

**Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
Федеральный научный центр Российской академии наук
«Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт
птицеводства» (ФНЦ «ВНИТИП» РАН) – филиал «Всероссийский научно–
исследовательский ветеринарный институт птицеводства» (ВНИВИП)**

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

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени кандидата
ветеринарных наук

Научный руководитель:
доктор ветеринарных наук,
профессор, член-корреспондент РАН

Трефилов Борис Борисович

Кандидат биологических наук, доцент
Никитина Нина Васильевна

Санкт-Петербург
2021

Оглавление

ВВЕДЕНИЕ	4
1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	10
1.1 Значение и предпосылки развития продуктивного утководства.....	10
1.2 Вирусный гепатит утят (ВГУ) типа I, распространение и ущерб, причиняемый болезнью.....	11
1.3 Характеристика вируса гепатита утят типа I.....	12
1.4 Клинико-патоморфологические признаки болезни	14
1.5 Диагностика вирусного гепатита утят типа I.....	18
1.6 Профилактика и меры борьбы.....	24
1.7 Инактивированные вакцины и их применение в промышленном птицеводстве.....	29
1.8 Заключение по обзору литературы.....	32
2. СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	33
2.1 Материалы и методы исследования.....	33
2.2 Результаты собственных исследований.....	40
2.2.1 Характеристика вакцинного штамма «ВН-3» вируса гепатита утят типа I.....	41
2.2.2 Разработка оптимальной схемы получения вирусного сырья.....	44
2.2.2.1 Получение вирусосодержащего материала.....	45
2.2.3 Инактивация вируса гепатита утят типа I.....	47
2.2.3.1 Изучение инактивирующего действия аминоэтилэтиленимина.....	47
2.2.4 Выбор оптимального компонентного состава инактивированной вакцины против вирусного гепатита утят типа I.....	50
2.2.5 Изучение физико-химических свойств инактивированной эмульгированной вакцины в зависимости продолжительности ее хранения...	52
2.2.6 Изучение антигенных свойств инактивированной сорбированной и эмульгированной вакцины в зависимости от продолжительности их хранения.....	55

2.2.7 Изучение динамики формирования поствакцинального иммунитета у уток, иммунизированных живой и инактивированной вакцинами против вирусного гепатита утят типа I.....	57
2.2.8 Изучение антигенных свойств инактивированной эмульгированной вакцины против вирусного гепатита утят типа I.....	60
2.2.8.1 Определение антител к вирусу гепатита в экстракте желтка яиц.....	60
2.2.8.2 Определение антител к вирусу гепатита в сыворотке крови суточных утят.....	61
3. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	63
4. ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	71
4.1 Практические предложения.....	72
4.2 Перспективы дальнейшей разработки темы исследований.....	73
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	74
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	75
ПРИЛОЖЕНИЕ.....	90

ВВЕДЕНИЕ

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 [95] и латентно у взрослой птицы, с преимущественным поражением печени и высокой смертностью молодняка до 90-95 % [20, 45, 80, 69, 92, 98].

Санитарным кодексом МЭБ (2008) ВГУ-1 включен в перечень особо опасных болезней [69].

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 [21, 45, 79, 85, 92].

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 [9, 18, 86, 104, 127].

Аттенуированная вирусвакцина при однократной вакцинации индуцирует недостаточно напряженный и продолжительный иммунитет у молодняка и родительского стада птиц, поэтому необходима 2-3 – кратная иммунизация[88].

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 [35, 127, 134].

Поэтому разработка высокоэффективной инактивированной вакцины против ВГУ-I, 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 [18, 69, 74, 80, 84, 85, 123].

В Российской Федерации для специфической профилактики ВГУ-I 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 [9, 18].

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 физико-химические 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, 08.05. 2018 [60].

Изучены режимы и кинетика инактивации вируса гепатита утят типа I аминоэтилэтиленимином.

Научно обоснован компонентный состав инактивированной сорбированной и эмульгированной вакцины, определены оптимальные соотношения антигена и адьювантов.

Доказана ее безвредность, высокая антигенность 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 методических положений «Вакцинация против вирусного гепатита утят типа I», технологии изготовления инактивированной вакцины и подготовки проекта нормативной документации на инактивированную вакцину против вирусного гепатита утят типа I.

Получен патент РФ «Вакцина против вирусного гепатита утят типа I», № 2712948, 27.06.2019 [39].

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 адъювантов, 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 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 диссертации. Диссертация изложена на 113 страницах

компьютерного текста и состоит из следующих разделов: введение; обзор литературы; собственные исследования, включающие материалы и методы, результаты исследований; обсуждение результатов; выводы; практические предложения; список литературы, список сокращений и приложение. Диссертация иллюстрирована 12 таблицами, 2 рисунками и 2 формулами. Список литературы включает 139 источников, из которых 76 зарубежных.

1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Значение и предпосылки развития продуктивного утководства

Утководство, как любая отрасль птицеводства является резервом ускоренного увеличения производства мяса. Развитие данной отрасли оправдано тем, что утиное мясо, отличаясь по вкусовым качествам от мяса других видов птиц, расширяет ассортимент мясных продуктов как ценный диетический продукт питания.

В отличие от других видов сельскохозяйственной птицы, утки обладают способностью использовать грубые, сочные и зеленые корма, содержащие большое количество клетчатки, что позволяет получать продукцию при минимальных затратах концентрированных кормов [51].

Способность уток удовлетворять свои потребности в питательных веществах за счет кормов естественных пастбищ и природных водоёмов определила целесообразность дальнейшего развития утководства на основе интеграции общественных хозяйств с личными подсобными хозяйствами населения.

Потребности населения в суточных утятах удовлетворяют крупные утководческие комплексы, специализирующиеся по производству племенной продукции водоплавающей птицы. Основу производства племенных птицеводческих заводов составляют утки собственной селекции с привлечением принципиально нового импортного генетического материала для обеспечения интенсивного роста и увеличения выхода постного мяса.

Созданные новые кроссы уток обладают более высокими продуктивными и воспроизводительными качествами, меньшим содержанием жира в тушке.

Дальнейшее увеличение производства мяса уток возможно благодаря эффективному использованию различных кормов и кормовых добавок [19], в том числе ферментных селенсодержащих препаратов и синтетических аминокислот [33].

В настоящее время в РФ насчитывается свыше 20 пород и породных групп уток. Утки породы Мулард особенно ценятся за качество красного мяса и при откорме на крупную печень. Пекинские утки французской селекции характеризуются небольшой ожиряемостью (15%), с весом при откорме до 3,5 кг.

В целом в хозяйствах Российской Федерации в год выращивается более 40 млн. утят, а производство утиного мяса составляет свыше 120 тысяч тонн.

Разработана технология круглогодичного производства мяса уток, в основе которой использование родительского стада в течение 2,5 лет. Два цикла яйцекладки у несушек позволяют получать инкубационные яйца 9 мес. в году. Яичная продуктивность уток возросла с 35 до 65-75 яиц.

Разработана технология принудительного откорма уток на жирную печень, созданы экспериментальные машины для откорма птицы 460-500 г за 21-23 дня принудительного откорма уток, что соответствует мировому уровню.

Использование рекомендаций по производству и переработки продукции утководства, разработанных сотрудниками ВНИТИП, ВНИИЗЖ, Государственного племенного птицеводческого завода «Благоварский», на основе результатов научных исследований, передового отечественного и зарубежного опыта, позволит достичь высоких производственных показателей на утководческих предприятиях.

1.2 Вирусный гепатит утят типа I, распространение и ущерб, причиняемый этой болезнью

Вирусный гепатит утят типа 1 (инфекционный гепатит уток) – остропротекающая контагиозная болезнь утят до 4-6 – недельного возраста, характеризующаяся поражением печени и высокой летальностью (90–95 %) [21, 22, 81, 89, 90, 116].

О заболевании птиц вирусным гепатитом первые сообщения появились в 1949 году в США [93] P.P. Levine и J. Fabricant. Позднее вирусный гепатит утят типа 1 был зарегистрирован в Англии, Германии, Канаде, Японии [90] и в

Китае [82], а в 1984 году возбудитель был идентифицирован как вирус гепатита утят типа I [76, 82, 94].

В СССР вирусный гепатит утят впервые зарегистрировали в 1958 году на территории Белгородской и Харьковской областей [7, 38, 44, 45].

В Белоруссии, в период с 1990 по 1996 гг., периодически наблюдали вспышки вирусного гепатита утят (ВГУ), при этом гибель утят достигала 50 % [43, 44].

В настоящее время заболевание регистрируется во многих европейских странах, а также в Египте, США и Канаде [7, 22, 26, 85, 91, 117, 118, 132]. Существенный экономический ущерб промышленному разведению уток ВГУ-1 наносит в Китае [83, 98, 123, 137], на него приходится более 80% смертности утят в возрасте до 3 недель, выращенных на утиных фермах [94]. Санитарным кодексом МЭБ (2008) по наземным животным ВГУ-1 включен в перечень notiфицируемых инфекций наряду с инфекционным бронхитом кур, болезнью Марека, инфекционной бурсальной болезнью кур, чумой и псевдоочумой птиц [69].

Вирусный гепатит утят типа 1 причиняет утководческим хозяйствам значительный экономический ущерб, который обусловлен смертностью утят в возрасте 1-30 суток (90-95%), снижением прироста живой массы переболевших утят и их преждевременной выбраковкой, а также нарушением селекционно-племенной работы [7, 21, 22, 26, 45, 129].

1.3 Характеристика вируса гепатита утят типа I

В настоящее время возбудитель вирусного гепатита утят генетически разделен на 3 серотипа [72, 94, 99]: всемирный традиционный классический серотип – вирус типа 1, получивший повсеместное распространение [114] вирус типа 2, изолированный на Тайване [117] и вирус типа 3, выделенный в Англии, в США [69, 94, 95], в Южной Корее и Китае [89, 91] и между ними нет перекрестной нейтрализации [117, 118].

Вирус гепатита утят типа I (ВГУ-I) классифицируется как РНК-содержащий вирус рода Avihepatovirus, семейства Picornaviridae. Исследования

структуры генома ВГУ-I показали, что геном вируса состоит из одного открытого участка для считывания между 5'- и 3'-нетранслируемыми областями. Транслируемый участок генома кодирует белок полипротеин, состоящий из 2249 аминокислот, который гидролизуется в 12 самостоятельных зрелых полипептидов [68, 85]. Среди трех структурных белков VP0, VP1 и VP3, белок VP1 является основным, который индуцирует образование защитных нейтрализующих антител [129, 137]. Кроме того, белок VP1 ответствен за патогенность и вирулентность вируса [85, 99, 119] и имеет наибольшее генетическое разнообразие среди разных изолятов [71, 77, 124]. Вирус гепатита утят типа 2 и 3 были классифицированы как семейство Aviaastrovirus уток и переименованы в Astrovirus типа 2 и 3 соответственно [75, 91, 114].

Вирус гепатита утят типа 1 сферической формы, диаметр вирионов 20-40 нм., его наблюдали в тонких срезах печени при электронной микроскопии [92, 94].

Вирус гепатита утят типа 1 репродуцируется в клеточных культурах, в 12-13 – суточных эмбрионах уток, 7-9 – суточных эмбрионах кур, а также в эмбрионах перепелок [66]. Вирус типа 2 хорошо размножается в утиных эмбрионах и организме уток, в культуре клеток печени и почек утенка. В отличие от вируса типа 1, его репродукция в культуре почек цыпленка и перепелки ограничена. Кроме этого, вирус типа 2 не репродуцируется в эмбрионах кур. Утята иммунные к вирусу типа 1 заболевают при заражении вирусом типа 3. Особенности репродукции свидетельствуют о наличии антигенных различий у вирусов гепатита [101, 133].

Исследования патогенности вируса гепатита для утиных и куриных эмбрионов при заражении в желточный мешок и аллантаисную полость в дозе $3,0 \text{ lg ЭЛД}_{50}/0,2 \text{ см}^3$ показали, что утиные эмбрионы были более чувствительными, их гибель наступала через 48-72 ч в 100% случаев, а куриные эмбрионы погибали через 72-96 ч в 20-60% случаев при заражении в аллантаисную полость и 30-90% при инфицировании в желточный мешок [29].

У павших эмбрионов наблюдалось отставание в развитии, гиперемия сосудов желточного мешка и аллантоиса, диффузная отечность зародыша, застойные и геморрагические явления, наличие в аллантоисной полости прозрачной, иногда опалесцирующей жидкости зеленоватого цвета. Печень увеличена, уплотнена, имеет серовато-беловатый или серовато-зеленоватый оттенок. Чередование пораженных и нормальных участков паренхимы придает печени мраморный вид. На поверхности печени выявляются некротические очаги [29, 42, 43, 48].

При гистологическом исследовании срезов печени погибших эмбрионов отмечают дегенерацию клеток печени и очаговые некрозы, лимфоидную инфильтрацию и пролиферацию гранулоцитов, а также гиперплазию желчных протоков [29, 42, 54, 73].

Для утят ВГУ-1 патогенен, в основном, до 30-суточного возраста. При инокуляции утят вирусосодержащим материалом клинические признаки болезни появляются спустя 24-48 ч [8]. Вирус стабилен при температуре до 40-45°C, но быстро инактивируется при более высоких температурах. При температуре 37°C вирус оставался жизнеспособным в течение 21 сут. Формальдегид в конечной концентрации 0,1% при температуре 37°C в течение 24 часов полностью инактивирует инфекционную активность вируса гепатита утят [54].

ВГУ-1 устойчив во внешней среде, при комнатной температуре вирус теряет патогенность через 48-96 ч. Вирусосодержащая жидкость при хранении в холодильнике при 2-4 °C остается инфекционной до 700 сут. [8].

1.4 Клинико-патоморфологические признаки болезни

Клинические признаки при вирусном гепатите утят типа I описаны многими авторами и имеют много общего.

Вирусный гепатит чаще всего протекает в сверхострой и острой формах [38, 109, 116].

Инкубационный период длится от 1 до 5, реже – до 12–13 суток. Разнообразие клинического проявления зависит от возраста и физиологического состояния птицы, условий содержания и кормления, а также вирулентности вируса [20, 21, 22, 43, 44].

Характерными признаками острого течения болезни являются ее внезапное начало, короткий инкубационный период, который составляет от 1 до 7 суток. Вначале больные утята держатся отдельно от остальных членов выводка, перестают двигаться и сидят с полузакрытыми глазами. Затем неожиданно падают на бок или спину, вытягивают ноги вдоль туловища, из-за судорожного сокращения мышц шеи, запрокидывают голову на спину. Через 1–3 ч после проявления клинических признаков утята в состоянии опистотонуса погибают.

Заболеваемость достигает 100%, а смертность у молодых утят, инфицированных вирусом гепатита уток типа 1, варьирует. У некоторых утят младше одной недели смертность может достигать 95%. Среди утят 1-3 – недельного возраста — 50% и менее. У 4-5 – недельных утят уровень заболеваемости и смертности низкие или отсутствуют [45, 85, 91].

Полное выздоровление отмечается редко. Переболевшие утята остаются вирусоносителями. Из образцов патологического материала (печень, головной мозг), полученных от переболевших утят, можно изолировать вирус, а в образцах сыворотки крови выявить специфические антитела [21, 43].

Хроническую форму наблюдают у утят 4-6 – недельного возраста. При сохранении объема потребления корма птица худеет и отстает в развитии. В некоторых случаях отмечают артриты и пингвинообразную походку. Патологоанатомические признаки при хроническом течении болезни характеризуются увеличением печени и селезенки с очагами некрозов. Взрослые утки переболевают бессимптомно [21, 43, 44, 106].

В стационарно неблагополучном хозяйстве молодняк и взрослые утки иногда переболевают ВГУ-1 хронически или субклинически, но с характерной иммунологической реакцией. Утки родительского стада являются

вирусоносителями и вирусовыделителями. В их организме могут одновременно персистировать вакцинный и патогенный штаммы вирусов ВГУ-1. Такие утки в 10-60% случаев в течение 6-9 месяцев несут инфицированные яйца, при инкубации которых возможна гибель эмбрионов на различных стадиях развития. Смертность эмбрионов в зависимости от вирулентности штамма и его дозы, может достигать 50%. При благополучном завершении инкубации проявление болезни на таких утках наблюдается в возрасте 15-30 дней, со смертностью по отдельным партиям 5-10%. При поступлении в неблагополучную популяцию молодняка без материнских антител к вирусу гепатита от партии к партии утят смертность возрастает и иногда достигает 80-95% [21, 43].

Как правило, вирус гепатита утят типа 1 поражает только молодых утят с выраженными некротическими и геморрагическими изменениями в печени [87, 92, 98, 110].

Но в 2016 году в некоторых утководческих хозяйствах в провинции Шаньдун в Китае были зарегистрированы тяжелые вспышки вирусной инфекции уток с падением яйценоскости, снижением потребления корма и заболеванием яичников [138]. Выделенный вирус из пораженных органов уток-несушек был подтвержден как возбудитель, вызывающий резкое снижение яйценоскости. По сравнению с другими штаммами ВГУ-1 новый изолят FC16115 имеет три специальные точки аминокислотных мутаций в наиболее вариабельных областях на С-конце VP1 [138]. При экспериментальном заражении уток-несушек результаты патоморфологических исследований образцов тканей павших уток показали, что очевидными изменениями у не вакцинированных и инфицированных уток были кровоизлияния в яичники, некроз яичника, атрофия и деформация яичника.

В то время как вакцинированные утки-несушки аттенуированной вакциной против ВГУ-1 были защищены от инфекции [138]. По мнению авторов [138], это первый зарегистрированный случай тяжелой вспышки

болезни, включающей синдром снижения яйценоскости, вызванный ВГУ-1.

Выделенный изолят FC16115 ВГУ-1, который вызывал заболевание яичников и яйцевода требует дальнейших исследований [138].

Вирусный гепатит утят часто протекает в ассоциации с вирусной, бактериальной и грибковой инфекциями, таких как: грипп, сальмонеллез, микоплазмоз, колибактериоз, аспергиллез. При этом ведущую роль в патогенезе ассоциированных инфекций играет возбудитель вирусного гепатита. В Украине ВГУ-1 в большинстве случаев протекает ассоциированным течением с сальмонеллезом или аспергиллезом, реже с колибактериозом [43]. Гибель утят в разных группах составляла от 15,4 до 90%. При этом признаки сальмонеллеза выявляли в 10 до 50% случаев, аспергиллеза – от 10 до 60% случаев, но были установлены случаи, когда признаки аспергиллеза регистрировались у 100% особей [43].

Характерными патологоанатомическими изменениями при ВГУ являются некродистрофические и воспалительные процессы, протекающие в печени. Она увеличивается в 2–3 раза, становится желтовато-глинистого цвета, дряблой консистенции, при надавливании легко разрывается. На поверхности и в паренхиме печени выявляют мелкие единичные точечные или пятнистые кровоизлияния, вследствие чего она имеет пестрый вид. Геморрагические поражения в печени могут быть ключевым фактором быстрой смерти утят [131].

Желчный пузырь растянут и переполнен желчью желто-зеленого цвета. Селезенка увеличена в 2–3 раза, бледная или темно-красного цвета, иногда бугристая с серовато-белыми очажками под капсулой или по всему органу. Почки набухшие, кровеносные сосуды инъецированы.

Сердечная мышца имеет цвет вареного мяса, часто с серозной жидкостью в перикарде, коронарные сосуды кровенаполнены. У многих утят обнаруживают катаральное воспаление кишечника, геморрагический асцит, отек легких, перикардит и фибринозный аэросаккулит.

В головном мозге выявляют сильную инъею сосудов мозговых оболочек и наличие мелких точечных кровоизлияний. Характер изменений в головном мозге соответствует серозному энцефалиту [43, 49].

Результаты патоморфологических исследований подтверждают, что при ВГУ-1 основные патологические изменения происходят в печени и головном мозге. В интервале 1–12 часами в гепатоцитах можно обнаружить вирусоподобные частицы [133]. Через 24 часа после заражения в печени наблюдаются первичные изменения в виде некробиоза и некроза гепатоцитов [79]. Начало регенеративных процессов в паренхиме печени соответствует началу периода выздоровления [49, 128].

В селезенке утят патоморфологические изменения можно обнаружить уже через 6 часов после инфицирования, а через 24 часа выявляются некротические изменения в ядрах и цитоплазме спленоцитов [43, 48].

В фабрициевой сумке патоморфологические изменения представлены пролиферацией плазматических клеток и гемоцитобластов, которая усиливается через 3 суток после инфицирования в связи с иммунологической реакцией на вирусный антиген. При увеличении продолжительности инфекционного процесса на 2-3 недели количество плазматических клеток в фабрициевой сумке и в селезенке увеличивается в 3-4 раза. В тимусе каких-либо существенных изменений не наблюдается.

1.5 Диагностика вирусного гепатита утят типа I

Диагноз на ВГУ-I ставят комплексно на основании результатов эпизоотологического анализа, клинических признаков болезни, патологоанатомических изменений, вирусологических исследований и данных биопробы на утиных или куриных эмбрионах и утятах.

В первую очередь учитывают внезапное начало и быстрое распространение инфекции среди молодняка утят, а также высокую смертность утят 1-10 – суточного возраста в течение 1-3 часов после появления первых признаков болезни.

В случае острого течения болезни при проведении патологоанатомического исследования отмечают геморрагический и некротический гепатит, гломерулонефрит, серозный энцефалит и миокардиодистрофию. Подострое течение болезни характеризуется наличием катарального энтерита. Основным признаком болезни у утят до 3 – недельного возраста является наличие геморрагий различной формы и интенсивности на всей поверхности печени.

Для выделения вируса отбирают кусочки пораженных органов (печень, селезенка, почки, головной мозг) и готовят суспензию на растворе Хенкса или физиологическом растворе, содержащем антибиотики в 1,0 см³: бензилпенициллина 1000 ЕД, 1000 мкг стрептомицина сульфата, 25 мкг амфотерицина В. Суспензию выдерживают при комнатной температуре в течение 1-2 часов и центрифугируют при 3000 об/мин в течение 10 мин. Надосадочную жидкость вводят в аллантаисную полость 8-9 – суточных куриных или 10-12 – суточных утиных эмбрионов. Специфическая гибель эмбрионов происходит на 3-4 сутки после заражения. При вскрытии у павших эмбрионов наблюдают отек подкожной клетчатки с геморрагиями, некротический гепатит и нефрозо-нефрит. У утиных эмбрионов поражения более выражены по сравнению с куриными эмбрионами. При проведении повторных пассажей перечисленные изменения становятся ярко выраженными. Для эмбрионов, погибших на 5-8 сутки после инфицирования, характерным признаком является «карликовость» [45, 79].

При заражении культуры клеток фибробластов куриных и утиных эмбрионов через 72-96 часов вирус индуцирует образование симпластов, вакуолизацию и зернистость пораженных клеток, с последующим формированием синцития и дегенерацией клеточного монослоя через 96-120 часов культивирования [28].

Вирусемию устанавливают с использованием метода прямого выделения возбудителя из крови, а также методом предварительного расщепления вирус-антительного комплекса [45].

Сыворотку крови, полученную от переболевших или гипериммунизированных птиц, используют в реакции нейтрализации (РН) для идентификации изолятов и титрации штаммов вируса [55].

В короткие сроки (в течение 3 часов) и с высокой точностью диагноз на вирусный гепатит утят может быть поставлен путем индикации вирусного антигена методом флюоресцирующих антител [21].

Биопробу проводят на 1-3 – суточных утятах, доставленных из благополучных по вирусному гепатиту утководческих хозяйств. Утят заражают суспензией, приготовленной из ткани печени или головного мозга. Суспензию предварительно обрабатывают антибиотиками и вводят утятам интраназально по 2-3 капли в каждое носовое отверстие или внутримышечно в дозе 0,5 см³. При положительном результате гибель начинается через 16 часов, достигая максимума (до 100%) к 48-72 часам после заражения. У павших утят отмечается характерная поза (оπισстотонус) и поражения печени [43].

Для выявления в сыворотке крови уток специфических антител рекомендована реакция нейтрализации (РН) с эталонным штаммом вируса гепатита [78,110] и ИФА [35,139] РЗГА не применяют, так как вирус не обладает гемагглютинирующими и гемадсорбирующими свойствами, но предложена реакция пассивной гемагглютинации [15, 31, 113].

Реакцию ингибирования бляшек вируснейтрализующими антителами впервые предложил R.R. Woolcock et al. [125]. Метод оказался более чувствительным, чем реакция нейтрализации вируса в эмбрионах. Позднее R. R. Woolcock [127] сообщил, что антисыворотка в реакции ингибирования бляшек в культуре клеток печени утиного эмбриона не нейтрализовала вирус гепатита типа 2 и 3. Автор также показал, что 50-процентная вирусная нейтрализация 1:64 в куриных эмбрионах эквивалентна 50-процентной вирусной нейтрализации 1:3200 и более в клетках печени утиного эмбриона.

Реакцию микронейтрализации при вирусном гепатите утят типа 1 в культуре клеток почек утиного эмбриона предложил E. F. Kaleta [85]. Автор утверждает, что этот метод практичнее, быстрее и экономичнее по сравнению

с другими альтернативными методами, но в то же время считает, что метод ингибирования бляшек является более чувствительным. Метод микронеutralизации был адаптирован для контроля вакцины в лабораторных условиях [127].

В настоящее время в основном для выявления антител при ВГУ-1 применяют метод иммуноферментного анализа. Сравнительный анализ результатов твердофазного иммуноферментного анализа, реакции нейтрализации вируса и реакции преципитации в агаровом геле для определения антител к вирусу гепатита утят типа 1 в сыворотке крови провел Zhao X. et al. [139]. Автор сообщил о схожести методов ИФА и реакции нейтрализации вируса по степени чувствительности, но не провел количественный анализ своих результатов по двум методам. Реакция преципитации была значительно менее чувствительной [139].

Бондаренко В. [3] разработал иммуноферментный метод выявления специфических антител к вирусу гепатита утят типа в сыворотке крови и показал его высокую чувствительность и специфичность.

Мао S. et al. [102], учитывая важность гуморального иммунитета при ВГУ-1, разработали непрямые методы ИФА для выявления при болезни сывороточных IgG, IgM и IgA. Результаты исследований показали, что корреляция между непрямым ИФА и реакцией нейтрализацией сыворотки для IgG и IgA составила 95,2%, а для IgM – 75%. Авторы считают, что данный метод является перспективным для изучения состояния гуморального иммунного ответа на ВГУ-1.

В последние годы за рубежом разработаны иммуноферментные тест-системы с использованием VP1 и VP3 белков ВГУ-1 в качестве сорбирующих антигенов для обнаружения вирусоспецифических антител [97, 100, 105]. Этот подход в разработке ИФА более быстрый, простой и практичный, чем классический [139].

Liu M. et al. [100] для обнаружения антител к вирусу гепатита утят типа I в ИФА в качестве сорбирующего антигена использовали клонированный и

экспрессированный белок VP1в *Escherichiacoli*. По сравнению с реакцией нейтрализации специфичность и чувствительность VP1-ИФА составила 92,5% и 96,7%. VP1-ИФА не реагирует с антисывороткой других вирусных инфекций утки, так как этот белок специфичен для распознавания антител к ВГУ-1. Авторы считают, что VP1-ИФА является высокочувствительным и специфическим тестом, который может быть использован для скрининга на инфекцию ВГУ-1 и контроля титров антител к вирусу гепатита утят типа 1.

Непрямой метод ИФА на основе рекомбинантного белка VP3 вируса гепатита утят типа 1 впервые разработал Shen Y.et al. [105]. Авторы установили, что новый метод ИФА способен одновременно обнаруживать антитела к ВГУ-1 и ВГУ-3. Результаты оценки специфичности показали, что к другим распространенным патогенам, к которым чувствительны утки, не было обнаружено перекрестной реакции, за исключением вируса гепатита утят 3-го типа, автор полагает, что это может быть общим подходом для одновременного обнаружения антител ВГУ-1 и ВГУ-3. Коэффициенты вариации для всех тестируемых образцов были ниже 10%. Корреляция между непрямым ИФА на основе субъединицы VP3 ВГУ-1 и на основе целой частицы ВГУ-1 составляло 96%. Эти результаты показывают, что метод ИФА на основе VP3 обладает высокой чувствительностью, специфичностью и воспроизводимостью, и столь же эффективен, как метод непрямого ИФА на основе антигена ВГУ-1. Автор считает, что новый метод ИФА может быть удобным для обнаружения специфических антител к вирусу гепатита утят, а также для эпизоотологического надзора за распространением инфекции [105].

В течение последних десятилетий в диагностике вирусного гепатита утят особенно широко применяется метод полимеразной цепной реакции (ПЦР), высокоточный метод молекулярно-генетической диагностики, который широко используется для индикации и идентификации инфекции ВГУ [65, 74, 88, 91].

В Китае вирусный гепатит утят регистрируется с тремя типами вирусов: DHAV-1, DHAV-3 и DАstV-1 [69, 71, 74, 84, 119, 135]. Утята, инфицированные любым из этих трех вирусов, проявляют одинаковые

симптомы, такие как короткий инкубационный период, внезапное начало, высокая смертность, опистотонус и увеличение печени с выраженными кровоизлияниями. Диагноз на вирусный гепатит утят может быть поставлен на основе клинических признаков и патологоанатомической картины, но трудно определить, какой тип (или типы) вируса вызывает инфекцию практически невозможно. Мультиплексная ПЦР, разработанная в 2008 году, позволила дифференцировать штаммы DHAV-1 и DHAV-3 [91], а в последнее время, разработанный дуплексный метод ПЦР в реальном времени, обеспечивает быстрое и экономичное обнаружение смешанных инфекций, вызванных различными штаммами DHAV-1 и DHAV-3 у утят [69].

Lin S. L. et al [98] разработали дуплексный анализ ПЦР в режиме реального времени для одновременного количественного определения DHAV-1 и DHAV-3, а Li K.P. et al.[96] разработали ОТ-ПЦР в реальном времени для быстрого обнаружения и дифференцирования вакцинного штамма вируса ВГУ-1 от полевого. Этот анализ очень специфичен для ВГУ-1, а предел обнаружения составляет около 100 копий вирусной РНК. Вирус гепатита утят типа 1 был обнаружен в фекальных образцах уже через 6 часов после инфицирования утят вирусом гепатита типа 1. Позднее Chen L. et al [68] впервые разработали мультиплексный метод обратной транскрипционной ПЦР, который позволил обнаружить одновременно DHAV-1, DHAV-3 и DAsV-1 в клинических образцах. Мультиплексный метод ПЦР является специфическим для вируса гепатита, он не выявляет геномную ДНК или РНК других утиных патогенов. Его предел обнаружения оценивается до 102 копий каждой вирусной РНК DHAV-1, DHAV-3 и DAsV-1. Кроме того, дифференцировать вирусы DHAV-1, DHAV-3 и DAsV-1 возможно в одной реакции в течение нескольких часов. Метод эффективен и практичен для дифференциальной диагностики смешанных инфекций с тремя типами вирусов гепатита утят. Мультиплексный метод ПЦР, разработанный Wang Y. et al. [121], позволил обнаружить вирус гепатита утят типа 1, вирус чумы утки, парвовирус и реовирус мускусной утки и вирус птичьего гриппа утки H9N2.

Авторы показали, что мультиплексная ПЦР система может быть использована для обнаружения вирусных нуклеиновых кислот в утиных эмбрионах, зараженных шестью распространенными вирусами и клинических образцах. Авторы считают, что метод специфичный, чувствительный и высокопроизводительный и может применяться для клинической идентификации и диагностики вирусной инфекции уток [96].

Все молекулярно-биологические методы диагностики ВГУ-1, которые широко используются в настоящее время, постоянно пополняются новыми исследованиями, связанными с постоянно меняющейся эпизоотической ситуацией, особенно, в Юго-Восточной Азии.

1.6 Профилактика и меры борьбы

Профилактика и организация мероприятий по ликвидации вирусного гепатита утят типа 1 складывается из трех составных частей: применение специфической профилактики (вакцин и сывороток), использование химиотерапевтических препаратов и проведение комплекса ветеринарно-санитарных мероприятий, обеспечивающих изолированное выращивание утят от неблагополучного стада. Особую роль в профилактике инфекционных болезней молодняка птиц играет пассивный иммунитет, обусловленный материнскими антителами. Так утята, получившие трансовариально желточные материнские антитела от иммунных родителей, защищены от полевого вируса. Невосприимчивость молодняка старше 6 – недельного возраста к вирусу гепатита утят обусловлена возрастной устойчивостью к данному патогену. В крови переболевшего молодняка циркулируют постинфекционные вируснейтрализующие антитела, которые обеспечивают устойчивость к повторному инфицированию [115]. У молодняка, вакцинированного против вирусного гепатита утят типа 1, вируснейтрализующие антитела появлялись в сыворотке крови на 4-е сутки после иммунизации и достигали пика на 7 – 9 сутки [26, 44, 45, 47, 64, 83, 127].

Для создания пассивного иммунитета утятам можно вводить сыворотку

крови от переболевших уток [39, 45]. Авторы установили превентивное действие сыворотки крови переболевших утят и предложили ее для профилактики болезни. Учитывая это свойство сыворотки защищать от болезни в неблагополучных хозяйствах, многие исследователи считали, что основным методом в борьбе с вирусным гепатитом, при отсутствии более надежных средств, можно применять серопротективную [39, 43]. Но применение сыворотки крови реконвалесцентов не всегда оказывало положительный эффект. Одной из причин снижения лечебно-профилактической эффективности сыворотки является снижение титра антител в крови переболевших утят с увеличением их возраста [44, 45]. Так, сыворотка, полученная от утят – реконвалесцентов в 3-4 – недельном возрасте предохраняла утят от заболевания, а в 2 – месячном возрасте протективными свойствами не обладала при введении ее утятам даже в больших дозах (2-3 см³).

Первые исследования по разработке вирусвакцины из аттенуированных штаммов вируса гепатита были проведены И.И. Паникар [44, 45, 86, 109]. О положительных результатах производственных испытаний вирусвакцины сообщили И.Ю. Безрукавая и Г.В. Малиновская [1, 32]. Вирусвакцина из аттенуированного штамма FC64 индуцировала выработку специфических антител в высоких титрах у утят, которые были устойчивы к заражению вирулентным штаммом SH [108, 109, 110].

Влияние иммуностимуляторов на напряженность гуморального иммунитета и показатели иммунной реактивности организма у утят, вакцинированных против вирусного гепатита, изучали многие исследователи, которые установили их стимулирующее действие на формирование поствакцинального иммунитета при вирусном гепатите утят типа 1 [11, 23, 24, 46, 70].

В связи с реверсией аттенуированных вакцинных штаммов вируса гепатита утят [78] возникла необходимость в разработке инактивированной вакцины. Эффективность вакцинации утят была обеспечена посредством

введения трех доз инактивированной масляно-эмульсионной вакцины на основе вируса гепатита утят типа 1 [78]. Но проведение вакцинации утят живой вакциной на основе вируса гепатита утят типа 1 в 2-3 – суточном возрасте с последующей ревакцинацией инактивированной вакциной на 22 неделе индуцировало выработку высоких титров вируснейтрализующих антител, чем при трехкратном введении только инактивированной вакцины. При изготовлении инактивированной вакцины из вируса, культивированного в утиных эмбрионах, титры специфических антител были выше, чем при использовании вируса, культивированного в куриных эмбрионах.

Инактивированную вакцину против ВГУ-I на маточном поголовье испытали Woolcock P.R. and G. Fabricant [124, 125] и установили, что при иммунизации утят 12 – недельного возраста аттенуированной вакциной и ревакцинации инактивированной вакциной в 18 – недельном возрасте титры специфических антител были в 16 раз выше, чем при вакцинации только вирусвакциной. Поствакцинальный иммунитет был достаточным для защиты утят в течение 8 месяцев репродуктивного периода уток. Инактивированные вакцины, изготовленные из культурального и эмбрионального вируса гепатита утят типа 1, были одинаково эффективными [128].

Уровень вируснейтрализующих антител в сыворотке крови утят определяли в реакции нейтрализации с применением первично-трипсинизированных клеток печени утиного эмбриона [127]. Только у 7 (11%) утят были обнаружены антитела в титрах $6 \log_2$, который авторы считают минимальным защитным титром от болезни в восприимчивый период [127].

Gough R.E. а. Spackman D. [78] также показали, что комбинированное применение живой и инактивированной вакцины вызывает высокий иммунный эффект.

В последнее десятилетие вирусный гепатит утят в Китае является наиболее опасной болезнью [98]. Быстрая мутация и широкое распространение вируса гепатита типа I и типа III уток приводят к огромным экономическим потерям в утководческих хозяйствах [69, 107].

Для борьбы со вспышками ВГУ-1 и ВГУ-3 Kang M. et. al. [87] разработали двухвалентную аттенуированную вакцину против ВГУ-1 и ВГУ-3 и сообщили о высокой эффективности и безопасности вакцины. Утят в 1 – суточном возрасте вакцинировали двухвалентной вакциной внутримышечно. При заражении вирулентными штаммами ВГУ-1 и ВГУ-3 через 2 сут после вакцинации утята были устойчивы к заражению. Более того, у утят регистрировали высокий гуморальный иммунный ответ, который достиг пика через 3 недели и поддерживался в течение 6 недель после вакцинации [84].

Yin F.[134] предложил для борьбы с ВГУ-1 и ВГУ-3 двухвалентную инактивированную вакцину. Вакцина была эффективной и надежной, нейтрализующие антитела были обнаружены на 7-е сут., а уровень иммунной защиты достиг с 14-го по 21-е сут 90-100%. Более того, иммунная невосприимчивость у утят длилась более пяти недель. Авторы рекомендуют новую вакцину для профилактики и контроля за распространением ВГУ.

Вакцина является основным методом контроля ВГУ, которую вводят однодневным утятам или уткам-несушкам для обеспечения материнских антител их потомству [92]. Однако иммунитет у утят не формируется за 3-5 дней после вакцинации [92], и в этот период утята имеют высокий потенциальный риск заражения данной инфекцией. Это связано с тем, что болезнь протекает быстро, и почти вся смертность в стаде происходит в течение 3-4 дней, причем пик смертности приходится на второй день после заражения.

Kang M. И Roh J.H.[87] предложили свою схему вакцинации живой аттенуированной вакциной против вируса гепатита утят для родительских стад. Стратегия включала первичную внутримышечную вакцинацию, а затем вторичные и третичные пероральные вакцинации уток в полевых условиях, объясняя такой подход преимуществами легкого применения, удобства и отсутствия требований к обработке отдельных утят, а, особенно, как лучший способ снизить стресс от вакцинации у уток-несушек во время цикла яйцекладки. В ходе исследований авторы [87] показали, что спустя пять

недель после первичной вакцинации титры вируснейтрализующих антител, увеличились на $8,4 \pm 1,3 \log_2$. Титры оставались стабильными около $9,0 \pm 1,1 \log_2$ в течение 36 недель. Ни один из утят потомков не умер при заражении вирулентным штаммом ВГУ в возрасте 1, 7 или 14 дней. Процент передачи антител от уток-несушек к их потомству составляло $12,8 \pm 3,0\%$. Было установлено, что уровень антител у потомства со дня вылупления до 20 – суточного возраста неуклонно снижался, достигнув среднего титра $0 \log_2$ через 20 дней. Период полураспада материнских антител против ВГУ составляли $3,4 \pm 1,1$ дня [87].

Анализ литературных данных свидетельствует о том, что для вакцинопрофилактики вирусного гепатита утят и уток применяют на практике как аттенуированные вирусвакцины, так и инактивированные препараты.

В настоящее время проводятся большие исследования по разработке генно-инженерных вакцин [76, 120, 122]. Fu Y. et al. [76] разработали и испытали вакцину гена VP1 вируса гепатита утят типа 1. Результаты исследований показали, что ВГУ-1-специфичные антитела, нейтрализующие антитела и пролиферация лимфоцитов были хорошо индуцированы у утят. Кроме того, все утята были защищены от заражения полевым штаммом ВГУ-1. Авторы считают, что данная вакцина является многообещающей вакциной, способствующая профилактике утиного гепатита, вызванного ВГУ-1. Wang et al. [122] в разработке генной вакцины использовали ген VP1 вируса гепатита утят типа 1 и аденоассоциированный вирус птиц. Экспериментальную вакцину вводили утятам внутримышечно однократно. Сыворотка от вакцинированных утят показала хороший иммунный ответ, который подтверждали VP1-специфическим ферментом иммуносорбентного анализа и реакцией нейтрализации. Кроме того, все утята, привитые данной вакциной, были защищены от заражения ВГУ-1. Данные количественной ОТ-ПЦР в реальном времени печени опытных утят также показали, что уровень копий вируса в вакцинированной группе был значительно ниже, чем у не вакцинированной группы.

Преимущества генно-инженерных вакцин велики. Они исключают возврат к патогенности вакцинного вируса. Вакцина может быть сделана специально для полевого вируса. Поэтому разработка безопасных и эффективных новых генно-инженерных вакцин для контроля болезни является перспективным направлением в будущем [76, 120, 122].

Таким образом, вакцинация родительских стад обеспечивает получение от них устойчивого к вирусному гепатиту потомства до возрастной резистентности. Эффективность этого метода профилактики зависит от вакцинных штаммов, возраста уток при первой прививке, сроков ревакцинации, интервала между последней вакцинацией уток и получением от них молодняка, а также от вирулентности и антигенной variability эпизоотических штаммов, циркулирующих в данной географической зоне.

1.7 Инактивированные вакцины и их применение в промышленном птицеводстве

Профилактика инфекционных болезней (вирусных, бактериальных, протозойных) в промышленном птицеводстве не отличаются от общепринятых в медицине и ветеринарии. Основным действующим началом каждой вакцины является иммуноген, то есть корпускулярная или растворенная субстанция, несущая на себе химические структуры, аналогичные компонентам возбудителя заболевания, ответственным за выработку иммунитета.

В зависимости от природы иммуногена вакцины подразделяются на цельномикробные или цельновирсионные, состоящие из микроорганизмов, бактерий или вирусов, сохраняющих в процессе изготовления свою целостность. Химические вакцины получают из продуктов жизнедеятельности микроорганизма (вируса) или его интегральных компонентов. Такие вакцины называются субмикробные или субвирсионные вакцины.

Генно-инженерные вакцины содержат продукты экспрессии отдельных генов микроорганизма (вируса), наработанные в специальных клеточных

системах. В векторных вакцинах, ген, контролирующий синтез протективного белка, встроен в безвредный микроорганизм в расчете на то, что синтез этого белка будет происходить в организме привитого. В синтетических вакцинах, в качестве иммуногена используется химический аналог протективного белка, полученный методом прямого химического синтеза.

Для предупреждения болезней используют активную или пассивную специфическую вакцинацию, а также неспецифическую иммунотерапию [13]. Активная вакцинация предусматривает использование антигенов инфекционной природы для того, чтобы индуцировать при введении в организм специфический иммунный ответ и получить невосприимчивость к заражению при контакте с возбудителем соответствующей вирусной инфекции.

Вакцины, предназначенные для активной иммунизации, должны обеспечивать длительную и полную защиту у вакцинированной птицы, не должны вызывать побочных эффектов, быть генетически стабильными, пригодными для массового применения и экономически рентабельными [17, 136].

Вакцинные препараты, содержащие инаktivированные микроорганизмы (вирусы), безопасны своей авирулентностью и отсутствием контаминации. Действующим началом инаktivированных вакцин являются белки вирионов, на которые формируются специфические антитела, выполняющие важную роль в защите от вирусных болезней [17]. Для производства инаktivированных вакцин используют вирусы, которые способны к высокой репродукции и накоплению в наиболее чувствительных биологических системах (клеточные культуры, эмбрионы и птица) [4, 17].

Основным критерием выбора штаммов и чувствительных систем для наработки вирусной биомассы для инаktivированных вакцин являются конечные показатели инфекционной активности. Необходимым условием является соответствие по антигенной активности вирусов-продуцентов биосырья и эпизоотических штаммов [4].

Инактивированные вакцины получают путем воздействия на микроорганизмы (вирусы) химическим путем или нагреванием. Химические агенты, действуя на инфекционную активность, существенно не изменяют антигенность и иммуногенность получаемых препаратов. Такие вакцины являются достаточно стабильными и безопасными, так как не могут вызвать реверсию вирулентности. Они часто не требуют хранения на холоде, что удобно в практическом использовании. Инактивация инфекционных свойств вирусов должна быть необратимой и позволяющей максимально сохранить целостность антигенных детерминант вириона, обеспечивающих специфический иммунный ответ привитого организма [47, 53]. Часто используют такие инактиванты, как формальдегид, глутаровый альдегид, бета-пропиолактон и различные производные этиленмина [5, 13, 16, 27, 47, 53].

При изготовлении инактивированных вакцин для достижения иммуностимулирующего эффекта широко используют различные адъюванты, которые смешивают с инактивированным вирусным антигеном в оптимальных, иммунологически-сбалансированных пропорциях [12, 34, 67, 103].

Инактивированные вакцины против инфекционных болезней птиц изготавливают, чаще всего, в сорбированной и эмульсионной формах. При изготовлении сорбированных вакцин в качестве адъюванта используют гидрат окиси алюминия, действие которого проявляется через макрофаги. Зачастую в состав сорбированных вакцин включают дополнительные адъюванты типа сапонины, который вызывает циркулярные поражения, ведущие к иммуностимуляции. Масляные адъюванты представляют собой комплекс высокоочищенных минеральных масел в сочетании с эмульгаторами. При соединении вирусного антигена с масляным адъювантом водную фазу диспергируют в масляной, в результате чего получают эмульсию обратного типа (вода-масло), то есть мельчайшие частицы водной фазы с антигеном находятся в масляной фазе [14]. Механизм действия масляных адъювантов связан с формированием депо инактивированного антигена в месте инъекции,

что приводит к постепенному и длительному его высвобождению для стимуляции иммунной системы. Обратные эмульсии вызывают значительное увеличение иммуногенности вакцин. Они характеризуются высокими показателями и длительным сохранением протективных антител в крови иммунизированных животных [103].

1.8 Заключение по обзору литературы

Широкий спектр и распространенность вирусного гепатита утят типа I выдвигают на первый план необходимость разработки эффективных методов борьбы с ним. В этом отношении пока единственным надежным средством остаются вакцины, изготовленные из живого или убитого вируса, или их антигенных компонентов. Целью вакцинации против вирусного гепатита утят является стимуляция и мобилизация специфических защитных факторов и механизмов организма. В то же время широчайшая вариабельность тяжести течения болезни (от бессимптомного субклинического до очень тяжелого) свидетельствует о прямой зависимости степени их клинических проявлений не только от свойств возбудителя, но и от генетически детерминированной иммунологической реактивности макроорганизма.

2. СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Материалы и методы исследования

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.

При выполнении работы использовали:

В работе использовали следующие материалы:

- 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.

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

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

- яйца инкубационные утиные 200 штук, ООО «Племптице завод Благоварский»;

- утки взрослые, 50 голов, фермерского хозяйства, благополучного по инфекционным болезням птиц.

- первично-трипсинизированная культура фибробластов утиных эмбрионов.

Питательные среды, сыворотки, растворы и реактивы: питательная среда Игла MEM жидкая, с L-глутамином; питательная среда ДМЕМ жидкая, с L-

глутамином; питательная среда №199 жидкая, с L-глутамином; сыворотка крови крупного рогатого скота жидкая для культур клеток; сыворотка крови плодов коровы; трипсина раствор 0,25% фирмы «USBIO»; версена раствор 0,02%; Хенкса раствор фирмы «Nucleone».

Сыворотки, исследуемые в непрямом варианте ИФА, не должны быть контаминированы бактериальной и грибковой флорой, а также гемолизированными и гиперлипидными.

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

Реактивы: фосфатно-солевой буфер производства ООО «Биолот»;

- фосфатно-цитратный буфер производства ООО «Биолот»;
- натрия хлорид, (NaCl), х.ч., ГОСТ 4233, ОАО «Реактив»;
- перекись водорода производства ОАО «Татхимфармпрепараты»;
- твин - 20 (P7949), производства фирмы Sigma;
- аминоэтилэтиленимин производства фирмы «Биохим ресурс» (Россия);
- формальдегид раствор 26% фирмы «Acros Organics» (USA);
- гидрата окиси алюминия раствор коллоидный 6%;
- адьювант 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.

Развивающиеся утиные эмбрионы или племенное яйцо получали из фермерских хозяйств, благополучных по острым инфекционным болезням птиц. Инкубацию эмбрионов/яиц проводили в лабораторных условиях в отдельном термостате. Для культивирования штамма «ВН-3» вируса гепатита утят типа I брали хорошо развивающиеся, с выраженными поверхностными кровеносными сосудами, подвижные 11-12 – суточные эмбрионы, которых инокулировали в аллантоисную полость вирусом в дозе $3,0 \lg \text{ЭЛД}_{50}$ в $0,2 \text{ см}^3$. и инкубировали при температуре $(37,5 \pm 0,5) \text{ }^\circ\text{C}$ в течение 3-4 сут, ежедневно овоскопируя. Павшие эмбрионы помещали в холодильник при $2-4^\circ\text{C}$ на 10-12 часов для охлаждения. Вирусосодержащий материал (хориоаллантоисная жидкость и тушки) подвергали трехкратному замораживанию и оттаиванию, затем гомогенизировали и очищали центрифугированием при 3000 об/мин в течение 30 мин при 4°C .

Утят 1-20-суточного возраста и уток доставляли из хозяйства благополучного по острым инфекционным болезням птиц, в котором не диагностировали вирусный гепатит утят типа I. На отсутствие антител к вирусу гепатита сыворотки крови утят/уток проверяли в ИФА [35].

Определение инфекционной активности вируса проводили на 14-15 – суточных развивающихся утиных эмбрионах. Перед заражением эмбрионы овоскопировали с целью выявления их жизнеспособности. Десятикратные ($10^{-1} - 10^{-8}$) разведения вируса готовили на растворе Хенкса с антибиотиками. Эмбрионы заражали в аллантоисную полость в объеме $0,2 \text{ см}^3/\text{эмбрион}$, по 4 эмбриона для каждого разведения, и инкубировали в термостате при температуре $(37 \pm 0,5) \text{ }^\circ\text{C}$ в течение 5 суток. Расчет инфекционного титра проводили по методу Reed L.J. & Muench H. (1938) [2] и его величину выражали в десятичных логарифмах эмбриональных летальных доз в $0,2 \text{ см}^3$ ($\lg \text{ЭЛД}_{50}/0,2 \text{ см}^3$).

Культуру фибробластов готовили из кожно-мышечной ткани 14-15 – суточных утиных эмбрионов по общепринятой методике [2]. Для трипсинизации ткани использовали раствор, состоящий из 0,25% раствора

трипсина, 0,02% раствора версена и раствора Хенкса в соотношении 1:2:2. Диспергирование измельченной ткани проводили на магнитной мешалке при температуре 36-37°C до полного расщепления фрагментов ткани на отдельные клетки. Действие трипсина в клеточной суспензии нейтрализовали сывороткой крови крупного рогатого скота до конечной концентрации 10%. Клетки осаждали центрифугированием при 900-1000 об/мин в течение 20 мин, и осадок ресуспензировали ростовой питательной средой до концентрации 650-750 тыс. кл/см³.

Ростовая питательная среда состояла из сред Игла MEM/DMEM и 199 в соотношении 2:1 с добавлением 10% сыворотки крупного рогатого скота и антибиотиков: бензилпенициллина 100 ЕД/см³ и стрептомицина сульфата — 100 мкг/см³.

Клеточную суспензию разливали в пробирки и инкубировали при температуре (37,0±0,5) °С. Клеточный монослой на поверхности стекла формировался в течение 48 часов.

Реакцию нейтрализации (РН) проводили по общепринятой методике [2], используя сыворотки свободные от термолабильных ингибиторов. Смеси вируса соответствующих разведений и сыворотки специфической и нормальной выдерживали при комнатной температуре в течение 60 мин, а затем в объеме 1,0 см³ вносили в 4 пробирочные культуры. Результаты РН оценивали по титру антител (β-вариант) и по вируснейтрализующей активности сыворотки (α-вариант).

Вируснейтрализующую активность сыворотки выражали в индексе нейтрализации, который представляет собой разность показателей логарифмов титров вируса в присутствии специфической и нормальной сыворотки.

За титр антител принимали то наибольшее разведение сыворотки, которое способно ингибировать активность вируса, внесенного в указанной дозе, в 50% зараженной культуры.

Желточные иммуноглобулины уток выделяли в несколько этапов. На первом этапе желток, очищенный от белка фильтровальной бумагой, гомогенизировали с дистиллированной водой в соотношении 1:5, тщательно перемешивали 30 мин и центрифугировали при 2000 об/мин в течение 15-20 мин. Из жидкой фазы иммуноглобулины (Ig Y) выделяли равным объёмом хлороформа, тщательно перемешивали 30 мин и центрифугировали при 3000 об/мин в течение 15-20 мин. Жидкость расслаивалась на 3 фракции, в верхней водной фазе содержались Ig Y. Содержание антител определяли в непрямом варианте ИФА.

Иммуноанализ антител. Для определения специфических антител к ВГУ-I в сыворотке крови утят/уток и для оценки поствакцинального иммунитета применяли иммуноферментный анализ (ИФА) [35].

Постановку реакции осуществляли согласно методическим положениям «Определение специфических антител к вирусу гепатита утят типа I методом иммуноферментного анализа», утвержденными 28. 08. 2018 г.

Определение стерильности проводили в соответствии с ГОСТ 28085-2013 «Препараты биологические. Методы бактериологического контроля стерильности» и согласно «Руководству МЭБ по стандартам для диагностических тестов и вакцин» на бактериальное загрязнение, исключение контаминации грибами и микоплазмами (Manual of Diagnostic Tests and Vaccine for Terrestrial Animals, 2004).

Проверку материалов на бактериальную контаминацию проводили посевами в МПБ, МПА, МППБ под вазелиновым маслом и на агаре Сабуро. Посевы выдерживают при 37°C в течение 10 суток, а на агаре Сабуро при 18-24°C в течение 14 суток.

О стерильности материалов судили по отсутствию роста микроорганизмов на этих питательных средах.

Вирус инактивировали аминоэтилэтиленимина (АЭЭИ) в различных концентрациях при постоянном перемешивании на магнитной мешалке и инкубированием при температуре (37,0±0,5) °C в течение 24 часов. Через

каждые 6 часов инкубирования отбирали пробы для определения снижения титра и полноты инактивации вируса.

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, которым тестируемый материал вводили в аллантоисную полость в объеме 0,2 см³. Отсутствие в течение 5 суток инкубации характерных для вируса гепатита утят изменений в эмбрионах и их гибели подтверждало его авирулентность.

Изготовление сорбированной формы инаktivированной вакцины. Лабораторные образцы сорбированной вакцины против ВГУ-I готовили с использованием 6% геля гидроокиси алюминия (ГОА), конечная концентрация составляла 0,3% в инаktivированной вирусосодержащей суспензии. ГОА добавляли при постоянном перемешивании на магнитной мешалке при комнатной температуре в течение 30 минут.

Изготовление эмульсионной формы инаktivированной вакцины. При изготовлении лабораторных образцов инаktivированной эмульгированной вакцины использовали масляный адьювант АБ – М4 (В/М) (ЗАО «Петрохим», Россия), образующий эмульсию обратного типа. Инаktivированный ВСМ и масло смешивали в соотношении, рекомендованном производителем адьюванта, на гомогенизаторе Ultraturrax-T-25 в течение 5-10 минут при скорости вращения винта 3000 оборотов/минуту и температуре 10°C.

Готовые образцы инаktivированной вакцины хранили при температуре 2 – 4 °С.

Контроль инаktivированной вакцины против ВГУ-I. Контроль сорбированной и эмульгированной форм инаktivированной вакцины против ВГУ-I осуществляли определением физико-химических (кинетическая вязкость, стабильность эмульсии) и иммунобиологических свойств (стерильность, безвредность и антигенная активность).

Определение типа вакцинной эмульсии осуществляли «капельным методом» [112].

Стабильность эмульсии определяли методом центрифугирования при 3000 оборотов/минуту в течение 30 минут и методом быстрого старения в течение 14 – суточной инкубации при температуре $(37,5 \pm 0,5) \text{ C}^\circ$.

Эмульсию считали стабильной, если после центрифугирования в каждой из трех проб, в процессе визуального контроля, не было обнаружено никаких изменений содержимого или, если высота столба прозрачной фракции, сформировавшейся в верхней части флакона, не превышала 10% от общей высоты столба эмульсии.

Кинематическую вязкость измеряли капиллярным вискозиметром ВПЖ-2 и выражали в $\text{мм}^2/\text{сек}$. Определение вязкости проводили при температуре вакцины $20 \text{ }^\circ\text{C}$, измеряя время истечения вакцины от первого до второго мениска с точностью 0,2 сек. Кинематическую вязкость вычисляли по формуле $V = C \cdot \Gamma$, где V – кинематическая вязкость, $\text{мм}^2/\text{сек}$; C – постоянная вискозиметра; Γ – средняя арифметическая времени истечения вакцины, сек.

Гранулометрический состав вакцины определяли методом световой микроскопии. Перед микроскопией вакцину разбавляли масляным адьювантом в соотношении 1:3, затем 20 мкл препарата помещали под покрывное стекло и исследовали под микроскопом.

Эмульсию считали хорошего качества, если в поле зрения микроскопа наблюдали равномерную мелкозернистую структуру.

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):

- легкие поражения проявляются в побледнение тканей, окружающих место инъекции, размером до 1,0 см в диаметре, признаки воспаления отсутствуют;

- при средних поражениях зона воспалительной реакции тканей, проявляющаяся отеком, побледнением или гиперемией, имеет размеры от 1 до 2 см в диаметре, присутствует диффузно расположенная вакцина;

- сильные поражения характеризуются очагом воспаления тканей с вовлечением поверхностных и глубоких мышц и образованием гранулем в диаметре от 3 до 4 см, вакцина вытекала на разрезе или присутствовала в тканях в виде белой творожистой массы.

Определение антигенной 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 диагностической тест-системы ВНИВИП согласно методическим положениям «Определение специфических антител к вирусу гепатита утят типа I методом иммуноферментного анализа», 2018.

Уток-несушек вакцинировали инактивированной сорбированной и эмульгированной вакциной однократно подкожно в нижнюю треть шеи в объеме 0,6 см³. Контролями служили утки:

- не вакцинированные инактивированной вакциной;
- вакцинированные вирусвакциной эмбриональной ВНИВИП против ВГУ-1.

Через различные сроки в течение 10 месяцев после вакцинации у контрольных и подопытных уток брали кровь для определения уровня антител в сыворотке крови.

Статистическую обработку данных проводили с использованием методов вариационной статистики, считая их достоверными при $P < 0,05$ [2].

2.2 Результаты собственных исследований

Необходимость в разработке инактивированной вакцины против ВГУ-1 возникла в результате следующих причин:

- непродолжительный иммунитет у родительского стада при применении живых вакцин;
- необходимость сокращения количества прививок с целью уменьшения стрессов и нагрузки на иммунную систему;
- изготовление вакцинного препарата, не содержащего в своем составе живого вируса;
- отсутствие отечественной инактивированной вакцины против ВГУ-1.

При разработке инактивированной вакцины против ВГУ-I в качестве производственного штамма был использован вакцинный штамм «ВН-3» вируса гепатита утят типа I, «Штамм «ВН-3» вируса гепатита утят типа I рода Avihepatovirus семейства Picornaviridae для производства вакцинных препаратов и диагностических наборов», патент РФ № 2675995, 08. 05. 2018, RU [60].

2.2.1 Характеристика 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.

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 аллантаисную полость в дозе $3,0 \lg \text{ЭЛД}_{50}/0,2 \text{ см}^3$ вирус гепатита штамма «ВН-3» вызывает 80 – 100 % гибели 11-12 – суточных утиных эмбрионов. Данные представлены в табл. 1.

Таблица 1 - Патогенность вакцинного штамма «ВН-3» вируса гепатита утят для развивающихся утиных эмбрионов

Штамм вируса	Возраст утиных эмбрионов, сут	Метод инокуляции				
		Аллантоисная полость				
		Число пассажей				
		1	2	3	4	5
«ВН-3»	11-12	Гибель утиных эмбрионов, %				
		60*	80	100	100	100

Примечание: * - гибель эмбрионов в процентах.

Патогенность вакцинного штамма «ВН-3» вируса гепатита утят изучали на утятах 2 – суточного возраста, которых инфицировали внутримышечно, подкожно и интраназально в дозе 3,0 lg ЭЛД₅₀. Клинические наблюдения за утятами контрольной и подопытных групп продолжались в течение месяца при ежедневном осмотре за общим состоянием птицы (табл. 2).

Таблица 2 - Сравнительная характеристика по признаку патогенности вакцинного штамма вируса гепатита для 2-суточных утят при различных способах инфицирования

Штамм вируса	Множественность заражения, lgЭЛД ₅₀	Метод заражения			Характеристика штамма
		внутри мышечный	подкожный	интраназальный	
		заболело/заражено	заболело/заражено	заболело/заражено	
ВН-3	3,0	0/10	0/10	0/10	P _d ⁻

Примечание: 0 – утята не заболели; P_d⁻ - признак патогенности.

Результаты опытов, приведенные в таблице 2, показывают, что вакцинный штамм «ВН-3» вируса гепатита при внутримышечной, подкожной и интраназальной инокуляциях не вызывал клинического проявления болезни у утят.

Репликация в культуре клеток. Способность штамма «ВН-3» вируса гепатита к репликации в клеточных культурах изучали в первично-трипсинизированной культуре фибробластов утиных эмбрионов, в клетках

почки утиных эмбрионов в дозах 0,1 – 1,0 ТЦД₅₀ на клетку. Данные представлены в табл. 3.

Таблица 3 - Биологическая активность вакцинного штамма «ВН- 3» вируса гепатита утят в культурах клеток

Штамм вируса	Активность штаммов, lg ТЦД ₅₀ , M±m*	
	Культура клеток	
	Фибробласты утиных эмбрионов	Почки утиного эмбриона
«ВН -3»	4,5±0,25	5,75±0,3

Примечание: M±m – среднее значение титров штамма вируса.

Результаты исследований, представленные в таблице 3 показали, что штамм репродуцируется в культуре утиных фибробластов и клетках почки утиного эмбриона, вызывая выраженный цитопатический эффект 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 ($lgK = 2,3Vt/V_0:t$) 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 штаммспецифических 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 $3,0 \lg \text{ЭЛД}_{50}/0,2 \text{ см}^3$, инкубация инфицированных эмбрионов при $37 \text{ }^\circ\text{C}$ и относительной влажности 60-70% в течение 72 часов. Уровень активности (титр) вируса в собранном вируссодержащем материале (аллантоисная жидкость + тушки зародышей) достигает максимально $7,5 \lg \text{ЭЛД}_{50}/\text{см}^3$. 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 антител, которые регистрируют серологическими методами в реакциях нейтрализации 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 в лиофилизированном состоянии под вакуумом при той же температуре – 5 лет.

2.2.2 Разработка оптимальной схемы получения вирусного сырья

Успех производства вакцины во многом обусловлен качеством исходного биологического сырья. Поэтому культивирование вируса является одним из основных этапов в технологии изготовления биопрепарата. Главной задачей данного этапа работы было изыскание оптимального метода культивирования вируса гепатита с высокой биологической активностью.

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.

Опыты по изучению способности вируса гепатита утят к репродукции в клеточных культурах проводили в первично-трипсинизированной культуре фибробластов утиных эмбрионов. В качестве питательной ростовой среды применяли среду Игла MEM и среду 199 в соотношении 2:1 с добавлением 10% нормальной сыворотки крупного рогатого скота и антибиотиков (бензилпенициллина 100 ЕД/см³ и стрептомицина сульфата 100 мкг/см³). Взвесь клеток вносили в ростовую среду из расчета 650-700 тыс. кл/см³. Культивирование проводили во флаконах PS «Orange Scientibic» в стационарных условиях при температуре (37,5±0,5) °С. Обычно через 24-48 ч инкубирования формировался сплошной ровный монослой клеток.

После формирования монослоя клеток, в культуру вносили вирус гепатита в дозах 0,1-1,0 ТЦД₅₀ на клетку и адсорбировали в течение 60 мин при 37°С. Затем добавляли поддерживающую среду с антибиотиками (без сыворотки).

Цитопатогенное действие через 18 часов сопровождалось округлением клеток на ограниченных участках монослоя, через 48-72 часа после инокуляции наблюдали появление симпластических образований с зернистостью в цитоплазме клеток, а через 96-120 часов происходила дегенерация клеточного монослоя и формирование синцития.

При культивировании вируса гепатита утят штамма «ВН-3» на развивающихся 11-12 – суточных утиных эмбрионах, их заражали в аллантоисную полость оптимальной заражающей дозой, равной 3,0 lg ЭЛД₅₀/0,2 см³. Инфицированные эмбрионы инкубировали в термостате при температуре (37,0±0,5) °С и относительной влажности 60-70% в течение 72 ч. Овоскопирование проводили два раза в сутки. Эмбрионы, погибшие в течение 24 часов после заражения, выбраковывали, а павшие эмбрионы в

последующие сутки хранили в холодильнике при температуре 4-6 °С. Охлажденные эмбрионы вскрывали в асептических условиях, а хориоаллантоисную жидкость и зародышей собирали во флаконы емкостью 250-450 см³.

Вирусосодержащий материал, полученный на культуре клеток и на эмбрионах, однократно замораживали и оттаивали. Затем вирусосодержащий материал, полученный на утиных эмбрионах, гомогенизировали при 3000-5000 об/мин и оба биоматериала центрифугировали при 3000 оборотов в течение 30 минут. Надосадочную жидкость проверяли на отсутствие контаминации высевами на среды: МПБ, МПА, МППБ под вазелиновым маслом и бульон Сабуро, а также на биологическую активность штамма вируса. Результаты исследований представлены в табл. 4.

Таблица 4 - 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 4, 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

После получения высокоактивной вирусной биомассы была проведена работа по выбору эффективного инактивирующего средства, его концентрации и оптимальных параметров инактивации, обеспечивающих полное подавление инфекционных свойств вируса при максимальном сохранении антигенных структур вирионов.

В опытах изучали инактивирующее действие аминоэтилэтиленимина вирус гепатита утят типа I. Данные ряда авторов показали, что производные этиленимина минимально изменяют ответственные за антигенность белковую структуру вириона, а антигены продолжительное время сохраняют свои свойства при хранении [27, 58].

2.2.3.1 Изучение инактивирующего действия аминоэтилэтиленимина

В экспериментах по инактивации вируса гепатита использовали вирусосодержащую суспензию штамма «ВН-3» с инфекционным титром $(7,5 \pm 0,5) \text{ lg ЭЛД}_{50}/\text{см}^3$. Известно, что антигенная активность получаемого препарата зависит от правильного выбора режима инактивации. Поэтому при проведении опытов учитывали концентрацию инактиватора в ВСМ, рН суспензии, температуру и время экспозиции.

Воздействие аминоэтилэтиленимина изучали в конечной концентрации 0,02; 0,05 и 0,1 % при температуре 37°C 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.

Снижение титра вируса в процессе инактивации выражали отношением

$$\text{lg } V_t/V_o, (1)$$

где V_0 – титр вируса до обработки, V_t – титр вируса после обработки в течение определенного времени. Константу скорости инактивации вычисляли по формуле:

$$K = 2,3 \cdot P_t / P_0 : t, \quad (2)$$

где 2,3 – основание натуральных логарифмов; P_0 – исходный титр вируса; P_t – титр обработанного вируса ко времени; t – время обработки вируса.

Полноту инактивации вируса определяли путем 3-кратных последовательных пассажей в утиных эмбрионах.

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 $6,5 \cdot 10^{-2}$ и $3,4 \cdot 10^{-2} \text{lg/ч}$. Под действием инактиванта в концентрации 0,1% вирус гепатита полностью потерял инфекционную активность в течение 24 ч (табл. 5).

Таблица 5 - Чувствительность вакцинного штамма вируса к действию АЭЭИ

Концентрация АЭЭИ, %	Инфекционный титр вируса, $\text{lg ЭЛД}_{50}/\text{см}^3$				Константа скорости инактивации через 24 ч, $\text{lgK}_{\text{ин}}$	p
	экспозиции инактивации, ч					
	6	12	18	24		
0,02	$7,5 \pm 0,1$	$6,75 \pm 0,1$	$5,75 \pm 0,2$	$3,75 \pm 0,1$	$6,5 \cdot 10^{-2}$	$< 0,05$
0,05	$6,9 \pm 0,2$	$6,3 \pm 0,3$	$5,2 \pm 0,3$	$2,0 \pm 0,3$	$3,4 \cdot 10^{-2}$	$< 0,05$
0,1	$5,75 \pm 0,3$	$4,5 \pm 0,25$	$2,0 \pm 0,1$	0		$< 0,05$
Контроль вируса	7,5	6,75	5,85	5,5		

Примечание. Исходный титр вируса (V_0) равен $8,0 \text{lg ЭЛД}_{50}/\text{см}^3$.

Данные кинетики инактивации (рис. 1) свидетельствуют о том, что вирус гепатита утят чувствителен к действию аминоэтилэтиленимина, снижение титра вируса следовало простой экспоненциальной кривой.

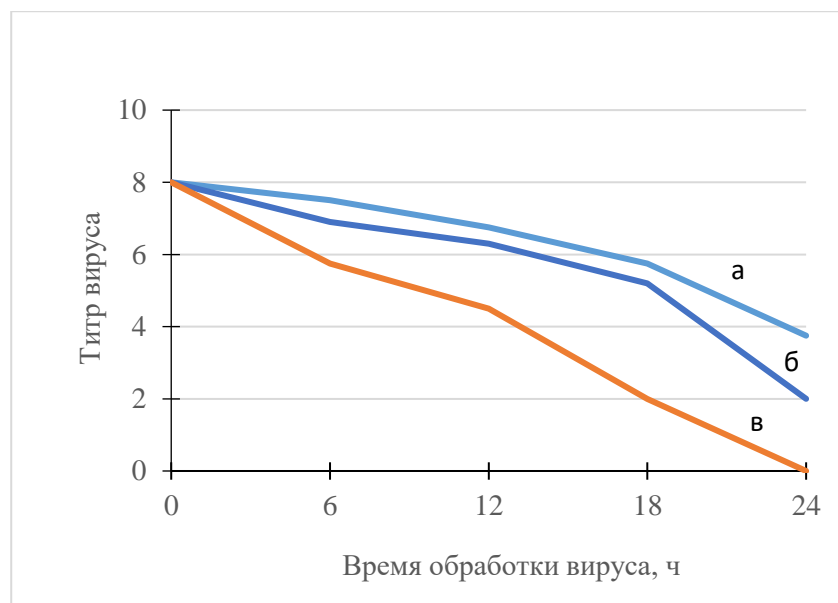


Рис. 1 - Кинетика инактивации вируса гепатита в конечной концентрации АЭЭИ 0,02% (а), 0,05% (б) и 0,1% (в).

Установлено, что скорость инактивации вируса была пропорциональна концентрации препарата в вирусосодержащей 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, полученные данные кинетики инактивации вируса гепатита утят, обработанного АЭЭИ в различных концентрациях при температуре 37°C, показали, что скорость инактивации вируса повышалась по мере увеличения концентрации препарата в вирусосодержащей суспензии и времени его воздействия.

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 гидрооксида алюминия (ГОА).

Данные многих исследований [4, 5, 13, 16, 18] при испытании широкого спектра масляных адъювантов и эмульсий различных типов показали, что вакцины против вирусных болезней птиц на основе масляного адъюванта Montanide ISA 70, образующего эмульсию обратного типа, имели наиболее оптимальные физические показатели и высокие иммунобиологические свойства.

Для изготовления эмульгированных вакцин в РФ используют масляные адъюванты, которые образуют с водными суспензиями антигена эмульсию обратного типа «вода/масло», которая вызывает у привитых птиц образование напряженного и продолжительного иммунитета.

В связи с этим при конструировании эмульгированной формы вакцины против вирусного гепатита утят типа I использовали масляный адъювант АБ-4М (В/М) производства ЗАО «Петрохим», Россия.

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

Сорбированную форму ГОА вакцины готовили при постоянном перемешивании инактивированного антигена 0,3% конечной концентрации адьюванта на магнитной мешалке в течение 30 минут при комнатной температуре.

Эмульгированную форму вакцины готовили на гомогенизаторе при скорости вращения винта 3000 оборотов/минуту в течение 5-10 минут и температуре 10°C. Соотношение антигена и адьюванта составило 30:70 соответственно (табл. 6)

Таблица 6 - Компонентный состав сорбированной и эмульгированной форм инактивированной вакцины против ВГУ-I

Наименование форм вакцины	Титр вируса до инактивации, lg ЭЛД ₅₀ /см ³	Соотношение	
		антигена	адьюванта
Сорбированная вакцина	7,5±0,5	остальное	0,3% ГОА
Эмульгированная вакцина	7,5±0,5	30%	70% масло АБ-4М (В/М)

В процессе исследований установлено, что наиболее оптимальным процентным соотношением антигена к адьюванту 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 физико-химических и иммунобиологических свойств.

2.2.5 Изучение физико-химических свойств инактивированной эмульгированной вакцины в зависимости от продолжительности ее хранения

В контроле эмульгированных вакцин существенное значение имеют их физико-химические свойства, такие как стабильность эмульсии, гранулометрический состав и кинематическая вязкость. Гранулометрический состав (размер микрочастиц дисперсной фазы вакцины) напрямую влияет на стабильность вакцины и, тем самым, косвенно – на эффективность в применении биопрепарата. Это связано с тем, что макрофаги, как начальное звено иммуногенеза, способны захватывать частицы размером не более 5 мкм. Следовательно, чем меньше частицы дисперсной фазы вакцинной эмульсии и гомогеннее ее состав, тем выше иммуногенные свойства вакцины. Частицы большого размера приводят к увеличению вязкости вакцины, что приводит к необратимым изменениям в вакцинной эмульсии и ее разрушению с выделением водной фазы на дно флакона. Кроме того, известны случаи «превращения» эмульсии обратного типа «вода-масло» в эмульсию прямого типа «масло-вода» в процессе их длительного хранения, вследствие сдвига гидрофильно-липофильного баланса эмульгаторов, входящих в состав адъювантов, что считается недопустимым.

Таким образом, изучение физико-химических свойств эмульгированных вакцин необходимо, в качестве одного из звеньев контроля их качества в процессе производства и хранения.

Физико-химические свойства эмульгированной вакцины против ВГУ-I изучали после изготовления и в процессе хранения (12 месяцев) при указанной температуре: тип вакцинной эмульсии, ее стабильность, гранулометрический состав и кинематическая вязкость.

Стабильность эмульсии определяли методом центрифугирования и методом быстрого старения (табл. 7).

Таблица 7 - Физико-химические свойства инактивированной эмульсионной вакцины против ВГУ-I

Срок хранения	Вязкость, мм ² /с	Стабильность эмульсии, %	
		Цетрифугиро вание	Быстрое старение
Свежеизготовленная	52,2	100	100
12 месяцев хранения	55,7	98,5	98,5

Данные, приведенные в таблице 7, показывают, что параметры физико-химических свойств свежеприготовленной вакцины и через 12 месяцев хранения при температуре (2–8)°С существенно не изменились, что свидетельствует о высокой стабильности эмульсии в вакцине.

Данные по изучению стабильности вакцинной эмульсии с помощью центрифугирования и «быстрого старения» показало, что свежеприготовленная партия эмульгированной вакцины была стабильна во всех тестах, отслоения водной фазы не отмечалось. Через 12 мес. хранения эти показатели практически не изменились: во всех 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 физико-химических свойств образцов эмульгированной вакцины показали высокую стабильность и гомогенность вакцинной эмульсии.

Определение стерильности инактивированной вакцины проводили по ГОСТ 28085-2013. Из каждого образца инактивированной вакцины производили посев на стерильные питательные среды: МПА, МПБ, МППБ под вазелиновым маслом и бульон Сабуро – по три пробирки. Для выявления аэробов высевали $0,5 \text{ см}^3$ посевного материала в одну пробирку, а для выявления анаэробов – $1,0 \text{ см}^3$. Пробирки с посевами на всех средах, кроме среды Сабуро, выдерживали в термостате при $(37,0 \pm 0,5) \text{ }^\circ\text{C}$ в течение 7 суток, на среде Сабуро – при $(22,5 \pm 2,5) \text{ }^\circ\text{C}$ в течение 14 суток. По истечении указанного срока аналогичным образом выполняли, пересев на те же питательные среды, исключая МПА. Одновременно проводили контроль стерильности питательных сред: три пробирки с каждой средой выдерживали в термостате в течение 14 суток при $(37,0 \pm 0,5) \text{ }^\circ\text{C}$, со средой Сабуро – при $(22,5 \pm 2,5) \text{ }^\circ\text{C}$.

Установлено, что высевы образцов инактивированной вакцины были свободны от контаминации бактериями и грибами.

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 введением 5-кратной прививной дозы ($3,0 \text{ см}^3$) 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 физико-химических показателей качества сорбированной и эмульгированной вакцины проводили оценку их антигенных 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.

Через 30 и 60 суток после иммунизации от вакцинированных и контрольных уток брали кровь с целью определения уровня антител в сыворотке крови в реакции нейтрализации и ИФА. Полученные результаты представлены в таблице 8.

Таблица 8 - Уровень специфических антител в сыворотке крови вакцинированных против вирусного гепатита утят типа I инактивированной сорбированной и эмульгированной вакциной (n=8)

№ п/п	Наименование групп	Сроки после вакцинации, сутки	
		30	60
		Уровень антител РН, log ₂ / ИФА	
1	Утки, вакцинированные эмульгированной вакциной свежеприготовленной	9,5/9782	10/9922
2	Утки, вакцинированные сорбированной 0,3% ГОА вакциной свежеприготовленной	9,5/6076	9,0/5270
3	Утки не вакцинированные	566±65	522±54

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

Данные, приведенные в таблице 8, показывают, что инактивированная вакцина из штамма «ВН-3» ВГУ-І в прививной дозе вызывала положительную сероконверсию в организме уток, индуцируя выработку специфических антител как к сорбированной, так и к эмульгированной вакцине. Результаты реакции нейтрализации и ИФА значимо коррелировали.

Результаты изучения антигенной активности, сорбированной и эмульгированной форм вакцин через 12 месяцев хранения представлены в таблице 9.

Таблица 9 - Уровень специфических антител в сыворотке крови уток, вакцинированных сорбированной и эмульгированной вакциной после 12 – месячного хранения (n=8)

№ п/п	Наименование групп	Сроки после вакцинации, сутки	
		30	60
		Уровень антител РН, log ₂ / ИФА	
1	Утки, вакцинированные эмульгированной вакциной со сроком хранения 12 месяцев	9,5/9225	9,0/9872
2	Утки, вакцинированные сорбированной 0,3% ГОА вакциной со сроком хранения 12 месяцев	9,0/5876	8,5/5055
3	Утки не вакцинированные	516±55	512±45

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

Результаты серологических исследований сыворотки крови уток, привитых образцами свежеприготовленной и хранившейся вакцины против вирусного гепатита, приведенные в таблице 9, свидетельствуют о том, что хранение инактивированной эмульгированной вакцины против ВГУ-І в

течение 12 мес. при температуре от 2 до 8°C не привело в существенному снижению антигенной активности препарата. 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 антигенные свойства инактивированной эмульгированной вакцины против ВГУ-I 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. Уток разделили на три подопытные группы, по 10 голов в каждой. Обе формы инактивированной вакцины и живую против ВГУ-1 вводили уткам подкожно в область нижней трети шеи, в объеме 0,6 см, однократно. Уток контрольной группы, в количестве 5 голов, не прививали. В течение 9 месяцев после вакцинации, начиная с 14 сут, затем в 30 сут и далее, через каждый месяц, от всех уток брали кровь и получали сыворотку для серологического исследования. Наличие специфических антител к вирусу ВГУ-1 определяли методом ИФА.

Опыты показали, что обе инактивированные вакцины в испытанных дозах не вызывали местных воспалительных и общих реакций. Данные сероконверсии у уток представлены в таблице 10 и на рисунке 2.

Таблица 10 - 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
Не вакцинированные утки	543	543	543	543	543	543	543	543	543	543

Примечание: * - обратные значения титра антител в ИФА

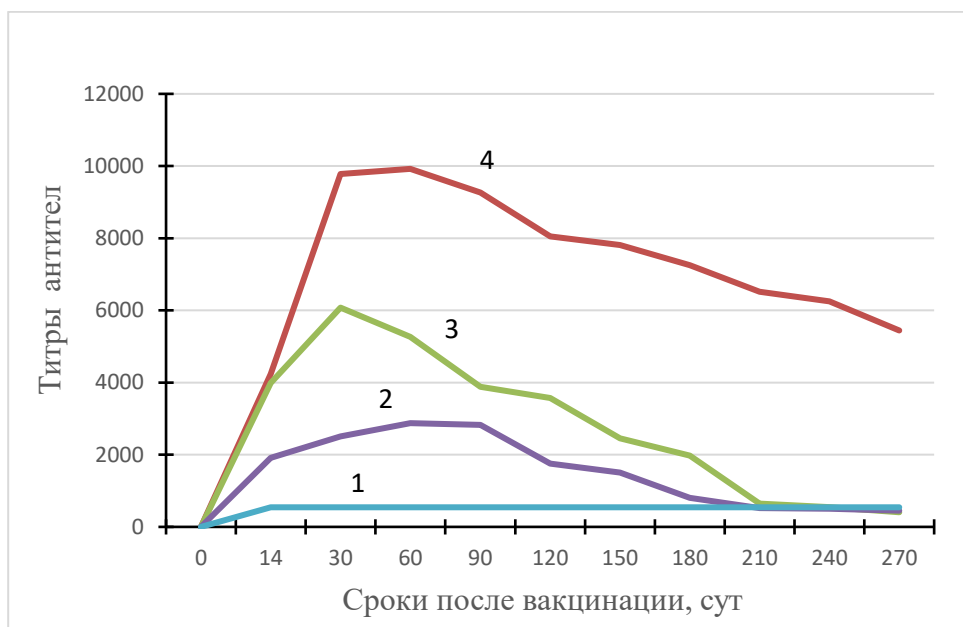


Рисунок 2 - Динамика образования специфических антител у вакцинированных уток живой и инактивированной вакциной против вирусного гепатита утят типа I.

Примечание: 1 – не вакцинированные утки; 2 – утки, вакцинированные вирусвакциной эмбриональной ВНИВИП; 3 – утки, вакцинированные инактивированной сорбированной 0,3% ГОА вакциной; 4 – утки, вакцинированные инактивированной эмульгированной вакциной.

Данные, приведенные в таблице 10 и на рис. 2 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 антигенных свойств инактивированной эмульгированной вакцины против вирусного гепатита утят типа I

Для оценки антигенных 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. Вылупленных утят содержали в изолированных боксах.

2.2.8.1 Определение антител к вирусу гепатита в экстракте желтка яиц

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. 11.

Таблица 11 - 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	9436	9056	9012	9087	9564
через 12 недель	6334	6936	6836	6295	6253
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 9231 ± 145 до 6531 ± 12 от уток в возрасте 8-12 недель после вакцинации, соответственно. В желтке яиц от контрольных уток средний титр антител равнялся 512 ± 45 .

2.2.8.2 Определение антител к вирусу гепатита в сыворотке крови суточных утят

У суточных утят опытной группы 1 брали сыворотку крови для определения уровня специфических антител против вирусного гепатита утят типа I.

Таблица 12 - Уровень трансвариальных антител в сыворотке крови суточных утят

Наименования группы	Титр антител в ИФА				
	Количество утят (n=5)				
	1	2	3	4	5
Утята, от вакцинированных уток:					
через 8 недель	6436	6356	6612	6087	6564
через 12 недель	5334	5536	5436	5295	5753
Утята, от не вакцинированных уток:					
через 8 недель	475	503	485	525	543
через 12 недель	487	522	512	542	528

Примечание: титры антител в обратных величинах.

Результаты исследований, представленные в табл. 12, показывают, что уровень материнских антител в сыворотке крови суточных утят, полученных от вакцинированных уток, составил 100%. Средний титр антител в сыворотке крови суточных утят от уток в возрасте 8 недель после вакцинации равнялся 6411 ± 132 , $P < 0,05$, а от уток в возрасте 12 недель после вакцинации 5471 ± 142 , $P < 0,05$, соответственно. Полученные нами данные по оценке

титра антител в желтке яиц и в сыворотке крови суточных утят согласуются с ранее полученными данными в реакции нейтрализации [10].

Таким образом, испытанная инактивированная как сорбированная, так и эмульгированная вакцина индуцировала иммунологическую перестройку в организме вакцинированных уток продолжительностью в течение репродуктивного периода.

3. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЙ

В настоящее время опубликовано значительное количество работ об успешном применении, наряду с живыми вакцинами, инактивированных вакцин против вирусных болезней птиц. В результате достигнут существенный прогресс в усовершенствовании специфической профилактики инфекционных болезней птиц [5, 6, 13, 14, 16].

Вирусный гепатит утят типа I является наиболее опасной вирусной болезнью у утят, требующей обязательной специфической профилактики.

За рубежом для обеспечения стойкого эпизоотического благополучия по ВГУ-1 применяются живые и инактивированные вакцины, которые обеспечивают создание напряженного и продолжительного иммунного ответа у птиц.

В Российской Федерации и странах СНГ широкое применение нашли живые вакцины, а фундаментальные научные разработки по созданию инактивированной вакцины против ВГУ-1 не проводятся.

Необходимость в разработке инактивированной вакцины против ВГУ-1 возникла в результате следующих причин:

- непродолжительный иммунитет у родительского стада при применении живых вакцин;
- необходимость сокращения количества прививок с целью уменьшения стрессов для родителей;
- изготовление вакцинного препарата, не содержащего в своем составе инфекционного вируса;
- отсутствие отечественной инактивированной вакцины против ВГУ-1.

В биотехнологии изготовления инактивированной вакцины против ВГУ-1 основное внимание уделяли следующим этапам:

- подбору производственного штамма ВГУ-1;
- оптимальным условиям его культивирования;
- выбору инактиванта и отработке методики инаktivации вируса;

- разработке компонентного состава инактивированной вакцины против ВГУ-1;
- проведению контроля физических и иммунобиологических свойств вакцины;
- испытанию антигенных свойств вакцины.

Получение вирусного материала занимает важное место в биотехнологии изготовления инактивированной вакцины против вирусного гепатита утят типа I.

В опытах по подбору штамма вируса гепатита использовали депонированный в Государственной коллекции вирусов в НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского, ФГБНУ «ФНИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России под № 2859 и патентован как «Штамм «ВН-3» вируса гепатита утят типа I рода *Avihepatovirus* семейства *Picornaviridae* для производства вакцинных препаратов и диагностических наборов» [60].

При изучении некоторых биологических свойств штамма на различных биологических моделях, характеризующих его как вирус гепатита утят типа I, установили, что вакцинный штамм «ВН-3» РНК – содержащий вирус, размер вириона 30-40 нм. не имеет внешней оболочки, сферической формы. Штамм «ВН-3» вируса гепатита утят типа I патогенный (вирулентный) для 11-12 – суточных утиных эмбрионов, а при заражении утят внутримышечно, подкожно и интраназально в дозе $3,0 \text{ lg ЭЛД}_{50}/0,2 \text{ см}^3$ не вызывает гибель и клиническое проявление болезни у утят 2 – суточного возраста, терморезистентный, генетически однородный, в культурах клеток вызывал острую форму вирусной инфекции, антигенно родственной с эпизоотическими штаммами и высоко иммуногенный. Полученные показатели штамма согласуются с данными других исследователей [28, 54, 55].

При молекулярно-генетическом исследовании установлено, что штамм «ВН-3» имеет 98% гомологии с изолятами гепатита I, обладает выраженной интерферогенностью.

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 в лиофилизированном состоянии под вакуумом при той же температуре – 5 лет.

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 показали, что при культивировании на развивающихся утиных эмбрионах вирус накапливался в наибольшем титре.

Оптимальными условиями накопления вируса являются: 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 $7,5\text{ lg ЭЛД}_{50}/\text{см}^3$.

Ключевым этапом в изготовлении инактивированных вакцин является выбор инактиватора и метода устранения его инфекционной активности, что в полной мере определяет иммуногенные свойства вакцины. Главным критерием эффективности избранного метода являются полнота и необратимость инактивации вирулентных свойств вируса с максимальным сохранением целостности антигенных структур вирионов, обеспечивающих специфический иммунный ответ у привитого организма [27, 62].

В опытах изучали инактивирующее действие аминоэтилэтиленимина на вирус гепатита утят типа I. По данным ряда авторов производные этиленимина минимально изменяют ответственные за антигенность белковые структуры вириона, а антигены продолжительное время сохраняют свои свойства при хранении [27, 62].

Изучение кинетики инактивирующего действия АЭЭИ показало, что снижение титра вируса гепатита следовало простой экспоненциальной кривой

(рис. 1). Это позволяло достаточно надежно контролировать процесс инактивации.

Полученные данные кинетики инактивации ВГУ-1, обработанного различными концентрациями (0,02, 0,05 и 0,1%) АЭЭИ при температуре 37°C в течение 24 часов при рН 7,3-7,5 в режиме постоянного перемешивания, показали, что скорость инактивации вируса была пропорциональна концентрации препарата в вируссодержащей 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.

Полученные нами результаты показали прямую зависимость процесса инактивации ВГУ-1 от концентрации инактиванта в вируссодержащем материале, что подтверждало ранее полученные данные в отношении чувствительности вирусов к химическим агентам, применяемым в качестве инактивантов [5, 10, 16].

На основании проведенных исследований нами установлено, АЭЭИ в конечной концентрации 0,1% при температуре 37°C и экспозиции 24 часа полностью и необратимо инактивировали вирус гепатита утят с сохранением его антигенных свойств. Антигенные свойства вируса, инактивированного АЭЭИ, и исходного вируса определяли на 2-суточных утятах при подкожной инокуляции. Полученные данные показали, что исходный и инактивированный АЭЭИ антиген индуцировал выработку специфических антител в титре 8,0--9,0 \log_2 .

При изготовлении лабораторных образцов сорбированной и эмульгированной форм вакцины в качестве инактиванта использовали АЭЭИ в конечной концентрации 0,1%.

Известно, что антигенная активность инактивированных противовирусных вакцин зависит от качества и количества антигенов и адъювантов. Инактивированные антигены в сочетании с адъювантами

обладают более выраженной антигенной активностью по сравнению с их водными растворами.

Для изготовления сорбированной формы инактивированной вакцины широко используют гель гидроокиси алюминия (ГОА).

Для изготовления эмульгированных вакцин в РФ используют масляные адъюванты, которые образуют с водными суспензиями антигена эмульсию обратного типа «вода/масло», которая вызывает у привитых птиц образование напряженного и продолжительного иммунитета. Данные многих исследований [4, 5, 13, 16, 18] при испытании широкого спектра масляных адъювантов и эмульсий различных типов показали, что вакцины против вирусных болезней птиц на основе масляного адъюванта Montanide ISA70, образующего эмульсию обратного типа, имели наиболее оптимальные физические показатели и высокие иммунобиологические свойства.

Исследования по конструированию оптимальной формы инактивированной вакцины против ВГУ-1 и подбору эффективных адъювантов были важным этапом.

При изготовлении эмульгированной формы вакцины против вирусного гепатита утят типа I использовали масляный адъювант АБ-4М (В/М) производства ЗАО «Петрохим», Россия.

При выборе адъювантов для изготовления сорбированной формы инактивированной вакцины против ВГУ-1 использовали гель ГОА в конечной концентрации 0,3%.

При конструировании эмульгированной формы соотношение вирусного сырья в водной фазе и масляного адъюванта АБ-4М (В/М) составило как 30:70, рекомендованном производителем, которое в дальнейшем считали оптимальным с обязательным учетом инфекционной активности вируса до инактивации.

Результаты опытов показали, что для приготовления инактивированной сорбированной и эмульгированной форм вакцины против вирусного гепатита

необходимо использовать вирусный антиген с активностью до инактивации $7,0-8,0 \lg \text{ЭЛД}_{50}/\text{см}^3$.

Определение физико-химических свойств (стабильность эмульсии, гранулометрический состав, вязкость) инаktivированных вакцин является одним из звеньев контроля их качества в процессе производства и хранения [5, 16].

Физико-химические свойства инаktivированной эмульгированной вакцины в процессе хранения существенно не изменились и оставались в пределах нормативных требований. Об этом свидетельствовали высокая стабильность вакцинной эмульсии, низкая вязкость и высокая гомогенность дисперсной фазы в вакцине как до, так и после хранения в течение 12 месяцев при температуре от 4 до 8 °С.

Параллельно исследованиям физико-химических показателей качества сорбированной и эмульгированной вакцины проводили оценку их антигенных свойств на утках свежеприготовленной и хранившейся в течение 12 месяцев при температуре (2-8) °С вакцины.

Результаты серологических исследований сыворотки крови уток, свидетельствовали о том, что хранение инаktivированной эмульгированной вакцины против ВГУ-I в течение 12 мес. при температуре от 2 до 8°С не привело в существенному снижению антигенной активности препарата. Инаktivированная 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 антигенные свойства инаktivированной эмульгированной вакцины против ВГУ-I и может быть рекомендован для хранения данного препарата.

Изучение динамики формирования поствакцинального иммунитета у уток, иммунизированных сорбированной и эмульгированной вакциной против

вирусного гепатита утят типа I показало, что инактивированная вакцина из штамма «ВН-3» ВГУ-I в прививной дозе вызывала положительную сероконверсию в организме уток, индуцируя выработку специфических антител как к сорбированной, так и к эмульгированной вакцине.

Данные исследований показали, что уровень антител в сыворотке крови вакцинированных уток эмульгированной вакциной был в 2-3 раза выше по сравнению с сорбированной вакциной в зависимости от сроков исследований после иммунизации. 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 вакциной, они постепенно снижались. Полученные данные свидетельствуют о том, что инактивированная эмульгированная вакцина антигенно активна на протяжении всего периода исследований.

Для оценки антигенных свойств инактивированной вакцины от вакцинированных и контрольных уток через 8 и 12 недель после вакцинации в желтке яиц и в сыворотке крови суточных утят определяли уровень специфических антител против вирусного гепатита утят типа I.

Результаты исследований показали, что в желтке яиц уровень материнских антител в ИФА колебался в пределах (9231 ± 145) - (6531 ± 125) от уток в возрасте 8-12 недель после вакцинации, соответственно. В желтке яиц от контрольных уток титр антител равнялся 512 ± 45 , а титр антител в сыворотке крови суточных утят от уток в возрасте 8-12 недель после вакцинации равнялся (6411 ± 132) - (5471 ± 142) , соответственно. Полученные нами данные по оценке титра антител в желтке яиц и в сыворотке крови суточных утят согласуются с ранее полученными данными в реакции нейтрализации [58].

Достоверно установлено, что инактивированная эмульгированная вакцина против вирусного гепатита утят типа I высоко антигенна, индуцирует у уток

формирование напряженного продолжительного иммунитета в течение всего репродуктивного периода, тем самым обеспечивает напряженный материнский иммунитет и потенциально увеличивает выживаемость потомства на ранних этапах жизни. Препарат пригоден для профилактики вирусного гепатита утят в стационарно неблагополучных хозяйствах.

4. 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 имея 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 $7,5 \lg$ ЭЛД₅₀/см³ 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 $37 \pm 0,5$ °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 срока 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 $7,0 \lg$ ЭЛД₅₀/см³.

7. Экспериментально показано, что эмульгированная инактивированная вакцина по антигенной активности и продолжительности иммунитета существенно превосходит вирусвакцину эмбриональную ВНИВИП против вирусного 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.

4.1 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);
- 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.

4.2 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.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АДВ – активно действующее вещество

АЭЭИ – аминоэтилэтиленимин

БОЕ – бляшкообразующая единица

ВСМ – вируссодержащий материал

ВГУ-I – вирус гепатита утят типа I

ГОА – гидроокись алюминия

УЭ – утиные эмбрионы

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ИФА – иммуноферментный анализ

УЭ – утиные эмбрионы

lg – логарифм по основанию 10

$lgK_{ин}$ - константа скорости инаktivации

log_2 - логарифм по основанию 2

МПА – мясо - пептонный агар

МПБ – мясо - пептонный бульон

ОП – оптическая плотность

РН – реакция нейтрализации

ЦПД – цитопатогенное действие

ТЦД₅₀/см³ - 50%-ная тканевая цитопатогенная доза в 1 см³

ЭЛД₅₀/см³ - 50%-ная эмбриональная летальная доза в 1 см³

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Безрукавая, И.Ю. Вакцина против вирусного гепатита утят из штамма ЗМ / И.Ю. Безрукавая // Пути обеспечения ветеринарного благополучия в промышленном животноводстве. – Киев. Южное отделение ВАСХНИЛ, 1978. – С. 90.
2. Белоусова, Р.В. Практикум по ветеринарной вирусологии: 3-е изд., перераб. и доп. / Р.В. Белоусова, Н.И. Троценко, Э. А. Преображенская//. – М.: Колос, 2013. – С. 248
3. Бондаренко, В. Иммуноферментный метод диагностики вирусного гепатита утят / В. Бондаренко // Вет. мед. Украины. - 1998. - №6. - С. 38 – 39.
4. Борисов, В.В. Инактивированные вакцины – возможные варианты применения в промышленном птицеводстве/ В.В. Борисов, А.В. Борисов, С.К. Старов // Матер. конф. по птицеводству. М., - 2003. – С. 208 - 209.
5. Борисова И.А. Разработка технологии изготовления и контроля инактивированной вакцины против ньюкаслской болезни и метапневмовирусной инфекции птиц: дис. ... канд. биол. наук / Борисова И.А.// -Владимир, 2008. - 167 с.
6. Бородина О.В. Разработка инактивированной эмульсионной вакцины против пастериллеза птиц: дис. ... канд.биол. Наук/О.В.Бородина//Ульяновск. – 2005. – 122 с.
7. Бубашко, О.А. Вирусный гепатит утят в Республике Беларусь и его профилактика / О.А. Бубашко// Эпизоотология, иммунология, фармакология и санитария. – 2005. – № 1. – С. 25 – 28.
8. Виноходов, О.В. Вирусные гепатиты птиц / О.В. Виноходов, В.О. Виноходов, Д.О. Виноходов // Архив вет. наук. – СПб, 1998. – С. 68-91.
9. Глейзер С., Фоменко В., Ирза В., и др. Специфическая профилактика вирусного гепатита утят /С. Глейзер, В.Фомнко, В.Ирза // Птицеводство, 2009; 3С. 44.

10. Глейзер Д.А. Получение инактивированного вируса инфекционного бронхита кур (штамм «Калужский») / Д.А. Глейзер, С.В. Фролов, А.В. Борисов, В.Ю. Кулаков // Ветеринарная патология. - 2008. - №4(27). - С.75-79.
11. Громов, И.Н. Влияние натрия тиосульфата на морфологический состав крови утят, вакцинированных против вирусного гепатита / И.Н. Громов, Д.Т. Соболев, А.М. Курилович // Исследования молодых ученых в решение проблем животноводства: Сб. статей Международной научно-практической конференции, г. Витебск, 22 – 23 мая 2001 г. – Витебск, 2001. – С. 55 – 56.
12. Гуславский А.И. Процессы разделения, очистки и концентрирования жидких систем в биотехнологии / А.И. Гуславский, В.М. Попова // Диагн., профилактика и меры борьбы с особо опасными, экзотич. и зооантропоноз. бол. ж-ных: матер. Междунар. науч.-практ. Конф. - Покров, 2000. - С. 124-126.
13. Джавадов Э.Д. Вирус-индуцированные иммуносупрессии и способы их предупреждения в промышленном птицеводстве: дис. ... д-ра. вет. Наук / Э.Д. Джавадов // Москва. – 2004. – 345 с.
14. Джавадов, Э.Д. Профилактика болезней птиц инактивированными вакцинами серии «Авикрон» / Э.Д. Джавадов, И.Н. Вихрева, М.Е. Дмитриева, А.С. Дубовой, Г.Н. Самусева // Матер. Междунар. конгр.-СПб, 2009.-С.30-31.
15. Дьяченко, Н.С. Реакция пассивной гемагглютинации и ее применение при вирусном гепатите / Н.С. Дьяченко // Пассивная гемагглютинация и ее применение в вирусологии. – Киев, 1979. – С. 113.
16. Ельников В.В. Технология изготовления ассоциированной инактивированной вакцины против ньюкаслской болезни и реовирусного теносиновита птиц: автореф. дис. ... канд. вет. наук / В.В. Ельников // Владимир. – 2003. – 24 с.

17. Игнатов П.Е. Иммунитет и инфекция // П.Е. Игнатов/ М.,: Время. – 2002. – 352 с.
18. Ирза, В.Н. Эмбриональная вакцина против ВГУ / В.Н. Ирза, В.Ю. Фоменко, С.В. Глейзер [и др.] // Матер. XVI конф.: «Достиж. В соврем. птицеводстве: исследования и инновации». - Сергиев Посад, 2009. – С. 362 – 364.
19. Кислюк С. Оптимальный набор кормовых добавок в условиях повышения цен на сырье /С. Кислюк // Птицеводство, 2008. - №7. - С.21-22.
20. Князев, В.П. Некоторые аспекты диагностики, лечения и специфической профилактики вирусных инфекций уток / В.П. Князев, О.В. Белорыбкина, С.Р. Кременчугская [и др.] // Владимир, 2003. – 60 с.
21. Князев, В.П. Болезни водоплавающих птиц: монография / В.П. Князев // Владимир, 2010. – 160с.
22. Князев, В.П. Вирусный гепатит утят (уток) / В.П. Князев // Владимир, 2013. – 325с.
23. Курилович, А.М. Диагностика и профилактика вирусного гепатита утят / А.М. Курилович, В.С. Прудников, Б.Я // Ученые записки ВГАВМ. – Витебск. – 1999. – Т. 35. – 4.1. – С. 74 – 76.
24. Курилович, А.М. Влияние иммуностимуляторов на напряженность гуморального иммунитета у утят, вакцинированных против вирусного гепатита / А.М. Курилович // Сб. статей Международной научно-практической конференции, г. Витебск, 22 – 23 мая 2001г. – Витебск, 2001. – С. 139 – 141.
25. Курилович, А.М. Влияние иммуностимуляторов на напряженность гуморального иммунитета и показатели иммунной реактивности организма у утят, вакцинированных против вирусного гепатита / А.М. Курилович, В.С. Прудников // Ветеринарная медицина Беларуси. – 2002. - №1. – С. 10 – 12.
26. Курилович, А.М. Иммуноморфогенез у утят, вакцинированных против вирусного гепатита, и влияние на него натрия тиосульфата: автореф. дис. ... канд. ветеринар. наук. / А. М. Курилович // . – Витебск, 2003. – 20с.

27. Лезова, Т.А. Вирулицидная активность координационных соединений этиленмина в отношении вирусов / Т.А. Лезова, В.В. Михалишин // Актуал. пробл. инфекц. патол. с.-х. ж-х: матер. Междун. науч. конф., посвящ. 45-летию ФГУ «ВНИИЗЖ». Владимир, 2003. – С.483 - 487.
28. Леонов, И.К. Способность к репликации вакцинных штаммов вируса гепатита утят в культурах клеток /И.К.Леонов // Матер. XVIII междунар. конф.: Инновационное обеспечение яичного и мясного птицеводства России. – Сергиев Посад, 2015. – С. 483-484.
29. Леонов, И.К. Биологические свойства вакцинных штаммов вируса гепатита утят типа 1: автореф. дис. ... канд. вет. наук: 06.02.02/И.К. Леонов //– Спб., 2017. – 23с.
30. Макаров В. Основы инфекционной иммунологии /В. Макаров, А. Гусев, У.Гусев, О. Сухаров // Владимир-Москва: Фолиант. – 2000. – в 176 с.
31. Малиновская, Г.В. Опыт использования пассивной гемагглютинации для контроля поствакцинального иммунитета против вирусного гепатита утят / Г.В. Малиновская // Конф. спец. Нечерноземной зоны.: Тез. докл. – НИВИ Нечерноземной зоны РСФСР. – Горький, 1979. – С. 128.
32. Малиновская, Г.В. Усовершенствование серологической диагностики вирусного гепатита утят и оценки поствакцинального иммунитета: автореф. ... канд. вет. наук./ Г.В. Малиновская // – Минск, 1981. – 21с.
33. Махалов А.Г. Научное обоснование использования биологически активных веществ в кормлении гусей: автореф. дис. ... д-ра с/х наук / А.Г. Махалов// Сергиев-Посад, 2008. - 43 с.
34. Медуницын, Н.В. Вакцинология / Н.В. Медуницын // Вакцинология: - 2-е изд., - М., 2004. - С. 162-184.
35. Никитина Н.В., Трефилов Б.Б., Дмитриев К.Ю. Способ определения специфических антител к вирусу гепатита утят типа I // Патент RU № 2684417, 08.05.2018.
36. 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.

37. Никитина Н.В. Специфическая профилактика вирусного гепатита утят типа I / Н.В. Никитина, Л.И. Явдошак , М.М. Трубицын. // Эффективное животноводство 2019.-№4(152).- С.34-35

38. Никитина Н.В. Сравнительная оценка антигенности живой и инактивированной вакцины против вирусного гепатита утят типа I / Н.В. Никитина, Л.И. Явдошак , М.М. Трубицын. // Ветеринария 2019.- №4.- С. 24- 27.

39. Никитина Н.В. Явдошак Л.И., Трубицын М.М. Вакцина против вирусного гепатита утят типа I // Патент RU № 2712948, 27.06.2019..

40. 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

41.Никитина Н.В. Новое в профилактике вирусного гепатита утят типа I // Мировое и российское птицеводство: состояние, динамика развития, инновационные перспективы. Материалы XX Международной конференции. Российское отделение Всемирной научной ассоциации по птицеводству // Н.В.Никитина, Л.И. Явдошак, М.М. Трубицын НП "Научный центр по птицеводству". 2020. С. 651-652

42. Отрыганьев, Г.К. Болезни эмбрионов птиц / Г.К. Отрыганьев, Б.Ф. Бессарабов, Ю.В. Исаев // М.: Россельхозиздат, 1981. – 136с.

43. Паникар, И.И. Клинико-эпизоотологическая и патологоанатомическая диагностика вирусного гепатита утят, протекающая в ассоциации с другими болезнями / И.И. Паникар, А.Т. Налеза // Интенсификация производства: сб. научн. Трудов. – Харьков, 1991. – С. 87 -90.

44. Паникар, И.И. Напряженность материнского поствакцинального иммунитета и профилактика вирусного гепатита у утят / И.И. Паникар, А.И.

Решетило // Вирусные болезни с.-х. ж-ных: тез. докл. Всерос. науч.- произв. конф. – Владимир, 1995. – С.274.

45. Паникар, И.И. Вирусный гепатит утят: эпизоотология, диагностика и специфическая профилактика / И.И. Паникар// - Пробл. зооинженерии и вет. мед. Сб. науч. статей, посвящ. 150-летию со дня основания Харьковского зооветеринарного ин-та. - Харьков, 2001. - № 9(33). - Ч.1. – С.24 – 27.

46. Прудников, В.С. Показатели иммунной реактивности утят раннего возраста, вакцинированных против вирусного гепатита с применением иммуностимуляторов // В.С. Прудников, А.М. Курилович, С.А. Большакова [др.] // Актуальные вопросы клинической и экспериментальной медицины: Тезисы докладов Международной научно-практической конференции молодых ученых. – Мн., 2000. – С. 386 – 387.

47. Сергеев, В.А. Вирусные вакцины. / В.А. Сергеев // - Киев: Урожай, 1993. - С. 159-183.

48. Стрельников, А.П. Патоморфологическая характеристика вирусного гепатита утят/ А.П. Стрельников // Ветеринария. – 1964а. – № 1. – С.57.

49. Стрельников, А.П. Патоморфология вирусного гепатита утят: автореф. дис. ... канд. вет. наук. / А.П. Стрельников // – М., 1964б. – 22с.

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

51. Тобоев Г. Оценка мясных качеств гусей линдовской породы / Г. Тобоев // Птицеводство, 2008. - №7.- С.26-27.

52. Трефилов Б.Б. Разработка и внедрение средств диагностики и специфической профилактики наиболее опасных вирусных болезней птиц (инфекционный ларинготрахеит, вирусный энтерит гусей, реовирусный теносиновит) : дис. ... д-ра вет. наук / Б.Б. Трефилов // – СПб., 2000.

53. Трефилов, Б.Б. Разработка инактивированной вакцины против реовирусного теносиновита кур. Новые фармак. средства в ветеринарии. / Б.Б. Трефилов, Р.Н. Коровин, А.С. Дубовой, В.В. Картамышева// Материалы 12-ой междунар. межвуз. научно-практ. конф. - СПб., 2000, - с. 102-103.

54. Трефилов, Б.Б. Биологические свойства вакцинных штаммов вируса гепатита утят / Б.Б. Трефилов, И.К. Леонов // Материалы междунар. конгр. – СПб, 2014. – С. 90 – 91.
55. Трефилов, Б.Б. Антигенная специфичность вакцинных штаммов вируса гепатита утят типа 1 / Б.Б. Трефилов, И.К. Леонов, Н.В. Никитина [и др.] // Вопросы нормативно-правового регулирования в ветеринарии. - СПб, 2015. - № 4. - С. 47 – 49.
56. Трефилов, Б.Б. Культуральные и антигенные свойства вируса гепатита утят / Б.Б. Трефилов, И.К. Леонов, Н.В. Никитина // Вопр. нормативно-правового регулирования в ветеринарии. – СПб, 2015. – № 4. – С. 35 – 38.
- 57.Трефилов Б.Б. Вирусный гепатит утят типа I (эпизоотология патогенез и диагностика) / Б.Б. Трефилов, Н.В. Никитина, К.Ю. Дмитриев, М.М. Трубицын // Эффективное животноводство, 2017.- №3 (177).- С.16-17**
58. Трефилов Б.Б. Инактивированная эмульгированная вакцина против вирусного гепатита утят типа I. I / Б.Б. Трефилов, Н.В. Никитина, М.М. Трубицын. // Ветеринария, 2018. - № 2. – С. 20 – 23.
59. Трефилов, Б.Б. Кинетика инактивации вируса гепатита утят типа I / Б.Б. Трефилов, Н.В. Никитина, И.К. Леонов // Вопросы вирусологии, 2018. - № 63(3). – С. 135 – 138.
60. Трефилов Б.Б., Никитина Н.В., Явдошак Л.И., Трубицын М.М. Штамм «ВН-3» вируса гепатита утят типа I рода Avihepatovirus семейства Picornaviridae для производства вакцинных препаратов и диагностических наборов // Патент RU № 2675995, 08.05.2018.
61. Трефилов, Б.Б. Сравнительная оценка антигенности живой и инактивированной вакцины против вирусного гепатита утят типа 1 / Б.Б. Трефилов, Н.В. Никитина, Л.И. Явдошак, М.М. Трубицын // Ветеринария. – 2019. – № 4. – С. 24-27.
62. Улупов Н.А. Аминоэтилэтиленимин -средство инактивации инфекционности вируса ящура./ Н.А. Улупов, В.В. Михалишин, А.А. Гусев,

Т.А. Лезова // Материалы научной конференции, посвященной 40-летию ФГУ «ВНИИЗЖ». Владимир; 1998; 53-62.

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

64. Anchun C. Study on bivalent attenuated vaccines against DP and DVH (duck virus hepatitis) / C. Anchun, W. Mingshu [et al.] // Chin. J. Anim. Vet. Sci. – 1996. – № 5. – Vol. 27. – P. 27.

65. Anchun C. Development and application of a reverse transcriptase polymerase chain reaction to detect Chinese isolates of duck hepatitis virus type 1 / C. Anchun, W. Mingshu, X. Hongyi [et al.] // J. Microbiol. Methods. – 2009. – V. 77. – P. 332 – 336.

66. Anderson P. A novel and rapid method to quantify cytolytic replication of picornaviruses in cell culture / P.A. Anderson, S. Alm, K. Edman [et al.] // J. Virol. Methods. – 2005. – V. 130. – P. 117 – 123.

67. Beck, I. Investigation of several selected adjuvants regarding their efficacy and side effects for the production of a vaccine for parakeets to prevent a disease caused by a paramyxovirus type 3/ I. Beck, H. Gerlach, E. Burkhardt, E.F. Kaleta // Vaccine. - 2003. - Vol. 21. - P. 1006 -1022.

68. Chen L. Simultaneous detection of duck hepatitis A virus types 1 and 3, and of duck astrovirus type 1, by multiplex RT-PCR/ L. Chen, M. Ma, R. Zhang [et al.] // VIROLOGICA SINICA. – 2014. - V. 29(3). – P. 196 – 198.

69. Chen L.L. Improved duplex RT-PCR assay for differential diagnosis mixed infection of duck hepatitis A virus type 1 and type 3 in ducklings / L.L. Chen, Q. Xu, R.H. Zhang [et al.] // J. Virol. Methods. – 2013. – V. 192. – P. 12 – 17.

70. Chen Y. Comparison of bush sophora root polysaccharide and its sulfate's anti-duck hepatitis A virus activity and mechanism. / Y.Chen, W Xiong, L. Zeng [et al.] // Carbohydr. Polym. – 2014. – V.102. - P. 333–340.

71. Ding C. Molecular analysis of duck hepatitis virus 1 / C. Ding, D. Zhang // Virology. – 2007. – V. 361. – P. 9 - 17.

72. Erfan A.M. Epidemiology and molecular characterisation of duck hepatitis A virus from different duck breeds in Egypt / A.M. Erfan, A.A. Selim, M.K. Moursi [et al.] // *J. Vet. Microbiol.* – 2015. – V. 177. – P. 347 – 352.
73. Fitzgerald J.E. Histopathologic changes induced with duck hepatitis virus in the developing chicken embryo / J.E. Fitzgerald, L.E. Hanson, J. Simon // *Avian Dis.* – 1969. – V. 13. – N. 1. – P. 147.
74. Fu Y. Molecular detection and typing of duck hepatitis A virus directly from clinical specimens / Y. Fu, M. Pan, X. Wang [et al.] // *Vet. Microbiol.* – 2008. – V. 131. – P. 247–257.
75. Fu Y. Complete sequence of a duck astrovirus associated with fatal hepatitis in ducklings. / Y. Fu, M. Pan, X. Wang [et al.] // *J. Gen. Virol.* – 2009. – V. 90. – P. 1104–1108.
76. Fu Y.Z. Protective immune responses in ducklings induced by a suicidal DNA vaccine of VP1 gene of duck hepatitis virus type 1 / Y.Z. Fu, Z.Y. Chen, C.F. Li [et al.] // *J. Vet. Microbiol.* – 2012. – V. 160. – P. 314 – 318.
77. Gao J. Genetic variation of the VP1 gene of the virulent duck hepatitis A virus type 1 (DHAV-1) isolates in Shandong province of China / J. Gao, J. Chen, X. Si, Z. Xie [et al.] // *Virol. Sin.* – 2012. – V. 27. – P. 248 – 253.
78. Gough R.E. Studies with in-activated duck virus hepatitis vaccines in breeder ducks / R.E. Gough, D. Spackman // *Avian Pathol.* – 1981. – V. 10. – P. 471 – 479.
79. Gough, R.E. Duck hepatitis virus type I influenza in mallard ducks (*Anas platyrhynchos*) / R.E. Gough, A.S. Wallis and I // *Vet. Rec.* – 1986. – V. 119. – P. 602.
80. Gough R.E. Picornaviridae / R.E. Gough, M.S. McNulty // *In Poultry Diseases*, 6th Edition. Eds Pattison M., McMullin P.F., Bradbury J.M., Alexander D.J. Elsevier / Butterworth-Heinemann. – 2008. – P. 350 – 358.
81. Gu C.Q. Cytokine gene expression in the liver of ducklings infected with duck hepatitis virus – 1 JX strain / C.Q. Gu, C.Q. Xei, X.Y. Hu [et al.] // *Poultry Science.* – 2012. – V. 91. – P. 583 – 591.

82. Guo Y. Preliminary identifications of the duck hepatitis virus serotypes isolated in Beijing, China. Chin. / Y. Guo, W. Pan // J. Vet. Med. (Zhongguo Shouyi Zazhi). – 1984. – V. 10. – P. 2 – 3.
83. Hassan, N.I. Studies on properties of duck virus hepatitis vaccine / N.I. Hassan, E.A. El-Ebiary [et al.]// Ass. Vet. Med. J. – 1992. – Vol. 26. – P. 52.
84. Hu Q. A one-step duplex rRT-PCR assay for the simultaneous detection of duck hepatitis A virus genotypes 1 and 3. / Q. Hu, D. Zhu, G. Ma [et al.] // J. Virol. Methods. – 2016. – V. 236. – P. 207 – 214.
85. Jin X. Identification and molecular analysis of the highly pathogenic duck hepatitis virus type 1 in Hubei province of China / X. Jin, W. Zhang, W.P. Zhang [et al.] // Res. Vet. Sci. – 2008. – V. 85. – P. 595 – 598.
86. Kaleta E. F. Duck viral hepatitis type I vaccination: monitoring of the immune response with a microneutralization test in Pekin duck embryo kidney cell culture / E.F. Kaleta // Avian Pathol. – 1988. - V. 17. – P. 325 – 332.
87. Kang M. Protective efficacy of a bivalent live attenuated vaccine against duck hepatitis A virus types 1 and 3 in ducklings / M. Kang, J. H. Roh, H. K. Jang // Veterinary Microbiology. – 2018. – V. 214. – P.108 – 112.
88. Kim M. C. Molecular analysis of duck hepatitis virus type I reveals a novel lineage close to the genus Parechovirus in the family Picornaviridae / M.C. Kim, Y.K. Kwon, S.J. Joh [et al.] // J. Gen. Virol. – 2006. – V. 87. – P. 3307 – 3316.
89. Kim M.C. Recent Korean isolates of duck hepatitis virus reveal the presence of a new geno- and serotype when compared to duck hepatitis virus type 1 type strains/ M. C. Kim, Y. K. Kwon, S. J. Joh [et al.] // Arch. Virol. – 2007a. – V. 152. – P. 2059 –2072.
90. Kim M.C. Development of one-step reverse transcriptase-polymerase chain reaction to detect duck hepatitis virus type 1/ M. C. Kim, Y. K. Kwon, S. J. Joh [et al.] // Avian Dis. –2007b. – V. 51. – P. 540 –545.

91. Kim M. C. Differential diagnosis between type-specific duck hepatitis virus type 1 (DHV-1) and recent Korean DHV-1 like isolates using multiplex polymerase chain reaction / M. C. Kim, Y. K. Kwon, S. J. Joh [et al.] // *Avian Pathology*. – 2008. – V. 37. – P. 171 – 177.
92. Kim M.C. Development of duck hepatitis a virus type3 vaccine and its use to protect ducklings against infections/ M. C. Kim, M. J. Kim, Y. K. Kwon [et al.] // *Vaccine*. – 2009. – V. 27. P. 6688–6694.
93. Levine P.P. A hitherto-undescribed virus disease of ducks in North America / P.P. Levine, J. Fabricant // *Cornell Vet.* – 1950. – V. 40. – P. 71 – 86.
94. Li J. Genetic characterization of duck hepatitis A viruses isolated in China / J. Li, Y. Bi, C. Chen [et al.] // *Virus Res.* – 2013. – V. 178. – P. 211 – 216.
95. Li C.F. Rapid detection of duck hepatitis A virus genotype C using reverse transcription loop-mediated isothermal amplification / C.F. Li, Z.Y. Chen, C.C. Meng [et al.] // *J. Virol. Methods*. – 2014. – V. 196. – P. 193 – 168.
96. Li K.P. Detection and differentiation of the vaccine strain and field isolates of duck hepatitis a virus type I using real-time RT-PCR and high-resolution melting assays / K.P. Li, S.C. Ou, J.H. Shien [et al.] // *Taiwan Veterinary Journal*. – 2015. – V. 41. – P. 1 – 7.
97. Li X. Evidence of VP1 of duck hepatitis A type 1 virus as a target of neutralizing antibodies and involving receptor-binding activity / X. Li, R. Zhao, W. Lin [et al.] // *Virus Research*. - 2017. - V. 227. - P. 240-244.
98. Lin S. L. Circulation and in vivo distribution of duck hepatitis A virus types 1 and 3 in infected ducklings / S. L. Lin, R. C. Cong, R. H. Zhang [et al.] // *Archives of Virology*. - 2016. - V. 161. - P. 405 – 416.
99. Liu G.Q. Genetic diversity of the VP1 gene of duck hepatitis virus type 1 (DHV-1) isolated from southeast China is related to isolated attenuation / G.Q. Liu, F. Wang, Z. Ni [et al.] // *Virus Res.* – 2008. – V. 137. – P. 137 – 141.
100. Liu M. Development and evaluation of a VP1-ELISA for detection of antibodies to duck hepatitis type 1 virus 3 / M. Liu, T. Zhang, Y. Zhang [et al.] // *Journal of Virological Methods*. – 2010. – V. 169. – P. 66 – 69.

101. Liu, N. Molecular characterization of a duck hepatitis virus 3-like astrovirus / N. Liu, F. Wang, J. Shi [et al.] // *Veterinary Microbiology*. – 2014. – V. 170. – P. 39–47.
102. Mao, S. Development and evaluation of indirect ELISAs for the detection of IgG, IgM and IgA1 against duck hepatitis A virus 1 / S. Mao, X. Ou, D. Zhu [et al.] // *Journal of Virological Methods*. - 2016. – V. 237. – P. 79 – 85.
103. Patnayak, D.P. Growth of vaccine strains of avian pneumovirus in different cell lines /D.P. Patnayak, A. Twari, S.M. Goyal // *Avian Pathol.* - 2005. - V.34. - P.123-126.
104. Roh, JH. Live attenuated duck hepatitis virus vaccine in breeder ducks: Protective efficacy and kinetics of maternally derived antibodies/ JH Roh, M. Kang.//*Vet. Microbiol.* – 2018. – V. 219. – P. 107-112.
105. Shen, Y. Development of an indirect ELISA method based on the VP3 protein of duck hepatitis A virus type 1 (DHAV-1) for dual detection of DHAV-1 and DHAV-3 antibodies / Y. Shen, A. Cheng, M. Wang [et al.] // *Journal of Virological Methods*. – 2015. - V. 225. - P. 30-34.
106. Sheng, X. D. Apoptosis induction in duck tissues during duck hepatitis A virus type 1 infection. / X. D. Sheng, W. P. Zhang, Q. R. Zhang [et al.] // *Poultry Science*. – 2014. – V. 93. – P. 527–534.
107. Soliman, M. The prevalence of duck hepatitis A virus types 1 and 3 on Korean duck farms. /M.Soliman, M.M. Alfajaro, M.-H. Lee [et al.] // *Arch Virol* . – 2015. – V. 160. – P. 493 – 498.
108. Song, C. Complete sequence and analysis of duck hepatitis virus type 1 strain FC64 / C. Song, X. Han, X. Qiu [et al.] // *Prog Vet Med*. - 2011. - V. 32. – P.17 – 20.
109. Song C. Effect of age on the pathogenesis of DHV-1 in Pekin ducks and on the innate immune responses of ducks to infection / C. Song, S. Yu, Y. Duan [et al.] // *Arch Virol*. – 2014a. – V. 159. – P.905 – 914.

110. Song, C. Virulent and attenuated strains of duck hepatitis A virus elicit discordant innate immune responses in vivo / C. Song, Y. Liao, W. Gao [et al.] // *Journal of General Virology*. – 2014b. – V.95. – 2716 – 2726.
111. Stone, H.D. The preparation and efficacy of manually emulsified Newcastle disease oil-emulsion vaccines / H.D. Stone // *Avian Dis.*-1991.-Vol. 35.-P.8-16.
112. Stone, H.D. Newcastle disease oil-emulsion vaccines prepared with animal, vegetable and synthetic oils / H.D. Stone // *Avian Dis.*-1997.-Vol. 41.-P.591-597.
113. Taylor, P.L. Indirect hemagglutination with duck hepatitis virus / P.L. Taylor, L.E. Hanson // *Avian Dis.* – 1967. – Vol. 11. – N 4. – P. 586-593.
114. Todd, D. Identification of chicken enterovirus-like viruses, duck hepatitis virus type 2 and duck hepatitis virus type 3 as Astroviruses / D. Todd, V.J. Smyth, N.W. Ball [et al.] // *Avian Pathol.* – 2009. – V. 38. – P. 21 – 30.
115. Toth, T.E. Humoral immune response of the duck to duckhepatitis virus: virus-neutralizing vs virus-precipitating antibodies / T. E. Toth, N.L. Norcross // *Avian Dis.* – 1981. – V. 25. – P. 17 – 28.
116. Tsai, P.R.W.a.H.-J. Viral infections of waterfowl. In: Swayne, D. E., Larry, J.R.G., McDougald, R., Nolan, Lisa K., Suarez, David L., Nair, Venugopal L. (Eds.), *Diseases of Poultry.*/ John Wiley & Sons, Inc., Oxford, UK. – 2013. - V. 13. –P. 417-463.
117. Tseng, C.H. Molecular analysis of duck hepatitis virus type 1 indicates that it should be assigned to a new genus / C.H. Tseng, N.J. Knowles, H.J. Tsai // *Virus Res.* -2007a. - V. 123. - P. 190 – 203.
118. Tseng, C.H. Molecular characterization of a new serotype of duck hepatitis virus. / C.H. Tseng, H.J. Tsai // *Virus Res.* – 2007b. – V. 126. – P. 19 – 31.
119. Wang, L. Classification of duck hepatitis virus into three genotypes based on molecular evolutionary analysis / L. Wang, M. Pan, Y. Fu [et al.] // *virus Genes.* – 2008. – V.37. – P. 52 – 59.
120. Wang, C. Recombinant VP1 protein of duck hepatitis virus 1 expressed in *Pichia pastoris* and its immunogenicity in ducks. *Acta. Virol.* /C. Wang, X. K. Li, T. C. Wu, [et al.]// *Acta. Virol.* – 2014. – V.58. – P. 333–339

121. Wang, Y. A multiplex PCR for detection of six viruses in ducks / Y. Wang, S. Zhu, W. Hong [et al.] // *Journal of Virological Methods*. – 2017. – V. 248. – P.172 – 176.
122. Wang, A. P. Protection against duck hepatitis a virus type 1 conferred by a recombinant avian adeno-associated virus /A. P. Wang, L. Liu, L. L. Gu, [et al.]// *Poultry Science*. – 2018. – V.0. – P. 1–7.
123. Wen, X. J. Detection, differentiation, and VP1 sequencing of duck hepatitis A virus type 1 and type 3 by a 1-step duplex reverse-transcription PCR assay / X.J. Wen, A.C. Cheng, M.S. Wang // *Poultry Science*. – 2014. – V. 93. – P. 2184 – 2192.
124. Wen, X. J. Molecular epidemiology of duck hepatitis a virus types 1 and 3 in China, 2010–2015. / X. J. Wen, D. Zhu, A. Cheng [et al.]//*Transbound. Emerg. Dis.* – 2018. – V. – 65. – P. – 10–15.
125. Woolcock, P.R. A plaque assay for duck hepatitis virus/ P.R. Woolcock, W.S.K. Chalmers, D. Davis // *Avian Pathol.* – 1982. – V. 11. – P. 607-610.
126. Woolcock, P.R. Duck hepatitis virus type I: studies with inactivated vaccines in breeder ducks / P.R. Woolcock // *Avian Pathol.* – 1991. – V. 20. – P. 509 – 522.
127. Woolcock, P.R. Duck virus hepatitis / P.R. Woolcock, G. Fabricant // *Diseases of Poultry*. – Ames, Iowa, 1991. – P. 597 – 608.
128. Woolcock, P.R. Duck hepatitis / P.R. Woolcock, J. Fabricant // *In Diseases of Poultry*, Edt.X, edt by B.W. Calnek. – 1997. – P.661.
129. Woolcock, P.R. Duck hepatitis / P.R. Woolcock, Y.M. Saif, A.M. Fadly [et al.] // *In: Diseases of Poultry 12th Edition*, 2008. - P. 373 - 384.
130. Wu, X. Y. Identification of a conserved B-cell epitope on duck hepatitis A type 1 virus VP1 protein. /X.Y. Wu, X.J. Li, Q.S. Zhang, S.Z. Wulin[et al.] //, 2015. *PLoS One* 10: e0118041.
131. Xie, J. Cytokine storms are primarily responsible for the rapid death of ducklings infected with duck hepatitis A virus type 1/J. Xie, M. Wang, A Cheng [et al.] // *Scientific Reports*. – 2018. – V. 8. – P. 6596.

132. Yang, M. Development and application of a one-step real-time Taqman RT-PCR assay for detection of Duck hepatitis virus type 1 / M. Yang, A. Cheng, M. Wang, H.Y. Xing // *J. Virol. Methods.* – 2008. – V. 153. – P.55 – 60.
133. Yao, F. Replication cycle of duck hepatitis A virus type 1 in duck embryonic hepatocytes / F. Yao, Y. Chen, J. Shi [et al.] // *J. Virology.* - 2016. – V. 491. – P. 73 – 78.
134. Yin, F. Development and evaluation of an inactivated bivalent vaccine against duck viral hepatitis / F. Yin, J. Li, S. Zhang, M. [et. al] // *J. Chinese Journal of Biotechnology.* – 2015. – V. 31 (11). – P.1579 – 1588.
135. Yun, T. Development of a one-step real-time RT-PCR assay using a minor-groove-binding probe for the detection of duck Tembusu virus / T. Yun, Z. Ni, J. Hua, [et al.] // *J. Virol Methods.* – 2012. – V. 181. - P.148 – 154.
136. Zander, D.V Principle of prophylaxis disease: diagnostic and control. / D.V. Zander, E.D. Bermudes, E.T. Mallinson// *Diseases of Poultry.* Jowa state Univ. Press, Ames, Jova. - 2003. – P. 11 – 60.
137. Zhang, R.H. Identification of a conserved neutralizing linear B-cell epitope in the VP1 proteins of duck hepatitis A virus rype 1 and 3 / R.H. Zhang, G.M. Zhou, Y.H. Xin [et al.] // *Vet. Microbiol.* – 2015. – V.180. – P. 196 – 204.
138. Zhang, R. Novel duck hepatitis A virus type 1 isolates from adult ducks show-ing egg drop syndrome/ R. Zhang , J. Chen, J. Zhang [et al.] // *Veterinary Microbiology.* – 2018. – V. 221. – P. 33–37.
139. Zhao, X. Studies on detection of antibody to duck hepatitis virus by enzyme-linked immunosorbent assay / X. Zhao, R.M. Phillips, G. Li [et al.] // *Avian Disease.* -1991. – V. 35. – P. 778 – 782.

ПРИЛОЖЕНИЕ

ФАНО РОССИИ
 Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
 Федеральный научный центр
 «Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт птицеводства»
 Российской академии наук
 (ФНЦ «ВНИТИП» РАН)
филиал
«Всероссийский научно-исследовательский ветеринарный институт птицеводства»
(ВНИВИП)

Черникова ул., д. 48, Санкт-Петербург, Ломоносов, 198412
 Тел./факс (812) 372-54-81 E-mail: vnivip@mail.ru
<http://vnivip.com>
 ИНН 5042000869 КПП 781943001

ПАСПОРТ ШТАМА «ВН-3» вируса гепатита утят типа I

1. Кодовый номер:
2. Название вируса, штамма (семейство, таксономическая и антигенная группа): Семейство <i>Picornaviridae</i> , род <i>Avihepatovirus</i> . Вирус гепатита утят типа I, штамм «ВН-3».
3. Выделен (год, место выделения, от кого и из какого материала): Выделен в 2013 г. от утят, фермерского хозяйства.
4. Физико-химические свойства: (криптограмма, размер, фильтрация, РНК, ДНК): Вирионы сферической формы диаметром 30-50 нм; РНК - содержащий вирус.
5. Генетические признаки: Штамм «ВН-3» имеет 98% гомологии с изолятами гепатита I, обладает выраженной интерферогенностью.
6. Антигенные свойства: Штаммспецифическая сыворотка в реакции нейтрализации имеет активность 8-9 log ₂ , а в ИФА – 11-12 log ₂
7. Прочие свойства: Штамм «ВН-3» предназначен для производства вакцинных препаратов и диагностического набора. Штамм вируса обладает выраженной антигенной активностью.
8. Количество пассажей: 10 пассажей на развивающихся 10-12 – суточных утиных эмбрионах и в культуре утиных фибробластов.

Инфекционная активность штамма на эмбрионах составляет 7,0-7,5 lg ЭЛД ₅₀ /см ³ , в культуре клеток 6,75 lg ТЦД ₅₀ /см ³ при культивировании 37 °С.						
10. Режим высушивания: Вирус лиофилизирован 0.0.2017 г. Объем материала во флаконе 3,0 см ³ в соотношении вирус : стабилизатор 2:1; в качестве стабилизатора использованы сахароза -10%, желатин -1 % и пептон -4%.						
11. Условия хранения Вирус хранят в лиофилизированном виде при температуре не выше +2-8°С. Для восстановления инфекционных свойств необходимо 1-2 пассажа на 10-12 – суточных утиных эмбрионах.						
12. Патогенность: Относится к микроорганизмам IV группы патогенности.						
13. Чувствительность к экспериментальной инфекции (животные, эмбрионы, членистоногие и клеточные культуры)						
Экспериментальная модель	Возраст, сут	Заражение		Инкубационный период	Проявление инфекции	Титр
		метод	см ³			
Утиные эмбрионы	11-12	аллантагическая полость	0,2	24 ч	Отставание в росте, гемопоэз, гепатит.	7,0 lg ЭЛД ₅₀ /см ³
Утята	1-2	внутримышечно	0,5		Отсутствие симптомов	
Культура клеток утиных эмбрионов	2	на монослой	0,2	48-72 ч	Округление клеток, зернистость, синцитий	6,75 lg ТЦД ₅₀ /см ³
14. Авторы штамма: Заведующий отделом вирусологии д-р вет. наук, профессор ВНИВИП филиала ФНЦ «ВНИТИП» РАН Б.Б. Трефилов						

Директор филиала ВНИВИП
Подпись Надеина К.А. заверяю
Ученый секретарь института



К.А. Надеин

Л.П. Терская

“УТВЕРЖДАЮ”

Директору НИИ вирусологии
Им. Д.И.Ивановского
ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф.Гамалеи»
Минздрава России
Профессор, Д.Б.Н.
А.В.Пронин



АКТ

Настоящий акт составлен в том, что в Государственную коллекцию вирусов депонированы и переданы в ГКВ штаммы вирусов:

1. Вирус гепатита утят типа-1, штамм «ВН-3»

Штаммы переданы в ГКВ представителем «Всероссийского Научно-Исследовательского Ветеринарного Института Птицеводства»-Филиал Федерального Государственного Бюджетного Научного Учреждения Федерального Научного Центра «Всероссийский Научно-Исследовательский и Технологический Институт Птицеводства» Российской Академии Наук г. Санкт-Петербург, Ломоносов, Трубициным М.М., паспорт серия 1714 351980 (код подразделения 330-012) по доверенности № 00000000037, в количестве 10 флаконов лиофилизированной вирусной суспензии штамма и 2 флакона специфической иммунной сыворотки и приняты руководителем лаборатории Госколлекции вирусов Института вирусологии им. Д.И.Ивановского ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф.Гамалеи» Минздрава России, д.м.н. профессором Дерябиным П.Г., старшим научным сотрудником Ботиковым А.Г., и старшим лаборантом Паниной Л.В.

Заведующий Государственной коллекцией вирусов
Института вирусологии им. Д.И.Ивановского
Профессор Д.М.Н.

П.Г. Дерябин

Старший научный сотрудник ГКВ

А.Г. Ботиков

Старший лаборант ГКВ

Л.В. Панина



Институт вирусологии им. Д.И. Ивановского
ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России

Государственная Коллекция Вирусов

123098, Москва, ул. Гамалеи, 16
Тел.: (499) 1903060, (499) 2777820 Факс.: (499) 2777819
<http://www.viruscollection.ru> E-mail: info@viruscollection.ru

УДОСТОВЕРЕНИЕ

Настоящее удостоверение выдано в том, что в Государственную коллекцию вирусов 5 декабря 2017г. депонирован вирус гепатита утят типа I, штамм «ВН-3». Семейство Picornaviridae, род Avihepatovirus.

Штамму присвоен номер в Государственной коллекции вирусов: **2859**

Родословная штамма (место, год выделения штамма): Штамм выделен в 2013 г. от утят фермерского хозяйства. Штамм прошёл 10 пассажей на развивающихся 10-12 суточных утиных эмбрионах в культуре утиных фибробластов. Штамм был идентифицирован в РН, активность 8-9 log₂, в ИФА-11-12 log₂.

Штамм предназначен для производства вакцинных препаратов и диагностических наборов. Штамм вируса обладает выраженной антигенной активностью.

Депонирование штамма осуществлено в связи с подачей заявки на изобретение.

Авторы штамма:

Заведующий отделом вирусологии д-р вет.наук, профессор ВНИВИП филиала ФНЦ «ВНИТИП» РАН Б.Б.Трефилов

Директор
Института вирусологии им. Д.И. Ивановского
ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России
Профессор, д.б.н.



А.В. Пронин

Руководитель
Государственной коллекции вирусов
Профессор, д.м.н.

П.Г. Дерябин

ЗАКРЫТОЕ АКЦИОНЕРНОЕ ОБЩЕСТВО
«ПЕТРОХИМ»



Петрохим

308017, Российская Федерация,
г. Белгород, ул. Рабочая, 14
Тел.: (4722) 425-126
Факс: (4722) 425-125
E-mail: post@petrohim.ru

Сертификат анализа №1

Химический реагент для приготовления масляных эмульсий. АБ — 4М В/М.

ТУ 2631-061-54651030-2010

Партия 1 022019 Изготовлено 13.02.2019г. Объем 30л Срок хранения 3 года

Показатели	Номер модификации и тип эмульсии					Нормируемый показатель	Фактически
	№1	№2	№3	№4	№5		
Внешний вид и запах	Прозрачная или мутная маслянистая жидкость без запаха						Прозрачная маслянистая жидкость без запаха
Термостабильность 50%-ной эмульсии при 37°С, суток, не менее	Не оп-ре-де-ля-ют	14	14	14	14	Отсутствие разделения фаз	Выдерживает испытание
Вязкость, сПз, при 20°С,	10-30	10-30	10-30	10-30	10-30	Вязкость	14,8 (17,9 сСт)
Дополнительные показатели:	Дополнительные требования заказчика						Не токсичен, апирогенен

Заключение ОТК Соответствует модификации №4

Продукт к числу токсичных и опасных не относится.

Нач. ОТК

 Е.Н.Берестовая

УТВЕРЖДАЮ
Директор ВНИВИП,
доктор биологических наук
К.А. Наедин
15 12 2019г.



А К Т

комиссионной апробации эмульгированной инактивированной вакцины
против вирусного гепатита утят типа I

В соответствии с приказом № 39-а от 19 сентября 2019 года по Всероссийскому научно-исследовательскому ветеринарному институту птицеводства комиссией в составе: Дубового А.С. – старшего научного сотрудника отдела вирусологии и ОБП (председатель); Самусевой Г.Н. – старшего научного сотрудника отдела вирусологии и ОБП; Котляра П.Ю. – старшего научного сотрудника начальника научно-производственного отдела; Явдошак Л.И. – старшего научного сотрудника отдела вирусологии и ОБП; Никитиной Н.В. – ведущего научного сотрудника отдела вирусологии и ОБП (ответственный исполнитель) составлен настоящий акт в том, что в период с 19 сентября по 14 декабря 2019 года проведены комиссионные испытания эмульгированной инактивированной вакцины против вирусного гепатита утят типа I.

На комиссионные испытания были представлены:

- две лабораторные (опытные) серии вакцины, изготовленных: серия № 1 - 01. 2019г., серия № 2 – 03.2019 г;
- набор для выявления антител к вирусу гепатита в сыворотках крови утят (уток) иммуноферментным методом в соответствии с методическими положениями «Определение специфических антител к вирусу гепатита утят типа I методом иммуноферментного анализа»,

одобренными и утвержденными Ученым советом ВНИВИП, протокол № 1 от 28.08.2018 года. Патент РФ № 2684417, 08.05.2018, RU.

В процессе комиссионных испытаний были проведены:

- контроль вакцины на стерильность, стабильность эмульсии и кинематическую вязкость;
- контроль вакцины на безвредность и антигенную активность.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

1. Контроль стерильности.

Определение стерильности 2-х лабораторных серий вакцины проводили по ГОСТ 28085-2013. Из каждого образца инактивированной вакцины производили посев на стерильные питательные среды: МПА, МПБ, МППБ под вазелиновым маслом и бульон Сабуро – по три пробирки. Для выявления аэробов высевали $0,5 \text{ см}^3$ посевного материала в одну пробирку, а для выявления анаэробов – $1,0 \text{ см}^3$. Пробирки с посевами на всех средах, кроме среды Сабуро, выдерживали в термостате при $(37,0 \pm 0,5) \text{ }^\circ\text{C}$ в течение 7 суток, на среде Сабуро – при $(22,5 \pm 2,5) \text{ }^\circ\text{C}$.

$^\circ\text{C}$ в течение 14 суток. По истечении указанного срока аналогичным образом выполняли, пересев на те же питательные среды, исключая МПА. Одновременно проводили контроль стерильности питательных сред: три пробирки с каждой средой выдерживали в термостате в течение 14 суток при $(37,0 \pm 0,5) \text{ }^\circ\text{C}$, со средой Сабуро – при $(22,5 \pm 2,5) \text{ }^\circ\text{C}$.

Установлено, что высевы 2-х лабораторных серий вакцины были свободны от контаминации бактериями и грибами.

2. Контроль на стабильность эмульсии

Стабильность эмульсии определяли методом центрифугирования, экспресс-методом и методом быстрого старения. Эмульсию считали стабильной, если после центрифугирования в каждой из трех проб, в процессе визуального контроля, не было обнаружено никаких изменений содержимого или, если высота столба прозрачной фракции, сформировавшейся в верхней части флакона, не превышает 10%.

Результаты исследований показали, что при проверке на стабильность эмульсии вышеуказанными методами изменений не обнаружено.

3. Контроль на кинематическую вязкость

Вязкость эмульсии определяли с помощью вискозиметра по методике, изложенной в ГФ 11.

Относительная вязкость вакцины была 50 мм²/с.

4. Контроль на безвредность

Безвредность вакцины проверяли на трех взрослых утках введением 5-кратной прививной дозы подкожно в нижнюю треть шеи. За птицей вели наблюдение в течение 21 сут. Все утки в течение указанного времени остались живыми, без видимых клинических признаков переболевания и в месте введения вакцины отсутствовали следы воспалительной реакции.

5. Контроль на антигенную активность

Для проведения испытаний использовали взрослых уток, из хозяйства благополучного по острым инфекционным болезням. Для проверки антигенной активности каждой серии вакцины 5-ти уткам вводили однократно подкожно в область нижней трети шеи препарат в объеме 0,6 см³. В качестве контроля оставляли пять уток.

Сыворотку крови получали от всех уток контрольной и подопытных групп до вакцинации и через 14 и 28 сут после иммунизации для определения

специфических антител методом ИФА. ИФА ставили согласно методическим положениям «Определение специфических антител к вирусу гепатита утят типа I методом иммуноферментного анализа». Методические положения рассмотрены и утверждены на Ученом совете ВНИВИП (28.08.2018 г., протокол № 1). Патент РФ № 2684417, 08.05.2018, RU.

Результаты исследований представлены в таблице.

Таблица
Титры антител в сыворотке крови уток, вакцинированных
инактивированной эмульгированной вакциной против вирусного
гепатита утят типа I

Наименование групп	Уровень антител в ИФА*	
	Сроки после вакцинации, сутки	
	14	28
Утки, вакцинированные вакциной (серия №1)	3110	7980
	4431	7119
	5195	10502
	4223	7818
	4054	8191
	СТ 4203± 105	СТ 8322±172
Утки, вакцинированные вакциной (серия №2)	4466	7657
	2352	8922
	3442	9743
	6944	10555
	5579	10878
	СТ 4557± 148	СТ 9151±186
Не вакцинированные утки	816	880

Примечание: * - титры антител в обратных значениях.


Данные, приведенные в таблице, показывают, что инактивированная эмульгированная вакцина вызывает иммунологическую перестройку в организме уток и индуцирует антитела в высоких титрах.

Таким образом, результаты исследований свидетельствуют о том, что испытанные серии вакцины стерильны, стабильны, безвредны и обладают высокой антигенной активностью.

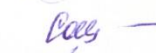



ПРЕДЛОЖЕНИЯ

Подготовить материалы, провести испытания опытных серий инактивированной вакцины в производственных условиях и подготовить проект НД на производство, согласно «Правилам государственной регистрации», утвержденными постановлением правительства РФ от 30 июня 2004 г. № 327.

Председатель комиссии:

 А.С. Дубовой

Члены комиссии:

 — Г.Н. Самусева
 Н.Ю. Котляра
 Л.И. Явдошак
 Н.В. Никитина

«Всероссийский научно-исследовательский ветеринарный институт птицеводства» (ВНИВИП) – филиал Федерального государственного бюджетного научного учреждения Федерального научного центра «Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт птицеводства» (ФНЦ «ВНИТИП» РАН)

Директор ВНИВИП

доктор биологических наук

Надеин К.А.

2019 г.



Вакцинация против вирусного гепатита утят типа I
(методические положения)

Санкт-Петербург, 2019

Методические положения разработаны сотрудниками Всероссийского научно-исследовательского ветеринарного института птицеводства – филиал Федерального государственного бюджетного научного учреждения Федерального научного центра «ВНИТИП» РАН: заведующим отделом вирусологии и опухолевых болезней птиц, док. вет. наук, профессором Трефиловым Б.Б., ведущим научным сотрудником, канд. биол. наук Никитиной Н.В., старшим научным сотрудником, Явдошак Л.И., аспирантом Трубицыным М.М.

В Методических положениях «Вакцинация против вирусного гепатита утят типа 1» изложены общие сведения о вирусном гепатите утят, об иммунной системе птицы и противовирусном иммунитете при вирусном гепатите, а также кратко освещены вопросы вакцинации и даны характеристики вакцин, применяемых в птицеводстве.

Методические положения предназначены для ветеринарных специалистов птицеводческих хозяйств и научно-исследовательских учреждений ветеринарного и биологического профиля, студентов, ветеринарных факультетов и слушателей курсов повышения квалификации ветеринарных институтов.

СОДЕРЖАНИЕ

стр.

1. Общие сведения о вирусном гепатите утят типа I.....	104
2. Иммунная система у уток.....	106
3. Противовирусный иммунитет при вирусном гепатите утят типа 1.....	109
4. Вакцинация при вирусном гепатите типа 1 и типы вакцин.....	110
4.1. Атенуированная вирусвакцина.....	110
4.2. Инактивированная вакцина.....	110
5. Схемы и сроки применения вакцин против вирусного гепатита утят типа 1.....	111

1. Общие сведения о вирусном гепатите утят типа 1

Вирусный гепатит утят типа 1 (гепатовирусная инфекция утят) – высоко контагиозная, сверхостро протекающая среди утят и латентно среди уток болезнь с преимущественным поражением печени и большой смертностью молодняка. Вирусный гепатит утят типа 1 (ВГУ-1) наносит значительный экономический ущерб утководческим хозяйствам, особенно промышленного типа, поскольку вызывает массовую гибель утят 1-30 – суточного возраста 30-95% и снижение продуктивности уток. Переболевшие утята отстают в росте и развитии, что ведет к частичной потере мясной продуктивности, нарушению племенной работы. Ущерб от ВГУ-1 усугубляется затратами на ограничительные мероприятия, нарушающие экономику хозяйства, особенно, когда болезнь принимает стационарный характер.

В естественных условиях вирусным гепатитом могут болеть утята до 40 – суточного возраста, но чаще в 1-30 – суточном возрасте. К вирусу гепатита утят восприимчивы также гусята 10-12 – суточного возраста, как в естественных условиях, так и при искусственном их заражении. Быстрое развитие возрастной невосприимчивости служит характерным свойством этой инфекции, то есть, более старшие утята и взрослые утки клинически не болеют. Не восприимчивы к возбудителю гепатита утят домашние, дикие и лабораторные животные, и другие виды птицы. Не зарегистрировано заболевание у людей.

Источником возбудителя инфекции является больная и переболевшая птица – вирусоносители, выделяющие во внешнюю среду возбудителя с пометом, носовыми и конъюнктивальными истечениями. Продолжительность вирусоносительства после переболевания колеблется от 60-75 до 300-650 сут.

Возбудитель болезни обычно заносится больными и переболевшими утятами, а также через инкубационное яйцо, завезенное из неблагополучных по ВГУ-1 хозяйств. Эмбрионы из таких яиц в 75-90% случаев погибают при инкубировании на различных стадиях эмбрионального развития. Занос

возбудителя возможен дикими утками и свободноживущими птицами. Внутри хозяйства вирус передается при совместном содержании больной и здоровой птицы. Возбудитель инфекции передается через инфицированный корм, воду, подстилку, предметы ухода, транспорт и обслуживающий персонал.

Заражение происходит алиментарно, но вполне возможно также аэрогенное инфицирование утят. Не исключено, что вирус может попасть в организм птиц при травмировании, например, при инъекциях различных препаратов, а также механическим и трансвариальным путями.

Отмечается характерная особенность эпизоотичности вирусного гепатита, повторяющаяся практически во всех случаях: гибель утят нарастает довольно быстро: пик на 4-5 сут, а снижение к 7-8 сут, к 10-12 сут. наблюдается резкое уменьшение количества погибших утят.

При вирусном гепатите отмечается стационарность очагов, которая определяется достаточно высокой устойчивостью возбудителя во внешней среде, постоянным наличием уток-вирусоносителей и восприимчивого поголовья, особенно при круглогодичном выращивании уток. Резервуаром вируса могут быть крысы.

Следует учитывать и возможность «природной очаговости» возбудителя. Дикие утки часто поселяются на водоемах вблизи утководческих хозяйств. Они также болеют вирусным гепатитом и могут распространять вирус. Выраженной сезонности нет, но нарушение условий содержания, неполноценное кормление птицы и кормовые токсикозы способствуют проявлению болезни.

Следует особо подчеркнуть, что ряд иммунодепрессивных и других возбудителей, которые способны осложнять течение основного инфекционного процесса. В первую очередь, возбудители сальмонеллеза, колибактериоза, аспергиллеза и хламидиоза, а у уток гепадновиральная инфекция. Такую птицу следует относить к категории повышенного риска.

При первичном появлении болезни в благополучном хозяйстве энзоотия начинается, как правило, среди утят 5-10 – суточного возраста и поражает ряд следующих друг за другом выводков, быстро охватывает все восприимчивое поголовье. Заболеваемость утят до 3 – недельного возраста составляет 80-90%, летальность при сверхостром течении за первые 10 суток жизни достигает 100%, при остром течении – 70-80%. В стационарно неблагополучных хозяйствах вирусный гепатит регистрируется среди утят 15-30 – суточного возраста и старше, падеж в отдельных партиях составляет 5-10%. Если в такое хозяйство повторно поступает неиммунный молодняк, то смертность среди утят от партии к партии вновь увеличивается и достигает иногда 80-95%.

2. Иммунная система у уток

Иммунная система уток – структурно-функциональная совокупность лимфоидной ткани, которая осуществляет специфический гомеостаз внутренней среды организма, тесно взаимодействуя с системой кроветворения, нервной, эндокринной, пищеварительной и другими системами.

Развитие иммунной системы начинается на ранней стадии эмбриогенеза. Предшественники бурсальных клеток начинают формироваться и могут быть выявлены у эмбриона птиц в возрасте 7-10 сут. Клетки, экспрессирующие поверхностные IgM, IgG и IgA, могут быть обнаружены к 10 -, 14 - и 16 - ти сут, соответственно. Образование клеток предшественников Т-клеток происходит в три этапа: первый в 5-7, второй в 11-13 и последний в 17-19 – суточном возрасте. Клетки каждого этапа способны дифференцироваться на α -, β - и γ - клетки. Т- клетки с CD3-поверхностными молекулами появляются в утиных эмбрионах на 15-16 сут эмбрионального развития.

В связи с этим можно предположить, что у уток на поздней стадии развития способны иммунологически отвечать на антигены, что, вероятно, позволит перед выводом применять вакцины методом «in ovo».

Интенсивное образование В - лимфоцитов в фабрициевой бурсе и их поступление в периферические лимфоидные органы происходит в последние 3-7 сут инкубации эмбрионов. При этом миграция Т-клеток сохраняется на низком уровне до вывода утят и после него в течение 5-7 сут. Затем уровень Т- клеток повышается. Окончательное оформление (созревание) иммунной системы при наличии Т, В- клеток и макрофагов в необходимых количествах и отношениях происходит в постэмбриональный период-7-10 сут и старше.

У взрослых уток нет чётко выраженных или оформленных лимфатических узлов и сосудов, как у млекопитающих; вероятно, это один из факторов, способствующих тому, что аллергическая реакция выражена слабее. Лимфатические органы условно подразделены на первичные (центральные), вторичные и периферические. К первичным органам системы относят: эмбриональный желточный мешок, костный мозг, тимус и фабрициеву сумку; к вторичным – селезенку, лимфоидные узелки слепых отростков, гардерову (слезную) железу, фарингальные скопления лимфоидных элементов в подслизистой оболочке дыхательного пути и лимфоидные образования кишечника. Кроме того, лимфоидные образования содержатся в слезном протоке и протоках латеральных носовых желез. Они представлены в виде центров скопления средних и больших лимфоцитов округлой формы или диффузной инфильтрации тканей малыми лимфоцитами. Подобное расположение лимфоцитов обнаружено в подслизистом слое стенки пищеварительного тракта, в меньшем количестве – в печени, коже, лёгких, поджелудочной железе, других органах и тканях.

Основные органы лимфоидной системы: желточный мешок – изначальный и основной кроветворный орган эмбриона, желточная масса которого служит структурным и энергетическим материалом. Образование сердца и сосудов происходит на 2-3 сут инкубации эмбриона. Участками

кроветворения вначале служат скопления мезенхимы в первичной аорте, зачатки селезёнки, тимуса, печени и бursы Фабрициуса, затем – в костном мозге. К 10 -13 сут инкубации в сосудах оболочек циркулируют лейкоциты, в основном гранулоциты. Моноциты появляются после 14-20 сут развития эмбрионов. Происходит интенсивное функционирование костного мозга – источника стволовых клеток и других компонентов крови. Стволовые клетки поступают в тимус.

Тимус (вилочковая железа) – центральный лимфоидный орган, ответственный за клеточный иммунитет. Здесь созревают и находятся Т-лимфоциты, которые вырабатываются из стволовых клеток. Максимальное развитие тимуса завершается у цыплят к 3-4 мес, у уток – 3,5-5 мес, затем он постепенно атрофируется. В тимусе до 2,5 – месячного возраста не выявляют В-лимфоциты, затем в нём находят тимоциты гетерогенной популяции – Т и В - клетки, ответственные за иммунологический ответ. Т- лимфоциты участвуют в разрушении структур и ферментативной обработке антигена.

Фабрициева бурса (сумка) расположена на дорсальной поверхности клоаки, это слепой складчатый дивертикул прямой кишки. Лимфоидные фолликулы расположены в центральном мозговом слое вблизи внутренней поверхности сумки. Бурса к 4-5 – месячному возрасту постепенно уменьшает свои функции и может исчезнуть в начале второго года жизни уток. Основная функция бursы – контроль созревания В-лимфоцитов, формирования гуморального иммунитета и способности синтезировать антитела. При введении антигена (например, пикорна, герпесвирусов, бактерий и т.д.) Т-клетки тимуса и макрофаги селезёнки разрушают и ферментируют его, «передают» информацию об этом В-клеткам, которые стимулируются и дифференцируются в плазматические клетки – продуценты специфических антивиральных или антибактериальных антител.

Селезёнка. Гранулоцитопоз у водоплавающих начинается 10-11 – суточного возраста, а эритропоз – с 15 – суточного возраста эмбрионов. У птицы селезёнка достигает максимального размера к 120-130 – суточному

возрасту. Селезёнка выполняет три функции: производство макрофагов, участвующих в фагоцитозе, главным образом эритроцитов; поглощение антигенов и образование антител; и лимфопоэз. В селезенке присутствуют Т - и В - лимфоциты.

Гардерова (слезная) железа содержит плазматические клетки, популяцию которых контролирует фабрициева бурса. Железа причастна к развитию иммунитета против бактерий при субклиническом течении инфекции, например, колибактериоза.

Периферические лимфоидные ткани расположены в органах пищеварительной и дыхательной систем, в оболочках висцеральных органов в виде диффузного расположения лимфоцитов тимуса, костного мозга и бурсы. Например, лимфоидные фолликулы в тонком отделе кишечника расположены в среднем по 3-4 на см². Кстати, в кишечнике кур лимфоцитов содержится в три раза больше, чем в крови, и они связаны с клеточным (фагоцитозом) и гуморальным (активностью иммуноглобулина А) иммунитетом. Например, у цыплят в периферической крови Т- лимфоцитов около 70%, а В - лимфоцитов – около 30%. В бурсе к 10 – недельному возрасту количество В - клеток увеличивается до 70%, в селезёнке их примерно 40-60%, а Т- лимфоцитов – 20-30%. Следует отметить, что иммунный ответ организма птицы начинается с представления антигена на поверхности макрофага или дендритных клеток, активирующих Т-лимфоциты. Процесс клеточного иммунитета сложен и заключается в активизации клеточных взаимодействий многих компонентов, в том числе специфических рецепторов лимфоцитов, главного комплекса гистосовместимости, дендрирующих лимфофолликул в угрожаемой зоне, Т – и В- клеток, переходящих из фазы G₀ в G₁, лимфокинов и монокинов-трансммиттеров.

3. Противовирусный иммунитет при вирусном гепатите утят типа 1

В организме переболевших вирусным гепатитом утят типа 1, экспериментально инфицированных вирусом гепатита, а также

вакцинированных аттенуированными и инактивированными вакцинами утят и уток вырабатываются комплементсвязывающие, вируснейтрализующие и преципитирующие антитела, которые наряду с другими факторами противовирусного иммунитета, обеспечивают устойчивость птицы к болезни. У привитых вирусвакциной утят (уток) содержание нейтрализующих антител в сыворотке крови уже через 2 недели достигает титра 6-8 log с продолжительностью у уток 7 – 9 месяцев и трансовариально антитела передаются утятам через желток яиц, обеспечивая невосприимчивость молодняка птицы к заражению эпизоотическим вирусом.

Экспериментально показана протективная роль противовирусного интерферона при ВГУ-1, который индуцируется через 24 – 96 ч на введение аттенуированного вируса или вакцины любого типа в высоких концентрациях, способного защитить утенка от заражения до формирования клеточного и гуморального иммунитета.

4. Вакцинация при вирусном гепатите типа 1 и типы вакцин

В комплексе мероприятий по предупреждению и ликвидации вирусного гепатита утят типа 1 важная роль отведена вакцинопрофилактике. В утководческих хозяйствах для вакцинации применяют вакцину из аттенуированного штамма вируса гепатита типа 1 согласно Инструкции по применению. В последние годы разработана инактивированная вакцина эмульгированная и сорбированная.

4.1. Аттенуированная вирусвакцина

Вакцина против вирусного гепатита утят из штамма ВГНКИ-К эмбриональная применяется для иммунизации утят суточного возраста и родительского стада уток в стационарно неблагополучных хозяйствах согласно утвержденной Инструкции по применению.

4.2. Инактивированная вакцина

Технология изготовления инактивированной вакцины против ВГУ-1 включает следующие этапы:

- подбор производственного штамма вируса гепатита типа 1;
- оптимальные условия культивирования вируса;
- выбор инактиванта и отработка метода инактивации вируса;
- разработка компонентного состава вакцины;
- контроль физических и иммунобиологических свойств вакцины;
- изучение антигенных и иммуногенных свойств вакцины.

В ветеринарной практике птицеводческой отрасли применяют сорбированную и эмульгированную формы инактивированной вакцины.

Сорбированная инактивированная вакцина включает инактивированный вирусный антиген с активностью 6,5-7,0 lg ЭЛД₅₀/ см³ и 0,3% гидроксида алюминия.

В состав эмульгированной инактивированной вакцины входят: инактивированный вирусный антиген с активностью 6,5 - 7,0 lg ЭЛД₅₀ /см³ и масляный адъювант Montanidae ISA 70 в соотношении 30:70.

Инактивированной вакциной иммунизируют уток родительского стада за 20-30 суток до планируемой яйцекладки однократно подкожно в дозе 0,6 см³. Одна доза вакцины содержит минимум 5,7 lg ЭЛД₅₀ инактивированного вируса гепатита. Предлагаемая вакцина вызывает иммунобиологическую перестройку у уток, индуцируя выработку специфических антител к гепатовирусу в высоких титрах, передающихся трансвариально с инкубационным яйцом выводившимся утятам. Желточный иммунитет обеспечивает защиту молодняка уток в восприимчивом возрасте в течение репродуктивного периода.

5. Схемы вакцинации против вирусного гепатита утят типа 1

Возможные схемы вакцинации с использованием аттенуированной вирусвакцины и инактивированного препарата в хозяйствах с различной эпизоотической ситуацией:

а) хозяйства (стада) благополучные по гепатовирусной инфекции утят: схема – инактивированный вакцинный препарат на родительском стаде за месяц до начала каждого репродуктивного периода согласно Инструкции по применению;

б) хозяйства (стада) с острой вспышкой гепатовирусной инфекцией утят: схема – аттенуированная вирусвакцина на утятах суточного возраста согласно Инструкции по применению. Инактивированный вакцинный препарат на родительском стаде согласно Инструкции по применению;

в) хозяйства (стада) стационарно неблагополучные по гепатовирусной инфекции; схема – инактивированный вакцинный препарат на родительском стаде за месяц до начала каждого репродуктивного периода (яйцекладки) согласно Инструкции по применению.

Успех по предупреждению и оздоровлению хозяйств от гепатовирусной инфекции утят зависит от своевременной организации зооветеринарных мероприятий и качественного проведения вакцинопрофилактики и контроля за ними.

«УТВЕРЖДАЮ»

Директор ВНИВИП,

доктор биологических наук

 К.А. Надеин«20»  2020г.

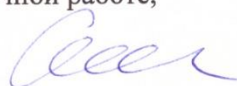
Справка

о внедрении результатов диссертационной работы в учебный процесс

Результаты научно-исследовательской работы аспиранта отдела вирусологии и ОБП им. академика Коровина Р.Н. Всероссийский научно-исследовательский ветеринарный институт птицеводства» - филиал Федерального государственного бюджетного научного учреждения Федеральный научный центр Российской академии наук «Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт птицеводства» (ФНЦ «ВНИТИП» РАН) Трубицына Михаила Михайловича на тему: «Иммунобиологические свойства инактивированной эмульгированной вакцины против вирусного гепатита утят типа I» по специальности 06.02.02 – ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология, микология с микотоксикологией и иммунология внедрены в учебный процесс.

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

Зам. директора института по научной работе,
доктор ветеринарных наук



О.К. Суховольский