Научная статья

УДК 619:578.835.1

Сравнительное изучение репродукции штамма «ВН-3» вируса гепатита утят типа I на различных биологических объектах

Нина Васильевна Никитина, Илья Константинович Леонов, Лариса Ивановна Явдошак

Всероссийский научно-исследовательский ветеринарный институт птицеводства (ВНИВИП) – филиал ФГБНУ Федеральный научный центр «Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт птицеводства» (ФНЦ «ВНИТИП»)

Аннотация: *Изучение особенностей репликации вакцинных штаммов вируса гепатита утят типа I (ВГУ-1) в процессе разработки и применения вакцин против этой болезни является важной задачей научных исследований. Представлены данные исследования репродукции вакцинного штамма данного вируса ВН-3 на куриных и утиных эмбрионах и в первичных клеточных культурах (куриные и утиные фибробласты). Установлено, что штамм вируса проявляет более высокую степень репродукции в развивающихся утиных эмбрионах: активность штамма, выраженная как lg ЭЛД$_{50}$/см^3, в утиных эмбрионах составила 7,0±0,2 против 5,5±0,2 в куриных эмбрионах. Культура клеток утиных фибробластов также была более чувствительной к изучаемому штамму вируса ВГУ-1: активность штамма, выраженная как lg ТЦД$_{50}$/см^3, в культуре утиных фибробластов составила 5,8±0,3 против 4,5±0,2 в культуре куриных фибробластов.*

Ключевые слова: *вирус гепатита утят типа I, эмбрионы, культура клеток, репликация, пассажи.*

Для цитирования: *Никитина, Н.В. Сравнительное изучение репродукции штамма «ВН-3» вируса гепатита утят типа I на различных биологических объектах / Н.В. Никитина, И.К. Леонов, Л.И. Явдошак // Птицеводство. – 2025. – №10. – С. 58-60.*
doi: 10.33845/0033-3239-2025-74-10-58-60

Введение. Вирусный гепатит утят I типа (ВГУ-1) – высоко контагиозная, остро протекающая среди утят и латентно среди уток болезнь с преимущественным поражением печени, сопровождающаяся высокой смертностью 1-30-суточных утят, достигающей до 95%. ВГУ-1 является широко распространенной инфекцией во всем мире [1-3]. Санитарным кодексом МЭБ (2008) ВГУ-1 включен в перечень особо опасных болезней.

Для предупреждения ВГУ-1 используют, в основном, активную специфическую профилактику, которая предусматривает применение аттенуированных живых и инактивированных вакцин. Утят с первых дней жизни прививают живыми вакцинами [4-6], а племенных уток – живыми и инактивированными [8,9].

Поддержание промышленного утководства на уровне, отвечающем стабильным требованиям, невозможно без разработки новых вакцин, применяемых для активной иммунизации молодняка и уток родительского стада. При этом весьма важно для каждого штамма вируса, который предполагается использовать в качестве вакцинного, и для каждого субстрата выявить оптимальные параметры размножения вируса, а также изучить дополнительные условия для усиления репродукции вируса в различных субстратах.

Цель исследования – изучить репродукцию вакцинного штамма ВН-3 вируса ВГУ-1 на различных биологических объектах.

Материал и методика исследований. ***Вирус.*** В работе использовали вакцинный штамм ВН-3 вируса ВГУ-1 [10]. Штамм культивировали в развивающихся 9-10-суточных куриных и 11-12-суточных утиных эмбрионах и в культуре куриных и утиных фибробластов при температуре 37±0,5°С и хранили при -20°С.

Куриное и утиное инкубационной яйцо получали из фермерских хозяйств, благополучных по острым инфекционным болезням птиц. Инкубацию эмбрионов проводили в лабораторных условиях в отдельном термостате. Для культивирования штамма ВН-3 вируса ВГУ-1 брали хорошо развивающиеся, с выраженными поверхностными кровеносными сосудами, подвижные 9-10-суточные куриные и 11-12-суточные утиные эмбрионы. Эмбрионы заражали в аллантоисную полость вирусом в дозе 3,0 lg ЭЛД$_{50}$ в 0,2 см^3 и инкубировали при температуре 37,5±0,5°С в течение 3-4 сут., ежедневно овоскопируя.

Культура клеток. Первично-трипсинизированную культуру клеток готовили из кожно-мышечной ткани 10-11-суточных куриных эмбрионов (ФЭК) и 12-13-суточных утиных эмбрионов (ФЭУ) по методике Dulbecco R. & Vogt M. (1954) [11].

Для культивирования культуры клеток использовали питательные среды Игла МЕМ/(ДМЕМ), №199, сыворотку крупного рогатого скота неконсервированную и антибиотики: бензилпенициллина 100 ед./см^3 и стрептомицина сульфата 100 мкг/см^3. Для диспергирования ткани использовали раствор трипсина 0,25%, раствор Версена 0,02% и раствор Хенкса.

Титрование вируса на куриных и утиных эмбрионах и в культуре клеток эмбрионов проводили методом десятикратных разведений и с соответствующими контролями. Величину титра вычисляли по методу Reed L.J. & Muench H. (1938) и выражали в lg ЭЛД$_{50}$/см^3 и lg ТЦД$_{50}$/см^3 соответственно [12].

Результаты исследований и их обсуждение. ***Культивирование штамма «ВН-3» вируса ВГУ-1***

Таблица 1. Патогенность вакцинного штамма ВН-3 вируса ВГУ-1 для развивающихся куриных и утиных эмбрионов

Штамм вируса	Число пассажей		
	1	2	3
ВН-3	Куриные эмбрионы 9-10-суточные		
	20	50	50
	Утиные эмбрионы 11-12-суточные		
	100*	100**	100

Примечание: * – гибель эмбрионов через 72 ч после заражения; ** – гибель эмбрионов через 48 ч после заражения.

Таблица 2. Биологическая активность вакцинного штамма ВН-3 вируса ВГУ-1 в развивающихся эмбрионах (n=10)

Штамм вируса	Активность штамма, lg ЭЛД$_{50}$/см^3, M±m*	
	Куриные эмбрионы	Утиные эмбрионы
ВН-3	5,5±0,2	7,0±0,2

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

Таблица 3. Биологическая активность вакцинного штамма ВН-3 вируса гепатита утят в первичных культурах клеток

Штамм вируса	Активность штамма, lg ТЦД$_{50}$/см^3, M±m*	
	Культура клеток	
	ФЭК	ФЭУ
ВН-3	4,5±0,2	5,8±0,3

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

на развивающихся куриных и утиных эмбрионах. Штамм ВН-3 вируса ВГУ-1 культивировали на развивающихся 9-10-суточных куриных и 11-12-суточных утиных эмбрионах. Заражение эмбрионов проводили в аллантоисную полость оттитрованным вирусом в дозе 1000 ЭЛД$_{50}$/0,2 см^3 и инкубировали при температуре 37,0±0,5°С. Характер патологических изменений, вызываемых вакцинным штаммом вируса, был изучен на 180 эмбрионах (100 куриных и 80 утиных).

Утиные эмбрионы были более чувствительными, их гибель наступала чаще – через 48-72 ч в 100% случаев, а куриные эмбрионы погибали через 72-96 ч в 20-40% случаев (табл. 1)

У зараженных эмбрионов отмечали отставание в росте. Патологоанатомические изменения у инфицированных эмбрионов выражались застойными и геморрагическими явлениями, диффузной отечностью у куриных эмбрионов. На коже в области головы и шеи нередко находили кровоизлияния. Печень у инфицированных куриных эмбрионов была увеличена, уплотнена серовато-беловатыми или серовато-зеленоватыми участками разной величины, иногда обнаруживали петехии. Сердечная мышца дегенерирована, цвета вареного мяса. У погибших эмбрионов печень была светло-коричневатого цвета. У эмбрионов на 5-6 сутки после инокуляции печень часто имела зеленый или темно-зеленый цвет. В таких случаях зеленоватое окрашивание приобретала хориоаллантоисная жидкость. У погибших утиных эмбрионов отмечали интенсивные геморрагические явления, дистрофические изменения печени, она уплотнена, желтовато-коричневатого цвета.

Вируссодержащий материал (ВСМ) (хориоаллантоисная жидкость и тушки), собранный от погибших эмбрионов с характерными для вируса ВГУ-1 изменениями, гомогенизировали и очищали центрифугированием при 3000 об./мин в течение 30 мин при 4°С. В надосадочной жидкости определяли биологическую активность вируса. Результаты исследований представлены в табл. 2. Наибольшая степень репликации штамма ВН-3 вируса ВГУ-1 наблюдалась в развивающихся утиных эмбрионах.

Культивирование штамма «ВН-3» вируса ВГУ-1 в культурах клеток куриных и утиных эмбрионов. Вакцинный штамм ВН-3 вируса ВГУ-1 вызывал острую форму вирусной инфекции в культурах клеток куриных и утиных эмбрионов. Цитопатогенное действие сопровождалось округлением клеток на ограниченных участках монослоя, появлением симпластических образований с зернистостью в цитоплазме клеток через 72-96 ч после инокуляции, а на последней стадии репликации вируса – формированием синцития и дегенерацией клеточного монослоя через 96-120 ч культивирования. Латентная фаза штамма ВН-3 составила 48 ч. Данные определения активности штамма в различных первично-трипсинизированных культурах клеток представлены в табл. 3.

Результаты исследований показали, что вакцинный штамм ВН-3 вируса ВГУ-1 в культуре клеток куриных и утиных эмбрионов вызывал цитопатогенное действие различной интенсивности. Установлено, что культура клеток утиных эмбрионов была более чувствительна к штамму вируса по сравнению с культурой фибробластов куриных эмбрионов. Активность штамма ВН-3 вируса ВГУ-1 в культуре утиных эмбрионов была выше (lg ТЦД$_{50}$/см^3 составил 5,8±0,3) по сравнению с активностью штамма вируса в культуре куриных эмбрионов (4,5±0,2).

Заключение. Вакцинный штамм ВН-3 вируса ВГУ-1 инициирует острую вирусную инфекцию в куриных и утиных эмбрионах, а также в клеточных культурах куриных и утиных фибробластов и отличается по инфекционной активности в зависимости от вида объекта. Высокую степень репродукции штамм вируса проявляет в развивающихся утиных эмбрионах. Культура клеток утиных фибробластов была наиболее чувствительна к штамму вируса.

Литература / References

1. 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, J.H. Chen, L.L. Xia, Z.J. Xie, Y. Wang, Y.L. Zhu, S.J. Jiang // Arch. Virol. - 2016. - V. 161. - No 2. - P. 405-416. doi: 10.1007/s00705-015-2648-z

2. Hassaan, M.N. Isolation and molecular identification of duck hepatitis A virus in Sharkia Governorate / M.N. Hassaan, A.M. Shahin, A.A.M. Eid // Zagazig Vet. J. - 2018. - V. 46. - No 1. – P. 88-95. doi: 10.21608/zvjz.2018.7628
3. Trefilov, B.B. Duck hepatitis virus type I / B.B. Trefilov, N.V. Nikitina, L.I. Yavdoshak, K.Y. Dmitriev, M.M. Trubitsyn // Eur. J. Nat. Hist. - 2018. - No. 1 - P. 3-6.
4. Князев, В.П. Болезни водоплавающих птиц / В.П. Князев. - Владимир, 2013. - 325 с. [Knyazev VP (2013) Diseases of Waterfowl. Vladimir, 325 pp. (in Russ.)]
5. Roh, J.-H. Live attenuated duck hepatitis virus vaccine in breeder ducks: protective efficacy and kinetics of maternally derived antibodies / J.-H. Roh, M. Kang // Vet. Microbiol. - 2018. - V. 219. - P. 107-112. doi: 10.1016/j.vetmic.2018.04.021
6. Kang, M.S. Protective efficacy of a bivalent live attenuated vaccine against duck hepatitis A virus types 1 and 3 in ducklings / M.S. Kang, J.-H. Roh, H.-K. Jang // Vet. Microbiol. - 2018. - V. 214. - P. 108-112. doi: 10.1016/j.vetmic.2017.12.018
7. Глейзер, С. Специфическая профилактика вирусного гепатита утят / С. Глейзер, В. Фоменко, В. Ирза [и др.] // Птицеводство. - 2009. - №3. - С. 44. [Gleizer S, Fomenko V, Irza V [et al.] (2009) Specific prophylaxis of duck viral hepatitis. *Ptitsevodstvo*, (3): 44 (in Russ.)]
8. Woolcock, P.R. Duck hepatitis virus type I: studies with inactivated vaccines in breeder ducks / P.R. Woolcock // Avian Pathol. - 1991. - V. 20. - No 3. - P. 509-522. doi: 10.1080/03079459108418788
9. Yin, F. Development and evaluation of an inactivated bivalent vaccine against duck viral hepatitis / F. Yin, L. Jing, S. Zhang, M. Yu, W. Zhang, G. Fan, X. Dong, W. Liu // Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao. - 2015. - V. 31. - No 11. - P. 1579-1588 (in Chinese).
10. Трефилов, Б.Б. Штамм «ВН-3» вируса гепатита утят типа I рода *Avihepatovirus* семейства *Picornaviridae* для производства вакцинных препаратов и диагностических наборов / Б.Б. Трефилов, Н.В. Никитина, Л.И. Явдошак, М.М. Трубицын. - Патент RU 2675995. - Заявка №2018117223, 08.05.2018; опубл. 25.12.2018. [Trefilov BB, Nikitina NV, Yavdoshak LI, Trubitsyn MM (2018) Strain "VN-3" of hepatitis virus of ducklings of type I of the genus *Avihepatovirus* of the family *Picornaviridae* for the production of vaccine drugs and diagnostic kits. Pat. RU 2675995, priority 08.05.2018]
11. Сюрин, В.Н. Ветеринарная вирусология / В.Н. Сюрин, Р.В. Белоусова, Н.В. Фомина. - М.: Агропромиздат, 1991. - 376 с. [Syurin VN, Belousova RV, Fomina NV (1991) Veterinary Virology. Moscow, Agropromizdat Publ., 376 pp. (in Russ.)]
12. 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. - 248 с. [Belousova RV, Trotsenko NI, Preobrazhenskaya EA (2013) Practicum in Veterinary Virology; 3d ed., revised and expanded. Moscow, Kolos Publ., 248 pp. (in Russ.)]

Сведения об авторах:

Никитина Н.В.: кандидат биологических наук, доцент, ведущий научный сотрудник отдела вирусологии; vnivip.nikitina@yandex.ru. **Леонов И.К.:** кандидат ветеринарных наук, старший научный сотрудник отдела вирусологии; leonov_ila@mail.ru. **Явдошак Л.И.:** старший научный сотрудник отдела вирусологии; yavdoshak2014@yandex.ru.

Статья поступила в редакцию 07.07.2025; одобрена после рецензирования 14.08.2025; принята к публикации 20.09.2025.

Research article

Comparative Study of the Reproduction of VN-3 Strain of Duck Hepatitis Virus Type I in Various Biological Objects

Nina V. Nikitina, Ilya K. Leonov, Larisa I. Yavdoshak

All-Russian Research Veterinary Institute of Poultry Science - branch of Federal Scientific Center
"All-Russian Research and Technological Institute of Poultry"

Abstract. *The study of the replication characteristics of duck hepatitis virus vaccine strains during the development and application of the vaccines against this disease is an important task of scientific research. The data on the reproduction of the VN-3 vaccine strain of duck hepatitis virus type I on chicken and duck embryos and in primary cell cultures (chicken and duck fibroblasts) are presented. The strain exhibited a higher degree of reproduction in developing duck embryos as compared to chicken embryos: activity of the strain (presented as lg ELD_{50}/mL) in duck embryos was 7.0±0.2 vs. 5.5±0.2 in chicken embryos. Similarly, duck fibroblast cell culture was more sensitive to the strain: activity of the strain (presented as lg $TCID_{50}$/mL) in the culture of duck fibroblasts was 5.8±0.3 vs. 4.5±0.2 in the culture of chicken fibroblasts.*

Keywords: *duck hepatitis virus type I, embryos, cell culture, replication, passages.*

For Citation: *Nikitina N.V., Leonov I.K., Yavdoshak L.I. (2025) Comparative study of the reproduction of VN-3 strain of duck hepatitis virus type I in various biological objects. Ptitsevodstvo,* ***74****(10): 58-60. (in Russ.)*
doi: 10.33845/0033-3239-2025-74-10-58-60

(For references see above)

Authors:

Nikitina N.V.: Cand. of Biol. Sci., Assoc. Prof., Lead Research Officer, Dept. of Virology; vnivip.nikitina@yandex.ru. **Leonov I.K.:** Cand. of Vet. Sci., Senior Research Officer, Dept. of Virology; leonov_ila@mail.ru. **Yavdoshak L.I.:** Senior Research Officer, Dept. of Virology; yavdoshak2014@yandex.ru.

Submitted 07.07.2025; revised 14.08.2025; accepted 20.09.2025.

© Никитина Н.В., Леонов И.К., Явдошак Л.И., 2025