

На правах рукописи

ТРУБИЦЫН МИХАИЛ МИХАЙЛОВИЧ

**ИММУНОБИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ИНАКТИВИРОВАННОЙ
ЭМУЛЬГИРОВАННОЙ ВАКЦИНЫ ПРОТИВ ВИРУСНОГО
ГЕПАТИТА УТЯТ ТИПА I**

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

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени кандидата
ветеринарных наук

Санкт-Петербург, 2021

Работа выполнена в отделе вирусологии и опухолевых болезнях птиц Всероссийского научно-исследовательского ветеринарного института птицеводства – филиала Федерального государственного бюджетного научного учреждения Федерального научного центра «Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт птицеводства» Российской академии наук

Научный руководитель:

Трефилов Борис Борисович

доктор ветеринарных наук, профессор,
член-корреспондент РАН

Никитина Нина Васильевна

кандидат биологических наук, доцент

Официальные оппоненты:

Плешакова Валентина Ивановна

доктор ветеринарных наук, профессор,
ФГБОУ ВО «Омский государственный
аграрный университет им. П.А. Столыпина»,
заведующий кафедрой ветеринарной
микробиологии, инфекционных и инвазионных
болезней

Луницин Андрей Владимирович

кандидат ветеринарных наук, старший научный
сотрудник, ФГБНУ Федеральный исследовательский
центр вирусологии и микробиологии
(ФГБНУ ФИЦВиМ), заместитель директора по
производству и качеству

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Сибирский федеральный научный центр агробιοтехнологий Российской академии наук (СФНЦА РАН).

Защита состоится « ____ » _____ 2022 года в ____ часов на заседании диссертационного совета Д 220.059.03 при ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет ветеринарной медицины» по адресу: 196084, г. Санкт-Петербург, ул. Черниговская д.5, тел./факс (812) 388-36-31.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет ветеринарной медицины» по адресу: 196084, г. Санкт-Петербург, ул. Черниговская д. 5 и на официальном сайте: <https://spbguvm.ru>.

Автореферат разослан « ____ » _____ 2021 г.

Учёный секретарь
диссертационного совета

Кузнецова Надежда Викторовна

1.ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Серьезным препятствием на пути успешного развития промышленного утководства являются различные инфекционные болезни молодняка, среди которых особое место занимает вирусный гепатит утят типа I.

Вирусный гепатит утят типа I (ВГУ- I, инфекционный гепатит уток) – высоко контагиозная болезнь, остропротекающая у утят до 4-6 – недельного возраста (Lin S.L. et al., 2016) и латентно у взрослой птицы, с преимущественным поражением печени и высокой смертностью молодняка до 90-95 процентов (Князев В.П., 2003; Паникар Т.Т., 2001; Gough, R.E., 2008; Chen L.L.et al., 2013; Kim M.C. et al., 2009; Lin S.L. et al., 2016).

Санитарным кодексом МЭБ (2008) ВГУ-1 включен в перечень особо опасных болезней (Chen L.L. et al., 2013).

ВГУ- I наносит значительный экономический ущерб утководческим хозяйствам, особенно промышленного типа, за счет массовой гибели утят 1-30 – суточного возраста (30 – 95 %) и снижения продуктивности уток. Молодняк после перенесенной болезни отстает в росте и развитии, что ведет к частичной потере мясной продуктивности и осложняет ведение племенной работы. Ущерб от инфекции усугубляется затратами на мероприятия, ограничивающие распространение болезни, когда болезнь принимает стационарный характер (Князев В.П., 2010; Паникар И.И., 2001; Gough R.E., 2008; Jin X.et al., 2008; Kim M.C.et al., 2008).

Для борьбы с вирусным гепатитом утят типа I (ВГУ-I) наряду с эффективными ветеринарно-санитарными мероприятиями важная роль принадлежит специфической профилактике, направленной на создание напряженного иммунитета у молодняка до 6-недельного возраста. С этой целью применяют аттенуированные и инактивированные вакцины (Глейзер С. и др. 2009; Ирза В.Н. и др., 2009; Gough R.E. a. Spackman D., 1981; Kang M. et al, 2018; Roh J.H. a.Kang M., 2018; Woolcock P.R., 1991).

Аттенуированная вирусвакцина при однократной вакцинации индуцирует недостаточно напряженный и продолжительный иммунитет у молодняка и родительского стада птиц, поэтому необходима 2-3 – кратная иммунизация (Kim M.C. et al., 2009).

Инактивированная вакцина, применяемая при иммунизации ремонтного молодняка уток или родительского стада за месяц до начала яйцекладки, индуцирует выработку специфических антител в высоких титрах и обеспечивает трансвариальную передачу материнских антител утятам в

течение всего репродуктивного периода (Трефилов Б.Б. и др., 2018; Woolcock P.R., 1991; Yin F. et al., 2015).

Поэтому разработка высокоэффективной инактивированной вакцины против ВГУ-1, применяемой в условиях промышленного утководства, фермерских хозяйств и личного подворья – остается востребованной в результате следующих причин:

- отсутствие отечественного инактивированного вакцинного препарата против вирусного гепатита уток;
- недостаточно длительный напряженный иммунитет при применении живых вакцин против вирусного гепатита утят типа I;
- сокращение количества вакцинаций с целью уменьшения стрессов и нагрузки на иммунную систему птицы;
- потребность в вакцинном препарате, не содержащем живого вируса.

Степень разработанности темы. Изменчивость возбудителя, его антигенная вариабельность, несвоевременная диагностика и несовершенная схема специфической профилактики болезни являются причиной сложной эпизоотической ситуации по вирусному гепатиту утят в хозяйствах промышленного типа (Ирза В.Н. и др., 2009; Chen L. et al., 2014; Fu Y. et al., 2008; Gough R.E., 2008; Hu Q. et al., 2016; Jin X. et al., 2008; Wen X.J. et al., 2014).

Российской Федерации для специфической профилактики ВГУ-1 применяют эмбриональную аттенуированную вирусвакцину из штамма ВГНКИ-К, которая индуцирует недостаточно длительный напряженный иммунитет при однократной вакцинации родительского стада и требуется 2-3 – кратная иммунизация в процессе выращивания (Глейзер С. и др. 2009; Ирза В.Н. и др., 2009).

Цели и задачи исследования. Целью настоящей работы являлась разработка инактивированной вакцины против вирусного гепатита утят типа I и изучение ее иммунобиологических характеристик.

Для достижения поставленной цели было необходимо решить следующие задачи:

- подобрать производственный штамм вируса гепатита утят и изучить его биологические характеристики;
- изучить оптимальные системы культивирования вируса;
- разработать компонентный состав инактивированной вакцины против вирусного гепатита утят;
- изучить физические параметры и иммунобиологические свойства инактивированной вакцины;
- изучить динамику формирования поствакцинального иммунитета у вакцинированных уток.

Научная новизна. Впервые разработана отечественная инактивированная эмульгированная вакцина против вирусного гепатита утят типа I. Отработана оптимальная схема получения вирусосодержащего сырья из вакцинного штамма «ВН-3» вируса гепатита утят.

Штамм «ВН-3» вируса гепатита для производства вакцинных препаратов и диагностических наборов депонирован в Государственной коллекции вирусов в НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского, ФГБНУ «ФНИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России под № 2859 и патентирован в РФ как «Штамм «ВН-3» вируса гепатита утят типа I рода Avihepatovirus семейства Picornaviridae для производства вакцинных препаратов и диагностических наборов, № 2675995 (Трефилов Б.Б. и др., 2018).

Изучены режимы и кинетика инактивации вируса гепатита утят типа I аминоктилэтиленимином. Научно обоснован компонентный состав инактивированной сорбированной и эмульгированной вакцины, определены оптимальные соотношения антигена и адъювантов. Доказана ее безвредность, высокая иммуногенность и способность индуцировать длительный иммунитет по сравнению с вирусвакциной ВНИВИП.

Изучена динамика формирования специфических антител к вирусу гепатита после иммунизации инактивированной эмульгированной вакциной.

Установлено, что инактивированная эмульгированная вакцина против вирусного гепатита утят типа I индуцирует у однократно привитых уток образование высокого уровня специфических антител к возбудителю.

Теоретическая и практическая значимость работы. На основании проведенных исследований разработана высокоэффективная инактивированная эмульгированная вакцина против вирусного гепатита утят типа I. Полученные результаты исследований послужили основанием для разработки технологии изготовления инактивированной вакцины и подготовки проекта нормативной документации на инактивированную вакцину против вирусного гепатита утят типа I:

- «Стандарт организации на вакцину против вирусного гепатита утят типа I инактивированную эмульгированную» (проект).

- «Временная инструкция по применению вакцины против вирусного гепатита утят типа I инактивированной эмульгированной», утверждена директором ВНИВИП, 2020 г.

Получен патент РФ «Вакцина против вирусного гепатита утят типа I», № 2712948 (Никитина Н.В. и др., 2019).

Методология и методы исследования. Методология работы включала анализ научной литературы, поисковые исследования, основанные на стандартных процедурах с использованием различных материалов и животных.

В работе использовали вирусологические, микробиологические, биохимические, физико-химические, серологические и статистические методы исследований.

Положения, выносимые на защиту:

1. Характеристика производственного вакцинного «ВН-3» вируса гепатита утят типа I (морфология, генетические признаки, биологические свойства, репликация в культуре клеток, терморезистентность, устойчивость к химическим агентам, антигенная активность, стабильность, биотехнологические характеристики, стерильность, условия хранения)

2. Схема получения вирусосодержащего сырья для изготовления инактивированной вакцины (культивирование вируса на культуре утиных фибробластов и утиных эмбрионах)

3. Инактивация вируса гепатита утят типа I аминоэтилэтиленимином (подбор оптимальной концентрации и параметров инактивации с сохранением антигенных структур вирионов)

4. компонентный состав инактивированной сорбированной и эмульсионной вакцины (изучение оптимального состава для вакцин с использованием разных адьювантов, таких как ГОА и масла АБ – 4М)

5. Физические и иммуногенные характеристики инактивированной вакцины против вирусного гепатита утят типа I (стабильность эмульсии, кинематическая вязкость, стерильность, безвредность и антигенная активность вакцины)

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, который включает в себя 200 утиных эмбрионов, взрослые утки в количестве 50 голов, полученных из хозяйства благополучного по инфекционным болезням птиц, 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 научной конференции «Фундаментальные исследования» (Прага, 2018).

Публикации. Основные положения диссертационной работы опубликованы в 10 научных изданиях, из них 4 – в периодических изданиях, входящих в перечень российских научных рецензируемых журналов для

опубликования основных результатов диссертаций, утвержденных ВАК Министерства образования и науки РФ, 2 патента Российской Федерации.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 113 страницах компьютерного текста и состоит из следующих разделов: введение, основная часть, заключение, список сокращений, список литературы и приложения. Диссертация иллюстрирована 8 таблицами, 2 рисунками и 2 формулами. Список литературы включает 139 источников, из которых 76 зарубежных.

2. Основное содержание работы

Работа выполнена за период с 2017 - 2019 гг. в отделе вирусологии и опухолевых болезней птиц Всероссийского научно-исследовательского ветеринарного института птицеводства (ВНИВИП), совместно с Трефиловым Б.Б., Никитиной Н.В., Явдошак Л.И., Леоновым И.К., Дмитриевым К.Ю., в соответствии с научно-технической программой НИР № 0599-2019-0224.

2.1 Материалы и методы исследований

Вирус: вакцинный штамм «ВН-3» вируса гепатита утят типа I, получен во ВНИВИП (Штамм «ВН-3» вируса гепатита утят типа I рода Avihepatovirus семейства Picornaviridae для производства вакцинных препаратов и диагностических наборов, патент РФ № 2675995, 2018).

Хранение матровой расплодки вируса осуществляли во флаконах при температуре минус 20°C и поддерживали на 11-12 суточных развивающихся утиных эмбрионах.

Инкубационные яйца, эмбрионы и утята: яйца уток ООО «Племптице завод Благоварский», 200 штук; эмбрионы уток, инкубированные на базе ВНИВИП, 150 штук; утки взрослые фермерского хозяйства, благополучного по инфекционным болезням, 50 голов.

Культура клеток: первично-трипсинизированная культура фибробластов утиных эмбрионов.

Питательные среды, сыворотки, растворы и реактивы: питательная среда Игла MEM или DMEM, жидкая, с L-глутамином; питательная среда 199, жидкая, с L-глутамином; 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 «Hyclone». Питательные среды и растворы из полнокомпонентной смеси фирмы «Hyclone», производства ООО «Биолот».

Набор для выявления антител к вирусу гепатита утят типа I иммуноферментным методом (ВНИВИП).

Сыворотки, исследуемые в непрямом варианте ИФА, не должны быть

контаминированы бактериальной и грибковой флорой, а также гемолизированными и гиперлипидными.

Постановку ИФА и обработку результатов проводили согласно методическим положениям «Определение специфических антител к вирусу гепатита утят типа I методом иммуноферментного анализа» (Никитина и др., 2018).

Оборудование и приборы: дозаторы для ИФА разных объемов; 96-луночные полистироловые плашки «Nunc», Дания; иммуноферментный анализатор «Униплан», Россия, перистальтический насос PD 5001, Heidolph, Германия, спектрофотометр UNICO-2800, США; холодильник низкотемпературный Sanyo, Япония; термостаты лабораторные с водяной рубашкой; инкубатор универсальный ИУФ-П-45; стерилизатор суховоздушный MOV-212F, Sanyo, Япония; центрифуги лабораторные, гомогенизатор Ultraturrax-T-25, Германия; микроскоп исследовательский, ЛОМО, Россия; вискозиметр капиллярный ВПЖ, ГОСТ-62, Россия.

Реактивы: фосфатно-солевой буфер и фосфатно-цитратный буфер ООО «Биолот»; натрия хлорид, х.ч., ГОСТ 4233; перекись водорода ОАО «Татхимфармпрепараты»; твин - 20 (P7949), Sigma; аминокэтилэтиленимин производства фирмы «Биохим ресурс» (Россия); гидрата окиси алюминия раствор коллоидный 6%; адъювант масляный АБ-4М (В/М), ЗАО «Петрохим», Россия; мертиолат производства фирмы «Acros Organics» (USA).

Микробиологические среды: мясопептонный бульон (МПБ), мясопептонный агар (МПА), мясопептонный печеночный бульон под вазелиновым маслом (среда Китта-Тароцци), агар Сабуро, производства ВНИВИП.

Определение инфекционной активности вируса проводили на 11-12 – суточных развивающихся утиных эмбрионах. Расчет инфекционного титра проводили по методу Reed L. J. & Muench H. (1938) и его величину выражали в десятичных логарифмах эмбриональных летальных доз в 0,2 см³ (lg ЭЛД₅₀/0,2 см³) (Белоусова Р.В., 2013).

Культуру фибробластов готовили из кожно-мышечной ткани 14-15 – суточных утиных эмбрионов по общепринятой методике (Белоусова Р.В., 2013).

Вирус титровали в культуре клеток методом десятикратных разведений и с соответствующим контролем по общепринятой методике (Белоусова Р.В., 2013). Специфичность цитопатогенного действия (ЦПД) подтверждали в реакции нейтрализации со специфической сывороткой.

Реакцию нейтрализации (РН) проводили по общепринятой методике, используя сыворотки свободные от термолабильных ингибиторов. Результаты

РН оценивали по титру антител (β -вариант) и по вируснейтрализующей активности сыворотки (α - вариант) (Белоусова Р.В., 2013).

Очистку вируса гепатита проводили методом дифференциального центрифугирования с последующей гельфильтрацией на колонкес макропористым стеклом (МПС), марки 1000 ВГХ в 0,01М фосфатно-солевом буфере (ФСБ), рН 7,3-7,5.

Вирус инактивировали аминоэтилэтиленимином АЭЭИ (ООО «Биохим ресурс», Россия) в различных концентрациях при постоянном перемешивании на магнитной мешалке и инкубированием при температуре $(37,0 \pm 0,5)$ °С в течение 24 часов .Остаточное количество АЭЭИ нейтрализовали 2М раствором бисульфита натрия до конечной его концентрации 0,01 – 0,03 М/дм³.

Полноту инактивации вируса проверяли методом трехкратных пассажей на утиных эмбрионах.

Изготовление сорбированной формы инактивированной вакцины против ВГУ-1 проводили с использованием гидроокиси алюминия (ГОА)конечной концентрации 0,3% в инактивированной вируссодержащей суспензии.

При изготовлении эмульгированной формы инактивированной вакцины использовали масляный адьювант АБ – М4 (В/М), Россия.

Контроль сорбированной и эмульгированной форм инактивированной вакцины против ВГУ-1 осуществляли определением физических (кинетическая вязкость, стабильность эмульсии) и иммунобиологических свойств (стерильность, безвредность и иммуногенная активность).

Стабильность эмульсии определяли методом центрифугирования при 3000 оборотов/минуту в течение 30 минут, методом быстрого старения в течение 14 – суточной инкубации при температуре $(37,5 \pm 0,5)$ С° и экспресс-методом, при котором эмульсию выдерживали при температуре минус 20°С в течение 1 часа, а затем при температуре $(37,5 \pm 0,5)$ С° в течение 1 часа.

Кинематическую вязкость измеряли капиллярным вискозиметром ВПЖ-2 и выражали в мм²/сек.

Гранулометрический состав вакцины определяли методом световой микроскопии.

Определение стерильности проводили в соответствии с ГОСТ 28085-2013 «Препараты биологические. Методы бактериологического контроля стерильности».

Определение безвредности вакцины. Визуальную оценку степени поражения тканей в месте введения эмульгированной вакцины проводили

через 28 и 42 сут. после иммунизации в прививной и пятикратной дозе вакцины по критериям, предложенным Stone H.D. (1991).

Определение антигенной и иммуногенной активности вакцины. Сущность метода заключалась в изучении способности вакцины индуцировать у вакцинированных уток выработку специфических антител к инактивированному антигену, уровень которых определяли в РН или ИФА с применением иммуноферментной тест-системы ВНИВИП (Никитина Н.В., 2018).

Статистическую обработку данных проводили с использованием методов вариационной статистики, считая их достоверными при $P < 0,05$ (Белюсова Р.В., 2013).

2.2 Результаты собственных исследований

2.2.1 Характеристика производственного вакцинного штамма «ВН-3» вируса гепатита утят типа I

Морфология. При электронно-микроскопическом исследовании методом негативного контрастирования установлено, что вирусные частицы штамма «ВН-3» не имеют внешнюю оболочку, сферической формы, размерами 30-40 нм. Нуклеокапсид содержит РНК.

Генетические признаки. При молекулярно-генетическом исследовании установлено, что штамм «ВН-3» имеет 98% гомологии с вакцинным производственным штаммом «КМИЭВ-16».

Биологические свойства. При инокуляции в аллантаоисную полость в дозе 3,0 lg ЭЛД₅₀/0,2 см³ вирус гепатита штамма «ВН-3» вызывает 70 – 80 % гибели 11-12 суточных утиных эмбрионов, а при заражении утят внутримышечно, подкожно и интраназально в дозе 3,0 lg ЭЛД₅₀/0,2 см³ не вызывает гибель и клиническое проявление болезни у утят 2 суточного возраста.

Репликация в культуре клеток. Штамм репродуцируется в культуре утиных фибробластов и клетках почки утиного эмбриона, вызывая острую форму инфекции с выраженным цитопатическим эффектом через 72 – 96 часов и 48 -72 часа соответственно и накапливается в титрах 4,5±0,25 и 5,75±0,3 lg ТЦД₅₀/см³.

Терморезистентность. Штамм «ВН-3» термостабилен. Константа скорости инактивации ($\lg K = 2,3Vt/V_0:t$) при температуре 56 °С в течение 60 мин равняется $2,8 \times 10^{-2} \lg$.

Устойчивость к химическим агентам. Штамм «ВН-3» вируса гепатита не чувствителен к инактивирующему действию (20% конечная концентрация) эфира и хлороформа. Формальдегид в 0,1% концентрации при 37 °С в течение

24 часов инактивировал инфекционную активность штамма с кинетической скоростью равной $5,9 \times 10^{-4}$ lg/ч.

Антигенная активность. Штамм «ВН-3» вируса гепатита индуцирует у утят выработку специфических вируснейтрализующих антител, а инактивированный вирусосодержащий материал в адьювантной форме, введенный парентерально утятам, инициирует синтез антител в высоких титрах, регистрируемых в реакции нейтрализации (РН) и иммуноферментном анализе (ИФА).

Стабильность. Штамм «ВН-3» стабилен, его свойства сохраняются неизменными в течение 10 пассажей в культуре клеток и на утиных эмбрионах.

Биотехнологические характеристики. Штамм «ВН-3» вируса гепатита утят типа I культивируется на развивающихся 11-12 суточных утиных эмбрионах. Оптимальными условиями накопления вируса является инокулирование в аллантоисную полость 11-12 суточных развивающихся утиных эмбрионов заражающей дозы, равной $3,0 \text{ lg ЭЛД}_{50}/0,2 \text{ см}^3$, инкубация инфицированных эмбрионов при $37 \text{ }^\circ\text{C}$ и относительной влажности 60-70% в течение 72 часов. Уровень активности (титр) вируса в собранном вирусосодержащем материале (аллантоисная жидкость + тушки зародышей) достигает максимально $7,5 \text{ lg ЭЛД}_{50}/\text{см}^3$. Штамм «ВН-3» вируса гепатита утят типа I патогенный (вирулентный) для 11-12 суточных утиных эмбрионов. Штамм «ВН-3» вируса гепатита утят типа I индуцирует у уток выработку вируснейтрализующих и преципитирующих антител, которые регистрируют серологическими методами в реакциях нейтрализации, преципитации и иммуноферментном анализе.

Стерильность. Штамм «ВН-3» вируса гепатита свободен от контаминации бактериями, микоплазмами, грибами и другими вирусами.

Условия хранения. При хранении штамма «ВН-3» вируса гепатита утят типа I в нативном состоянии при температуре $-70 \text{ }^\circ\text{C}$ допустимая длительность хранения без освежения составляет 24 мес., а при хранении лиофилизированном состоянии под вакуумом при той же температуре – 5 лет.

2.2.2 Разработка оптимальной схемы получения вирусного сырья

2.2.2.1 Получение вирусосодержащего материала

Вирус гепатита утят типа I, штамма «ВН-3» культивировали на развивающихся 11-12 суточных утиных эмбрионах, а также в культуре фибробластов утиных эмбрионов. Результаты исследований представлены в табл. 1.

Таблица 1 - Биологическая активность вакцинного штамма «ВН-3» ВГУ (n=8)

Биологическая модель	Активность вируса, lg ЭЛД ₅₀ /см ³
Утиные эмбрионы	7,5±0,25
Культура утиных фибробластов	Активность вируса, lg ТЦД ₅₀ /см ³
	5,5±0,1

Примечание: n – определений.

Данные, приведенные в таблице 1, показали, что при культивировании на развивающихся утиных эмбрионах вирус накапливался в наибольшем титре, что и послужило основанием для выбора оптимального метода наработки вируса гепатита для изготовления вакцинных препаратов. Вирусосодержащий материал с активностью не ниже 6,5-7,0 lg ЭЛД₅₀/см³ хранили при температуре минус 20 °С и использовали для изготовления вакцины.

2.2.3 Инактивация вируса гепатита утят типа I

Для изучения кинетики инактивации вируса гепатита был выбран аминоэтилэтиленимин (АЭЭИ), как препарат, широко применяемый при изготовлении инактивированных вакцин. Данные ряда авторов показали, что производные этиленимина минимально изменяют ответственные за антигенность белковую структуру вириона, а антигены продолжительное время сохраняют свои свойства при хранении (Улупов Н.А. и др., 1998; Лезова Т.А., 2003).

2.2.3.1 Изучение инактивирующего действия аминоэтилэтиленимина

В экспериментах по изучению кинетики инактивации вируса гепатита использовали вирусосодержащую суспензию штамма «ВН-3» с инфекционным титром (7,5±0,5) lg ЭЛД₅₀/см³, учитывая концентрацию инактиватора в ВСМ, рН суспензии, температуру и время экспозиции. Воздействие АЭЭИ изучали в конечной концентрации 0,02; 0,05 и 0,1 % при температуре 37°С в течение 24 часов при рН 7,3-7,5 в режиме постоянного перемешивания. В процессе инактивации через 6, 12, 18 и 24 часов отбирали пробы вирусосодержащей суспензии параллельно с контролем для определения инфекционного титра вируса. По окончании инактивации проводили нейтрализацию остаточного количества АЭЭИ путем добавления 2 М раствора тиосульфата натрия до конечной концентрации 0,03 М/дм³ и охлаждали суспензию до 4-8 °С.

Полноту инактивации вируса определяли путем 3-кратных последовательных пассажей в утиных эмбрионах. Результаты исследований представлены в табл. 2.

Таблица 2 - Чувствительность вакцинного штамма вируса к действию АЭЭИ

Концентрация АЭЭИ, %	Инфекционный титр вируса, lg ЭЛД ₅₀ /см ³				Константа скорости инактивации через 24 ч, lg K _{ин}	p
	экспозиции инактивации, ч					
	6	12	18	24		
0,02	7,5 ± 0,1	6,75 ± 0,1	5,75 ± 0,2	3,75 ± 0,1	6,5 · 10 ⁻²	< 0,05
0,05	6,9 ± 0,2	6,3 ± 0,3	5,2 ± 0,3	2,0 ± 0,3	3,4 · 10 ⁻²	< 0,05
0,1	5,75 ± 0,3	4,5 ± 0,25	2,0 ± 0,1	0		< 0,05
Контроль вируса	7,5	6,75	5,85	5,5		

Примечание. Исходный титр вируса (V₀) равен 8,0 lg ЭЛД₅₀/ см³.

Полученные данные показали, что АЭЭИ в концентрациях 0,02 и 0,05% инактивировал инфекционную активность вируса в течение 24 ч на 53,1 и 75% соответственно с кинетической скоростью 6,5 · 10⁻² и 3,4 · 10⁻² lg/ч. Под действием инактиванта в концентрации 0,1% вирус гепатита полностью потерял инфекционную активность в течение 24 ч.

Установлено, что скорость инактивации вируса была пропорциональна концентрации препарата в вирусодержащей жидкости и времени его воздействия. При обработке вируса АЭЭИ в концентрации 0,1% константа его скорости инактивации через 24 часа равнялась нулю (lg K = 0), что подтверждало полную потерю инфекционной активности вируса с сохранением его антигенных свойств.

Таким образом, при изготовлении инактивированной вакцины против ВГУ- I в качестве инактиванта был использован АЭЭИ в 0,1% концентрации при температуре 37°C и экспозиции в течение 24 часа.

2.2.4 Выбор оптимального компонентного состава инактивированной вакцины против вирусного гепатита утят типа I

Иммуногенная активность инактивированных противовирусных вакцин зависит от качества и количества основных компонентов препарата: антигенов и адъювантов. Инактивированные антигены в сочетании с адъювантами обладают более выраженной иммуногенной активностью по сравнению с их водными растворами. Адсорбированный антиген становится более концентрированным. При введении в организм он депонируется и поступает с

места введения в органы и ткани небольшими дозами. Медленная резорбция антигена пролонгирует иммунный эффект вакцины и существенно снижает ее токсичные и аллергические свойства.

В ветеринарной практике птицеводческой отрасли применяют две формы инактивированных вакцин: сорбированную и эмульгированную. Для изготовления сорбированной формы использовали широко применяемый в производстве вакцин гель гидроокиси алюминия (ГОА) в конечной концентрации 0,3%. Для изготовления эмульгированной формы вакцины использовали масляный адъювант АБ-4М (В/М). Вакцину готовили на гомогенизаторе при скорости вращения винта 3000 оборотов/минуту в течение 5-10 минут и температуре 10 °С.

При изготовлении обеих форм вакцины против ВГУ-І использовали инактивированное АЭЭИ вирусное сырье с биологической активностью 7,0-8,0 lg ЭЛД₅₀/см³.

В процессе исследований установлено, что наиболее оптимальным процентным соотношением антигена к адъюванту в водной фазе эмульсионной вакцины должно быть 30 к 70 при активности вируса до инактивации 7,5±0,5 lg ЭЛД₅₀/см³. Инактивированные препараты, изготовленные в приведённых соотношениях, сохраняли антигенные и иммуногенные свойства.

Образцы вакцин хранили при температуре (2–8) °С до проведения испытаний физических и иммунобиологических свойств.

2.2.5 Изучение физических свойств инактивированной эмульгированной вакцины в зависимости от продолжительности ее хранения

В качестве одного из звеньев контроля качества эмульгированных вакцин существенное значение имеют их физические свойства, такие как стабильность эмульсии, гранулометрический состав и кинематическая вязкость. Физические свойства эмульгированной вакцины против ВГУ-І изучали после изготовления и в процессе хранения (12 месяцев) при температуре (2–8) °С.

Стабильность эмульсии определяли методом центрифугирования, экспресс-методом и методом быстрого старения. Результаты исследований представлены в табл. 3.

Таблица 3 - Физические свойства инактивированной эмульсионной вакцины против ВГУ-1

Срок хранения	Вязкость, мм ² /с	Стабильность эмульсии, %		
		центрифугирование	Экспресс метод	Быстрое старение
Свежеизготовленная	52,2	100	100	100
12 месяцев хранения	55,2	98,5	98,5	98,5

Данные, приведенные в таблице 3, показывают, что свежеприготовленная партия эмульгированной вакцины была стабильна во всех трёх тестах, отслоения водной фазы не отмечалось. Через 12 мес. хранения эти показатели практически не изменились: во всех трёх тестах величина верхней фракции составляла 1,5 %, отслоения водной фазы также не отмечалось. Это свидетельствует о том, что вакцинная эмульсия обладала высокой стабильностью как сразу после изготовления, так и в течение длительного срока хранения.

Результаты по изучению гранулометрического состава вакцинной эмульсии до и после хранения в течение 12 месяцев с помощью световой микроскопии показали мелкозернистую равномерную структуру эмульсии (индекс гомогенности составил 0,94).

«Капельный метод» показал, что вакцинная эмульсия как до, так и после 12-месячного хранения представляла собой «обратный» тип эмульсии, т.е. «вода-масло».

Таким образом, результаты исследований физических свойств образцов эмульгированной вакцины показали высокую стабильность и гомогенность вакцинной эмульсии.

При определении безвредности визуально оценивали степень поражения тканей в месте введения вакцины по критериям, предложенным Stone H.D. (1997) для инактивированной вакцины против ньюкаслской болезни.

Безвредность вакцины проверяли на шести взрослых утках введение 5-кратной прививной дозы (3,0 см³) подкожно в нижнюю треть шеи. За птицей вели наблюдение в течение 42 сут. Результаты контроля показали, что образцы вакцины не вызывали воспалительных реакций в месте введения препарата в течение периода наблюдения, что подтверждает их безвредность.

2.2.6 Изучение антигенных свойств инактивированной сорбированной и эмульгированной вакцины в зависимости от продолжительности ее хранения

Параллельно исследованиям физических показателей качества сорбированной и эмульгированной вакцины проводили оценку их иммуногенных свойств на утках 8 – месячного возраста, которым подкожно в

нижнюю треть шеи вводили в объеме 0,6 см³ свежеприготовленную и хранившуюся в течение 12 месяцев при температуре (2-8) °С вакцину. Полученные результаты представлены в таблице 4.

Результаты серологических исследований сыворотки крови уток, привитых образцами свежеприготовленной и хранившейся вакцины против вирусного гепатита, приведенные в таблице 4, свидетельствуют о том, что хранение инактивированной сорбированной и эмульгированной вакцины против ВГУ-1 в течение 12 мес. при температуре от 2 до 8°С не привело в существенному снижению иммуногенной активности препарата.

Таблица 4 - Уровень специфических антител в сыворотке крови вакцинированных против вирусного гепатита утят типа I инактивированной сорбированной и эмульгированной вакциной свежеприготовленной и со сроком хранения 12 месяцев (n=8)

№ п/п	Наименование групп	Сроки после вакцинации, сутки	
		30	60
		Уровень антител РН, log ₂ / ИФА	
1	Утки, вакцинированные эмульгированной вакциной: - свежеприготовленной - со сроком хранения 12 месяцев	9,5/9782	10/9922
		9,5/9225	9,0/9872
2	Утки, вакцинированные сорбированной 0,3% ГОА вакциной: - свежеприготовленной - со сроком хранения 12 месяцев	9,5/6076	9,0/5270
		9,0/5876	8,5/5055
3	Утки не вакцинированные	566±65	522±54

Примечание: титр вируснейтрализующих антител в РН, log₂/ обратные значения титра антител в ИФА, (P<0,05).

Инактивированная вакцина обладала выраженной антигенной активностью и индуцировала в организме вакцинированной птицы образование высокого уровня специфических антител к возбудителю болезни.

Использованный температурный режим хранения биопрепаратов является общепринятым в биологической промышленности и ветеринарной практике, не оказывает отрицательного воздействия на иммуногенные свойства инактивированной эмульгированной вакцины против ВГУ-1 и может быть рекомендован для хранения данного препарата.

2.2.7 Изучение динамики формирования поствакцинального иммунитета у уток, иммунизированных вирусвакциной и инактивированной вакциной против вирусного гепатита утят типа I

Формирование поствакцинального иммунитета у уток родительского стада изучали после однократного применения вирусвакцины эмбриональной ВНИВИП и инактивированной сорбированной и эмульгированной вакцины в условиях вивария института. Перед вакцинацией сыворотка крови уток была исследована на отсутствие антител к вирусу гепатита. Обе формы инактивированной вакцины и живую против ВГУ-1 вводили уткам подкожно в область нижней трети шеи, в объеме 0,6 см³, однократно. Уток контрольной группы, в количестве 5 голов, не прививали. Опыты показали, что обе инактивированные вакцины в испытанных дозах не вызывали местных воспалительных и общих реакций. Данные сероконверсии у уток представлены в табл.5.

Таблица 5 - Уровень специфических антител у привитых уток (n=10)

Наименование групп	Титры антител в ИФА*									
	Сроки после вакцинации, сут									
	14	30	60	90	120	150	180	210	240	270
Утки,вакцинированные инактивированной эмульгированной вакциной	4235	9780	9922	9265	8052	7808	7254	6516	6254	5441
Утки,вакцинированные инактивированной сорбированной 0,3% ГОА вакциной	3987	6076	5270	3884	3573	2452	1975	648	545	408
Утки,вакцинированные вирусвакциной эмбриональной ВНИВИП	1912	2505	2875	2825	1752	1508	808	525	502	448
Невакцинированные утки	543	543	543	543	543	543	543	543	543	543

Примечание: * - обратные значения титра антител в ИФА

Данные, приведенные в таблице 5, показывают, что уровень антител в сыворотке крови вакцинированных уток инактивированной вакциной как эмульгированной, так и сорбированной в 2-3 раза выше по сравнению с эмбриональной вирусвакциной ВНИВИП в зависимости от сроков исследований после иммунизации. При сравнении двух инактивированных вакцин повышение титра антител наблюдали постепенно и максимальных значений титр достигал к 30-60 сут. после введения обеих форм вакцин. Титры антител у уток, вакцинированных эмульгированной вакциной сохранялись на одном уровне в течение 9 мес (срок наблюдения), в то время как у уток, привитых сорбированной и живой вакциной, они постепенно снижались. Полученные данные свидетельствуют о том, что инактивированная эмульгированная вакцина антигенно активна на протяжении всего периода исследований.

2.2.8 Изучение иммуногенных свойств инактивированной эмульгированной вакцины против вирусного гепатита утят типа I

Для оценки иммуногенных свойств инактивированной вакцины от вакцинированных и контрольных уток через 8-12 недель после вакцинации собирали яйца и инкубировали при 37,5 ° С и влажности 55% в течение 28 дней до вылупления. Экстракт желтка яиц получали от вакцинированных и контрольных уток по 10 проб в каждой группе. Наличие специфических антител к вирусу гепатита определяли методом ИФА. Результаты исследований представлены в табл. 6.

Таблица 6 - Уровень материнских антител в экстракте желтка яиц

Наименования группы	Титр антител в ИФА				
	Количество проб(n=5)				
	1	2	3	4	5
Яйцо, от вакцинированных уток:					
через 8 недель	6334	6936	6836	6295	6253
через 12 недель	9436	9056	9012	9087	9564
Яйцо, от не вакцинированных уток:					
через 8 недель	475	503	485	525	543
через 12 недель	487	512	512	542	528

Примечание: титры антител в обратных величинах.

Результаты исследований показали, что в желтке яиц средний уровень материнских антител в ИФА колебался в пределах от 6531±125 до 9231±145 от

уток в возрасте 8-12 недель после вакцинации, соответственно. В желтке яиц от контрольных уток средний титр антител равнялся 512 ± 45 .

Таким образом, инактивированная эмульгированная вакцина против вирусного гепатита утят типа I способна вызывать иммунобиологическую перестройку в организме уток, индуцируя выработку специфических антител в высоких титрах, которые обеспечивают защиту утят в восприимчивый период от болезни.

3. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Разработанная вакцина предназначена для специфической профилактики вирусного гепатита утят типа I в стационарно неблагоприятных утководческих комплексах и фермерских хозяйствах.

2. В качестве производственного штамма предложен вакцинный «ВН-3», который по основным генетическим маркерам (морфологической и антигенной структуре и биологическим свойствам) соответствует эталонным штаммам вируса гепатита утят имени гомогенность 98% с производственным штаммом «КМИЭВ-16», он апатогенен для утят, что доказывается отсутствием клинических признаков у 2-суточных утят, при различных методах заражения, ареверсибелен и обладает выраженной антигенной и иммуногенной активностью.

3. Вакцинный штамм «ВН-3» способен к репродукции в культуре клеток утиных эмбрионов, но в высоких титрах $7,5 \lg \text{ ЭЛД}_{50}/\text{см}^3$ вирус гепатита утят типа I накапливается в 10-12 суточных утиных эмбрионов, необходимого для изготовления инактивированной вакцины.

4. Изучена кинетика полной инактивации вируса гепатита утят АЭЭИ и определены оптимальные параметры процесса инактивации (конечная концентрация АЭЭИ в ВСМ 0,1%, время экспозиции 24 часа при температуре $37 \pm 0,5 \text{ }^\circ\text{C}$).

5. Изготовлены и испытаны сорбированная и эмульгированная формы инактивированной вакцины. Показана их высокая антигенная и иммуногенная активность, достигая пиковых значений на 60 день после вакцинации. Однако по иммунобиологическим показателям и продолжительности иммунитета эмульгированная вакцина признана наиболее перспективной, так как показывает более высокие значения титров антител и сохраняет высокий уровень, в период всего скока наблюдения 270 дней.

6. Отработано оптимальное соотношение антигена в водной фазе вакцины с масляным адьювантом АБ-4М (В/М) (30:70) с биологической активностью вируса до инактивации не ниже $7,0 \lg \text{ ЭЛД}_{50}/\text{см}^3$.

7. Экспериментально показано, что эмульгированная инактивированная вакцина по антигенной активности и продолжительности иммунитета

существенно превосходит вирусвакцину эмбриональную ВНИВИП против вирусного вируса гепатита утят типа I, показав уровень антител в ИФА 9922 на 60 сутки и сохранение титра антител на высоком уровне в течение 9 месяцев.

8. Инактивированная эмульгированная вакцина против вирусного гепатита утят типа I безвредна при однократном парентеральном применении. Индуцирует формирование поствакцинального напряженного иммунитета у утят, вызывая иммунологическую перестройку на весь репродуктивный период.

3.1 Практические предложения

Результаты научных исследований послужили основанием для разработки методических положений «Вакцинация против вирусного гепатита утят типа I», а также технологии изготовления инактивированной вакцины и подготовки проекта нормативной документации на новый вакцинный препарат:

- СТО на инактивированную эмульгированную вакцину против вирусного гепатита утят типа I (проект);
- Временная инструкция по применению инактивированной вакцины против вирусного гепатита утят типа I.

Получен патент РФ «Вакцина против вирусного гепатита утят типа I», № 2712948, 27.06.2019.

Материалы, изложенные в диссертации, используются в учебном процессе на курсах повышения квалификации ветеринарных специалистов.

3.2 Перспективы дальнейшей разработки темы

Дальнейшая разработка лабораторного технологического регламента на изготовление инактивированной вакцины против вирусного гепатита утят типа I позволит внедрить вакцину в производство и в ветеринарную практику.

4. Список опубликованных работ по теме диссертации

Статьи в журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ:

1. Трефилов, Б.Б. Инактивированная эмульгированная вакцина против вирусного гепатита утят типа I / Б.Б. Трефилов, Н.В. Никитина, Л.И. Явдошак, М.М. Трубицын // Ветеринария. – 2018. – № 2. – С. 20-23.
2. Трефилов, Б.Б. Сравнительная оценка антигенности живой и инактивированной вакцины против вирусного гепатита утят типа I / Б.Б. Трефилов, Н.В. Никитина, Л.И. Явдошак, М.М. Трубицын // Ветеринария. – 2019. – № 4. – С. 24-27.
3. Никитина, Н.В. Антигенная и иммуногенная активность инактивированной эмульгированной вакцины против вирусного гепатита утят типа I / Н.В. Никитина, Л.И. Явдошак, М.М. Трубицын // Вопросы нормативно-правового регулирования в ветеринарии. – 2019. – № 3. – С. 54-56.
4. Никитина Н.В. Разработка инактивированной эмульгированной вакцины против вирусного гепатита утят типа I / Н.В. Никитина, Л.И. Явдошак, И.К. Леонов, М.М. Трубицын // Птицеводство. – 2020. - №7-8. – С.67-71.

Статьи, опубликованные в сборниках материалов конференций:

5. Трефилов, Б.Б. Вирусный гепатит утят типа I (эпизоотология, патогенез и диагностика) / Б.Б. Трефилов, Н.В. Никитина, К.Ю. Дмитриев, М.М. Трубицын // Жур. Эффективное животноводство. – 2017. – № 3. – С. 12-13.
6. Трефилов, Б.Б. Вирусный гепатит утят типа I / Б.Б. Трефилов, Н.В. Никитина, Л.И. Явдошак, К.Ю. Дмитриев, М.М. Трубицын // EUROPEAN JOURNAL OF NATURAL HISTORY. – № 1. – 2018. – С. 59-61.
7. Трефилов, Б.Б. Специфическая профилактика вирусного гепатита утят типа I. / Б.Б. Трефилов, Н.В. Никитина, Л.И. Явдошак, М.М. Трубицын // Материалы Международной научной конференции «Фундаментальные исследования». 10-16 мая 2018 г. – Чехия (Прага).
8. Никитина, Н.В. Специфическая профилактика вирусного гепатита утят типа I / Н.В. Никитина, И.К. Леонов, Л.И. Явдошак, М.М. Трубицын // Эффективное животноводство. – 2019. – № 4. – С. 34.

Патенты:

1. Патент на изобретение RU 2675995 C1, 25.12.2018. Штамм «ВН-3» вируса гепатита утят типа I рода avihepatovirus семейства picornaviridae для производства вакцинных препаратов и диагностических наборов / Трефилов Б.Б., Никитина Н.В., Явдошак Л.И., Трубицын М.М., заявка №2018117223 от 08.05.2018.

2. Патент на изобретение RU 2712948 C1, 03.02.2020. Вакцина против вирусного гепатита утят типа I / Никитина Н.В., Явдошак Л.И., Трубицын М.М., заявка №2019120308 от 27.06.2019.