arch. Virol.* - 1999. - V. 144. - P. 2065-2069.

155. Randhawa J.S. Nucleotide sequence of the gene encoding the viral polymerase of avian pneumovirus / J.S. Randhawa, S.D. Wilson, K.P. Tolley [et all.] // *J. Gen. Virol.* -1996. - V. 77. - P. 3047-3051.

156. Seal B.S. Avian pneumoviruses and emergence of a new type in the United State of Americ / B.S. Seal // *Anim. Health. Res. Rev.* - 2000. - V. 1. - P. 67-72.

157. Seal B.S. Fasion protein predicted amino acid sequence of the first U.S. avian pneumovirus isolate and lack of heterogeneity among other U.S. isolates / B.S. Seal, H.S. Sellers, R.J. Meinersmann // *Virus Res.* - 2000. - V. 66. - P. 139-147.

158. Senne D.A. Avian pneumovirus update / D.A. Senne, R.K. Edson, J.C. Pederson [et al.] // *Proc. 134th Ann. Conf- Schaumburg, Illinois: Am. Vet. Med. Assoc,* 1997. - P. 190.

159. Shin H.J. Specific detection of avian pneumovirus (APV) US isolates by RT-PCR / H.J. Shin, G. Rajashekara, F.F. Jirjis [et all.] // *Arch. Virol.* - 2000. - V. 145. - P. 1239-1246.

160. Shin H.J. Isolation of avian pneumoviruses from mallard ducks that is genetically similar to viruses uses isolated from neighboring commercial turkeys / H.J. Shin, K.V. Nagaraja, B. McComb // *Virus Res.* – 2002a. - V. 83. - P. 207-212.

161. Shin H.J. Molecular epidemiology of subgroup C avian pneumoviruses isolated in the United Slates and comparison with subgroup A and B viruses/ H.J. Shin, K.T. Cameron, J.A. Jacobs [et all.] // *J. Clin. Microbiol.* – 2002b. - V. 40 - P. 1687-1693.

162. Shin H.J. Neonatal avian pneumovirus infection in commercial turkeys / H.J. Shin, F.F. Jirjis, M.C. Kumar [et all.] // *Avian Dis.* - 2002c. - V. 46. - P. 239-244.

163. Toquin D. Infectious rhinotracheitis in turkeys: antigenic differences revealed by ELISA / D. Toquin, N. Eterradossi, M. Guittet // *New and Evolving Virus Diseases of Poultry: Proc. Seminar. Europ. Comm., Brussels.* - 1994. - P. 111-121.

164. Toquin D. Use of a related ELISA antigen for efficient TRT serological testing following live vaccination / D. Toquin, N. Eterradossi, M. Guittet // *Vet. Rec.* - 1996. - V. 139. - P. 71-72.

165. Toquin D. Isolation of a pneumovirus from a Muscovy duck / D. Toquin, M.H. Bâyon-Auboyer, N. Eteradossi // *Vet. Rec.* - 1999. - V. 145. – P .680.

166. Toquin D. Eterradossi N. Lack of antigenic relationship between French and recent North American non –A/non-B turkey rhinotracheitis viruses / D. Toquin, M.H. Bâyon-Auboyer, D.A. Senne // *Avian Disease.* - 2000. - V. 44. - P. 977-982.

167. Toquin D. Subgroup C avian metapneumovirus (MPV) and the recently isolated human MPV exhibit a common organization but have extensive sequence divergence in their putative SH and G genes / D. Toquin, C. de Boisseson, V. Beven [et al.] // *J. Gen. Virol.* – 2003. – V. 84. – P. 2169-2178.

168. Turpin E.A. Evidence of avian metapneumovirus subtype C infection of wild birds in Georgia, South Carolina, Arkansas and Ohio, USA / E.A. Turpin, D.E. Stallknecht, R.D. Slemins [et al.] // *Avian Pathol.* – 2008. – V. 37. – P. 343-351.

169. Townsend E. Susceptibility of avian pneumovirus isolated from Minnesota turkeys to physical and chemical agents / E. Townsend, D.A. Halvorson, K.V. Nagaraja [et al.] // *Avian Dis.* – 2000. – V. 44. – N. 2. – P. 336-342.

170. Usami Y. Detection of antibodies to avian pneumovirus by a micro indirect immunofluorescence test / Y. Usami, M. Mase, O. Yamaguchi [et all.] // *Avian Dis.* - 1999. -V. 43. - P. 384-390.

171. Van de Zande S. Comparative pathogenesis of a subtype A with a subtype B avian pneumovirus in turkeys / S. Van de Zande, H. Nauwynck, S. De Jonghe [et al.] // *Avian Pathol.* - 1999. - V. 28. - P. 329-244.

172. Van de Zande S. The clinical, pathological and microbiological outcome of an *Escherichia coli* O2: K1 infection turkeys / S. Van de Zande, H. Nauwynk, M. Pensaert // *Vet. Microbiol.* – 2001. – V. 81. – N. 4. – P. 353-365.

173. Velayudhan B.T. Glycoprotein gene truncation in avian metapneumovirus subtype C isolates from United States / B.T. Velayudhan, Q. Yu, C.N. Esteves [et al.] // *Virus Genes.* – 2008. – V. 37. – P. 266-272.

174. Yu Q. Sequence and in vitro expression of the M2 gene of turkey rhinotracheitis pneumovirus / Q. Yu, P.J. Davis, T.D. Brown [et all.] // *J. Gen. Virol.* - 1992. – V. 73. – P. 1355-1363.

175. Yunus A.S. Deduced amino acid sequence of the small hydrophobic protein of US avian pneumovirus has greater identity with that of human metapneumovirus than those of non-US avian pneumovirus / A.S. Yunus, D. Govindarajan, Z. Huang [et al.] // *Virus Res.* – 2003. – V. 93. – P. 91-97.

ПРИЛОЖЕНИЕ

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

УТВЕРЖДАЮ
Директор ФНЦ ФГБНУ
«ВНИТИП» РАН
Д.Н. Ефимов
2020 г.



**«ВЫЯВЛЕНИЕ И СЕРОТИПИРОВАНИЕ
ВОЗБУДИТЕЛЯ МЕТАПНЕВМОВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ ПТИЦ
МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКИМИ МЕТОДАМИ»
(методические положения)**

В методических положениях «Выявление и серотипирование возбудителя метапневмовирусной инфекции птиц молекулярно-биологическими методами» изложены новые усовершенствованные методики по использованию ПЦР для выявления и серотипирования возбудителя метапневмовирусной инфекции птиц. Представлены основные этапы постановки реакции, начиная с оборудования и реактивов, используемых при ПЦР-диагностике, и заканчивая интерпретацией полученных результатов.

Методические положения разработаны сотрудниками Всероссийского научно-исследовательского ветеринарного института птицеводства - филиала Федерального государственного бюджетного научного учреждения Федерального научного центра «ВНИТИП» РАН: старшим научным сотрудником отдела диагностики и эпизоотологического анализа Абгарян С.Р., ведущим научным сотрудником отдела вирусологии, канд. биол. наук Никитиной Н.В., заведующей отделом диагностики и эпизоотологического анализа, канд. вет. наук Семиной А.Н.

Методические положения предназначены для ветврачей-вирусологов региональных, областных, зональных и специализированных лабораторий и научно-исследовательских учреждений ветеринарного и биологического профиля.

Рецензенты: кандидат ветеринарных наук В.О. Виноходов, ассистент кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии ФГБОУ ВО СПб АВМ; доктор ветеринарных наук, профессор, заведующий отделом вирусологии и ОБП ВНИВИП В.А. Бакулин.

Методические положения рассмотрены и одобрены на Ученом Совете ВНИВИП (15 октября 2019 г., протокол № 4).

СОДЕРЖАНИЕ

1. Сущность метода.....	92
2. Область применения.....	92
3. Меры предосторожности при работе с реактивами.....	92
4. Оборудование, материалы и реактивы необходимые для работы.....	93
5. Проведение анализа.....	94
5.1. Отбор материала для исследования.	94
5.2. Подготовка исследуемого материала.	95
5.3. Выделение РНК.	95
5.4. Проведение ОТ-ПЦР.....	97
5.5. Постановка полимеразной цепной реакции (ПЦР).....	97
5.6. Проведение электрофореза.....	98
5.7. Учёт результатов амплификации.	99

1. Сущность метода

Выявление и серотипирование метапневмовируса птиц в биологических материалах кур проводится методом полимеразной цепной реакции (ПЦР), в которой используются специфические праймеры для данного вида возбудителя. По наличию в реакционной смеси специфических фрагментов ДНК, комплементарной матричной РНК метапневмовируса делают заключение о присутствии в исследуемом материале возбудителя МПВИ птиц.

ПЦР включает в себя серию повторяющихся циклов, каждый из которых начинается со стадии денатурации молекулы. На первой стадии при 95 °С разрываются водородные связи, соединяющие спиральные цепи ДНК. На второй стадии температуру понижают до определённых значений, соответствующих температуре отжига праймеров и зондов. Третьей стадией является элонгация праймеров – синтез новой цепи ДНК с участием фермента Таг-полимеразы.

Анализ продуктов амплификации проводят методом электрофореза в агарозном геле, содержащем бромид этидия, который в процессе реакции под действием ультрафиолетового света обеспечивает свечение. Амплифицированные фрагменты ДНК выявляют в виде светящихся оранжевых полос.

2. Область применения

Методика предназначена для выявления нуклеиновой кислоты и определения нуклеотидной последовательности генома метапневмовируса птиц в биологических образцах на основе ПЦР.

3. Меры предосторожности при работе с реактивами

Этидия бромид – канцерогенное соединение, поэтому при работе с ним следует соблюдать правила безопасности: работать только в перчатках, не допускать попадания на кожу и слизистые оболочки, в случае контакта немедленно смыть его большим количеством проточной воды.

4. Оборудование, материалы и реактивы необходимые для работы

- набор одноканальных лабораторных дозаторов по ГОСТ 28311, с варьируемыми объемами доз 0,5-10 мм³, 10-100 мм³, 20-200 мм³, 100-1000 мм³, 2-20 мм³.
- стерильный ламинарный шкаф «БАВп-01-Ламинар-С» -1,2», Россия;
- программируемый твердотельный термостат «Гном», производства «ДНК-Технология», Россия;
- персональная мини-центрифуга для пробирок;
- микроцентрифуга-вортекс;
- амплификатор программируемый четырехканальный для микропробирок вместимостью 0,5 см³ «Терцик», производства ООО «НПО ДНК-Технология», Россия;
- ДНК-амплификатор с нагревающейся крышкой термоблока;
- ПЦР-бокс с ультрафиолетовым рециркулятором АВп-01-Ламинар-С» 1,2»;
- отсасыватель вакуумный медицинский с колбой ловушкой;
- камера для горизонтального электрофореза;
- источник постоянного тока с напряжением 150-460 В «Эльф 4»;
- ультрафиолетовый трансиллюминатор с кабинетом для просмотра гелей;
- видеосистема с цифровой видеокамерой и программным обеспечением;
- микроволновая печь для плавления агарозы мощностью не менее 800 Вт, соответствующая требованиям ГОСТ ИЕС 60335-2-25;
- холодильник бытовой с температурными режимами 4°С;
- морозильник бытовой, с температурным режимом минус 23 °С;
- автоматический секвенатор MegaBACE, GE Healthcare Bio-Sciences, Sweden;
- весы электронные II класса точности.
- набор реагентов для экстракции РНК, "РИБО-сорб" (Россия);
- набор реагентов для ОТ-ПЦР, включающий: транскриптазу обратную рекомбинантную модифицированную из вируса лейкемии мышей «М-MLV» активностью 0,2 ед./см в буфере для хранения; ДНК-буфер; реагенты «RT-mix» и

«RT-G-mix-1», содержащие рабочий буферный раствор, дНТФ и гексануклеотидные праймеры со случайной последовательностью нуклеотидов;

- растворы прямых и обратных ПЦР-праймеров молярной концентрацией 10 ммоль/дм с чистотой специфического олигонуклеотида не менее 98%, позволяющих амплифицировать фрагмент гена М МПВ подтипа А и В;

- набор для проведения амплификации ScreenMix, производства ЗАО «Евроген», г. Москва;

- вода деионизованная, свободная от рибонуклеаз, дезоксирибонуклеаз, неорганических и органических примесей компания Синтол, Москва;

- трис-боратный буфер (ТБЕ) концентрированный с бромидом этидия (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии, Роспотребнадзора, Россия);

- агароза для электрофореза ДНК (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии, Роспотребнадзора, Россия).

5. Проведение анализа

5.1. Отбор материала для исследования

При отборе образцов материала, а также при подготовке проб для исследования необходимо соблюдать меры, предупреждающие обсеменение объектов внешней среды, руководствуясь при этом действующими правилами и инструкциями.

Материал от каждого животного отбирают отдельными инструментами.

Для исследования используют: патологический материал (трахеи, легкие), смывы хоан, инфраорбитальных синусов и трахеи от цыплят 15-20 – суточного возраста с признаками респираторных болезней. Образцы проб рекомендуется хранить при температуре 4...8°C не более 48 ч. Для более длительного хранения образцы следует заморозить и хранить при температуре минус 20°C и ниже. Допускается лишь однократное замораживание-оттаивание материала. После размораживания пробы тщательно перемешать.

5.2. Подготовка исследуемого материала

Из патологического материала готовят 10 % суспензию на стерильном физиологическом растворе или фосфатном буфере. Центрифугируют пробы при 10000-12000 об/мин на центрифуге MiniSpin, Eppendorf, Германия) в течение 2 мин.

5.3. Выделение РНК

5.3.1. Набор реагентов для экстракции РНК прогреть при температуре от 60 до 65 °С до полного растворения кристаллов.

5.3.2. Отобрать необходимое количество одноразовых пробирок (включая отрицательный и положительный контроли выделения). Внести в каждую пробирку по 450 мкл лизирующего раствора. Промаркировать пробирки.

5.3.3. В пробирки с лизирующим раствором внести по 100 мкл исследуемых проб, используя наконечники с аэрозольным барьером. В пробирку для отрицательного контроля (ОК) выделения внести 100 мкл 0,85% физиологического раствора.

5.3.4. Пробы перемешать на вортексе и центрифугировать в течение 5 сек при 5000 об/мин на микроцентрифуге для удаления капель со внутренней поверхности крышки пробирки.

5.3.5. Сорбент ресуспендировать на вортексе. В каждую пробирку отдельным наконечником добавить по 25 мкл ресуспендированного сорбента. Перемешать на вортексе, поставить в штатив на 1 мин, еще раз перемешать и оставить на 5 мин.

5.3.6. Для осаждения сорбента пробирки центрифугировать при 10000 об/мин в течение 30 сек на микроцентрифуге. Удалить надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы.

5.3.7. Добавить в пробирки по 400 мкл раствора для отмывки 1. Перемешать на вортексе до полного ресуспендирования сорбента, затем центрифугировать 30

сек при 10000 об/мин на микроцентрифуге. Удалить надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы.

5.3.8. Добавить в пробирки по 500 мкл раствора для отмывки 3. Ресуспендировать сорбент на вортексе и центрифугировать 30 сек при 10000 об/мин на микроцентрифуге. Удалить надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы.

5.3.9. Повторить отмывку раствором для отмывки 3, следуя п. 5.3.8.

5.3.10. Добавить в пробирки по 400 мкл раствора для отмывки 4. Ресуспендировать сорбент на вортексе и центрифугировать 30 сек при 10000 об/мин на микроцентрифуге. Полностью удалить надосадочную жидкость из каждой пробирки отдельным наконечником, используя вакуумный отсасыватель.

5.3.11. Поместить пробирки в термостат при температуре 60 °С на 12-15 мин для подсушивания сорбента. При этом крышки пробирок должны быть открыты.

5.3.12. В пробирки добавить по 50 мкл РНК-буфера, используя наконечник с аэрозольным барьером, свободный от РНКаз. Перемешать на вортексе. Поместить в термостат при температуре 60 °С на 2-3 мин. Перемешать на вортексе и центрифугировать пробирки на максимальных оборотах микроцентрифуги (12-13 тыс об/мин) в течение 1 мин. Надосадочная жидкость содержит очищенную РНК.

Пробы готовы к постановке реакции обратной транскрипции и ПЦР-амплификации. Реакцию обратной транскрипции следует проводить сразу после получения РНК пробы. Отбирать раствор РНК для реакции нужно очень осторожно, не захватывая сорбент. Если сорбент взмутился, необходимо осадить его на центрифуге.

Очищенная РНК может храниться до 4 ч при температуре от 2 до 8 °С. Для длительного хранения препарата, необходимо, не захватывая сорбент, перенести надосадочную жидкость в стерильную пробирку и хранить при температуре не выше минус 68 °С в течение года.

5.4. Проведение ОТ-ПЦР

Все реактивы набора Реверта-L для проведения обратной транскрипции сначала разморозить и встряхнуть с помощью микроцентрифуги-вортекс. Для проведения одного анализа реактивы смешать в пропорциях, указанных в таблице 1.

Таблица 1

Пропорциональные объемы реагентов для получения кДНК на матрице РНК

Реактивы	мкл
RT-G-mix-1	10
RT-mix	0,4
Ревертаза (MMlv)	0,5
РНК-пробы	10

Приготовить реакционную смесь по количеству исследуемых проб, в соответствии с табл. 1. Затем поставить пробирки в амплификатор (термостат) и инкубировать 30 мин при температуре 37 °С. Полученную в реакции обратной транскрипции кДНК для последующей постановки ПЦР развести в 2 раза ДНК-буфером (к 20 мкл кДНК отдельным наконечником с аэрозольным барьером добавить 20 мкл ДНК-буфера, аккуратно перемешивали пипетированием 10 раз). Готовый препарат кДНК можно хранить при температуре не выше минус 16 °С в течение 7 дней или при температуре не выше минус 68 °С в течение 1 года.

5.5. Постановка полимеразной цепной реакции (ПЦР)

В микропробирки объемом 0,6 см³ внести по 5 мкл ПЦР-смеси ScreenMix с Taq ДНК-полимеразой, смесь нуклеотидтрифосфатов с концентрацией 0,2 мМ каждого нуклеотида, 2 мМ Mg², красный и желтый красители, по 1 мкл прямого и обратного праймера и 9 мкл деионизованной воды. Затем в одну пробирку вносили 10 мкл отрицательного контрольного образца, в другую пробирку

положительного контрольного образца, в остальные по 10 мкл кДНК исследуемых образцов. На поверхность водной фазы наносят по капле минерального масла. Затем пробы переносят в амплификатор и проводят ПЦР при следующих режимах (табл.2):

Таблица 2

Протокол амплификации

Температура °С	Время, сек	Число циклов
95°С	300	1
95°С	10	40
55°С	20	
72°С	10	
72°С	60	1
10°С	хранение	

Анализ продуктов амплификации проводят методом электрофореза в агарозном геле, используя комплект реагентов для электрофоретической детекции продуктов амплификации в агарозном геле «ЭФ».

5.6. Проведение электрофореза

5.6.1. Приготовить рабочий электрофорезный буфер. В мерный цилиндр влить 25 мл трисборатного буфера (ТБЕ) концентрированного с бромидом этидия, довести дистиллированной водой до 500 мл, закрыть цилиндр парафильмом и перемешать.

5.6.2. Агарозу из одного флакона пересыпать в стеклянную колбу из термостойкого стекла на 250 мл. Налить 100 мл рабочего буфера, перемешать вращением колбы и плавить в микроволновой печи до полного растворения агарозы. Время плавления агарозы в микроволновой печи мощностью 800 Вт при ее загруженности 1 колбой – 1,5 мин. Если в микроволновую печь мощностью 800

Вт ставится 5 колб с агарозой, время плавления увеличивается до 5 мин. Вынуть колбу с расплавленной агарозой из микроволновой печи, аккуратно перемешать, вращая колбу. После этого вновь поместить колбу с агарозой в микроволновую печь на 1,5 мин (при мощности 800 Вт), довести агарозу до кипения. Вынуть колбу из микроволновой печи и остудить агарозу, вращая колбу, до температуры 65-70 °С.

5.6.3. Выровнять столик для заливки гелей, залить расплавленный гель в форму камеры для горизонтального электрофореза. Установить гребенки, не касаясь дна формы, на расстоянии не менее 3 см или 5 см друг от друга. Толщина геля должна быть около 0,6 см.

5.6.4. После полного застывания геля (30 мин при комнатной температуре), осторожно вынуть из него гребенки, не повредив лунки. Поместить подложку с готовым гелем в камеру для горизонтального электрофореза, лунки должны располагаться ближе к отрицательному электроду (ДНК будет двигаться к положительному). Залить в камеру для горизонтального электрофореза готового буфера столько, чтобы он покрывал гель на 5 мм сверху.

5.6.5. Из пробирок с исследуемыми образцами после завершения амплификации отбирают из-под масла по 10 мкл реакционной смеси, перемешивают наконечником для пипеточных дозаторов и вносят в лунки агарозного геля.

Электрофорез проводят при напряжении 10 В/см длины геля в течение 18-20 мин.

5.7. Учет результатов ПЦР

Результаты электрофореза учитывают на трансиллюминаторе в ультрафиолетовом свете при длине волны 254 нм. Амплифицированные фрагменты кДНК выявляют в виде светящихся оранжевых полос. Регистрацию полученных результатов проводят с помощью гельдокументирующей системы.

Положительными на МПВ подтипа А считают пробы, в которых имеются полосы в геле, располагающиеся на таком же уровне, что и полоса положительного контроля 501 п.н. Положительными на МПВ подтипа считают

пробы, в которых имеется полоса в геле, располагающаяся на уровне 291 п.н. Исследуемые пробы считаются отрицательными, если в них не выявлено указанных полос, или они не соответствуют приведенным величинам. В отрицательном контроле не должно выявляться специфических полос, соответствующих данным подтипам МПВ.

Таким образом с помощью разработанных нами праймеров можно проводить идентификацию возбудителя МПВИ птиц и провести серотипирование метапневмовируса подтипов А и В с использованием методов электрофоретической детекции, основанных на ПЦР.

Разработанная последовательность праймеров может быть использована для исследования проб биологического и клинического материала от естественно инфицированной птицы.



СПРАВКА

о внедрении результатов диссертационной работы в учебный процесс

Результаты научно-исследовательской работы аспиранта отдела диагностики «Всероссийского научно-исследовательского ветеринарного института птицеводства» - филиала ФНЦ «Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт птицеводства» РАН Абгарян Сусанны Рафиковны на тему: «Эпизоотологические особенности метапневмовирусной инфекции птиц у кур-несушек» по специальности 06.02.02 – ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология, микология с микотоксикологией и иммунология внедрены в учебный процесс.

Материалы научных исследований используются для проведения лабораторных и практических занятий с аспирантами очного обучения и для чтения лекций на курсах повышения квалификации ветеринарных специалистов, работающих в области промышленного птицеводства.

Зам. директора института по научной работе,
доктор сельскохозяйственных наук

Т.А. Егорова