



Контроль вирусного гепатита утят типа I

Никитина Н.В., кандидат биологических наук, доцент, ведущий научный сотрудник отдела вирусологии

Всероссийский научно-исследовательский ветеринарный институт птицеводства (ВНИВИП) – филиал ФГБНУ ФНЦ «Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт птицеводства» РАН

Аннотация: Вирусный гепатит утят типа I (ВГУ-1) является высоко летальной, контагиозной и быстро распространяющейся инфекцией молодых утят, приводящей к значительным экономическим потерям в утководстве. Важная роль по предупреждению и ликвидации болезни принадлежит специфической профилактике. Приведены результаты экспериментальных исследований по применению инактивированной вакцины против ВГУ-1 на взрослых утках, которые были первично вакцинированы аттенуированной вирусвакциной. Показано, что утята, вакцинированные живой вакциной в 2-суточном возрасте и затем вакцинированные инактивированной вакциной в 6 недель, имели титры антител в 2 раз выше, чем утки, вакцинированные только инактивированной вакциной. Вакцина может быть широко использована для специфической профилактики болезни в устойчиво неблагополучных по ВГУ-1 хозяйствах.

Ключевые слова: вирусный гепатит утят типа I, вакцина, сыворотка крови, специфические антитела.

Введение. Вирусный гепатит утят типа I (ВГУ-1) является высоко контагиозной и быстро распространяющейся инфекцией молодых утят, в основном, до 4-недельного возраста. Болезнь протекает с преимущественным поражением печени и высокой смертностью молодняка (до 95%), что наносит значительный экономический ущерб утководческим хозяйствам [1-3].

Контроль над заболеванием в настоящее время основан на использовании живых вакцин, которыми вакцинируют утят однодневного возраста, чтобы получить активный иммунитет, или уток-несушек, с целью передачи материнских антител потомству. Живые вакцины из аттенуированных штаммов при однократной вакцинации родительского стада индуцируют недостаточно длительный напряженный иммунитет, поэтому в процессе выращивания необходима 2-3-кратная вакцинация [4-9].

За рубежом для обеспечения стойкого эпизоотического благополучия по ВГУ-1 живой вакциной вакцинируют утят однодневного возраста, а инактивированную вакцину применяют при иммунизации ремонтного молодняка уток или при его переводе в родительское стадо, за месяц перед началом яйцекладки, с целью получения утят, устойчивых к заражению полевым вирусом в течение восприимчивого периода [10].

При экспериментальном изучении опытных серий эмбриональной инактивированной вакцины из вакцинного штамма «ВН-3» с использованием отечественного масляного адьюванта титры вируснейтрализующих антител составили $9,5 \pm 1,2 \log_2$ и оставались стабильными в течение 9 мес. Уровень материнских антител у потомства составил $7,0-6,5 \log_2$ в зависимости от сроков после вакцинации.

Целью настоящих исследований явилось изучение эффектив-

ности инактивированной эмульгированной вакцины против ВГУ-1 на взрослых утках, первоначально вакцинированных аттенуированной вирусвакциной ВНИВИП.

Материал и методика исследований. Для проведения экспериментальных исследований был использован «Штамм «ВН-3» вируса гепатита утят типа I, рода *Avihepatovirus* семейства *Picornaviridae*, для производства вакцинных препаратов и диагностических наборов» (патент RU 267599). Его культивировали и титровали на 11-12-суточных утиных эмбрионах из благополучного по инфекционным болезням фермерского хозяйства.

Эмбрионы заражали в аллантоисную полость оттитрованным вирусом в дозе $3,0 \text{ Ig ЭЛД}_{50}/0,2 \text{ см}^3$. Инфицированные и контрольные эмбрионы инкубировали при температуре $37,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$ и относительной влажности 60-70% в течение 96 ч, ежедневно овоскопируя. Вирусосодержащий



материал, собранный от павших эмбрионов через 72-96 ч инкубации, после гомогенизирования и 3-кратного замораживания и оттаивания центрифугировали при 3000 об./мин в течение 30 мин. В надосадочной жидкости определяли биологическую активность вируса.

Биологическую активность вируса оценивали титрованием десятикратных разведений вирусосодержащего материала на утиных эмбрионах. Величину титра вычисляли методом Рида-Мюнха (1938) и выражали в $\lg \text{ЭЛД}_{50}/\text{см}^3$.

Стерильность вирусосодержащего материала определяли по ГОСТ 28085-2013 высевами в МПБ, МПА, МППБ под вазелиновым маслом и на агаре Сабуро. Посевы выдерживали при 37°C в течение 10 суток, а на агаре Сабуро при 18-24°C в течение 14 суток.

Вирус инаktivировали биоцидом «Инак» (ЗАО «Петрохим», Россия) в конечной концентрации 0,1% в режиме постоянного перемешивания в течение 24 ч при температуре 37,0±0,5°C. По окончании инаktivации остаточное количество биоцида нейтрализовали 2М раствором тиосульфата натрия до конечной концентрации 0,03 М. Полноту инаktivации вируса проверяли методом трехкратных пассажей на утиных эмбрионах, которым тестируемый материал вводили в аллантаоисную полость в объеме 0,2 см³. При инкубации в течение 5 суток характерных для вируса гепатита утят изменений в эмбрионах и их гибели не наблюдали, что подтверждало его авирулентность.

При изготовлении инаktivированной эмульгированной вак-

цины использовали масляный адьювант АБ-М4 (В/М) (ЗАО «Петрохим», Россия). Его смешивали с инаktivированным антигеном в соотношении 70:30 на гомогенизаторе в течение 5-10 мин при 3000 об./мин и температуре 10°C.

Определение физико-химических свойств вакцины проводили по общепринятым методам.

Безвредность инаktivированной эмульгированной вакцины оценивали через 21 сутки после иммунизации птицы по критериям, предложенным Н.Д. Stone (1997).

Аттенуированную вакцину изготавливали из вирусосодержащего материала, полученного от зараженных утиных эмбрионов, и защитной среды высушивания ВНИВИП в соотношении 2:1. Ее опытные образцы содержали вакцинный штамм вируса в концентрации 6,25±0,15 $\lg \text{ЭЛД}_{50}/\text{см}^3$.

Утят суточного возраста, полученных из фермерского хозяйства, благополучного по острым инфекционным болезням, в том числе и по ВГУ-1, разделили на 3 опытные группы, и их сыворотка крови была исследована методом ИФА для подтверждения отсутствия антител к вирусу гепатита. Птицу всех групп содержали в изолированных боксах.

Утят группы 1 (n=15) в 2-суточном возрасте вакцинировали аттенуированной вирусвакциной из штамма «ВН-3», подкожно, дозой 10⁴ ЭЛД_{50} в 0,5 см³, а через 6 недель этих уток иммунизировали инаktivированной эмульгированной вакциной однократно, подкожно, в область нижней трети шеи, в объеме 1,0 см³. Группу 2 (n=15) вакцинировали только инаktivированной вакциной в возрасте 6 недель,

подкожно, в область нижней трети шеи, в объеме 1,0 см³. Утят контрольной группы (n=10) не прививали.

Пробы крови у утят, вакцинированных живой вакциной, брали на 14, 28 и 42 сутки, у взрослых уток – на 14 и 28 сутки после иммунизации. Полученную от них сыворотку исследовали на наличие специфических антител в β -варианте реакции нейтрализации (РН) [11] и ИФА [12].

Полученные данные обрабатывали статистически с использованием критерия Стьюдента, считая различия достоверными при $p < 0,05$.

Результаты исследований и их обсуждение. Физико-химические свойства инаktivированной вакцины (стабильность эмульсии, гранулометрический состав, кинематическая вязкость) соответствовали нормативным требованиям.

Данные по изучению антигенной активности опытной аттенуированной вирусвакцины свидетельствовали о том, что в течение всего периода наблюдения она индуцировала у утят выработку специфических антител с нарастающим титром как в РН, так и в ИФА (табл. 1).

Уровень специфических антител у вакцинированных утят на 42 сутки составил в РН 8,0±1,2 \log_2 , а в ИФА – 3612±108. Нежелательных поствакцинальных реакций у утят не отмечали.

После повторной вакцинации уток 1 группы инаktivированной вакциной средние титры антител в сыворотке крови значительно увеличились и составили на 14 и 28 сутки в РН 12,0±1,0 и 13,5±1,2 \log_2 , а в ИФА – 10252±208 и 15160±228 соответственно (табл. 2).



Таблица 1. Уровень специфических антител у утят, вакцинированных аттенуированной вакциной из штамма «ВН-3» (n=15)

Группы	Уровень антител в РН, log ₂ / ИФА*		
	Сроки после вакцинации, сут.		
	14	28	42
Утята, вакцинированные живой вакциной	6,5 / 1043	7,5 / 2412	8,0 / 3612
Утята, не вакцинированные	552±53	542±54	532±48

*Обратные значения титра антител в ИФА, p<0,05.

Таблица 2. Уровень специфических антител у уток, вакцинированных инактивированной вакциной из штамма «ВН-3» (n=15)

Группы	Уровень антител в РН, log ₂ / ИФА*	
	Сроки после вакцинации, сут.	
	14	28
Утки, вакцинированные живой + инактивированной вакциной	12,0 / 10252	13,5 / 15160
Утки, вакцинированные инактивированной вакциной	9,0 / 4586	10,5 / 9954
Утки, не вакцинированные	532±48	535±51

*Обратные значения титра антител в ИФА, p< 0,05.

Уровень антител в сыворотке крови уток, вакцинированных только инактивированной вакциной, был значительно ниже и составил на 14 и 28 сутки после иммунизации в РН 9,0±0,5 и 10,5±0,8 log₂, а в ИФА – 4586±112 и 9954±208 соответственно (p<0,05).

Полученные данные свидетельствуют о том, что инактивированная вакцина вызывает иммунологическую перестройку в организме уток, индуцируя выработку специфических антител в высоких титрах. У птицы, вакцинированной эмульгированной инактивированной вакциной, после иммунизации утят в 2-суточном возрасте аттенуированной вирусвакциной против ВГУ-1, титры антител на 28 сутки после вакцинации достигали 13,5±0,5 log₂, а титры антител в сыворотке крови суточных утят, полученных от этих уток, колебались в пределах 9,0-8,0 log₂ в зависимости от сроков после вакцинации.

Местные реакции на введение инактивированной вакцины отсутствовали, клинических отклонений в состоянии здоровья птицы не регистрировали, что указывало на безвредность вакцины.

Следует отметить, что однократная вакцинация инактивированной вакциной после применения аттенуированной вирусвакцины для уток-несушек имеет значительные преимущества, заключающиеся в снижении трудозатрат и стресса по сравнению с многократным применением живой вакцины на родительском поголовье.

Заключение. Инактивированная эмульгированная вакцина против ВГУ-1 обладает высокими иммунобиологическими свойствами и может быть широко использована для специфической профилактики болезни в устойчиво неблагополучных хозяйствах.

Литература

1. Kim M.C., Kwon Y.K., Joh S.J., Kim S.J, Tolf C., Kim J.H., Sung H.W., Lindberg A.M., Kwon J.H. 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 // Arch. Virol. - 2007. - V. 152, No 11. - P. 2059-2072.
2. Li J., Bi Y., Chen C., Yang L., Ding C., Liu W. Genetic characterization of duck hepatitis A viruses isolated in China // Virus Res. - 2013 - V. 178, No 2. - P. 211-216.
3. Трефилов Б.Б., Никитина Н.В., Дмитриев К.Ю., Трубицын М.М. Вирусный гепатит утят типа I (эпизоотология, патогенез и диагностика) // Эффективное животноводство. - 2017. - №3. - С. 12-13.
4. Глейзер С. В., Фоменко В. Ю., Ирза В. Н. Специфическая профилактика вирусного гепатита утят // Птицеводство. - 2009. - №3. - С. 44.
5. Ирза В.Н., Фоменко В.Ю., Глейзер С.В. [и др.] Эмбриональная вакцина против ВГУ // Мат. XVI конф. ВНАП «Достижения в современном птицеводстве: исследования и инновации». - Сергиев Посад, 2009. - С. 362-364.
6. Roh J.-H., Kang M. Live attenuated duck hepatitis virus vaccine in breeder ducks: protective efficacy and kinetics of maternally derived antibodies // Vet. Microbiol. - 2018. - V. 219. - P. 107-112.
7. Kang M.S., Jang H.K, Kim M.C., Kim M.J., Joh S.J, Kwon J.H, Kwo Y.K. Development of a stabilizer for lyophilization of an attenuated duck viral hepatitis vaccine // Poult. Sci. - 2010. - V. 89. - P. 1167-1170.
8. Zou Z., Ma J., Huan K., Chen H., Liu Z., Jin M. Live attenuated vaccine based on duck enteritis virus against duck hepatitis A virus types 1 and 3 // Front. Microbiol. - 2016. - V. 7. - P. 1613.
9. Kang M.S., Roh J.H., Jang H.K. Protective efficacy of a bivalent live attenuated

vaccine against duck hepatitis A virus types 1 and 3 in ducklings // Vet. Microbiol. - 2018. - V. 214. - P. 108-112.

10. Woolcock P.R. Duck hepatitis virus type I: studies with inactivated vaccines in breeder ducks // Avian Pathol. - 1991. - V. 20. - P. 509-522.

11. Белоусова Р.В. Практикум по ветеринарной вирусологии / Р.В. Белоусова, Н.И. Троценко, Э. А. Преображенская. - 3-е изд., перераб. и доп. - М.: Колос, 2013. - С. 248.

12. Никитина Н.В., Трефилов Б.Б., Дмитриев К.Ю. Способ определения специ-

фических антител к вирусу гепатита утят типа I. Патент RU 2684417, 2018.

Для контакта с автором:

Никитина Нина Васильевна

E-mail:

vnivip.nikitina@yandex.ru

Control of Duck Viral Hepatitis A Type I with the Use of an Inactivated Vaccine

Nikitina N.V.

*Federal Scientific Center "All-Russian Research and Technological Institute of Poultry"
of Russian Academy of Sciences*

Summary: Duck viral hepatitis A type I (DVH-1) is a highly lethal, contagious and rapidly spreading infection of young ducklings resulting in significant financial losses to duck farms. The specific prophylaxis of the disease plays an important role in its on-farm prevention and elimination. The results of the experimental study are presented on the application of an inactivated vaccine against DVH-1 at 6 weeks of age to adult ducks preliminary vaccinated or not vaccinated with an attenuated live vaccine at 2 days of age. It was found that the specific antibody titers in ducklings vaccinated with live vaccine at 2 days of age and vaccinated with an inactivated vaccine at 6 weeks of age were 2-fold higher in compare to ducks vaccinated with an inactivated vaccine only. The conclusion was made that inactivated vaccine can be widely used for specific prophylaxis of DVH-1 on the farms with permanent problems with the disease.

Keywords: duck viral hepatitis A type I, vaccine, blood serum, specific antibodies.

