

УДК 619:616.98:578.831:636.52/58:57.082.26

## ВЫДЕЛЕНИЕ ПОЛЕВЫХ ИЗОЛЯТОВ МЕТАПНЕВМОВИРУСА ПТИЦ В ТРАХЕАЛЬНОЙ ОРГАННОЙ КУЛЬТУРЕ

Никонова З.Б., Лазарева С.П., Мудрак Н.С., Дрыгин В.В.

ФГУ «Федеральный центр охраны здоровья животных» (ФГУ «ВНИИЗЖ»), г. Владимир

Метапневмовирусная инфекция птиц (МПВИ) – респираторное заболевание преимущественно индеек и кур, характеризующееся чиханием, трахеальными хрипами, назальными выделениями, конъюнктивитами, опуханием инфраорбитальных синусов [1]. Возбудителем заболевания является метапневмовирус (МПВ) птиц семейства *Paramyxoviridae*. Выделяют 4 подтипа вируса: А, В, С и D. Метапневмовирусы птиц подтипов А и В распространены повсеместно [1, 5]. Вирусы подтипа С выявляли преимущественно у индеек в США. О выделении в 1985 г. МПВ птиц подтипа D сообщили исследователи из Франции [6], однако впоследствии случаев выявления вирусов данного подтипа в мире не регистрировали.

Для выделения МПВ птиц подтипов А и В большинство исследователей используют трахеальную органную культуру (ТОК), приготовленную из трахей развивающихся эмбрионов кур или индеек. Клетки мерцательного эпителия трахеи являются естественной системой для репродукции МПВ птиц, что позволяет сократить время выделения вируса и предотвратить изменение его свойств. МПВ птиц подтипов А и В оказывают цитостатическое действие на мерцательный эпителий трахеи птиц, в отличие от МПВ птиц подтипа С [7]. Для выделения МПВ птиц подтипа С используют РЭК, первичную культуру клеток фибробластов эмбрионов кур (ФЭК) и перевиваемую культуру клеток почки зеленой мартышки Vero [4].

В период с 2005 г. по 2010 г. в ФГУ «ВНИИЗЖ» геном МПВ птиц подтипов А и В выявлен методом ОТ-ПЦР в 161 пробе от кур и индеек из 64 птицефабрик, расположенных в РФ, Украине и Беларуси. Показано преобладание МПВ птиц подтипа В (96 % случаев выявления вируса). В результате анализа нуклеотидных последовательностей фрагментов генов G и N были выявлены нуклеотидные замены, отличающие выявленные МПВ птиц от штаммов вируса, используемых в составе живых вакцинных препаратов Nemovac («Merial», Франция), Aviffa-RT1 («Merial», Франция) и Nobilis RTV 8544 («Intervet International B.V.», Нидерланды). МПВ птиц других подтипов не выявляли.

В условиях достаточно широкого распространения МПВИ в птицеводческих хозяйствах РФ актуальным направлением исследований является выделение полевых изолятов МПВ птиц с целью дальнейшего изучения их биологических свойств. Полученные данные могут способствовать определению роли МПВ в развитии респираторного заболевания у птиц, необходимости вакцинации против данного заболевания, совершенствованию средств его специфической профилактики за счет поиска новых вакцинных штаммов, обладающих высокой иммуногенностью.

**Материалы и методы.** *Вирусосодержащий материал.* В работе использовали суспензии фрагментов внутренних органов птиц (трахеи, тканей носовых раковин, легких), в которых методом ОТ-ПЦР был выявлен геном МПВ птиц.

*Культуры клеток и органов.* ТОК. Выделение вируса проводили с использованием ТОК, приготовленной из трахей развивающихся эмбрионов кур на 19-21 сутки инкубации или 1-суточных цыплят категории SPF (specific pathogen free). В асептических условиях извлекали трахею эмбриона или цыпленка от верхней гортани до области бифуркации (нижней гортани) вместе с комплексом прилежащих тканей и помещали в раствор Хенкса с добавлением антибиотиков. С помощью пинцета и бритвенного лезвия очищали трахеи от соединительной и жировой ткани, промывали в растворе Хенкса и нарезали на тонкие (0,5-1 мм) кольца. Из одной трахеи получали в среднем 10-15 колец необходимой толщины. Полученные эксплантаты трахеи культивировали в 24-луночных культуральных планшетах в CO<sub>2</sub>-инкубаторе во влажной среде при температуре 37 °С. Для дальнейшего использования отбирали только эксплантаты с хорошей двигательной активностью эпителия на всей внутренней поверхности среза трахеи. Экспериментальный материал вносили в объеме 50-100 мкл на один эксплантат трахеи и инокулировали в течение 1,0-1,5 ч. Затем инокулят удаляли и вносили в каждую лунку планшета питательную среду в объеме 0,5-1,0 мл.

На 3-5 сутки после инфицирования ТОК, когда накопление МПВ птиц достигало максимальных значений [2], отбирали эксплантаты трахеи вместе с культуральной жидкостью для хранения и дальнейшего пассирования. Часть эксплантатов трахеи каждого пассажа оставляли до 14 суток инкубации для наблюдения цитостаза (остановки движения мерцательного эпителия трахеи). В качестве контроля культуры использовали неинфицированные эксплантаты трахеи.

*Культура клеток ФЭК.* Первично-трипсинизированную культуру клеток из кожно-мышечной ткани РЭК категории SPF на 10-12 сутки инкубации готовили по общепринятой методике.

*Питательные среды.* В качестве ростовой среды для культуры клеток ФЭК использовали смесь сред Лейбовица L-15 и Маккоя (Sigma-Aldrich, США) в соотношении 2:1 с добавлением 10 % фетальной сыворотки КРС. В качестве поддерживающей среды для ТОК и культуры клеток ФЭК использовали питательную среду DMEM/F-12 (Sigma-Aldrich, США) без добавления фетальной сыворотки КРС.

**Результаты и обсуждение.** Одной из сложностей при выделении полевых изолятов МПВ птиц является короткий период персистенции вируса в органах респираторного тракта птиц – в среднем 7 суток [2, 5]. Для выделения МПВ птиц необходимо отбирать материал не позднее 6-7 суток после инфицирования или 3-х суток после появления у птиц клинических признаков респираторного заболевания. Выявление РНК вируса с помощью ПЦР возможно и в более поздние сроки, однако при этом вирус уже не обладает инфекционными свойствами [3].

Другой сложностью при выделении изолятов МПВ птиц является присутствие в патологическом материале других инфекционных агентов. Это могут быть как вакцинные штаммы, так и полевые изоляты вирусов инфекционного бронхита кур, ньюкаслской болезни, инфекционного ларинготрахеита и др., а также микоплазмы. Поскольку ТОК обладает высокой чувствительностью к широкому спектру патогенов, для выделения МПВ птиц отбирали пробы патологического материала с минимальной контаминацией другими вирусами или ее полным отсутствием.

Для выделения МПВ птиц в ТОК проводили не менее 3 последовательных пассажей каждого материала. Дегенеративные изменения в ТОК под действием МПВ птиц наблюдали, начиная с 3-5 суток после инфицирования. Патогенное действие вируса проявлялось в округлении эпителиальных клеток трахеи и снижении их двигательной активности. Пораженные вирусом клетки отслаивались и скапливались в просвете трахеи (рис. 16). Полный или частичный цитостаз наблюдали на 8-10 сутки после инфицирования.

Однако цитостаз не является специфическим признаком размножения МПВ птиц. В случае дегенеративных изменений в ТОК, наблюдаемых в течение не менее 3 последовательных пассажей исследуемого материала, выделение МПВ птиц подтверждали методом ОТ-ПЦР. Кроме того, материал пассажей исследовали методом ПЦР на контаминацию другими вирусами и микоплазмами.



**Рис. 1** Трахеальна органна культура, незаражена (а) і заражена (б) ізолятом аМРВ/В/14/2009 МПВ птиці

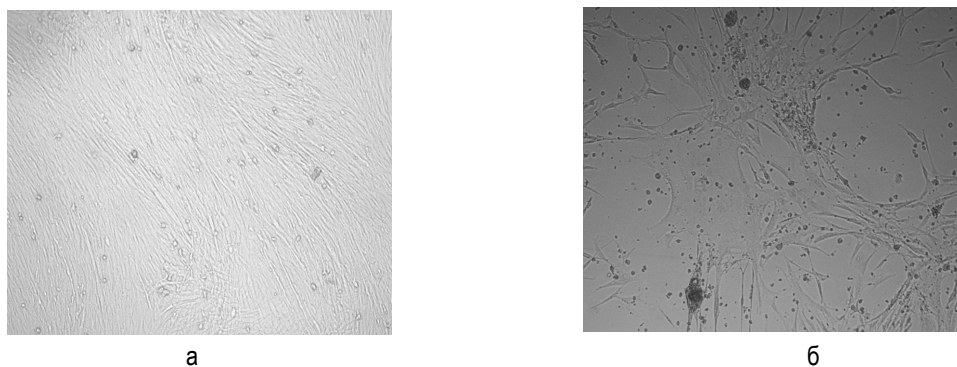
В результаті проведеної нами роботи в 2007-2010 гг. з використанням ТОК були виділені 7 ізолятів МПВ птиці підтипу В (табл.).

**Таблиця** – Ізоляти МПВ птиці підтипу В, виділені в ТОК

Ізолят	Регион	Вид птиці	Вік птиці, сут.	Контамінація іншими вірусами	Титр інфекц. активності після 5 пас. в ТОК (lg ТЦД <sub>50</sub> /мл)
aMPV/V/2/2007	Калужська обл.	Бройлери	20-30	ні	4,50
aMPV/V/7/2008	Брянська обл.	Бройлери	24	вірус ІБК	н.и.
aMPV/V/10/2008	Волгоградська обл.	Бройлери	32-38	вірус ІАЦ	н.и.
aMPV/V/5/2009	Україна	Бройлери	38-39	ні	4,75
aMPV/V/14/2009	Белгородська обл.	Бройлери	32	ні	5,00
aMPV/V/12/2010	респ. Мордовія	Несушки	153, 315	ні	4,85
aMPV/V/22/2010	Белгородська обл.	Бройлери	29	вірус ІБК	н.и.

**Примечание:** н.и. – не дослідували.

Виділені в ТОК ізоляти МПВ птиці в подальшому були адаптовані до росту в первинній культурі кліток ФЭК. Цитопатичне діяння вірусів проявлялось в утворенні синцитієв, відшаруванні кліток, деструкції моношару (рис. 2б).



**Рис. 2** Культура кліток ФЭК, незаражена (а) і заражена (б) ізолятом аМРВ/В/2/2007 МПВ птиці

Після проведення 3 пасажів ізолятів аМРВ/В/7/2008, аМРВ/В/10/2008 і аМРВ/В/22/2010 в культурі кліток ФЭК контамінація матеріала іншими вірусами була виключена методом ПЦР.

Вірулентні властивості двох виділених ізолятів МПВ птиці аМРВ/В/2/2007 і аМРВ/В/5/2009 були досліджені в результаті експериментального інфікування цыплят породи білий Леггорн, вільних від антител до МПВ птиці, в віці 7 днів. Вірусоносіячий матеріал вводили цыплятам інтраназально, орально і на кон'юнктиву. У птиці спостерігали слабкі риніти (виділення слизу з ніздрів при легкому наддуванні), кон'юнктивіти. Було продемонстровано можливість горизонтального поширення інфекції при спільному утримуванні інфікованих і здорових птиці. Специфічні антитіла до МПВ птиці виявляли методом ІФА в сироватках крові цыплят, починаючи з 10 днів після інфікування. Робота по дослідженню властивостей інших виділених ізолятів МПВ птиці буде продовжена.

**Висновки.** З використанням ТОК виділені 7 польових ізолятів МПВ птиці підтипу В, які в подальшому адаптовані до росту в культурі кліток ФЭК. Патогенність двох ізолятів вірусу досліджена на цыплятах.

*Список літератури*

1. Cook, J. K. A. Avian pneumovirus infections in turkeys and chickens / J. K. A. Cook // Vet. J. – 2000. – Vol. 160 (2). – P. 118-123.
2. Cook, J. K. A. The pathogenesis of turkey rhinotracheitis virus in turkey poults 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. 20. – P. 155-166.
3. Detection of Avian Pneumovirus in tissues and swab specimens from infected turkeys / J.C. Pedersen, D.A. Senne, B. Panigrahy, D.L. Reynolds // Avian Diseases. – 2001. – V. 45. – P. 581-592.
4. Isolation of

avian pneumovirus from an outbreak of respiratory illness in Minnesota turkeys / S. M. Goyal, S. J. Chiang, A. M. Dar [et al.] // J. Vet. Diagn. Invest. – 2000. – Vol. 12. – P. 166-168. 5. Jones, R. C. Avian pneumovirus infection: questions still unanswered / R. C. Jones // Avian Pathol. – 1996. – V. 25. – P. 639-648. 6. Nucleotide sequences of the F, L and G protein genes of two non-A/non-B avian pneumoviruses (APV) reveal a novel APV subgroup / M. H. Băyon-Auboyer, C. Arnauld, D. Toquin, N. Etteradossi // J. Gen. Virol. – 2000. – V. 81. – P. 2723-2733. 7. Preliminary antigenic characterization of an avian Pneumovirus isolated from commercial turkeys in Colorado, USA / J. K. A. Cook, M. B. Huggins, S. J. Orbell, D. A. Senne // Avian Pathol. – 1999. – V. 28. – P. 607-617.

#### ISOLATION OF FIELD AVIAN METAPNEUMOVIRUS ISOLATES USING TRACHEAL ORGAN CULTURE

**Nikonova Z.B., Lazareva S.P., Mudrak N.S., Drygin V.V.**  
FGI "Federal Center for Animal Health" (FGI "ARRIAH"), Vladimir

We recovered 7 field avian metapneumovirus (aMPV) isolates using tracheal organ culture. Properties of virus replication were described. The aMPV isolates were adapted to growth in chicken embryo fibroblast cell culture.

УДК 619:579.887.111:636.5

#### ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ РАЗЛИЧНЫХ КОНЦЕНТРАЦИЙ БЕТА-ЛАКТАМОВ НА РЕПРОДУКТИВНЫЕ СВОЙСТВА *Mycoplasma gallisepticum* И СОПУТСТВУЮЩЕЙ БАКТЕРИАЛЬНОЙ МИКРОФЛОРЫ

**Обуховская О.В.**

Национальный научный центр «Институт экспериментальной и клинической ветеринарной медицины», г. Харьков

Респираторный микоплазмоз – широко распространенное инфекционное заболевание сельскохозяйственной птицы, которое наносит значительный ущерб птицеводческим хозяйствам во всех странах мира [1, 2, 3, 4]. Условием успешной борьбы с этим заболеванием является установление эпизоотического статуса группы птицы (на основе результатов серологических и бактериологических исследований) и проведение иммунизации или антибиотикотерапии (в зависимости от стадии эпизоотического процесса) [5, 6, 7, 8]. Основой для постановки окончательного диагноза служат результаты бактериологического исследования. Одним из главных условий успешной и своевременной диагностики респираторного микоплазмоза является получение проб биологического материала, которые не контаминированы сопутствующей микрофлорой. С этой целью в среде для транспортировки проб добавляют пенициллин, так как представители семейства *Mycoplasmataceae* не чувствительны к этому антибиотику [9, 10, 11, 12]. Однако, другие бактериальные патогены, которые циркулируют среди птицепоголовья наряду с микоплазмами, в большинстве своем пенициллинрезистентны.

Поэтому на сегодняшний день актуально направление исследований по разработке подобных сред, в состав которых введены более эффективные и современные антибактериальные препараты.

Целью наших исследований было подобрать граничные концентрации таких антибактериальных препаратов, которые ингибируют рост представителей банальной микрофлоры, но не влияют на репродуктивные способности возбудителя респираторного микоплазмоза птиц.

**Материалы и методы.** В работе использовали «Жидкую питательную среду для изоляции и культивирования микоплазм» (ТУ У 24.4-00497087-091:2009), разработанную коллективом авторов ННЦ «ИЭКВМ». Для изучения ингибирующего влияния антибиотиков группы бета-лактамов на репродуктивные свойства микоплазм в готовую среду добавляли цефазолин и цефатаксим в концентрациях от 12,5 до 1000,0 мкг/см<sup>3</sup>, а также пенициллин в концентрации 1000,0 мкг/см<sup>3</sup>.

В качестве контроля использовали среду, содержащую только пенициллин (контроль 1), а также среду без добавления антибиотиков (контроль 2). Среды фасовали в бактериологические пробирки в количестве 5,0 см<sup>3</sup> и контролировали на стерильность по стандартной методике.

В качестве бактериальных тест-культур использовали музейные штаммы *Staphylococcus aureus* 209, *Escherichia coli* K99, *Bacillus alvei* 5, *Proteus mirabilis* K. Культуры микроорганизмов инкубировали на МПА (при температуре 37,5±0,5 °С в течении 20 часов). Бакмассу смывали стерильным физраствором и стандартизовали в соответствии с оптическим стандартом мутности и вносили в питательные среды с целью получения конечной концентрации 5х10<sup>8</sup> КОЕ/см<sup>3</sup> и культивировали в течении 5 суток при температуре 37,5±0,5 °С. На пятые сутки культивирования оценивали наличие и интенсивность роста бактерий визуально и путем микроскопии мазков. Визуально оценивали наличие и интенсивность помутнения среды, наличие осадка. Микроскопически определяли наличие бактерий в мазках, окрашенных по Грамму.

В качестве тест-культур микоплазм использовали музейный штамм *Mycoplasma gallisepticum* S<sub>6</sub>. 4-х суточную культуру вносили в пробирки с питательной средой в количестве 5х10<sup>8</sup> КОЕ/см<sup>3</sup> и культивировали в течении 5 суток при температуре 37,5±0,5 °С. На пятые сутки культивирования оценивали наличие и интенсивность роста микоплазм визуально, путем микроскопии мазков и путем фотокалориметрии.

Визуально оценивали наличие и интенсивность опалесценции среды, наличие осадка. Микроскопически определяли наличие элементарных тельц микоплазм в мазках, окрашенных по Романовскому-Гимзе. На ФЕКе КФК-2 определяли изменение оптической плотности среды при зеленом светофильтре, длине волны 420-440 нм против стерильной среды.

**Результаты исследований.** Для проведения исследований из группы цефалоспоринов мы выбрали цефазолин (препарат I-го поколения) и цефатаксим (препарат III-го поколения), как наиболее эффективные, доступные и широко применяемые в практике.

На первом этапе мы подбирали минимальные концентрации цефалоспоринов, которые подавляют рост бактериальных культур. Выбор в качестве тест-культур *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus alvei* и *Proteus mirabilis* объясняется не только тем фактом, что это типичные представители наиболее широко распространенных в птицеводстве групп бактериальных патогенов, но также и тем, что действующие на территории Украины нормативные документы рекомендуют использовать именно эти культуры при проведении изучения эффективности различных антибактериальных препаратов. В опытах использовали такую концентрацию культур, которая в 2-2,5 раза превышает аналогичный показатель в полевых условиях. Результаты исследований представлены в таблице 1.

Результаты исследований показали, что наличие пенициллина в составе питательной среды (1000,0 мкг/см<sup>3</sup>) не ингибирует рост бактериальных тест-культур при условии их первоначальной концентрации 5х10<sup>8</sup> КОЕ/см<sup>3</sup>. Цефазолин оказывает бактерицидное действие на все тест-культуры в концентрациях от 25,0 до 1000,0 мкг/см<sup>3</sup>. Действие цефатаксима аналогично для всех тест-культур за исключением *Bacillus alvei*, для этого патогена ингибирующей являются концентрации от 50,0 до 1000,0 мкг/см<sup>3</sup>.