

ГЛАВА 3.3.15.

РИНОТРАХЕИТ ИНДЕЕК

(заражение метапневмовирусом птиц)

РЕЗЮМЕ

Метапневмовирус птиц (aMPV) вызывает острое, высококонтагиозное, инфекционное заболевание верхних дыхательных путей у индеек и кур. Первоначально болезнь, вызванную aMPV, называли заражением метапневмовирусом птиц и ринотрахеитом птиц; также данное заболевание упоминали, как ринотрахеит индеек и синдром опухшей головы кур (СОГ).

aMPV представляет собой вирус, содержащий несегментированную, одноцепочечную РНК отрицательного смысла, и его относят к семейству Paramyxoviridae, роду метапневмовирусов. Болезнь может стать причиной серьезных экономических потерь в стадах кур и индеек, особенно, если ее течениеотягощено вторичными патогенами. Кроме индеек и кур известно, что перечисленные ниже виды птиц также могут поддерживать репликацию aMPV: фазаны, мускусные утки, пекинские утки и цесарки. Болезнь распространена по всему миру в регионах, где производят домашнюю птицу, исключая Океанию и Канаду, которые объявлены свободными от aMPV.

Всего установлено четыре разных антигенных подтипа aMPV: А, В, С и D. Они были идентифицированы с помощью нейтрализации моноклональными антителами, возможной ограниченной перекрестной реактивности в твердофазном иммуноферментном анализе (ИФА) и помощью анализа последовательности G-гликопротеина прикрепления.

У восприимчивых индеек заражение органов дыхательной системы может быть отмечено в любом возрасте, хотя у молодняка поражения проявляются в более тяжелой форме. Степень тяжести болезни и показатели смертности в значительной степени зависят от вторичных бактериальных инфекций, хотя и другие факторы, связанные с принципами ведения животноводства, могут осложнить течение болезни. Также очевидны различия в степени тяжести клинических признаков и показателей заболеваемости у птиц внутри стада или между стадами. Заражение aMPV может привести к серьезным проблемам в процессе производства яиц в племенных стадах индеек и уток. Клинические признаки заболевания включают: чихание, угнетение, появление щелкающих звуков, трахеальные хрипы, затрудненное дыхание, выделения из глаз и носовой полости, воспаление подглазничных синусов и конъюнктивит. Проявление клинических признаков и распространение инфекции в стаде может быть стремительным, а именно в течение 2-4 часов. У кур заражение aMPV выражено в меньшей степени и зачастую ассоциируется с симптомами поражения верхних дыхательных путей на фоне снижения яйценоскости у племенных кур и несушек. Для болезни также характерны отеки окологлазничных, подглазничных синусов и лицевой части, известные, как синдром опухшей головы (СОГ). По мере развития болезни можно часто наблюдать церебральную дезориентацию, искривление шеи, опистотонус. aMPV у бройлеров не рассматривают в качестве единственного или первичного патогена, а считают спутником других патогенов при проявлении СОГ или других многофакторных комплексов респираторных болезней.

Идентификация возбудителя: Выделение вируса в культурах клеток, в развивающихся куриных эмбрионах и трахеальных органных культурах, а также молекулярные методы идентификации нуклеиновой кислоты позволяют успешно выявлять aMPV. Степень успешности выявления вируса зависит от его штамма, от типа проб и своевременности их отбора, также от принципов работы с пробами и условий их хранения. Для идентификации вируса широко используется электронная микроскопия, реакция вируснейтрализации и молекулярные методики. Выявление и идентификация вируса могут быть затруднены, исключая случаи, когда пробы взяты на ранних этапах течения болезни. И аттенуированные, и вирулентные штаммы aMPV реплицируются до самых высоких титров в тканях верхних дыхательных путей у молодых индеек; вирус может быть выделен в течение приблизительно 10 дней.

Для дифференциации подтипов А и В в реакции вируснейтрализации были использованы моноклональные антитела к G-гликопротеину шиповидных отростков, а реакции нейтрализации с использованием поликлональной антисыворотки продемонстрировали, что подтипы А и В принадлежат одному общему серотипу. Подтип С слабо нейтрализуется моноспецифической антисывороткой против подтипов А и В и не нейтрализуется моноклональными антителами, которые дифференцируют подтипы А и В. Данные сведения указывают на то, что подтип С представляет второй серотип aMPV.

Моноспецифическая антисыворотка и моноклональные антитела могут быть использованы для идентификации возбудителя в реакции вируснейтрализации и при иммунофлуоресцентном окрашивании зараженных культур клеток; хотя необходимо учитывать антигенные характеристики. Также для подтверждения изолятов используется реакция иммунодиффузии.

Для выявления или геномного субтипирования aMPV используются молекулярные процедуры на основе генов aMPV: гибридного белка (F), G, матричного белка (M) и гена нуклеопротеина (NP). Белки, закодированные генами F и G, являются основными иммуногенами и фактически представляют нуклеотидную вариабельность. Анализ нуклеотидных последовательностей гена G используется для подтверждения результатов реакции вируснейтрализации, проведенной ранее для дифференциации подтипов А и В. Традиционная полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией тоже может быть использована для геномного субтипирования aMPV А и В. Кроме всего прочего, анализ нуклеотидной последовательности гена, кодирующего матричный белок (M), далее подтверждает деление на подтипы А и В. Анализ последовательностей M гена подтипа С aMPV демонстрирует, что изолят из США имеет четкие отличия от вирусов подтипов А и В. ОТ-ПЦР, нацеленный на F и M гены, является подтип-специфическим и полезным для выявления aMPV, когда известен подтип вируса. Впрочем, один набор праймеров ОТ-ПЦР, нацеленных на N ген, позволяет обнаружить подтипы А, В, С, D, и его возможно использовать в качестве набора универсальных праймеров для выявления aMPV.

Серологические тесты: Учитывая сложности при выделении и идентификации aMPV подтвердить заражение можно с помощью серологических методов, в частности в невакцинированных стадах. ИФА - наиболее часто используемый метод. К другим методам относятся реакция вируснейтрализации (РВН), реакция иммунофлуоресценции и иммунодиффузии. Реакцию вируснейтрализации можно проводить на первичных трахеальных органных культурах, на фибробластах эмбрионов кур (ФЭК) и в печени эмбрионов кур (ПЭК); также успешно применяется несколько клеточных линий (Vero,

MA104 или QT35). Несмотря на то, что РВН и ИФА демонстрируют одинаковую чувствительность, наиболее часто используемым методом является ИФА. Было разработано множество коммерческих наборов ИФА, равно как и внутрипроизводственных анализов. Среди коммерческих наборов были установлены отличия в показателях чувствительности и специфичности тестов. С учетом антигенных вариаций в качестве антигена следует использовать гомологичный штамм aMPV. Во многих странах, где болезнь эндемична, в том числе применяется вакцинация, что усложняет интерпретацию результатов. В идеале для тестирования необходимо брать образцы сыворотки от птиц в острой фазе заболевания и от выздоровевших птиц. У кур серологический ответ на заражение aMPV выражен слабо по сравнению с ответом, наблюдаемым у индеек.

Требования к вакцинам и диагностическим биологическим препаратам:

В настоящее время на рынке представлено два типа вакцин для борьбы с ринотрахеитом индеек (РТИ): живые аттенуированные вакцины, вакцины эмульсионные инактивированные на основе масляного адьюванта.

А. ВВЕДЕНИЕ

Метапневмовирус птиц aMPV, ранее известный как пневмовирус птиц (APV) и вирус ринотрахеита индеек (ART), вызывает высококонтагиозную инфекцию верхних дыхательных путей у индеек и кур. У индеек вирус вызывает болезнь, известную как ринотрахеит индеек (РТИ). Возбудитель представляет собой оболочечный вирус, содержащий несегментированную, одноцепочечную вирусную РНК отрицательного смысла длиной приблизительно 14 т.п.н., находящуюся в спиралевидном, симметричном нуклеокапсиде (Gough, 2003). Данный вирус обладает рядом характеристик пневмовируса, но отличается от пневмовирусов млекопитающих на молекулярном уровне, поэтому его классифицировали как типовой штамм нового рода *Metapneumovirus*, семейства *Paramyxoviridae* (Padersen et al, 2000). Метапневмовирусы обнаруживали и у людей, когда они вызывали заражение органов дыхания у детей (Naylor & Jones, 1993; Toquin et al., 2003; Van Den Hoogen et al., 2001). У метапневмовируса птиц нет структурных белков NS1 и NS2 и порядок генов (3'-N-P-M-F-M2-SH-G-L-5') отличается от такового у пневмовирусов млекопитающих (3'-NS1-NS2-N-P-M-SH-G-F-M2-L-5') (Tanaka et al., 1995). Метапневмовирус птиц был классифицирован на 4 подтипа: А, В, С и D на основе анализа нуклеотидных последовательностей. Используя моноклональные антитела, между подтипами наблюдали ограниченную перекрестную реактивность в твердофазном иммуоферментном анализе (ИФА) и в реакции вируснейтрализации (Collins et al., 1993; Cook et al., 1993a). Могут существовать и другие подтипы, но пока их еще не выявили и не идентифицировали.

Заражение aMPV может проявиться у довольно молодых индеек. Следующие симптомы являются признаками заражения: щелкающие звуки, хрипы, чихание, выделения из носа, конъюнктивит с пенистыми выделениями, опухание подглазничных синусов и появление подчелюстного отека (Pringle, 1998). Возбудители вторичных инфекций могут в значительной степени усилить проявление клинических признаков. При неосложненном течение инфекции выздоровление наступает довольно быстро, и птицы полностью поправляются приблизительно за 14 дней. Если же за птицами ухаживают ненадлежащим образом или появляются вторичные бактериальные инфекции, аэросаккулит, перикадрит, пневмония и перигепатит, то течение болезни продлевается, сопровождаясь возможным увеличением показателей заболеваемости и смертности (Cook et al., 1991; Mekkes & De Wit, 1999). К возбудителям вторичных инфекций, которые отягощают и продлевают клиническое течение болезни, относят: *Bordetella avium*, пастерелла-подобные организмы,

Mycoplasma gallisepticum, *Chlamydophila* и *Ornithobacterium rhinotracheale* (Alkhalaf et al., 2002; Cook et al., 1991; Jirjis et al., 2004; Senne et al., 1997; Van Loock et al., 2006). Показатель заболеваемости может достигать 100%, смертность находится в диапазоне от 0,5% у взрослых индеек до 80% среди молодняка (Buys et al., 1989; Gough, 2003; Van De Zande et al., 1999). Клинические признаки заражения у кур проявляются в меньшей степени, чем у индеек. У цыплят-бройлеров может проявиться тяжелый респираторный дистресс, особенно в случае отягощения течения болезни вторичными патогенами (вирус инфекционного бронхита, микоплазмы и *E.coli*) (O'Brien, 1985; Pattison et al., 1989). В отличие от подтипов А и В, штамм США-Колорадо (или подтип С) не вызывает естественное заражение у кур, хотя экспериментально зараженные куры оказались восприимчивыми к подтипу С изолята индеек aMPV (Shin et al., 2000). Различные штаммы aMPV обладают специфическим тропизмом для кур и индеек (Cook et al., 1993b). Есть сообщения о заражении aMPV среди других видов птиц, однако у них редко наблюдали проявления клинических симптомов (Gough et al., 1988). Вирусы, отнесенные к подтипу С aMPV, и продемонстрировавшие 75-83% нуклеотидной идентичности с подтипом С aMPV США-Колорадо, были ассоциированы с респираторными симптомами и стали причиной снижения показателей яйценоскости у уток во Франции (Тоquin et al., 1999; 2006). Ретроспективный молекулярный анализ вирусов, выделенных в 1980-х от индеек во Франции, показал наличие четвертого подтипа aMPV, названного подтипом D (Bäyon-Auboyer et al., 2000). Результаты экспериментальных исследований показывают, что для передачи вируса от птицы к птице необходим прямой контакт (Alkhalaf et al., 2002; Cook et al., 1991). В условиях промышленных предприятий также вероятно аэрогенное заражение на фоне передачи вируса по воздуху, поскольку болезнь ограничивается поражением дыхательных путей. После экспериментального заражения индеек в возрасте 2 недель одним только aMPV, вирус обнаруживали в органах дыхания в течение лишь нескольких дней (Bäyon-Auboyer et al., 1999). Однако у птиц, которым aMPV ввели вместе с *B.avium*, вирус обнаруживали в течение 7 дней после введения (dpi) (Collins & Gough, 1988; Cook et al., 1993b; Naylor & Jones, 1993). Неизвестно, может ли aMPV быть причиной латентной инфекции или статуса носительства болезни.

Хотя время от времени сообщается о случаях заражения новорожденных индеек (Shin et al., 2002a), сообщений о вертикальной передаче aMPV не было.

У молодняка репликация вируса ограничивается верхними дыхательными путями и коротким периодом виремии. Репликация аттенуированных и вирулентных штаммов aMPV сохраняется приблизительно на 10 дней после введения (Cook et al., 1991; Van De Zande et al., 1999). Ограниченную репликацию наблюдают в трахее, легких, но после естественного заражения вирус не реплицируется в других тканях (Cook, 2000a; 2000b). Последующие гистопатологические и иммуногистохимические исследования продемонстрировали вирусную репликацию в носовых раковинах, следствием чего является тяжелый ринит с повышенной активностью желез, эксфолиация эпителиальных слоев, очаговое выпадение ресничек эпителия, гиперемия, умеренная мононуклеарная инфильтрация подслизистого слоя и наличие эозинофильных интрацитоплазматических включений в реснитчатых клетках носовых раковин на 2 день после введения. На 3-4 день после введения наблюдали катаральный ринит со слизисто-гнойным экссудатом, поражения эпителиального слоя и обильную мононуклеарную воспалительную инфильтрацию подслизистой оболочки. В трахее наблюдали временные поражения, в других тканях и конъюнктиве поражений отмечали немного, либо они отсутствовали совсем (Giraud et al., 1988; Majo et al., 1995). У индеек-несушек респираторная инфекция протекает не так тяжело, однако яйценоскость может снизиться до 70% (Stuart, 1989), а качество яиц в период выздоровления (до трех недель) может заметно снизиться. У

несушек-индеек, зараженных экспериментально, репликация вируса наблюдается в половых и дыхательных путях вплоть до 9 дня после введения (Jones et al., 1988).

Получено достаточно сведений относительно того, что aMPV является одной из причин возникновения синдрома опухшей головы (СОГ). Этот синдром характеризуется возникновением респираторной болезни, вялостью, отеком подглазничных синусов и односторонним или двусторонним периорбитальным отеком и отеком лицевой части, которые стремятся покрыть всю голову. Данные признаки часто сопровождаются церебральной дезориентацией, искривлением шеи, опистотонусом. Хотя процент смертности обычно не превышает 1-2 %, заболеваемость может достичь 10%, болезнь часто отрицательно сказывается на яйценоскости (Gough et al., 1994; Morley & Thomson, 1984; O'Brien, 1985; Pattison et al., 1989; Picault et al., 1987; Tanaka et al., 1995).

Имеющиеся серологические данные свидетельствуют о том, что aMPV широко распространён по всему миру и имеет важное экономическое значение, особенно в отрасли производства индеек. Океания и Канада - единственные страны, которые не сообщали о случаях aMPV (Cook, 2000a; 2000b; Gough, 2003). Имеются серологические и молекулярные сведения о том, что aMPV регистрируется у некоторых других видов птиц, включая фазанов, цесарок, страусов, воробьиных и различных водных птиц (Bennett et al., 2004; Gough, 2003; Lee et al., 2007; Shin et al., 2002b), но подтверждённых свидетельств, указывающих на наличие болезни, нет.

В. ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ МЕТОДИКИ

1. Идентификация возбудителя

Чтобы максимально увеличить шансы на успешное выделение вируса, рекомендуется применять многосторонний подход к диагностике. Особенно это касается ситуаций, когда ведется работа с различными подтипами или генотипами, которая может потребовать различных методов выделения вируса *in-vitro*. Первые неудачные попытки выделить aMPV подтипа С в США наглядно подтверждают целесообразность такого подхода. Подтип С США не был связан с цилиостазом в трахеальных органных культурах (Cook et al., 1999; Senne et al., 1997), и возбудителя смогли культивировать только после многочисленных пассажей на эмбрионах и культуре клеток. Этот опыт противоречил уже имевшимся в Европе и в других частях мира наработкам, где трахеальные органные культуры и/или Vero клетки зарекомендовали себя в качестве самого надежного метода для первичного выделения подтипов А, В, С и D aMPV (Cook & Cavanagh, 2002; Giraud et al., 1988; Toquin et al., 1999; 2000).

1.1. Сбор диагностических образцов и подбор подходящих

При попытках выделения вируса очень важно брать образцы на ранней стадии заражения, поскольку вирус присутствует в синусах и носовых раковинах лишь ограниченное время. В идеале пробы следует брать, используя для этих целей стерильные тампоны, из верхних дыхательных путей птиц, переживающих острую фазу болезни (Gough, 2003; Stuart, 1989). Наиболее удачные в этом смысле пробы: назальный экссудат, мазки из клоакальной щели, соскобы из синусов и образцы ткани из носовых раковин. Вирус выделяют, в том числе, из трахеи и легких, иногда из внутренних органов пораженных болезнью молодых индеек (Buys et al., 1989; Cook et al., 1999). Удачно выделить вирус от птиц с тяжелыми хроническими признаками получается редко, поскольку крайняя степень проявления клинических признаков часто связана с наличием возбудителей вторичных инфекций. Это в полной мере относится к СОГ у кур, когда типичные признаки проявляются из-за

вторичной инфекции *E.coli*. Более того, по пока невыясненным причинам, выделение вируса от кур представляет больше трудностей, чем выделение вируса от индеек.

Важно незамедлительно отправить пробы в диагностическую лабораторию, обеспечив их сохранность на льду. Если ожидается задержка в транспортировке более 3 дней, то пробы следует заморозить до отгрузки. Мазки для выделения вируса следует отправлять, расположив их на льду и полностью погрузив в вирусную транспортную среду, хотя пробы для проведения полимеразной цепной реакции можно отправлять в сухом виде, но тоже на льду или в замороженном виде.

Для выделения вируса готовится 20% (o/o) суспензия назального экссудата или гомогенизированной ткани в фосфатно-буферном растворе (ФБР) или бульоне с сердечно-мозговым экстрактом (ВН), содержащем антибиотики, рН 7.0-7.4. Затем проводят очистку центрифугированием при 1000 g в течение 10 минут, и супернатант пропускают через мембранный фильтр с размером пор 450 нм.

1.2. Культивирование и идентификация метапневмовируса птиц (aMPV)

Лучше всего для первичного выделения вируса от зараженных птиц воспользоваться трахеальными органами культурами или яйцами кур и индеек с развивающимися эмбрионами с последующим культивированием в клеточных культурах (Buys et al., 1989; Cook et al., 1999); чувствительным методом выделения aMPV оказался серийный пассаж на Vero клетках (Giraud et al., 1988). Самое первое выделение aMPV в конце 70х годов в Южной Африке и более актуальное выделение aMPV в Колорадо были проведены на яйцах с развивающимися эмбрионами, однако, выделение подтипов А и В aMPV сейчас часто проводят на трахеальных органах культурах (Cook & Cavanagh, 2002). Подтип С aMPV и, возможно, другие еще не идентифицированные подтипы APV не вызывают цилиостаз в органах культурах; по этой причине предпочтительным способом выделения вируса является использование куриных яиц с развивающимися эмбрионами и последующий пассаж на культуре клеток (Gough, 2003; Senne et al., 1997). Все четыре подгруппы aMPV можно выделить на Vero клетках (Тоquin et al., 1999; 2000).

Трахеальные органы культуры готовят из эмбрионов индеек или очень молодых птенцов индеек, взятых из стад, свободных от антител к aMPV. Можно, в том числе, использовать трахеи куриных эмбрионов или 1-2-дневных цыплят. Поперечные срезы трахеи промывают в ФБР (рН 7.2), затем помещают в пробирки (из расчета один срез на одну пробирку) в среду Игла с антибиотиками, выдерживают при 37°C.

После инкубации с культур снимают среды, и добавляют 0,1 мл инокулята, сводного от бактерий. После инкубации в течение часа при 37°C добавляют ростовую среду и культуры инкубируют при 37°C на аппарате роллерного типа, вращающимся со скоростью 30 оборотов в час. После активного перемешивания в лабораторном миксере с целью удаления дебриса из просвета культуры ежедневно проверяют. Цилиостаз может проявиться в течение 7 дней после инокуляции на первичном пассаже, но обычно он проявляется быстро и последовательно лишь после нескольких слепых пассажей (Gough, 2003).

В куриные яйца или яйца индеек с развивающимися эмбрионами в возрасте 6-8 дней, взятые из стад, свободных от антител к aMPV, через желточный мешок вводят 0,2-0,3 мл материала, свободного от бактерий, полученного от зараженных птиц и инкубируют при 37°C.

Если после первого пассажа признаков заражения нет (остановка развития эмбрионов или смерть), то материал желточного мешка следует переработать для второго слепого пассажа на эмбрионах. Обычно в течение 7-10 дней появляются признаки остановки роста эмбрионов и отмечают несколько случаев смерти. До того, как возбудитель вызовет системную гибель эмбрионов, часто требуется проведение серийного пассажа. Выделение на яйцах с развивающимися эмбрионами – процесс медленный, дорогой и трудоемкий. Он требует многочисленных последующих пассажей на культуре клеток для идентификации (Gough, 2003).

С разной степенью успешности для первичного выделения aMPV используют различные клеточные культуры, включая клетки куриных эмбрионов, Vero клетки и с недавнего времени QT-35 клетки. Первичное выделение подтипа С США провели после многочисленных (5-6 серийных пассажей) на культуре клеток Vero (Bennett et al., 2004). Хотя как только вирус адаптируется к росту в яйцах с развивающимися эмбрионами или в трахеальных органных культурах, где он растет лишь до низких показателей титров, он начинает легко реплицироваться до умеренных показателей титров после многочисленных пассажей в различных первичных клетках эмбрионов кур и индеек, Vero клетках, и QT-35 клетках (Buys et al., 1989; Cook, 2000a; 2000b; Gouzm et al., 2000).

Первичное выделение всех четырех подгрупп aMPV оказалось успешным после серийного пассажа на Vero клетках (Тоquin et al., 2000). Вирус вызывает типичное цитопатическое действие (ЦПД) с синтициальным образованием в течение 7 дней. Идентифицировать культуры клеток, пораженные вирусом, можно с помощью иммунофлюоресцентного окрашивания зараженных клеток или с помощью молекулярных методов.

С помощью электронной микроскопии (негативный контраст) можно наблюдать морфологические признаки вируса, схожие с парамиксовирусами. Обычно наблюдают реснитчатые частицы плеоморфной формы, в общих чертах напоминающие сферу диаметром 80-200 нм. Иногда присутствуют более крупные нитеобразные формы, достигающие в длину до 1000 нм. Поверхностные отростки могут быть до 13-14 нм в длину, и наблюдаемый спиралевидный нуклеокапсид, появляющийся из разрушенных частиц, достигает в диаметре 14 нм с расчётным шагом спирали 7 нм на поворот (Collins & Gough, 1988; Giraud et al., 1988).

1.3. Молекулярная идентификация

Учитывая прихотливость aMPV к питательной среде, метод полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) оказывается значительно более чувствительным и быстрым способом выявления aMPV, чем стандартные методы выделения вируса (Cook & Cavanagh, 2002; Gough, 2003). Для выявления aMPV используются процедуры ОТ-ПЦР, нацеленные на гены F, M, N и G; однако по причине молекулярной гетерогенности штаммов aMPV процедуры ОТ-ПЦР в основном являются подтип-специфическими и не обнаруживают все подтипы (Bäyon-Auboyer et al., 1999; Cook & Cavanagh, 2002; Padersen et al., 2000; 2001). Подтип-специфические анализы успешно применяют для выявления и диагностики эндемичных штаммов (Bäyon-Auboyer et al., 2000; Cook & Cavanagh, 2002; Mase et al., 2003; Naylor et al., 1997; Padersen et al., 2001). Однако необходимо признать ряд ограничений, связанных с использованием подтип-специфических анализов для диагностики респираторной формы болезни. Праймеры, нацеленные на консервативные участки гена N, продемонстрировали более широкую специфичность, выявляя репрезентативные изоляты подтипов А, В, С и D (Bäyon-Auboyer et al., 1999). Также успешно для идентификации генотипа или подтипа применяли ОТ-ПЦР, нацеленный на G ген (Bäyon-Auboyer et al., 2000; Juhasz & Easton,

1994; Lwamba et al., 2005; Mase et al., 1996). Было разработано и апробировано множество методик ОТ-ПЦР, о чем представлены подробные сведения в дополнительных источниках (Cook & Cavanagh, 2002; Njenga et al., 2003).

Предпочитаемыми пробами для проведения тестирования являются назальные экссудаты, мазки из клоакальной щели, пробы из носовых раковин, взятые на 2-7 день после воздействия вируса (Cook et al., 1993b; Gough, 2003; Padersen et al., 2001; Stuart, 1989). Очень важно брать пробы при первом появлении клинических признаков, поскольку недавние исследования показали, что максимальное количество вируса присутствует в трахее и носовых раковинах на 3 день после инокуляции, а РНК вируса сохраняется в трахее в течение 9 дней и в носовых раковинах до 14 дней (Velayudhan et al., 2005). Есть свидетельства того, что аМРV можно выявить в пробах, собранных на 7-10 дни после воздействия вируса, однако концентрация вируса в этом случае будет значительно меньше, снижая тем самым успешность выделения возбудителя (Alkhalaf et al., 2002; Padersen et al., 2001). Мазки от одного стада можно объединить по пулам от групп (не более пяти особей в каждой), чтобы получилось переработать пробы от большего количества птиц, увеличив при этом потенциальную степень выявления.

Матричную РНК для ОТ-ПЦР можно выделить из гомогенизированной ткани, пулов сухих мазков и влажных мазков с помощью кварцевой колонки или коммерческих реагентов для выделения РНК на магнитных частицах в соответствии с протоколами производителя. Пробы супернатантов от трахеальных мазков и жидкости из синусов (140 мкл/600 мкл лизирующего буфера) также можно переработать с помощью процедуры RNeasy® (Qiagen, Валенсия, СА).

Таблица 1. Примеры праймеров, которые можно использовать для выявления N гена подгрупп А, В, С и D аМРV (Bayon-Auboyer et al., 1999; Toquin et al., 1999)

Мишень	Идентификация праймера	Последовательность 5'-3'	Позиция	Размер продукта
N ген	Nc	5'-TTC-TTT-GAA-TTG-TTT-GAG-AAG-A-3'	632-653	ОТ праймер
	Nx	5'-CAT-GGC-CCA-ACA-TTA-TGT-T-3'	830-812	115
	Nd	5'-AGC-AGG-ATG-GAG-AGC-CTC-TTT-G-3'	716-737	115

1.3.1. Пример протокола

- i) Синтез кДНК можно провести в 20 мкл объеме с ОТ праймером Nc (или любым подходящим праймером, таким как олиго(dT) или обратным праймером праймерной пары, который используется в ПЦР) и ферментом РНКазы Н из набора обратной транскриптазы SuperScript II® (Invitrogen, Карлсбад, Калифорния). Нагреть 1 мкл ОТ-праймера (2 пмол), 1 мкл смеси dNTP (10 mM каждый) с экстрагированной РНК и стерильной дистиллированной водой (QS до 20 мкл) до 65°C в течение 5 минут.
- ii) Быстро охладить и провести импульсное центрифугирование.
- iii) Добавить 4 мкл 5 х буфера для синтеза первой цепи, 2 мкл 0,1 М DTT и 1 мкл РНКазы ОУТ® (Invitrogen, Карлсбад, Калифорния).
- iv) Нагреть содержимое до 42°C в течение 2 минут и добавить 1 мкл (200 единиц) SuperScript II®, слегка смешать.
- v) ОТ проводят при 42°C в течение 50 минут, затем при 70°C в течение 15 минут для инактивации ОТ-фермента.

- vi) Амплификацию в ПЦР можно проводить с полимеразой AmliTaq Gold® (Applied Biosystems, Фостер Сити, Калифорния) в соответствии с инструкциями производителя. Условия амплификации: 94°C в течение 15 минут и 30 циклов по 94°C в течение 20 секунд; 51,0°C в течение 45 секунд (для праймерной пары Nd\Nx, если используется еще одна пара, то необходимо отрегулировать температуру отжига); 72°C в течение 45 секунд с итоговым увеличением до 72°C в течение 10 минут.

Некоторые анализы ОТ-ПЦР, нацеленные на гены F, G и M гены, были успешно использованы для идентификации и выявления подтипа или диагностики эндемичного aMPV (Goym et al., 2000; Jirjis et al., 2004; Majo et al., 1995). Нуклеотидное секвенирование и филогенетический анализ гена G применяли для генотипирования подтипов A, B C и D aMPV, и эта процедура рекомендована для идентификации подтипа неидентифицированного вируса. Рекомендованные процедуры ОТ-ПЦР для анализа последовательности гена G описаны у Väyon-Auboyer et al., 2000; Juhasz & Easton, 1994; Lwamba et al., 2005; Toquin et al., 2006. Недавно появилась информация о том, что ОТ-ПЦР в реальном времени обладает способностью специфического выявления, идентификации и количественного определения подгрупп A, B, C и D aMPV (Guionie et al., 2007.).

Процедуры идентификации РНК подтипов A и B в диагностических образцах описаны у Naylor et al., 1997, а процедуры выявления вирусов подтипов A и C описаны у Padersen et al., 2001. Выделение вируса от кур представляет определённые сложности, и проходит успешно лишь в ограниченном количестве случаев; по этой причине для выявления aMPV у кур, прежде всего, пользовались молекулярными тестами (Cook & Cavanagh, 2002; Mase et al., 1996). Важно помнить, что ОТ-ПЦР обнаруживает вирусную РНК, а не живой вирус, поэтому еще предстоит установить значимость положительного ПЦР результата с точки зрения выявления активной инфекции.

2. Серологические тесты

По причине сложностей при выделении и идентификации aMPV чаще всего для диагностики заражения aMPV применяются серологические методы, в частности в невакцинированных стадах. Наиболее часто применяемым методом является ИФА, однако, наряду с ней также применяются реакция вируснейтрализации, реакция микроиммунофлуоресценции и иммунодиффузии. Существуют коммерческие и внутрипроизводственные наборы ИФА, подходящие для тестирования сывороток от кур и индеек; однако, коммерческие наборы отличаются чувствительностью и специфичностью (Eterradossi et al., 1995; McFarlane-Toms & Jackson, 1998; Mekkes & De Wit, 1999).

Были разработаны наборы конкурентного или блокирующего ИФА, включающие aMPV-специфические моноклональные антитела. Заявлено, что данные наборы обладают более широким спектром чувствительности и специфичности для всех подтипов aMPV и могут быть использованы для тестирования сывороток от многих видов птиц. Внутрипроизводственные наборы ИФА для выявления антигенов, как описано ниже, изготовлены в различных субстратах, включая разные культуры клеток и трахеальные органные культуры (Chiang et al., 2000; Cook & Cavanagh, 2002). Обычно антитела к aMPV обнаруживаются хуже, когда в качестве антигена используется гетерологичный штамм aMPV, даже если штаммы оказываются близкородственными по итогам реакции вируснейтрализации (Cook & Cavanagh, 2002; Eterradossi et al., 1995). Ситуация осложняется несостыковками между разными наборами ИФА с точки зрения их способности выявлять вакцинные антитела, когда в качестве покрывающих антигенов

используются различные штаммы aMPV (Etteradossi et al., 1995). Широко применяются внутрипроизводственные тесты с гомологичным антигеном для надзора за эндемичными штаммами aMPV.

В идеале для тестирования необходимы образцы сыворотки, взятые как в острый период проявления болезни, так и в период выздоровления. У кур серологическая реакция на заражение aMPV проявляется слабо по сравнению с реакцией у индеек (Cook et al., 1991).

2.1. Твердофазный иммуноферментный анализ

Можно воспользоваться приведённым ниже протоколом (Chiang et al., 2000), или альтернативными методами с документально подтверждёнными результатами (Giraud et al., 1987; Grant et al., 1987).

Размножить вирус в фибробластах эмбрионов кур (ФЭК) или культуре клеток Vero, пока не станет очевидным одновременное заражения 70-100% монослоя (3-4 день). Слить культуральную жидкость, а монослой промыть в ФБР (pH 7.2.). Монослой подвергнуть лизису в 0,5 мл (на 75 см² колбу) 0,5% раствора неионного детергента (IGEPAL CA-630 или Nonidet P-40) на качающейся платформе в течение 1 часа при 4°C. После физического разрушения лизированных клеток цельный лизат вирусного антигена очистить при 3000 g в течение 15 минут. Незараженные клеточные культуры обработать тем же способом, что и антиген отрицательного контроля. Серийные разведения антигена проверить в сравнении с серийными разведениями антивидового иммуноглобулина G конъюгированного с пероксидазой хрена, используя метод «шахматного анализа», для определения оптимального разведения антиген\конъюгат. Рабочее разведение антигена aMPV и обычный антиген (100 мкл) сенсibilизировать на титрационных микропланшетах с плоским дном с карбонатно-бикарбонатным сенсibilизирующим буфером (Chiang et al., 2000). Каждую сыворотку тестировать в сравнении с aMPV и обычным антигеном для определения соотношения S/P. Сенсibilизированные планшеты инкубировать при 4°C в течение ночи и промыть в общей сложности 5 раз в промывочном растворе Твин 20 (Chiang et al., 2000) до использования или трижды перед долгосрочным хранением при -70°C. Остаточный промывочный раствор оставляют на планшетах, когда планшеты замораживают. После хранения и выравнивания температуры планшета до комнатной температуры планшеты промыть два раза, и промокнуть досуха перед использованием.

2.1.1. Метод тестирования

- i) Развести тест сыворотки 1\40 в буфере для разведения\блокирующем буфере (Chiang et al., 2000).
- ii) Нанести 50 мкл тест-сывороток и рабочих разведений положительных и отрицательных сывороток на антиген aMPV и обычные лунки, покрытые антигеном.
- iii) Инкубировать при комнатной температуре в течение 1 часа.
- iv) Промыть планшеты пять раз в промывочном растворе Твин 20.
- v) Нанести 50 мкл рабочего разведения антивидового IgG, конъюгированного с пероксидазой хрена, на каждую лунку и инкубировать в течение 1 часа при комнатной температуре.
- vi) Промыть планшеты пять раз в промывочном растворе Твин 20.
- vii) Нанести 100 мкл подготовленного раствора субстрата ортофенилендиамина (ОФД) на каждую лунку и инкубировать в темноте в течение 10 минут. Соединить следующие реагенты для подготовки

субстрата ОФД: 243 мл 0.1 М лимонной кислоты, 257 мл 0,2 М двузамещённого фосфорнокислого натрия, установить рН на уровне 5.0 и QS до 1 литра с помощью дистиллированной воды.

- viii) Остановить реакцию 25 мкл\лунку 2.5 М серной кислоты.
- ix) Считать показатель оптической плотности при 490\450 нм.

Результаты выражаются, как разница показателей оптической плотности между лунками, покрытыми антигенами вируса, и лунками отрицательного контроля. Далее определяют средний показатель считывания ОП 490 для каждого двойного комплекта лунок с положительным и отрицательным антигеном для каждой сыворотки. Антигены обычно калиброваны таким образом, что проба с разницей показателя ОП490 более 0,2 между антиген-покрытыми лунками и антиген-покрытыми лункам отрицательного контроля считается положительной (метод разработан в лаборатории, указанная пороговая величина может быть пересмотрена в конкретных местных условиях путем оценки панели отрицательных сывороток со свежеприготовленными антигенами). Неотъемлемой частью ИФА являются спорадические, неспецифические положительные реакции, особенно с сыворотками от уток и кур, и в качестве подтверждающего теста может быть использована реакция иммунофлюоресценции.

С. ТРЕБОВАНИЯ К ВАКЦИНАМ И ДИАГНОСТИЧЕСКИМ БИОЛОГИЧЕСКИМ ПРЕПАРАТАМ

В настоящее время для борьбы с ринотрахеитом индеек в продаже имеется два вида вакцин: живые аттенуированные вакцины или вакцины эмульсионные инактивированные на основе масляного адьюванта (Cook, 2000a). Вакцины предназначены только для индеек. В настоящее время существует возможность разработать живые рекомбинантные вакцины на основе переносчика оспы кур, экспрессирующего F белок аMPV (Stuart, 1989), ДНК вакцины, кодирующие различные белки аMPV (Tanaka et al., 1995), и, с недавнего времени, генетически аттенуированный аMPV, произведённый методами обратной генетики (Тоquin et al., 1999).

Руководства по производству ветеринарных вакцин приведены в Главе 1.1.8 *Принципы производства ветеринарных вакцин*. Руководства, приведённые здесь и в Главе 1.1.8., по сути, являются общими и могут быть дополнены национальными и региональными требованиями.

1. Живые вакцины: методы использования

Живые вакцины против ринотрахеита индеек производят из штаммов вируса, аттенуированных в ходе серийного пассажа на яйцах с развивающимися эмбрионами, в трахеальных органных культурах и культурах клеток (различные клеточные линии или фибробласты эмбрионов кур), либо в ходе чередующихся пассажей, сочетающих эти методы. Имеющиеся в настоящее время в продаже живые аттенуированные вакцины против РТИ были получены из изолятов аMPV подгрупп А и В в Европе и из изолята аMPV подгруппы С в США. На этикетке вакцины должно быть указание на ту подгруппу, к которой относится данная вакцина, поскольку эта информация имеет непосредственное отношение к эффективности поствакцинального серологического мониторинга. Живые вакцины против РТИ предназначены для молодых птиц, чтобы вызывать у них активный иммунный ответ, который позволит не допустить заражения респираторной формой болезни, вызванной аMPV. Кроме того, живые вакцины против РТИ используют в родительских стадах индеек для выработки первичного ответа еще до вакцинации,

проводимой к моменту кладки яиц с использованием инактивированной вакцины (см. ниже).

Живые вакцины против РТИ обычно применяют несколько раз, используя метод крупнокапельного распыления, введение через питьевую воду или через глазные носовые ходы. Имеются сообщения о применении однократной инъекции *in-ovo* (Shin et al., 2002b), но наиболее часто первую вакцинацию против РТИ проводят на суточных птенцах индеек или в возрасте до 7 дней. Второй раз живую вакцину против РТИ вводят или примерно в возрасте 6 недель (когда проводят только две вакцинации), или примерно в возрасте 3 недель (когда есть третья вакцинация), либо после 6-недельного возраста. Обоснованием для таких повторных вакцинаций является тот факт, что, во-первых, существуют сложности с установлением длительного иммунного ответа, который длился бы всю жизнь у индеек мясного направления. Во-вторых, необходимо избегать вакцинации молодняка от РТИ, если его недавно вакцинировали от геморрагического энтерита (вакцины против вируса геморрагического энтерита (ВГЭ) обычно вводят приблизительно в возрасте 28 дней, чтобы не допустить интерференции с материнскими антителами к ВГЭ).

Хотя есть сведения о том, что материнские антитела к вирусу РТИ не защищают суточных птенцов индеек от заражения вирулентными штаммами *aMPV* (Тоquin et al., 2003), есть наблюдения, показывающие, что может появиться определённая интерференция между материнскими антителами и некоторыми живыми вакцинами против РТИ.

В результате этой интерференции птенцы индеек с повышенным уровнем материнских антител демонстрировали пониженное усвоение вакцины. Есть сведения о клинической перекрёстной защите между живой вакциной и вирусом контрольного заражения, относящимся к подгруппам А и В (и наоборот) (Cook et al., 1993b; Velayudhan et al., 2005; Worthington et al., 2003). Защитный иммунитет наблюдали в том числе у птиц, иммунизированных против подгрупп А и В *aMPV*, которых далее подвергли контрольному заражению вирулентным вирусом *aMPV* подгруппы С, но не в обратном эксперименте (Worthington et al., 2003).

Метапневмовирусы птиц легко нейтрализуются в условиях внешней среды под воздействием физических и химических факторов, поэтому надлежащая вакцинация живыми вирусами может оказаться довольно трудоемкой.

Если вакцину вводят через питьевую воду, то необходимо использовать чистую воду с нейтральным рН, вода должна быть без запаха и привкуса хлора или металлов. Можно добавить обезжиренное сухое молоко из расчёта 2 г на литр. Необходимо проследить, чтобы все птицы получили свою дозу вакцины. В связи с введением вакцины через питьевую воду, предварительно следует удалить всю имеющуюся воду в системе поения и перекрыть ее на 2-3 часа до подачи воды с лекарственным средством. Следует проследить, чтобы после процедуры вакцинации в трубах подачи питьевой воды или поилках не осталось воды, обогащенной лекарственным средством. Если вакцинацию проводят распылением, то необходимо использовать высококачественную воду с нейтральным рН, не содержащую остатков дезинфектантов. Для проведения вакцинации в виде распыления следует пользоваться специальным небулайзером, который предназначен исключительно для данных целей.

Данный аппарат должен поддерживать идеальное постоянное давление на протяжении всего процесса вакцинации (т.е. тем самым гарантировать подачу вакцинных капель постоянного размера). Индейки, подлежащие вакцинации, должны перед вакцинацией быть собраны по группам, после чего небулайзер производит несколько рассеиваний

препарата, гарантирующих попадание вакцины на всех птиц. Системы отопления и вентиляции в птичнике должны быть переведены в минимальный рабочий режим, чтобы распыленная вакцина не попала в вентиляционные ходы и не была инактивирована перегревом (отопление, кроме всего прочего, стимулирует испарение, что уменьшает размеры распыляемых вакцинных частиц и увеличивает необходимый объем вакцины для попадания в органы дыхания; существует подозрение, что именно это явление и является причиной патологической реакции на живую вакцинацию). Важно, чтобы сразу после распыления птицам дали успокоиться, поскольку существенные количества вакцины могут быть поглощены в процессе чистки перьев после процедуры распыления.

Вакцины против аMPV не конфликтуют с вакцинами против болезни Ньюкасла у кур (Van De Zande et al., 1999; Yu et al., 1992); однако, пока документально не подтверждена сочетаемость вакцин против РТИ у индеек. Что касается других вакцин, то вакцинировать следует только здоровых птиц. Флаконы с лиофилизированными вакцинами следует хранить до применения при температуре между 2-8°C.

2. Инактивированные вакцины: метод использования

Инактивированные вакцины против аMPV используются в основном для обеспечения высоких уровней антител, продолжительного и постоянного иммунитета у племенных индеек, которые предварительно были примированы живой вакциной или подверглись естественному воздействию полевого вируса во время выращивания. Обоснованием для использования инактивированных вакцин для племенных птиц является намерение усилить их защиту не только от респираторных симптомов РТИ, но также предотвратить появление репродуктивных проблем (снижение яйценоскости), связанных с заражением аMPV. Нередки случаи, когда инактивированные вакцины против аMPV также связывают данный вирус с некоторыми другими вирусами, в том числе вызывающими респираторные и/или репродуктивные проблемы. Обычная программа применения предполагает введение инактивированной вакцины минимум через 4-6 недель после последней вакцинации живой вакциной индеек в возрасте до 28 недель, избегая 4 последние недели до начала кладки яиц. Инактивированную вакцину производят в виде эмульсии «вода в масле» и ее следует вводить каждой птице через инъекции. Предпочтительно производить инъекцию внутримышечно в мышцы лапы, подальше от суставов, сухожилий или крупных кровеносных сосудов, либо подкожно. Можно воспользоваться шприцом на несколько доз, при условии, что устройство находится в рабочем состоянии, при этом соблюдены инструкции производителя и рекомендованные гигиенические практики. Все оборудование необходимо очищать и стерилизовать между стадами, а группы специалистов по вакцинации должны соблюдать строгие гигиенические стандарты, при переходе от одного стада к другому. Вакцину нельзя замораживать; ее следует хранить при температуре между 4°C и 8°C (но до инъекции ей необходимо дать настояться до комнатной температуры). Инактивированные вакцины не должны подвергаться воздействию света или высоких температур.

Вакцинировать можно только здоровых птиц, которые сенсibilизированы в результате предыдущего воздействия аMPV. Используемые таким образом инактивированные вакцины должны вызвать хороший иммунный ответ, который обеспечит защиту племенных птиц от респираторных и репродуктивных симптомов во время периода кладки (Van De Zande et al., 2000). Точный уровень и продолжительность иммунитета, вызываемого инактивированными вакцинами, в основном зависят от концентрации антигена в дозе. Задача производства заключается в том, чтобы получить высокую концентрацию антигена, а следовательно, и сильнодействующую вакцину.

3. Работа с посевным материалом

3.1. Характеристики посевного материала

3.1.1. Живая вакцина

Посевной вирус должен быть свободен от посторонних вирусов, бактерий, микоплазм и грибов, в особенности от возбудителей болезней птиц.

Посевной вирус должен быть стабильным, не проявлять способности к восстановлению вирулентности. Данная способность подтверждается в ходе минимум пяти последовательных пассажей от индейки к индейке с интервалом 2-6 дней. Для этих целей используют индеек не старше 3 недель, свободных от материнских антител к aMPV. Пассаж можно проводить путем естественного распространения или путем введения суспензии, приготовленной из слизистой носовых ходов и верхней части трахеи ранее привитых птиц, или из трахеальных смывов. Необходимо позаботиться о том, чтобы не допустить контаминации вирусами от предыдущих пассажей и показать, что вирус был передан. Стабильность следует оценивать, демонстрируя отсутствие особо тяжелых клинических симптомов при сравнении вируса, прошедшего максимальное количество пассажей, с вакциной не прошедшей пассажи. Для количественной оценки степени тяжести клинических признаков можно воспользоваться бальной системой.

3.1.2. Убитая вакцина

Самыми важными характеристиками убитых вакцин являются высокая репродуктивность и хорошие антигенные свойства. Необходимо показать, что посевной вирус свободен от посторонних вирусов, бактерий, микоплазм и грибов, в особенности от возбудителей болезней птиц.

3.2. Метод культивирования

Посевной материал метапневмовируса птиц может быть размножен в различных системах клеточных культур. Общий объем распределяют по аликвотам и лиофилизируют в герметичных контейнерах.

3.3. Валидация вакцины

Сведения об эффективности должны быть получены до начала массового производства вакцины. Вакцину необходимо вводить птицам тем же способом, который предполагается использовать для введения препарата в полевых условиях. Живые вакцины можно давать молодым птицам и измерять ответ серологическими методами, оценивая также показатели резистентности при экспериментальном контрольном заражении. В случае с убитыми вакцинами тестирование необходимо проводить, придерживаясь рекомендованного графика вакцинации, на более взрослых птицах, которые уже способны к откладыванию яиц, чтобы можно было продемонстрировать продолжительную сероконверсию. Для количественной оценки степени тяжести клинических признаков можно воспользоваться бальной системой.

3.3.1. Живая вакцина

Тест на эффективность: эффективность проверяют для каждого рекомендованного способа вакцинации. Используют индеек не старше минимального рекомендованного возраста для вакцинации, свободных от антител к аMPV. Каждой из 20 индеек следует ввести одну полевую дозу вакцины с минимальным рекомендованным титром, используя один из рекомендованных способов вакцинации, оставив при этом в качестве контрольной группы 10 невакцинированных индеек. Через 21 день провести контрольное заражение всех индеек, путем введения подходящей дозы вирулентного штамма аMPV через глазоносную полость. Вирусы, подходящие для контрольного заражения, могут быть предоставлены справочной лабораторией МЭБ по РТИ; см. таблицу в части 4 этого *Руководства по наземным животным*. Далее за индейками ежедневно наблюдают, отмечая у каждой птицы наличие клинических признаков. Считается, что вакцина не прошла тестирование, в случае если не выполнено условие, когда минимум 90% вакцинированных индеек выживает без клинических симптомов или поражений, типичных для аMPV. Можно воспользоваться бальной системой для количественной оценки степени тяжести симптомов. Если менее 80% невакцинированных индеек проявляет клинические симптомы после контрольного заражения, или более 10% контрольных или привитых птиц умирает от причин, не связанных с тестированием, то тест считается недостоверным. При получении удовлетворительных результатов, тестирование необходимо провести только на одной партии из всех тех партий, которые приготовлены из той же партии посевного материала.

3.3.2. Убитая вакцина

Тест на эффективность: поскольку в экспериментальных условиях воспроизвести ситуацию снижения яйценоскости не так и просто, весьма сложно доказать способность вакцины вызывать защиту от снижений яйценоскости после контрольного заражения вирулентным аMPV, поэтому вполне допустимо принять протоколы, цель которых продемонстрировать снижение уровней экскреции. В качестве альтернативы можно воспользоваться индуцированием продолжительного иммунного ответа после инъекции инактивированной вакциной. Для проведения второго эксперимента минимум 20 непримированным индейкам рекомендованного возраста (перед моментом откладывания яиц) дают одну дозу вакцины, используя один из рекомендованных способов, уровень антител измеряют между 4 и 6 неделями после вакцинации с помощью ИФА или реакции нейтрализации сыворотки. Если рекомендуется первичная вакцинация живой вакциной, то в дополнительной группе индеек проводят только первичную вакцинацию, чтобы оценить исключительно действие инактивированной вакцины.

4. Метод производства

Производство вакцины должно быть организовано в специальном и безопасном производственном блоке, который надлежащим образом отгорожен от диагностических помещений или коммерческой птицы.

Производство вакцины следует организовать по принципам системы посевных серий с использованием подходящего штамма известного происхождения и учетом истории пассажей. При размножении и тестировании вакцины для всех используемых в процедуре материалов должны быть использованы СПФ яйца. Живые вакцины производят путем выращивания в яйцах или клеточных культурах. Инактивированные вакцины можно производить с использованием вирулентного вируса, выращенного в клеточной культуре

или в яйцах с развивающимися эмбрионами. Необходима высокая концентрация вируса. Эти вакцины производят в виде эмульсии «вода в масле». Обычный состав предполагает соотношение 80% минерального масла и 20% вирусной суспензии с подходящими эмульгаторами и консервантами.

5. Внутрипроизводственный контроль

Доля антигена: вырастив вирус до высоких показателей концентрации, необходимо оценить показатель его титра, используя трахеальную органную культуру или клеточные культуры, в зависимости от ситуации, в отношении используемого штамма вируса. Доля антигена, необходимая для производства достаточных партий вакцины, рассчитывается исходя из данных, полученных по тестовой вакцине, которая продемонстрировала эффективность в лабораторных и полевых испытаниях.

Инактивация убитых вакцин: обычно проводится либо с использованием β -пропиолактона или формалина. Инактивирующий агент и процедура инактивации должны быть продемонстрированы в условиях производства вакцины, чтобы инактивировать вакцинный вирус и любые потенциальные контаминанты, например, бактерии, источником которых могут стать исходные материалы.

Перед инактивацией необходимо получить гомогенную суспензию, свободную от частиц, в которые не может проникнуть инактивирующий агент. Тест на инактивацию вакцины необходимо проводить на каждой партии как нефасованного вакцинного материала после инактивации, так на готовом продукте. Выбранный тест должен подходить используемому вакцинному вирусу и должен состоять минимум из двух пассажей на чувствительных культурах клеток, эмбрионах или индейках, десять повторностей на пассаж. Не должно быть никаких признаков наличия живого вируса или микроорганизмов.

Стерильность убитых вакцин: масло, используемое для производства вакцины должно быть стерилизовано нагреванием до 160°C в течение 1 часа, или фильтрацией. Необходимо подтвердить, что процедура была достаточно эффективна. Тесты, подходящие для масляных эмульсионных вакцин, проводят на каждой партии готового продукта в соответствии с описаниями, которые к примеру, приведены в Европейской Фармакопее.

6. Контроль партии

6.1. Стерильность

Описание тестов биологических материалов на стерильность и свободу от контаминации можно найти в Главе 1.1.9.

6.2. Безопасность

6.2.1. Тест на безопасность живой вакцины

Десять полевых доз вакцины вводят в глазоносные ходы каждой из 10 индеек, достигших минимального рекомендованного возраста вакцинации, и свободных от антител к аMPV. Далее за птицами наблюдают в течение минимум 21 дня. Считается, что вакцина не прошла тест, если хотя бы одна птица погибает или демонстрирует симптомы болезни, с которой призвана бороться тестируемая вакцина. Если клинические признаки проявляются у двух и более индеек, или погибает две и более птицы по причинам, не

связанным с применением вакцины, то тест не обходимо повторить. Такое тестирование проводится на каждой партии итогового вакцинного продукта.

6.2.2. Тест на безопасность убитой вакцины

Десяти индейкам в возрасте 14-28 дней, свободным от материнских антител к аMPV, вводят двойную полевую дозу рекомендованным способом. За птицами наблюдают 3 недели. Необычные местные или системные реакции должны отсутствовать. Тестирование проводят на каждой партии готовой вакцины.

6.3. Иммуногенность

6.3.1. Тест на иммуногенность живой вакцины

Каждую серию (партию) произведенной вакцины следует подвергать тесту на иммуногенность (титрование вируса) на яйцах с развивающимися эмбрионами, трахеальных органных культурах или подходящих клеточных культурах, в зависимости от вакцинного вируса. Вакцинный титр на момент выхода продукта должен быть достаточно высоким, чтобы гарантировать, что на дозу сохраняется минимальный титр вируса как минимум до конца истечения срока годности. Кроме того, в отношении одной репрезентативной партии из всех партии, подготовленных из одной посевной серии, необходимо воспользоваться методом, описанным в Разделе С.3.3.1 *Живые вакцины* (тест на эффективность).

6.3.2. Тест на иммуногенность убитой вакцины

Тест на иммуногенность инактивированных вакцин разрабатывается на основе результатов теста на эффективность на репрезентативной партии вакцины из исходного вакцинного вируса путем измерения уровня образовавшихся антител.

6.4. Стабильность

Необходимо предоставить сведения по как минимум одной репрезентативной партии вакцины, подтверждающие, что вакцина проходит тест на иммуногенность и через 3 месяца после заявленного срока годности.

6.5. Консерванты

Консерванты обычно требуются для вакцин, расфасованных по многодозовым контейнерам. Необходимо проверять концентрацию и сохранность консерванта в готовой вакцине на протяжении всего срока годности. Для указанных целей следует воспользоваться уже утвержденным подходящим консервантом. Существуют требования к максимальным уровням антибиотиков, консервантов и остатков инактивирующих агентов.

6.6. Меры предосторожности (опасности)

Хотя метапневмовирус птиц и не считается возбудителем зоонозных болезней, все равно следует соблюдать меры предосторожности на всех этапах производства или во время вакцинации, чтобы свести к минимуму воздействие вирусных аэрозолей на человека.

Вакцины в виде масляных эмульсий вызывают серьезные повреждения при случайной инъекции в руку или другие ткани (случаи возможны при работе специалистов, проводящих вакцинацию). В такой ситуации следует незамедлительно обратиться к врачу, показав упаковку препарата и сведения производителя о препарате. Каждый флакон и вся упаковка вакцины должны быть четко маркированы знаками, предупреждающими о серьезных последствиях случайного самоповреждения.

7. Тесты на готовом продукте

7.1. Безопасность

См. Раздел С.6.2.

7.2. Иммуногенность

См. раздел С.6.3.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- ALKHALAF A.N., WARD L.A., DEARTH R.N. & SAIF Y.M. (2002). Pathogenicity, transmissibility and tissue distribution of avian pneumovirus in turkey poults. *Avian Dis.*, 46, 650–659.
- BÄYON-AUBOYER M.H., ARNAULD C., TOQUIN D. & ETERRADOSSI N. (2000). Nucleotide sequences of the F, L and G protein genes of two non-A/non-B avian pneumoviruses (APV) reveal a novel APV subgroup. *J. Gen. Virol.*, 81, 2723–2733.
- BÄYON-AUBOYER M.H. JESTIN V., TOQUIN D., CHERBONNEL M. & ETERRADOSSI N. (1999). Comparison of F-, G- and Nbased RT-PCR protocols with conventional virological procedures for the detection and typing of turkey rhinotracheitis virus. *Arch. Virol.*, 144, 1091–1109.
- Bennett R.S., Nezworski J., Velayudhan B.T., Nagaraja K.V., Zeman D.H., Dyer N. Graham T., Lauer D.C., Njenga M.K. & Halvorson D.A. (2004). Evidence of avian pneumovirus spread beyond Minnesota among wild and domestic birds in central North America. *Avian Dis.*, 48, 902–908.
- BUYS S.B., DU PREEZ J.H. & ELS H.J. (1989). The isolation and attenuation of a virus causing rhinotracheitis in turkeys in South Africa. *Onderstepoort J. Vet. Res.*, 56, 87–98.
- CHIANG S., DAR A.M., GOYAL S.M., SHEIKH M.A., PEDERSEN J.C., PANIGRAHY B., SENNE D., HALVORSON D.A., NAGARAJA K.V. & KAPUR V. (2000). A modified enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of avian pneumovirus antibodies. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 12, 381–384.
- COLLINS M.S. & GOUGH R.E. (1988). Characterization of a virus associated with turkey rhinotracheitis. *J. Gen. Virol.*, 69, 909–916.
- COLLINS M.S., GOUGH R.E. & ALEXANDER D.J. (1993). Antigenic differentiation of avian pneumovirus isolates using polyclonal antibody and mouse monoclonal antibodies. *Avian Pathol.*, 22, 469–479.
- COOK J.K.A. (2000a). Avian rhinotracheitis. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.*, 19, 602–613.
- COOK J.K.A. (2000b). Avian pneumovirus infections of turkey and chickens. *Vet. J.* 160, 118–125.
- COOK J.K.A. & CAVANAGH D. (2002). Detection and differentiation of avian pneumoviruses (metapneumoviruses). *Avian Pathol.*, 31, 117–132.
- COOK J.K.A., ELLIS M.M. & HUGGINS M.B. (1991). The pathogenesis of turkey rhinotracheitis virus in turkey poults inoculated with the virus alone or together with two strains of bacteria. *Avian Pathol.*, 20, 155–166.
- COOK J.K.A., HUGGINS M.B., ORVELL S.J. & SENNE D.A. (1999). Preliminary antigenic characterization of an avian pneumovirus isolated from commercial turkeys in Colorado, USA. *Avian Pathol.*, 28, 607–617.

- COOK J.K.A., JONES B. V., ELLIS M. M., LI J. & CAVANAGH D. (1993a). Antigenic differentiation of strains of turkey rhinotracheitis virus using monoclonal antibodies. *Avian Pathol.*, 22, 257–273.
- COOK J.K.A., KINLOCH S., & ELLIS M.M. (1993b). In vitro and in vivo studies in chickens and turkeys on strains of turkey rhinotracheitis virus isolated from the two species. *Avian Pathol.*, 22, 157–170.
- ETERRADOSSI N., TOQUIN D., GUITTET M. & BENNEJEAN G. (1995). Evaluation of different turkey rhinotracheitis viruses used as antigens for serological testing following live vaccination and challenge. *J. Vet Med. [B]*, 42, 175– 186.
- GIRAUD P., GUITTET M., TOQUIN D. & BENEJEAN G. (1988). La rhinotrachéite infectieuse de la dinde: description et rôle d'un nouvel agent viral. *Rec. Med. Vet.*, 164, 1, 39–44.
- GIRAUD P., TOQUIN D., PICAULT J.P., GUITTET M. & BENEJEAN G. (1987). Utilisation de la méthode ELISA pour le sérodiagnostic de l'infection par le virus de la rhinotrachéite infectieuse chez la dinde la poule et la pintade. *Bull. Lab. Vet.*, 27–28, 71–75.
- GOUGH R.E. (2003). Avian pneumoviruses. In: *Diseases of Poultry*, eleventh edition, Saif Y.M., Barnes H.J., Glisson J.R., Fadly A.M., McDougald L.R. & Swayne D., eds. Blackwell Publishing, 92–99.
- GOUGH R.E., COLLINS M.S., COX W.J. & CHETTLE N.J. (1988). Experimental infection of turkeys, chickens, ducks, guinea fowl, pheasants and pigeons with turkey rhinotracheitis virus. *Vet. Rec.*, 123, 58–59.
- GOUGH R.E., MANVELL R.J., DRURY S.E.N. & PEARSON D.B. (1994). Isolation of an avian pneumovirus from broiler chickens. *Vet. Rec.*, 134, 353–354.
- GOYAL S.M., CHIANG S.J., DAR A.M., NAGARAJA K.V., SHAW D.P., HALVORSON D.A. & KAPUR V. (2000). Isolation of avian pneumovirus from an outbreak of respiratory illness in Minnesota turkeys. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 12, 166– 168.
- GRANT M., BAXTER-JONES C. & WILDING G.P. (1987). An enzyme-linked immunosorbent assay for the serodiagnosis of turkey rhinotracheitis infection. *Vet. Rec.*, 120, 279–280.
- GUIONIE O., TOQUIN D., ZWINGELSTEIN F., ALLEE C., SELLAL E., LEMIERE S. & ETERRADOSSI N. (2007). A laboratory evaluation of a quantitative real-time RT-PCR for the detection and identification of the four subgroups of avian metapneumoviruses. *J. Virol. Methods*, 139, 150–158.
- JIRJIS F.F., NOLL S.L., HALVORSON D.A., NAGARAJA K.V., MARTIN F. & SHAW D.P. (2004). Effects of bacterial coinfection on the pathogenesis of avian pneumovirus infection in turkeys. *Avian Dis.*, 48, 34–49.
- JONES R.C., WILLIAMS R.A., BAXTER-JONES C., SAVAGE C.E. & WILDING P. (1988). Experimental infection of laying turkeys with rhinotracheitis virus: distribution of virus in the tissues and serological response. *Avian Pathol.*, 17, 841–850.

- JUHASZ K. & EASTON A. J. (1994). Extensive sequence variation in the attachment (G) protein gene of avian pneumovirus: evidence for two distinct subgroups. *J. Gen. Virol.*, 75, 2873–2880.
- LEE E.H., SONG M.S., SHIN J.Y., LEE Y.M., KIM C.J., LEE Y.S., KIM H. & CHOI Y.K. (2007). Genetic characterization of avian metapneumovirus subtype C from pheasants in a live bird market. *Virus Res.*, 128 (1–2), 18–25.
- LWAMBA H.C.M., ALVAREZ R., WISE M.G., YU Q. HALVORSON D., NJENGA M.K. & SEAL B.S. (2005). Comparison of fulllength genome sequence of avian metapneumovirus subtype C with other paramyxoviruses. *Virus Res.*, 107, 83– 92.
- MAJO N., ALLAN G.M., O’LOAN C.J., PAGES A. & RAMIS A.J. (1995). A sequential histopathologic and immunocytochemical study of chickens, turkey poult and broiler breeders experimentally infected with turkey rhinotracheitis virus. *Avian Dis.*, 39, 887–896.
- MASE M.S., ASAHI S., IMARI K. NAKAMURA K & YAMAGUCHI S. (1996). Detection of turkey rhinotracheitis virus from chickens with swollen head syndrome by reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR). *J. Vet. Med. Sci.*, 58, 359–361.
- MASE M., YAMAGUCHI S., TSUKAMOTO K., IMADA T., IMAI K. & NAKAMURA K. (2003). Presence of avian pneumovirus subtypes A and B in Japan. *Avian Dis.*, 47, 481–484.
- MCFARLANE-TOMS I.P. & JACKSON R.J.H. (1998). A comparison of three commercially available ELISAs for detecting antibodies to turkey rhinotracheitis virus (TRTV). Proceedings of the International Symposium on Infectious Bronchitis and Pneumovirus infections in Poultry, Rauschholzhausen, Germany, 15–18 June, 26–37.
- MEKKES D.R. & DE WIT J.J. (1999). Comparison of three commercial ELISA kits for the detection of turkey rhinotracheitis virus antibodies. *Avian Pathol.*, 27, 301–305.
- MORLEY A.J. & THOMSON D.K. (1984). Swollen-head syndrome in broiler chickens. *Avian Dis.*, 28, 238–243.
- NAYLOR C.J. & JONES R.C. (1993). Turkey rhinotracheitis: a review. *Vet. Bull.*, 63, 439–449.
- NAYLOR C., SHAW K., BRITTON P. & CAVANAGH D. (1997). Appearance of type B avian pneumovirus in Great Britain. *Avian Path.*, 26, 327–338.
- NJENGA M.K., LWAMBA H.M. & SEAL B.S. (2003). Metapneumoviruses in birds and humans. *Virus Res.*, 91, 163– 169.
- O’BRIEN J.D.P. (1985). Swollen head syndrome in broiler breeders. *Vet. Rec.*, 117, 619–620.
- PATTISON M., CHETTLE N., RANDALL C.J. & WYETH P.J. (1989). Observations on swollen head syndrome in broiler and broiler breeder chickens. *Vet. Rec.*, 125, 229–231.
- PEDERSEN J.C., REYNOLDS D.L. & ALI A. (2000). The sensitivity and specificity of a reverse transcriptase-polymerase chain reaction assay for the avian pneumovirus (Colorado strain). *Avian Dis.*, 44, 681–685.

PEDERSEN J.C., SENNE D.A., PANIGRAHY B. & REYNOLDS D.L. (2001). Detection of avian pneumovirus in tissue and swab specimens from infected turkeys. *Avian Dis.*, 45, 581–592.

PICAULT J.P., GIRAUD P., DROUIN P., GUITTET M., BENNEJEAN G., LAMANDE J., TOQUIN D. & GUEGUEN C. (1987). Isolation of a TRTV-like virus from chickens with swollen-head syndrome. *Vet. Rec.*, 121, 135.

PRINGLE C.R. (1998). Virus Taxonomy-San Diego. *Arch. Virol.*, 143, 1449–1459.

SENNE D.A., EDSON R.K., PEDERSEN J.C. & PANIGRAHY B. (1997). Avian pneumovirus update. In: Proceedings of the American Veterinary Medical Association, 134th Annual Congress, Reno, Nevada, July 1997, p.190.

SHIN H.J., JIRJIS F.F., KUMAR M.C., NJENGA M.K., SHAW D.P., NOLL S.L., NAGARAJA K.V. & HALVORSON D.A. (2002a). Neonatal avian pneumovirus infection in commercial turkeys. *Avian Dis.*, 46, 239–244.

SHIN H.J., MCCOMB B., BACK A., SHAW D.P., HALVORSON D.A. & NAGARAJA K. (2000). Susceptibility of broiler chicks to infection by avian pneumovirus of turkey origin. *Avian Dis.*, 44, 797–802.

SHIN H.J., NAGARAJA K.V., MCCOMB B., HALVORSON D.A., JIRJIS F.F., SHAW D.P., SEAL B.S. & NJENGA M.K. (2002b). Isolation of avian pneumovirus from mallard ducks that is genetically similar to viruses isolated from neighbouring commercial turkeys. *Virus Res.*, 83, 207–212.

STUART J.C. (1989). Rhinotracheitis: turkey rhinotracheitis (TRT) in Great Britain. *Recent Advances in Turkey Science. Poultry Science Symposium*, 21, 217–224.

TANAKA M., TAKUMA H., KOKUMAI N., OISHI E., OBI T., HIRAMATSU K. & SHIMIZU Y. (1995). Turkey rhinotracheitis virus isolated from broiler chicken with swollen head syndrome in Japan. *J. Vet. Med. Sci.*, 57, 939–945.

TOQUIN D., BAYON-AUBOYER M.H., ETERRADOSSI N., MORIN H. & JESTIN V. (1999). Isolation of a pneumovirus from a Muscovy duck. *Vet. Rec.*, 145, 680.

TOQUIN D., BÄYON-AUBOYER M.H., SENNE D. & ETERRADOSSI N. (2000). Lack of antigenic relationship between early French and recent North-American non-A non-B turkey rhinotracheitis viruses. *Avian Dis.*, 44, 977–982.

TOQUIN D., DE BOISSESON C., BEVEN V., SENNE D.A. & ETERRADOSSI N. (2003). 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. *J. Gen. Virol.*, 84, 2169–2178.

TOQUIN D., GUIONIE O., JESTIN V., ZWINGELSTEIN F., ALLEE C. & ETERRADOSSI N. (2006) European and American subgroup C isolates of avian metapneumovirus belong to different genetic lineages. *Virus Genes*, 32, 97–103.

VAN DEN HOOGEN B.G., DE JONG J.C., GROEN J., KUIKEN T., DE GROOT R., FOUCHIER R.A.M. & OSTERHAUS A.D.M.E. (2001) A newly discovered human

pneumovirus isolated from young children with respiratory tract disease. *Nature Med.*, 7, 719–724.

VAN DE ZANDE S., NAUWYNCK H., DE JONGHE S. & PENSAERT M. (1999). Comparative pathogenesis of a subtype A with a subtype B avian pneumovirus in turkeys. *Avian Pathol.*, 28, 239–244.

VAN DE ZANDE S., NAUWYNCK H., NAYLOR C. & PENSAERT M. (2000). Duration of cross-protection between subtypes A and B avian pneumovirus in turkeys. *Vet. Rec.*, 147, 132–134.

VAN LOOCK M, LOOTS K, ZANDE SV, HEERDEN MV, NAUWYNCK H, GODDEERIS BM, VANROMPAY D. (2006) Pathogenic interactions between *Chlamydophila psittaci* and avian pneumovirus infections in turkeys. *Vet. Microbiol.*, 10, 53–63.

VELAYUDHAN B.T., MCCOMB B., BENNETT R.S., LOPES V.C., SHAW D., HALVORSON D.A., NAGARAJA K.V. (2005). Emergence of a virulent type C avian metapneumovirus in turkeys in Minnesota. *Avian Dis.*, 49, 520–526.

WORTHINGTON K.J., SARGENT B.A., DAVELAAR F.G. & JONES R.C. (2003). Immunity to avian pneumovirus infection in turkeys following in ovo vaccination with an attenuated vaccine. *Vaccine*, 21, 1355–1362.

YU Q., DAVIS P.J., LI J. & CAVANAGH D. (1992). Cloning and sequencing of the matrix protein (M) gene of turkey rhinotracheitis virus reveals a gene order different from that of respiratory syncytial virus. *Virology*, 186, 426–434.

* * *

NB: Есть референтная лаборатория МЭБ по РТИ (Для получения самой последней версии списка референтных лабораторий см. Таблицу в части 4 этого Руководства по наземным животным или на сайте МЭБ <http://www.oie.int/en/our-scientific-expertise/reference-laboratories/list-of-laboratories/>). Для получения дальнейшей информации по диагностическим тестам, реагентам и вакцинам против РИТ, обращайтесь в референтные лаборатории МЭБ.