

Разработка инактивированной эмульгированной вакцины против вирусного гепатита утят типа I

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

Явдошак Л.И., старший научный сотрудник отдела вирусологии

Леонов И.К., кандидат ветеринарных наук, старший научный сотрудник отдела вирусологии

Трубицын М.М., младший научный сотрудник отдела вирусологии

Всероссийский научно-исследовательский ветеринарный институт птицеводства (ВНИВИП) - филиал ФНЦ «ВНИТИП» РАН

Аннотация: *Первостепенным этапом в борьбе с вирусным гепатитом утят типа I в племенных стадах уток является применение средств специфической профилактики. В работе представлены результаты основных этапов технологического процесса изготовления инактивированной вакцины против вирусного гепатита утят типа I. Оптимизированы параметры получения вирусосодержащего материала, очистки, концентрации антигена, инактивации вирусного генома и включения в состав вакцины адьюванта. Показано, что вакцина обладает высокой иммунобиологической активностью и может быть использована для специфической профилактики против данной болезни.*

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

Введение. Вирусный гепатит утят типа I (ВГУ-1) - контагиозная, сравнительно малоизученная болезнь, поражающая утят, в основном, до 4-6-недельного возраста, протекает с преимущественным поражением печени [1,2]. В некоторых утководческих хозяйствах от этой болезни погибает до 95% утят, что наносит значительный экономический ущерб [3,4].

В настоящее время большинство исследователей в борьбе с вирусными инфекциями склонны отдавать предпочтение инактивированным вакцинам [5-7], так как они разрешают проблему нежела-

тельных поствакцинальных реакций, исключают возможность заражения восприимчивой птицы и возникновение латентной инфекции, обусловленной вакцинным вирусом.

Целью настоящих исследований явилась разработка технологии изготовления инактивированной эмульгированной вакцины против ВГУ-1.

Материал и методика исследований. В работе использовали вакцинный штамм «ВН-3» вируса ВГУ-1, который депонирован в Государственной коллекции вирусов НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского, ФГБНУ

«ФНИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России под № 2859. Штамм вируса запатентован в РФ как «Штамм «ВН-3» вируса ВГУ-1 рода *Avihepatovirus* семейства *Picornaviridae* для производства вакцинных препаратов и диагностических наборов, патент № 2675995 [8].

При проведении экспериментов использовали инкубационное яйцо и утиные эмбрионы, доставленные из ООО «Племптицевазавод Благоварский».

Биологическую активность вируса оценивали титрованием десятикратных разведений вирусосодержащего материала на ути-





ных эмбрионах. Величину титра вычисляли методом, предложенным Ридом и Мюнхом [9], и выражали в $Ig\text{ ЭЛД}_{50}/\text{см}^3$.

Стерильность вирусосодержащего материала определяли по ГОСТ 28085-2013 посевами 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 $18-24^{\circ}\text{C}$ в течение 14 суток.

Вирус инаktivировали аминокислотами (АЭИ) (ООО «Биохимресурс», Россия). Остаточное количество АЭИ нейтрализовали 2М раствором бисульфита натрия до конечной его концентрации $0,01-0,03\text{ М}/\text{дм}^3$. Полноту инаktivации вируса проверяли методом трехкратных пассажей на утиных эмбрионах.

При изготовлении инаktivированной вакцины против ВГУ-1 использовали масляный адьювант АБ-4М (В/М) (ЗАО «Петрохим», Россия). Изготовление эмульгированной инаktivированной вакцины и определение ее физических параметров проводили общепринятыми методами, описанными в литературе [7].

Антигенную активность вакцины оценивали по выработке специфических антител у вакцинированных уток, уровень которых определяли в реакции нейтрализации и методом иммунофермен-

тного анализа [8].

Иммуногенные свойства вакцины оценивали по уровню трансовариальных антител в желтке яиц и в сыворотке крови суточных утят, полученных от иммунизированных уток, и их устойчивости к контрольному заражению. Вакцину считали иммуногенной, если титр антител в сыворотке крови был не ниже $5\log_2$ у более чем 80% утят [10].

Полученные данные подвергали статистическому анализу с использованием критерия Стьюдента, считая различия достоверными при $P<0,05$ [9].

Результаты исследований и их обсуждение. При разработке технологии изготовления инаktivированной вакцины против ВГУ-1 основное внимание уделяли следующим этапам:

- подбору производственного штамма вируса гепатита;
- выбору чувствительной биологической системы его культивирования;
- выбору инаktivанта и оптимальных условий инаktivации вируса;
- разработке компонентного состава инаktivированной вакцины;
- контролю физических и иммунобиологических свойств вакцины;
- испытанию антигенных и иммуногенных свойств вакцины.

Получение вирусного материала занимает важное место в технологии изготовления инаktivированной вакцины против ВГУ-1. Для поддержания и наработки вирусосодержащего материала использовали систему посевных материалов (seed lot system).

Штамм «ВН-3» вируса культивировали на развивающихся 11-12-суточных утиных эмбрионах из благополучных по инфекционным болезням хозяйств, в том числе и по ВГУ-1. Эмбрионы заражали путем инокуляции в аллантоисную полость оттитрованным вирусом в дозе $1000\text{ ЭЛД}_{50}/0,2\text{ см}^3$. Инфицированные эмбрионы инкубировали при $37\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ и относительной влажности 60-70% в течение 72 ч. Вирусосодержащий материал (ВСМ) (аллантоисная жидкость и тушки), собранный от эмбрионов, гомогенизировали, однократно замораживали и оттаивали, затем очищали центрифугированием при 3000 об./мин в течение 30 мин при 4°C . Инфекционная активность штамма «ВН-3» составила $7,2\pm 0,2\text{ Ig ЭЛД}_{50}/\text{см}^3$.

Важным условием эффективности инаktivированных вакцин является выбор инаktivатора и оптимальных условий инаktivации, позволяющих полностью и необратимо лишить вирус вирулентных свойств, при максимальном сохранении целостности анти-



Таблица 1. Данные кинетики инактивации вируса гепатита утят типа I аминоэтилэтиленимином (АЭЭИ)

Концентрация АЭЭИ, %	Скорость инактивации, lg К _{ин}			
	Время экспозиции, ч:			
	6	12	18	24
0,02	0,96	0,84	0,72	0,46
0,05	0,86	0,79	0,64	0,24
0,1	0,72	0,58	0,22	0

Примечание: * - обратные значения титра антител в ИФА.

генных структур вирионов, обеспечивающих специфический иммунный ответ у привитого организма.

По данным литературы известно, что формальдегид, используемый для инактивации вируса гепатита, оказывает денатурирующие действие на поверхностные белки вириона, что могло снижать антигенную активность вируса. При этом производные этиленмина минимально изменяют ответственные за антигенность белковые структуры вириона, а антигены продолжают длительное время сохранять свои свойства при хранении [11].

Поэтому для инактивации вируса использовали АЭЭИ. Результаты инактивации вируса АЭЭИ представлены в табл. 1.

Скорость инактивации вируса с помощью АЭЭИ находилась в прямой зависимости от концентрации препарата и времени воздействия. Кинетика инактивации вируса, обработанного различными концентрациями (0,05; 0,02; 0,1%) АЭЭИ при температуре 37⁰С и рН 7,2 в режиме постоянного перемешивания, показала, что скорость инактивации возрастала

по мере увеличения концентрации препарата в вирусосодержащей суспензии. При обработке вируса инактивантом в концентрации 0,1% константа скорости инактивации через 24 ч (lg К_{ин}=0) подтверждала полную потерю вирусом инфекционной активности.

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.

При конструировании оптимальной формы инактивированной вакцины против ВГУ-1 также проведены эксперименты по подбору эффективных адьювантов - веществ разнообразной химической природы, неспецифически стимулирующих иммунный ответ к антигену вируса гепатита. В качестве масляной фазы использовали адьювант АБ-М4 (В/М) (ЗАО «Петрохим», Россия). Вакцину против ВГУ-1 готовили на гомогениза-

торе при скорости вращения винта 3000 об./мин в течение 5-10 мин и температуре 10⁰С, при соотношении антигена и адьюванта 30:70, установленном экспериментально, которое в дальнейшем считали оптимальным, с обязательным учетом инфекционной активности вируса до инактивации.

Для изготовления инактивированной эмульгированной вакцины против ВГУ-1 использовали вирусный антиген с активностью до инактивации 7,0-8,0 lg ЭЛД₅₀/см³.

Одним из звеньев контроля качества инактивированных вакцин в процессе их производства и хранения является определение физических свойств (стабильность эмульсии, гранулометрический состав, кинематическая вязкость). Установлено, что физические свойства инактивированной эмульгированной вакцины в процессе хранения существенно не изменились и оставались в пределах нормативных требований. Высокая стабильность вакцинной эмульсии, низкая вязкость и высокая гомогенность дисперсной фазы в вакцине сохранялись как до, так и после хранения в течение 12 месяцев при температуре от 4 до 8⁰С.

Антигенные и иммуногенные свойства инактивированной вакцины оценивали по изменению



серологических показателей у вакцинированных уток, а также уровня антител в желтке яиц и у суточных утят, полученных от привитых уток. Полученные результаты исследований свидетельствовали о том, что у иммунизированных уток наступала выраженная сероконверсия. Повышение титра антител наблюдали постепенно, и максимальных значений титр достигал к 30-60 сут. после введения вакцины. Результаты исследований сыворотки крови в ИФА представлены в табл. 2.

Уровень антител в сыворотке крови уток, вакцинированных инактивированной вакциной, был максимальным в течение 6 месяцев, а затем он уменьшился в среднем на 17% (срок наблюдения 9 месяцев), что обеспечивало защиту утят от заражения.

При изучении влияния различных доз антигена в вакцине на иммуногенные показатели установлена прямая зависимость титров антител от дозы антигена. Так, при диапазоне доз антигена $2,5 \cdot 10^4$ - $2,5 \cdot 10^5$ ЭЛД₅₀/см³ титры антител равнялись в ИФА (8011 ± 106)-(10295 ± 162) и (8871 ± 101)-(11220 ± 175) на 28-е и 42-е сутки соответственно (значения титров в обратных величинах).

Для оценки иммуногенных свойств инактивированной вакцины определяли уровень специфических антител к ВГУ-1 в желтке

Таблица 2. Титр специфических антител в крови у уток, вакцинированных против вирусного гепатита утят типа I инактивированной эмульгированной вакциной

	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

яиц и в сыворотке крови у суточных утят. Установлено, что в желтке яиц уровень материнских антител в реакции нейтрализации колебался в пределах $9,0-7,0 \log_2$ в зависимости от сроков после вакцинации, а средний титр антител в ИФА у 2-3-суточных утят равнялся 6552 ± 132 . При контрольном заражении показана 100%-ная иммуногенная эффективность с коэффициентом корреляции $r = -1,0$.

Заключение. Разработана технология изготовления высокоэффективной инактивированной вакцины против вирусного гепатита утят типа I. Инактивированная эмульгированная вакцина безвредна, стабильна и способна вызывать иммунобиологическую перестройку в организме уток, индуцируя выработку специфических антител в высоких титрах, которые обеспечивают защиту молодняка уток от болезни в восприимчивый период.

На вакцину получен патент РФ на изобретение «Вакцина против вирусного гепатита утят типа I» № 2712948, приоритет 27.06.2019.

Литература

1. Kim M.C., Kim M.J., Kwon Y.K., Lindberg A.M., Joh S.J., Kwon H.M. [et al.] Development of duck hepatitis A virus type 3 vaccine and its use to protect ducklings against infections // Vaccine. - 2009. - V. 27. - P. 6688-6694.
2. 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. // Arch. Virol. - 2016. - V. 161. - P. 405-416.
3. Бубашко О.А. Вирусный гепатит утят в Республике Беларусь и его профилактика // Эпизоотология, иммунология, фармакология и санитария. - 2005. - № 1. - С. 25-28.
4. Князев В.П. Болезни водоплавающих птиц. - Владимир, 2013. - 325 с.
5. Борисова И.А. Разработка технологии изготовления и контроля инактивированной вакцины против ньюкаслской болезни и метапневмовирусной инфекции птиц: дис. ... канд. биол. наук. - Владимир, 2008. - 167 с.
6. Джавадов Э.Д. Вихрева И.Н., Дмитриева М.Е., Дубовой А.С., Самусева Г.Н. Профилактика болезней птиц инактивированными вакцинами серии «Авикрон» // Мат. Междун. конгр. - СПб, 2009. - С. 30-31.
7. Трефилов Б.Б., Никитина Н.В.,

Михайлов А.О., Явдошак Л.И. Вакцина и способ вакцинации против парвовирусной инфекции гусей. Пат. RU 2420571, 2010.

8. 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. Пат. RU № 2675995, 2018.

9. Белоусова Р.В. Практикум по ветеринарной вирусологии: 3-е изд., пере-

раб. и доп. / Р.В. Белоусова, Н.И. Троценко, Э. А. Преображенская. - М.: Колос, 2013. - С. 248.

10. Никитина Н.В., Трефилов Б.Б., Дмитриев К.Ю. «Способ определения специфических антител к вирусу гепатита утят типа I». Пат. RU 2684417, 2018.

11. Лезова Т.А., Михалишин В.В. Вирулицидная активность координационных соединений этиленмина в отношении вирусов // Актуальные проблемы инфекционной патологии сельско-

хозяйственных животных: Мат. Междун. науч. конф., посв. 45-летию ФГУ «ВНИИЗЖ». - Владимир, 2003. - С. 483-487.

Для контакта с авторами:

Никитина Нина Васильевна

E-mail: vnivip.nikitina@yandex.ru

Явдошак Лариса Ивановна

E-mail: yavdoshak2014@yandex.ru

Леонов Илья Константинович

E-mail: leonov_ila@mail.ru

Трубицын Михаил Михайлович

E-mail: hawx_93@mail.ru

The Development of Inactivated Emulsified Vaccine against Duck Viral Hepatitis Type I

Nikitina N.V., Yavdoshak L.I., Leonov I.K., Trubitsyn M.M.

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

Summary: The primary stage in the fight against duck viral hepatitis type I (DVH-1) in parental flocks of ducks is the use of specific prophylactic agents. The main stages of the technology of inactivated vaccine against DVH-1 are presented. The parameters for the obtaining of virus-containing material, purification, antigen concentration, inactivation of the viral genome, and inclusion of an adjuvant in the vaccine composition were optimized. It was shown that the vaccine has high immunobiological activity and can be used for specific prophylaxis of this disease.

Key words: duck viral hepatitis type I, vaccine, specific antibodies.

ОТРАСЛЕВЫЕ НОВОСТИ

Комбикорма для птиц в России подорожали до нового рекорда

Об этом информирует SoyaNews, ссылаясь на свежие данные ЕМИСС.

В июле 2020г. цена на комбикорма для птиц в нашей стране составила в среднем 19,5 тыс.руб./т. - это на 0,1% больше, чем месяцем ранее, и на 2,3% больше, чем в июле 2019 года. С начала года цена выросла на 10,3%. За период с января 2018г. минимальная цена на комбикорма для птиц в России зафиксирована в январе 2018г. - 15,0 тыс.руб/т, обращает внимание SoyaNews; максимальная зарегистрирована в июле 2020г. - 19,5 тыс.руб./т.

Самые дорогие комбикорма для птиц в июле 2020г. продавались в Южном федеральном округе (22,8 тыс.руб./т), самые дешёвые - в Сибирском (18,0 тыс.руб./т).

Источник: soyanews.info