

**ФАНО РОССИИ**  
**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

**ЛЕОНОВ ИЛЬЯ КОНСТАНТИНОВИЧ**

**БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ВАКЦИННЫХ ШТАММОВ**  
**ВИРУСА 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

Санкт-Петербург 2017 г

## СОДЕРЖАНИЕ

стр.

ВВЕДЕНИЕ .....	4
1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	8
1.1 Краткие исторические данные, распространение вирусного гепатита утят типа I и экономический ущерб, причиняемый этой болезнью.....	8
1.2 Биологические свойства вируса гепатита утят типа I.....	9
1.2.1 Классификация вируса гепатита утят.....	9
1.2.2 Устойчивость вируса к физическим и химическим факторам.....	10
1.2.3 Патогенность вируса гепатита утят типа I (P-признак) .....	11
1.2.4 Способность вируса гепатита к репликации в клеточных культурах (ТС-признак) .....	14
1.2.5 Антигенная вариабельность вируса.....	15
1.3 Эпизоотологические особенности вирусного гепатита утят типа I.....	15
1.4 Патогенез вирусного гепатита утят типа I.....	18
1.5 Клиническая картина и патологоанатомические изменения при вирусном гепатите типа I.....	19
1.6 Диагностика болезни .....	22
1.7 Иммунитет и профилактика вирусного гепатита утят типа I.....	24
2 СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	27
2.1 Материалы и методы исследований.....	27
2.2 Результаты собственных исследований.....	35
2.2.1 Патогенные свойства вакцинных штаммов вируса гепатита утят типа I (P-признак) .....	35
2.2.1.1 Изучение патогенности для развивающихся куриных и утиных эмбрионов (P <sub>che</sub> - и P <sub>de</sub> - признаки).....	36
2.2.1.2 Изучение патогенности для утят (P <sub>d</sub> - признак) .....	39
2.2.2 Биологические свойства вируса гепатита утят типа I, связанные с особенностями внутриклеточной репликации.....	41
2.2.2.1 Изучение цитопатогенной активности вакцинных штаммов вируса гепатита утят.....	41

2.2.2.2 Изучение способности вакцинных штаммов ВГНКИ-К и 3М-УНИИП вируса гепатита утят типа I к репликации в культуре клеток при различной температуре ( $R_{ct}^{TC}$ – признак) .....	44
2.2.2.3 Изучение способности вакцинных штаммов вируса к индукции интерферона и их чувствительность к действию экзогенного интерферона.....	47
2.2.3 Признаки вакцинных штаммов вируса гепатита утят типа I, обусловленные свойствами поверхностной структуры вируса.....	50
2.2.3.1 Изучение термостабильности ( $t_{56}$ -признак) вируса гепатита утят.....	51
2.2.3.2 Изучение устойчивости вируса гепатита утят к действию формальдегида.....	53
2.2.3.3 Изучение антигенных свойств (антигенной специфичности Ag-признака и степени нейтрализации An-признака) вакцинных штаммов вируса гепатита утят типа I.....	55
3 ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	61
4 ВЫВОДЫ.....	69
4.1 Практические предложения .....	70
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	71
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	72
ПРИЛОЖЕНИЕ.....	93

## ВВЕДЕНИЕ

**Актуальность темы исследования.** Интенсивному развитию промышленного утководства препятствуют инфекционные болезни. Среди них по всему миру распространение получили вирусные гепатиты утят типов I, II и III [56,71,125,169,170,208].

К числу малоизученных относится вирусный гепатит утят типа I – сверхострая контагиозная болезнь утят до 6 – недельного возраста и латентно протекающая у уток, характеризующаяся поражением печени и высокой смертностью среди молодняка (от 30 до 95 %) [15,49,56,72,163].

Это связано с эпизоотологическими особенностями, стационарностью очагов, значительной устойчивостью возбудителя, его принадлежностью различным генотипам и трудностью оздоровления хозяйств [10,16,30,38,74]. Для профилактики болезни в Российской Федерации депонированы аттенуированные вакцинные штаммы ВГНКИ-К и 3М-УНИИП вируса гепатита утят типа I. В настоящее время изготавливается вирусвакцина из штамма ВГНКИ-К вируса гепатита [43,47].

Накоплен обширный материал, с достаточной убедительностью показывающий возможность широкой изменчивости вирусов, вызывающих гепатиты у уток, как в естественных условиях циркуляции, так и при длительных пассажах в организме восприимчивой птицы.

В связи с выше изложенным, усовершенствование имеющихся методов контроля и научно-практическая разработка новых критериев контроля вакцинных штаммов вируса гепатита утят типа I в процессе производства и применения вакцин, является актуальным.

**Степень разработанности темы.** Эпизоотическая ситуация по вирусному гепатиту утят в промышленных утководческих хозяйствах остается сложной по причине несовершенной схемы специфической профилактики болезни, изменчивости и принадлежности возбудителя к различным серотипам.

В Российской Федерации для борьбы с вирусным гепатитом утят типа I применяют эмбриональную вирусвакцину из аттенуированного штамма ВГНКИ-К вируса гепатита [43,49].

**Цели и задачи исследования.** Целью исследования явилось изучение биологических свойств вакцинных штаммов вируса гепатита утят типа I, их стабильность в процессе исследований.

В соответствии с поставленной целью были выдвинуты следующие задачи:

- изучить патогенные свойства вакцинных штаммов вируса гепатита утят типа I;
- изучить признаки вакцинных штаммов вируса гепатита утят типа I, связанные с особенностями их внутриклеточной репродукции и выявляемые *in vitro*;
- изучить признаки вакцинных штаммов вируса гепатита утят типа I, обусловленные свойствами поверхностной структуры вируса;

**Научная новизна.** Впервые изучены генетические признаки вакцинных штаммов ВГНКИ-К и 3М-УНИИП вируса гепатита утят, показано их различие и доказана необходимость использования их для контроля при производстве вакцины против вируса гепатита утят.

Показана возможность культивирования и динамика накопления вакцинных штаммов в различных биологических системах. Установлено различие в антигенной специфичности штаммов вируса.

**Теоретическая и практическая значимость работы.** Полученные результаты исследований используются для контроля стабильности вакцинных штаммов при производстве вакцин против вирусного гепатита утят типа I.

Разработаны ВНИВИП и утверждены академиком РАН В.И. Фисининым директором Федерального научного центра «Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт птицеводства» Российской академии наук методические положения «Диагностика вирусного гепатита утят типа I» от 25. 01. 2016 г.

**Методология и методы исследования.** Знание генетических маркеров вакцинных штаммов дает практике возможность отбирать штаммы вируса гепатита утят типа I при изготовлении вакцин, удерживать популяцию вакцинного штамма в состоянии генетической однородности, контролировать постоянство их свойств при непрерывных пассажах в процессе производства.

При выполнении работы использовали вирусологические, микробиологические, биохимические и генетические методы исследований.

Полученные данные обработаны методом вариационной статистики Стьюдента Фишера.

**Положения, выносимые на защиту:**

результаты изучения патогенных свойств вакцинных штаммов вирусного гепатита утят;

генетические признаки вакцинных штаммов, связанные с их внутриклеточной репродукцией;

генетические признаки вакцинных штаммов, обусловленные свойствами их поверхностной структуры.

**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 вирусологических, биохимических и серологических методов исследований.

Результаты исследований по теме диссертации доложены и обсуждены на заседаниях Методического совета отдела вирусологии и ОБП и Ученого совета ФГБНУ ВНИВИП (2013-2015), на Международном агропромышленном конгрессе «Актуальные проблемы ветеринарной медицины и зоотехнии» (Санкт-Петербург, 2012); XVIII Международной конференции: «Инновационное обеспечение яичного и мясного птицеводства» (Сергиев Посад, 2015); II Международном Ветеринарном Конгрессе VETistanbul Group – 2015 (SPb, 2015); Международной научно-практической конференции: «Фундаментальные и прикладные вопросы науки и образования». – Смоленск, 2016.

**Публикации.** По материалам диссертационной работы опубликовано 7 статей, в которых изложены основные положения и выводы по работе, из них 3 – в периодических изданиях, входящих в перечень российских научных рецензируемых

журналов для опубликования основных результатов диссертаций, утвержденных ВАК Министерства образования и науки РФ.

**Структура диссертации.** Диссертация изложена на 120 страницах компьютерного текста и состоит из следующих разделов: введение, основная часть, заключение, список сокращений, список литературы и приложения.

Диссертация иллюстрирована 16 таблицами, 7 рисунками и 7 формулами. Список литературы включает 230 источников, из которых 127 зарубежных.

## **1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ**

### **1.1 Краткие исторические данные, распространение вирусного гепатита утят типа I и экономический ущерб, причиняемый этой болезнью**

Вирусный гепатит утят типа I (инфекционный гепатит уток) – высоко контагиозная, сверхостро протекающая среди утят до 6-недельного возраста [10,50,71,77] и латентно среди уток болезнь [9,38,82,173,196], с преимущественным поражением печени и большой смертностью молодняка.

Болезнь впервые зарегистрирована в США на острове Лонг-Айленд в 1949 [174]. В течение трех месяцев инфекция охватила 75 ферм острова. Позже она распространилась в других штатах Америки [146,175] и в Канаде [177]. В 60-х годах XX столетия вирусный гепатит утят распространился по всем континентам: Бразилии (1957), Италии (1957), Нидерландах (1957), Германии и Франции (1958), Англии (1959), Египте, Бельгии и Индии (1958,1960), Чехословакии и Израиле (1959), России и Украине (1958), Румынии и Тайланде (1960), Японии (1960), и других странах. В 60-70 годы заболеваемость птицы достигала 100 %, а смертность от 20 до 95 % [135,193,195,199,202,203].

В СССР болезнь впервые зарегистрирована в 1958 году в Белгородской и Харьковской областях [71,78], а затем в различных регионах страны [2,3,19,30,35,51,52,67,80,87,91].

Вирусный гепатит утят (ВГУ) 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 усугубляется затратами на ограничительные мероприятия, нарушающие экономику хозяйства, особенно когда болезнь принимает стационарный характер [8,30,49,82,146,173,188].



## **1.2 Биологические свойства вируса гепатита утят типа I**

### **1.2.1 Классификация вируса гепатита утят**

К настоящему времени известно, что возбудителями гепатитов утят могут быть три типа вируса: тип 1 – «классический», распространенный повсеместно [110,111,226], тип 2, выделенный в Англии [113,138,194] и тип 3, выделенный в США [140,209]. Определено, что вирусы типа 1 и типа 3 – относятся к семейству пикорнавирусов. Вирус типа 1 репродуцируется в клеточных культурах и эмбрионах уток, кур, перепелок. Вирус типа 2 отличается от типа 1 тем, что хорошо репродуцируется в эмбрионах и организме уток, в культуре клеток печени и почек утенка, но его репродукция в культуре почек цыпленка и перепелки ограничена, а в эмбрионах кур он не репродуцируется. Важно отметить, что вирус типа 3 вызывает гепатит среди иммунных к вирусу типа 1 утят, то есть эти типы вируса имеют антигенные различия. Что касается вируса типа 2, то последние исследования показали, что он относится к астровирусам.

Возбудителем ВГУ типа 1 является РНК-содержащий вирус, относящийся к семейству Picornaviridae, роду Avihepatovirus гепатит уток типа 1 (Duck hepatitis virus – DHV-1, синонимы: инфекционный гепатит уток, вирусный гепатит утят, Duck virus hepatitis, Duck hepatitis type 1) [168,214].

Различают три различных генотипа, называемых – вирус гепатита уток А типа 1, 2 и 3 [220].

Филогенетический анализ, основанный на фрагментах VP1 DHV-1, показал три различные генетические группы. Показано соответствие среди генетических групп на основе полных VP0 и VP3 и неполных регионов 3D и названы ВГУ А, В и С. В попарном сравнении полного VP1, VP0, VP3 нуклеотида, фрагментов аминокислот и неполного региона 3D, вирусы гепатита утят того же генотипа были четко разграничены от гетерологичных генотипов.

Международный комитет по таксономии вирусов создал новый род Avihepatovirus в семействе Picornaviridae, который включает три серотипа вируса гепатита утят типа 1 (DHV-1) и обозначил их как DHAV-1, DHAV-2 и DHAV-3 (Resolution adopted by the world assembly of delegates of the oie in May, 2010).

Размер DHAV-1 составляет 20-40 нм [188]. Richter W.R. et al. [191] при проведении электронной микроскопии наблюдали в тонких срезах печени частицы размером 30 нм. Tauraso N.M. et al. [207] с помощью фильтрации подтвердили, что размер вируса не менее 50 нм.

Вирус гепатита утят типа 2 и 3 (DHV-2 и DHV-3) были классифицированы как род *Aviastrovirus* уток и переименованы в *Astrovirus* типа 1 и 2 соответственно [170,208], которые отличаются от вируса гепатита уток В, относящегося к роду *Avihepadnavirus*, и не вызывающего существенного клинического заболевания у уток [228].

### **1.2.2 Устойчивость вируса к физическим и химическим факторам**

Морфология и физико-химические свойства DHV-1 соответствуют характеристике его таксономического положения [207].

Вирус гепатита утят типа 1 сравнительно стабилен при температуре, не превышающей 40-45°C, но быстро инактивируется при более высоких температурах. Устойчив к тепловой инактивации при температуре 50°C в молярных растворах NaCl, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, MgCl<sub>2</sub> и MgSO<sub>4</sub> и стабилен при pH=3,0 в течение 9 часов [123,207]. Dvorakova D. а. Kozusnik L. [126] сообщили, что DHV-1 выдерживал нагревание 56°C в течение 18ч, в то время как другой штамм вируса потерял инфекционность после 105 мин воздействия этой же температуры [146]. Вирус инактивировался при температуре 56°C в течение 30 мин [146]. Однако по сообщению Asplin F.D. [112] вирус сохранял свою жизнеспособность при 56°C в течение 60 мин, но инактивировался при 62°C в течение 30 мин, а по данным Dvorakova D. а. Kozusnik L. [126] для полной инактивации вируса при 56°C потребовалось 23ч. При температуре 37°C вирус оставался жизнеспособным в течение 21 сут.

Ультрафиолетовые лучи на расстоянии 30 см от объекта инактивировали вирус за 3 мин, а 60 см – за 10 мин [20].

ВГУ-1 устойчив к действию эфира или фторуглерода [184], хлороформа [71,81], pH 3,0 или трипсина [207], 30% метанола или сульфата аммония [146]. Не

наблюдалось снижение активности вируса при обработке 2% раствором лизола или 0,1% раствором формальдегида [112], 15% раствором креолина, нафтализолола или 20% раствором безводного бикарбоната натрия [76]. Полная инаktivация вируса была отмечена при действии 1% раствора формальдегида или 2%-ного раствора гидроксида натрия при 15-20°C в течение 2ч и 2%-ного раствора гипохлорида кальция в течение 3ч [76], 3%-ного раствора хлорамина через 5ч или 0,2% раствора формальдегида через 2ч [126], 5%-ного раствора фенола, неразбавленного вескодина и гипохлорида натрия [145].

ВГУ-1 устойчив во внешней среде, особенно в белковых субстратах. Он сохранял патогенные свойства в несанированных птичниках до 75 сут, в помете – 37 сут, в подстилке – 21 сут, в воде – до 74 сут и в почве от 105 до 131-157 сут [26,71]. Г.Д. Волковский [25] и А.А. Поляков [76] сообщали, что вирус оставался жизнеспособным на поверхности стен птичников от 20 до 40 сут в зависимости от температуры воздуха, в помете до 15-20 сут. Вакцинный вирус гепатита сохранял свою биологическую активность в аэрозоле при 18-20°C в помещении в течение 45 мин [71].

При комнатной температуре вирус теряет патогенность через 48-96 ч. Вирусодержащая жидкость при хранении в холодильнике при 2-4°C остается инфекционной до 700 сут [26].

### **1.2.3 Патогенность вируса гепатита утят типа 1 (Р-признак)**

Патогенность – весьма стойкий наследственный признак вирусов, однако он может быть изменен в результате специальных воздействий. При этом у ряда вирусов были получены варианты, стойко снизившие или утратившие патогенность для каких-либо восприимчивых животных, а также приобретшие это свойство для обычно не восприимчивых животных.

В литературе накоплен обширный материал по изучению изменений в сторону аттенуации патогенности вирусов в результате различного рода экспериментальных воздействий. Наглядными примерами этого служат аттенуированные вирусвакцины

против целого ряда вирусных инфекций птиц: инфекционный ларинготрахеит, бурсальная болезнь, метапневмовирусная инфекция, оспа, парвовирусная инфекция.

ВГУ-1 патогенен, в основном, для утят до 30-суточного возраста. При инокуляции утят вируссодержащим материалом клинические признаки болезни появляются спустя 24-48 ч [67,114,127,175,190,197,212,230].

Латентный период болезни зависит от возраста утят и пути проникновения вируса в организм (энтеральный, аэрогенный), а при экспериментальном инфицировании от метода введения (внутримышечный, подкожный, внутрибрюшинный, в перепонку лапы, интраназальный) [50,55,87,114,185,188,190,199]. Так, при внутримышечной инокуляции гибель утят достигала от 37 до 93%, при интраназальной - 42%, при энтеральной – от 30 до 85%, при аэрогенном заражении – до 100%, при интраперитонеальном – до 60% и при контактном – от 30 до 80% [71,85,133,188].

У заболевших утят отмечали следующие симптомы: отказ от корма, движения становились неуверенными, нервные явления, подергивание головой, утята падали, совершали плавательные движения, судороги (рис.1).



Рисунок 1. Опистотонус у павшего утенка (цит. по Виноходов О.В. и др, 1998).

При вскрытии характерные изменения находили в печени. Она была ярко-желтая, охряная или желто-коричневая, на ее поверхности выступали множественные кровоизлияния (рис.2).

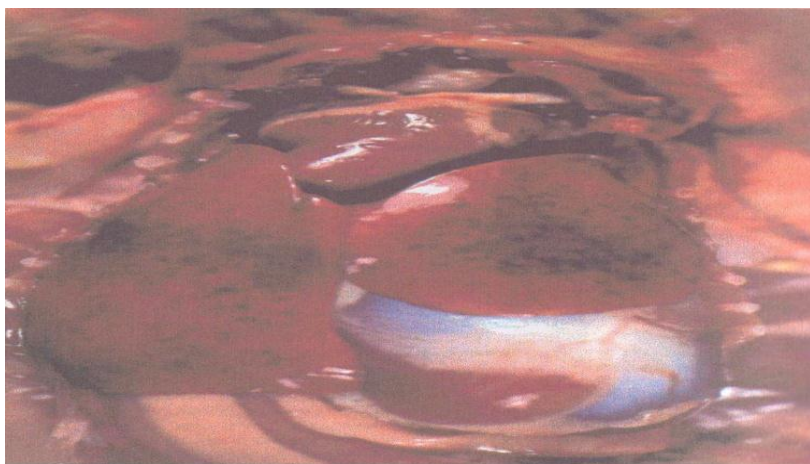


Рисунок 2. Кровоизлияния в печени павшего утенка  
(цит. по Виноходов О.В. и др, 1998).

Установлена патогенность вируса гепатита для суточных гусят. Так, гибель гусят в эксперименте на 4-5 сутки составляла от 50 до 66,5% с характерными для гепатита кровоизлияниями [1,71]. Показана патогенность вируса для диких утят при экспериментальном заражении. Болезнь протекала с характерными для вирусного гепатита клиническими признаками и патологоанатомическими изменениями, и гибелью до 30% [19,20,22].

Первые эксперименты по культивированию вируса гепатита утят на утиных эмбрионах проведены Rossi G. a. Pini A. [193]. Высокая чувствительность эмбрионов уток к инокуляции вирусом гепатита обусловлена высокой степенью репликации его в клетках эмбриона, о чем свидетельствуют высокие титры [141,142].

У инфицированных вирусосодержащим материалом эмбрионов как куриных, так и утиных обычно обнаруживали сходные изменения: отставание в росте и развитии зародыша, отеки в области головы и шеи, гиперемия, а иногда кровоизлияния на коже. Эмбрионы погибали на 3-5 сут после заражения. Наиболее постоянно находили изменения в печени в виде очажков некроза и кровоизлияний. Печень увеличена, дряблая, бледно-коричневая или с зеленоватым оттенком. Желчный пузырь напряжен [71,153,154,155]. Авторы показали, что инфекционная активность изученных штаммов вируса на утиных эмбрионах была выше на 2-4 lg ЭЛД<sub>50</sub>/0,2 см<sup>3</sup>, чем на куриных эмбрионах. Вирус накапливался в титрах до 7,5 lg в

тушке эмбриона, 5,79 lg в хориоаллантаической оболочке и 3,62 lg ЭЛД<sub>50</sub> в аллантаической жидкости.

#### **1.2.4 Способность вируса гепатита утят к репликации в клеточных культурах (ТС-признак)**

Метод тканевых культур находит все большее применение в генетических исследованиях с вирусами, вызывающими заболевания птиц.

Исследования многих авторов свидетельствуют о неодинаковой чувствительности различных клеточных культур к вирусу гепатита утят типа I.

В работах [128,130,156,162,180,184] описаны попытки культивирования вируса гепатита утят типа 1 в клеточных культурах уток и кур.

Аттенуированные штаммы вируса гепатита репродуцируются в эмбриональных клеточных культурах гусей, индеек, куропаток, фазанов, цесарок и кур [122], в то время как вирулентные штаммы поражают только клетки эмбрионов цесарок, куропаток, и индеек [135]. В культурах клеток печени и почек утиных эмбрионов вирус гепатита утят типа 1 вызывает цитопатогенное действие с образованием бляшек [223,224,225,226], а также вызывает ЦПД в культурах фибробластов эмбрионов кур и клетках сердца, печени и почек односуточных цыплят [122,123,163].

Л.А. Белецкая [6], А.Д. Майборода [61] и Hwang G. [156] сообщили о репликации вируса гепатита типа 1 в культуре фибробластов куриных и утиных эмбрионов с коллагеназой, а А.Д. Майборода [61], Fitzgerald J.E. [129], Fitzgerald J.E., Hanson L.E. [130], Hwang G. и Dougherty E. [155], Hwang G. [156] – клетках печени и почек уток и гусей. Вирус индуцировал образование симпластов, вакуолизацию пораженных клеток и деструкцию монослоя.

А.Д. Майборода [62] изучил формирование вируса гепатита в культуре клеток почек утиных эмбрионов прямым методом иммунофлуоресценции и показал, что вирусный антиген появляется в цитоплазме клетки через 8 ч после инокуляции в виде слабосветящегося кольца вокруг ядра. Максимальное накопление антигена

наступает через 48-96 ч, располагающегося диффузно, иногда концентрируясь в отдельных участках цитоплазмы на уровне  $6,5-7,0 \lg \text{ТЦД}_{50}/0,2 \text{ см}^3$ .

Kaleta E.F. [163], Woolcock P.R. [225,226] успешно использовали культуры клеток печени и почек утиного эмбриона при проведении серологических исследований и получении аттенуированных вариантов вируса гепатита утят.

### **1.2.5 Антигенная вариабельность вируса**

Долгое время считалось, что вирус гепатита утят имеет один серотип, но впоследствии были выделены изоляты вируса, которые отличались серологически и по патогенности от классического вируса типа 1. Вирус был идентифицирован как тип 1 А [194,227]. Филогенетический анализ, основанный на фрагментах VP1 показал три различные генетические группы, которые были названы вирус гепатита утят А, В, С [220].

Типирование ВГУ-1 требуется для идентификации развивающихся серотипов, поскольку иммунизация серотипоспецифична и не обеспечивает защиты от болезней, вызванных гетерологичными серотипами. И.И. Паникар [73] сообщил, что эпизоотические штаммы гепатита утят, выделенные на протяжении тридцати лет, серологически принадлежали одному серотипу и были близкородственными.

Согласно мнению большинства исследователей не существует антигенной вариабельности между штаммами вируса выделенными не только в пределах одной страны, но даже на различных континентах. Так, Sasawa H. et al. [195] изучая в перекрестной реакции нейтрализации штаммы, выделенные в Японии и полученные из Америки, установили их иммунобиологическую идентичность. Не наблюдали антигенного различия между штаммами, выделенными в Канаде и США [177], Англии и Голландии [203], Германии [149,150,151].

### **1.3 Эпизоотологические особенности вирусного гепатита утят типа I**

На основе теоретического изучения инфекционных болезней возможно своевременное и правильное осуществление профилактических мероприятий и мер

борьбы с распространением заразной болезни, что представляет главную практическую задачу эпизоотологии [27].

В естественных условиях вирусным гепатитом могут болеть утята до 40-суточного возраста, но чаще – в 1-30-суточном возрасте [10,51,71,83]. К вирусу утят типа 1 восприимчивы также гусята до 10-12 – суточного возраста, как в естественных условиях, так и при искусственном заражении. Быстрое развитие возрастной невосприимчивости служит характерным свойством этой инфекции, то есть более старшие утята и утки клинически не болеют. Не восприимчивы к возбудителю гепатита утят домашние, дикие, лабораторные животные и человек. Полевые наблюдения показывают, что птицы семейства куриных устойчивы к заболеванию. Однако цыплята, индюшата, фазанята, перепелята и цесарята в возрасте 1-7 сут проявляют некоторые признаки болезни и у них обнаруживают вируснейтрализующие антитела. При экспериментальном заражении цыплят вирус выделяли из печени на 17 сут после инокуляции [1,112,122,160,185,188,198].

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 [26].

Возбудитель болезни обычно заносится утятами и инкубационными яйцами, завезенными из неблагополучных по ВГУ 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 [20,50,215,216]. Изучение их роли в эпизоотологии заболевания посвящены работы В.Д. Буряковского [17,21] и И.И. Паникара [74].

Внутри хозяйств птица заражается при совместном содержании здоровой и больной птицы. Возбудитель инфекции передается также с инфицированным кормом, водой, подстилкой, предметами ухода, транспортом и обслуживающим персоналом.

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 [8,17,21,37,216,217].

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 утят [23,36,38,110,112]. Наблюдениями исследователей установлена возможность его появления во все времена года [54,88,92,143,175,196].

Резервуаром вируса типа I могут быть крысы [30]. Авторы отмечают, что вирус сохраняет свою активность в легких и печени клинически здоровых крыс в течение 33 сут и выделяется во внешнюю среду через 18-22 сут после скармливания вирусосодержащего материала. Сывороточные антитела были выявлены через 12-24 сут после инокуляции.

Следует учитывать и возможность «природной очаговости» возбудителя. Дикае утки часто поселяются на водоемах вблизи утководческих хозяйств. Они также болеют вирусным гепатитом и могут распространять вирус [20,22].

При первом появлении болезни в благополучном хозяйстве энзоотия начинается, как правило, среди утят 5-10 – суточного возраста и поражает ряд следующих друг за другом выводков, быстро охватывая 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 – 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% [71].

Нарушение условий содержания, неполноценное кормление птицы и кормовые токсикозы способствуют проявлению болезни. Следует особо подчеркнуть, что ряд возбудителей способен осложнять течение основного инфекционного процесса. Среди утят это, в первую очередь, сальмонеллез, колибактериоз, аспергиллез и хламидиоз, а среди уток – гепадновирусная инфекция соответственно с новообразованиями в печени. Такую птицу следует относить к категории повышенного риска [9,23,56,114].

#### **1.4 Патогенез вирусного гепатита утят типа I**

Патогенез ВГУ изучен недостаточно. Вирус гепатита попадает в организм утят различными путями. В естественных условиях заражение происходит в основном через слизистые оболочки органов пищеварения и дыхания. Вирус, внедрившись в организм, быстро размножается и разносится кровью во многие органы, в первую очередь в печень и головной мозг. Титр вируса уже в первые часы после инфицирования в крови высокий, но постепенно к 48-72 ч снижается. В то же время титр вируса в печени и головном мозге к 48-72 ч после инфицирования повышается. Гибель утят происходит в результате необратимых изменений в печени и других органах. Погибают, как правило, утята с хорошей упитанностью, при явлениях интоксикации. При хроническом течении вирусного гепатита изменения в органах носят тот же характер, но очаги некрозов в печени утят более обширные[22,55,71,166].

В печени инфицированных эмбрионов и заболевших утят развиваются гепатоз и гепатит, которые закономерно сопровождаются некробиозом и некрозом клеточных элементов, а также снижением уровня общего протеина и альбумина в сыворотке крови, снижением защитных свойств сывороточных коллоидов и уровня щелочной фосфатазы, глутамат-пируват-трансаминазы, билирубина и креатинина [115]. Обезвреживающая барьерная функция печени снижается, и токсичные продукты разносятся кровью по всему организму. Повреждение желчных протоков и кишечной стенки ведут к задержке желчи и последующему ухудшению

эмульгирования жиров, снижению активности ферментов, нарушению пищеварения и обмена веществ, что заканчивается вторичной интоксикацией [165,166].

### **1.5 Клиническая картина и патологоанатомические изменения при вирусном гепатите типа I**

Вирусный гепатит утят протекает сверхостро и остро [149,150,151]; описаны хроническое течение и атипичная форма болезни. Инкубационный период при естественном заражении составляет 1-5 сут, а при искусственном инфицировании – 1-8 сут. Более короткий инкубационный период при пероральном, интраназальном и аэрогенном инфицировании по сравнению с парентеральным методом [67,114,129,175,185,190,196,212].

В условиях неблагополучных хозяйств при остром течении болезни инкубационный период равняется 1-7 (реже 12-13) сут, а продолжительность болезни – 1-3 ч, реже 4-5 ч. Заболевание с видимыми клиническими признаками протекает быстро, и часто период предвестников болезни с первыми клиническими признаками гепатита остается незамеченным. Нередко в клинически здоровых с вечера стадах утром обнаруживают много погибших утят. При этом отмечено, что большинство утят выбегали из помещения на выгул, а несколько десятков утят сидели, нахохлившись или падали и гибли сразу с явлением судорог до 95% [35,89,108,175,177,199].

При вирусном гепатите утят, в основном, развиваются однотипные признаки болезни: потеря аппетита, сонливость, малоподвижность, утята подолгу сидят, при движении нарушается координация, иногда отмечают понос, ринит, конъюнктивит; через 1-2 ч, реже через 5-6 ч, с момента появления нервных признаков болезни, появляются судороги, при этом конечности вытянуты вдоль туловища, утята лежат на спине или на боку с запрокинутой назад головой (описотонус), совершают плавательные движения. После нескольких приступов судорог наступает смерть. Утята выздоравливают полностью редко, иногда болезнь принимает хроническое течение, при этом птица отстаёт в росте и развитии [37,38,50,67,68,78,108,127,165,173,187,201,202,203,204,205].

Хроническое течение болезни наблюдается обычно у 3-4 – недельного молодняка. Болезнь продолжается 10-20 сут, иногда и более и проявляется поносами. Утята становятся малоподвижными, у некоторых опухают суставы конечностей. Наблюдается пингвиноподобная походка – утята двигаются, сохраняя вертикальное положение тела [8,38,173].

Заболевание утят не всегда сопровождается клиническими признаками. Болезнь у таких утят протекает бессимптомно, или субклинически [82]. Не все утята проявившие первые признаки болезни, погибают, часть из них выздоравливает, и их нельзя отличить от здоровых. От этих утят можно выделить вирус, а также в сыворотке крови обнаружить вируснейтрализующие антитела.

Наблюдается ассоциированное течение вирусного гепатита с: сальмонеллезом, гриппом, микоплазмозом, колибактериозом и аспергиллезом. При этом ведущим остается вирусный гепатит. Так, по данным И.И. Паникара и А.Т. Належа [72], в Украине ВГУ типа 1 чаще протекал в ассоциации с сальмонеллезом или аспергиллезом, реже колибактериозом. Гибель утят колебалась в разных группах от 15,4 до 90%. При этом признаки сальмонеллеза варьировали от 10 до 50%; аспергиллеза – от 10 до 60%, в одном случае до 100%.

При вскрытии павших утят в очаге энзоотии наиболее выраженные и характерные изменения находят в печени, которая выглядит заметно увеличенной в размере, охряно-желтого цвета, консистенция ее паренхимы дряблая, легко разрушается под давлением, в большинстве случаев ее поверхность усеяна кровоизлияниями, от точечных до пятнистых геморрагий без четких границ. Желчный пузырь, как правило, переполнен желчью. Почки припухшие, кровенаполненные. Изменения селезенки не однотипны и не характерны. Она бывает бледная или темно-красная, нормальной величины или увеличена, иногда бугристая, крапчатая. Сердечная мышца дегенерирована, имеет вид вареного мяса, коронарные сосуды кровенаполнены, в перикардальной полости нередко отмечают повышенное количество серозной жидкости. У многих утят находят катаральное воспаление кишечника, что, впрочем, в большей мере соответствует осложнению гепатита бактериозами, прежде всего сальмонеллезом.

Такие же поражения были неоднократно воспроизведены в эксперименте на утках. При этом в результате патологогистологических исследований было уточнено, что изменения при ВГУ происходят, главным образом, в печени и головном мозге.

В печени первичные (через 24 ч после заражения) изменения выглядят в виде некробиоза и экстенсивного некроза гепатоцитов, иногда обширных некротических очагов, а также геморрагий. В промежутке между 1-18 ч в гепатоцитах обнаруживали вирусоподобные частицы [139]. При дальнейших наблюдениях находят вариации мелкоочаговых пролифератов внутри долек, около синусоидных кровеносных капилляров, а также распад воспаленных клеток. Периваскулярная инфильтрация, сначала гранулоцитами, а позже лимфоцитами и плазматическими клетками, особенно заметна по ходу наиболее крупных кровеносных сосудов и желчных протоков. Появление регенеративных и иммуноморфологических процессов соответствует началу выздоровительного периода [66,118,119,139].

В селезенке регрессивные изменения находят уже через 6 часов после инфицирования утят, а некротические изменения в ядрах и цитоплазме клеток – через 24 ч. При выздоровлении птицы, через 1-2 недели, в красной и белой пульпе увеличивается количество полиплоидных макрофагов, плазмоцитов, лимфоцитов и гистиоцитов. Это сопровождается активным процессом пролиферации ретикулярных клеток и утолщением периартериальных лимфоцитарно-плазматических муфт [66,88,89,90].

В фабрициевой сумке на фоне гиперемии, повышенной инфильтрации серозным экссудатом и отдельных дегенеративных изменений ткани обычно находят пролиферацию бластных клеток (плазматических и гемоцитобластов), которая с 3-х сут усиливается по мере удлинения срока течения инфекционного процесса, что можно связать с развитием иммунологической реакции на вирусный антиген. Если инфекционный процесс затягивается на 2-3 недели, то количество плазматических клеток в сумке, а также в селезенке увеличивается в 3-4 раза. В тимусе сколько-нибудь постоянных изменений не отмечают [12,66]. Изменения в головном мозге соответствуют серозному энцефалиту [12].

При вскрытии эмбрионов, замерших на 20-25 сут инкубации, изменения, свойственные ВГУ следующие: выраженная инъекция кровеносных сосудов желточного мешка, застойные явления и отечность кожных покровов зародыша, особенно в области головы, шеи, спины, реже конечностей, иногда массовые точечные кровоизлияния. У эмбрионов, замерших после 15 сут инкубации, сосуды желточного мешка и аллантоиса гиперемированы, желток темно-зеленого цвета, в аллантоисной полости находят тягучую, густую, прозрачную, иногда опалесцирующую зеленоватого цвета жидкость. Эмбрион, как правило, недоразвит («карлик»). В некоторых случаях наблюдают атрофию мышц конечностей. Печень увеличена, окраска ее неравномерная – от слабо-коричневой до темно-зеленой, рядом с пораженными участками паренхимы расположены неизмененные, что придает печени мраморный вид. На поверхности видны также очажки некроза в виде точек или тонких переплетающихся тяжей.

При гистологических исследованиях печени у замерших эмбрионов обнаруживают дегенерацию гепатоцитов и фокусные некрозы, а также инфильтрацию лимфоидными клетками и пролиферацию гранулоцитов внутри долек, около синусоидных капилляров. Желчные протоки также в стадии гиперплазии [12,19,69,131].

У гусят патологоанатомические изменения аналогичны указанным при вирусном гепатите утят, но менее выражены: печень ярко-желтого цвета с зеленоватым оттенком, желчный пузырь увеличен, сосуды почек инъецированы кровью, сердце расширенное, дряблое. Кровоизлияний на печени, столь характерных для вирусного гепатита утят, у экспериментально зараженных гусей не наблюдают.

## **1.6 Диагностика болезни**

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

Прежде всего учитывают внезапное появление и быстрое распространение заболевания среди утят до месячного возраста, а также падеж преимущественно среди утят 1-10 – суточного возраста в течение 2-3 ч после проявления первых признаков недомогания.

При патологоанатомической диагностике в острых случаях течения болезни обращают внимание на геморрагический и некротический гепатит, гломерулонефрит, серозный энцефалит и миокардиодистрофию, а в подострых случаях – на катаральный энтерит. Геморрагические поражения печени у утят до 3 – недельного возраста – практически патогномоничный признак.

Вирусологические исследования. Материалом для выделения вируса служат печень, селезенка, почки, головной мозг и кровь. Надосадочную жидкость гомогената этих органов и тканей вводят в аллантаисную полость 8-9 – суточных куриных или 10-12 – суточных утиных эмбрионов. В случае положительной биопробы у эмбрионов, которые замирают через 2-4 сут после инфицирования, находят отек подкожной клетчатки с геморрагиями, некротический гепатит и нефрозо-нефрит. Утиные эмбрионы замирают раньше и поражения у них проявляются ярче, чем у куриных эмбрионов. При повторных пассажах эти изменения усиливаются. У эмбрионов, которые замирают через 5-8 сут после инфицирования, макроскопические изменения соответствуют признаку «карликовость» [9,139].

Вирусемии диагностируют как прямым методом выделения возбудителя из крови, так и методом предварительного расщепления вирус-антительного комплекса [66].

Сыворотка крови от переболевших или гипериммунизированных птиц обладает вируснейтрализующими свойствами, что позволяет использовать референтные сыворотки в РН на 8-9 – суточных куриных эмбрионах для идентификации изолятов и титрации штаммов вируса.

Быстрый (через 3 ч) и точный диагноз на гепатит может быть поставлен методом идентификации вирусного антигена с помощью флюоресцирующих антител [23,31,62]. Предложено также использовать в этих целях РДП [81,181], хотя

в отношении последней высказаны сомнения о ее специфичности [212,218]. Были получены обнадеживающие результаты по применению РНГА для идентификации вируса [32].

Биопробу на 1-3 – суточных утятах ставят с учетом благополучия их происхождения в эпизоотологическом отношении. Для заражения используют суспензию тканей печени и головного мозга, которую предварительно деконтаминируют от микрофлоры антибиотиками. Материал вводят птице интраназально по 2-3 капли или внутримышечно в дозе 0,5 см<sup>3</sup>. Утята заболевают через 1-5 сут, реже позднее, с характерными для ВГУ клиническими признаками.

Серологические исследования. Для обнаружения в сыворотке крови уток специфических антител (ретроспективная диагностика) рекомендована РН с эталонным штаммом вируса гепатита [139]. РЗГА не применяют, т.к. вирус не обладает гемагглютинирующими и гемадсорбирующими свойствами, но предложена реакция пассивной гемагглютинации [39,63,206], а также ИФА [229].

### **1.7 Иммуитет и профилактика вирусного гепатита утят типа I**

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.

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. Лимфоидные 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 – селезёнку, лимфоидные узелки слепых отростков, гардерову (слёзную) железу, фарингиальные скопления лимфоидных элементов в подслизистой оболочке дыхательного пути и лимфоидные образования кишечника. Кроме того, лимфоидные образования содержатся в слёзном протоке и протоках латеральных



носовых желёз. 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.

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  $G_0$  в  $G_1$ , лимфокинов и монокинов – трансммиттеров, передающих сигналы, и т. д., что в итоге приводит к элиминации антигена из организма.

В местном клеточном иммунитете, кроме лимфоидных фолликул, плазматических клеток и малых лимфоцитов, важную роль играют иммуноглобулины, в частности, кишечника и дыхательной системы – иммуноглобулины класса А, препятствующие проникновению вирусов и бактерий через эпителиальные барьеры.

Защита организма птицы обеспечивается как неспецифическими, так и специфическими факторами.

Утята, полученные от иммунных уток, а также молодняк старше 6 – недельного возраста не восприимчивы к вирусу гепатита утят. Переболевшие особи, в крови которых содержатся вируснейтрализующие антитела, устойчивы к повторному инфицированию. В сыворотке крови утят, вакцинированных против вирусного гепатита, нейтрализующие антитела появляются на 4-е сут после иммунизации. Максимальный иммунный ответ формируется в течение 7-9 суток [44,45,57,73,93,106,148,176,182,206,209,226].

Многие исследователи показали эффективность гипериммунной сыворотки или сыворотки, полученной от уток реконвалесцентов для профилактики вирусного гепатита утят [34,40,75,89,109,174,192].

Исследования по разработке средств активной иммунизации против вирусного гепатита были проведены Levine P.P. а. Fabricant J. [174], Asplin F.D. [110,112,113].

Об успешном лабораторном испытании вирусвакцины из аттенуированных штаммов вируса гепатита сообщали И.Н. Дорошко, И.И. Паникар [70], Asplin F.D. [111], Reuss U. [188], Hwang J. а. Dougherty E. [153], Hwang J. [158,159], а затем данные о их производственных испытаниях М.К. Скоробогатько [83], Г.В. Малиновская [64,65].

В связи с реверсией аттенуированных вакцинных штаммов вируса гепатита утят [111,230] возникла необходимость в разработке инаktivированной вакцины.

Однако предложенные убитые вакцины из аттенуированных или вирулентных штаммов вируса оказались неэффективными [70,158,210]. В то время как бета пропионлактоновая инаktivированная вакцина из штамма «Н5-30» была иммуногенной [172]. Gough R.E. а. Spackman D. [137] показали, что комбинированное применение живой и инаktivированной вакцины вызывает высокий иммуногенный эффект.

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 вариабельности эпизоотических штаммов, циркулирующих в данной географической зоне.

## 2 СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

### 2.1 Материалы и методы исследования

Работа выполнена в 2012-2015 гг. в отделе вирусологии и опухолевых болезней птиц Всероссийского научно – исследовательского ветеринарного института птицеводства (ВНИВИП) в соответствии с научно-технической программой НИР 08.07.01.05 и 06.

**Вирус.** В работе использовали производственные вакцинные штаммы ВГНКИ-К и 3М-УНИИП вируса гепатита утят.

Вирусные штаммы поддерживали пассажами в культурах клеток и на куриных и утиных эмбрионах и хранили при температуре минус 20°C.

Краткая характеристика вакцинных штаммов вируса гепатита утят представлена в табл. 1.

Таблица 1

Характеристика вакцинных штаммов вируса гепатита утят типа I

Автор	Страна, фирма	Обозначение штамма	Метод аттенуации штамма	Тип вируса	Назначение штамма вируса
Р.А. Зубцова	Россия	ВГНКИ-К	Переменяющиеся пассажи на эмбрионах уток и культуре утиных фибробластах	I	производственный
И.Ю. Безрукавая	Украина	3М-УНИИП	серийные пассажи на эмбрионах кур и уток	I	производственный

#### Инкубационные яйца, эмбрионы и утята:

- яйца уток фермерского хозяйства, 450 штук;

- эмбрионы уток, инкубированные на базе ВНИВИП, 300 штук;
- эмбрионы кур «Синявинская птицефабрика»;
- утята фермерского хозяйства, 100 голов.

#### **Культуры клеток:**

- первично-трипсинизированные культуры фибробластов эмбрионов кур (ФЭК), утиных эмбрионов (ФЭУ), клетки печени и почек утиных эмбрионов.

#### **Питательные среды, сыворотки, растворы и реактивы:**

- питательная среда Игла MEM или DMEM, жидкая, с L-глутамином;
- питательная среда 199, жидкая, с L-глутамином;
- сыворотка крови крупного рогатого скота, неконсервированная для культур клеток;
- сыворотка крови плодов коровы;
- трипсина раствор 0,25% фирмы «US BIO»;
- версена раствор 0,02%;
- Хенкса раствор фирмы «Hyclone»;

Питательные среды и растворы из полнокомпонентной смеси фирмы «Hyclone», производства ООО «Биолот».

**Микробиологические среды:** мясо-пептонный бульон (МПБ), мясо-пептонный агар (МПА), мясо-пептонный печеночный бульон под вазелиновым маслом (среда Китт-Тароцци), агар Сабура, производства ФГБНУ ВНИВИП.

**Культура клеток.** Первично-трипсинизированные культуры фибробластов готовили из кожно-мышечной ткани 10-12 – суточных куриных и 14-15 – суточных утиных эмбрионов по методике Dulbecco R.&Vogt M. в модификации Younger J.S. [92]. Раствор для диспергирования ткани состоял из 0,25% раствора трипсина, 0,02% раствора версена и раствора Хенкса в соотношении 1:2:2. Трипсинизацию измельченной кожно-мышечной ткани проводили на магнитной мешалке при температуре 36-37°C в течение 10-15 мин до полного расщепления фрагментов ткани на отдельные клетки. По истечении указанного времени клеточную взвесь

сливали во флаконы с охлажденной смесью сыворотки крови крупного рогатого скота до 10% и среды Игла (соотношение 1:1) с целью нейтрализации действия трипсина. Суспензию клеток центрифугировали при 900-1000 об/мин в течение 20 мин. Из осадка после ресуспензирования готовили суспензию клеток в ростовой питательной среде с содержанием 650-750 тыс. кл/см<sup>3</sup>. Подсчет клеток проводили в камере Горяева по общепринятой методике [92].

В качестве ростовой питательной среды использовали среду Игла MEM/DMEM и среду 199 в соотношении 2:1 с добавлением 10% нормальной сыворотки крупного рогатого скота и антибиотиков: бензилпенициллина 100 ЕД/см<sup>3</sup> и стрептомицина сульфата — 100 мкг/см<sup>3</sup>.

Клеточную суспензию разливали в пробирки и матрасы по 2 и 220 см<sup>3</sup> соответственно и инкубировали в стационарных условиях при температуре (37,0±0,5)°C. В течение 48 часов на поверхности стекла формировался клеточный монослой.

Культуру клетки печени и почек готовили из 22-25 – суточных утиных эмбрионов по выше описанной методике.

**Стандартизация вирусологических исследований.** В работе руководствовались правилом, что постановка опытов и их результаты должны быть выражены в относительных единицах, исчисляемых путем составления активности исследуемого образца с действием стандарта. С этой целью в каждом опыте присутствовали два или три контроля.

Все штаммы вируса использовали в дозах, определяемых путем титрации в культурах клеток и на эмбрионах кур и уток.

При титровании вируса руководствовались правилами, сформулированными Armitage P. [107]:

Каждый морфологический очаг поражения должен образовываться от одной частицы вируса. Агрегация и наличие вторичных бляшек осложняет ситуацию, поэтому необходимо правильно подбирать время подсчета и тщательно дезагрегировать титрируемые взвеси.

Частицы вируса должны действовать в тест-объекте независимо друг от друга.

Каждый тест-объект должен получать равный объем инокулята.

Разные партии культуры клеток должны иметь равную чувствительность к вирусу.

**Титрование вируса на культуре клеток по цитопатогенному действию (ЦПД)** проводили в чувствительных клеточных культурах методом десятикратных разведений и с соответствующими контролями. Из культуральной вируссодержащей жидкости готовили 10-кратные разведения  $10^{-1}$ - $10^{-6}$  на поддерживающей среде без добавления сыворотки. Предварительно монослой клеток отмывали раствором Хенкса. Каждым разведением в объеме  $1,0 \text{ см}^3$  вируса заражали 4 пробирки с культурой клеток. Время контакта вируса с клеточным монослоем составляло 30 мин при температуре  $(37,5 \pm 0,5)^\circ\text{C}$ . Зараженные и контрольные культуры инкубировали при температуре  $37,5^\circ\text{C}$ , ежедневно в течение 5-7 суток проводили учет ЦПД, выражая его по 4-крестовой системе. Специфичность ЦПД подтверждали в реакции нейтрализации со специфической сывороткой.

Величину титра вычисляли по методу Reed L.J. & Muench H. [92] и выражали в  $\lg \text{ТЦД}_{50}$  в  $1,0 \text{ см}^3$  (тканевая цитопатогенная доза).

Результаты титрования вируса подвергли статистической обработке методами, изложенными в соответствующих руководствах [94,103].

Среднее арифметическое значение вычисляли по формуле:

$$M = \frac{\sum x_i}{n}, \text{ где} \quad (1)$$

$\sum x_i$  - значение суммы вариантов;

$n$  - общее число вариантов.

Ошибку средней арифметической величины определяли по формуле:

$$m = \pm \frac{\delta}{n}, \text{ где} \quad (2)$$

$\delta$  — средняя квадратичная ошибка (отклонение).

Величину квадратичного отклонения определяли по формуле:

$$\delta = \pm \sqrt{\frac{\sum (x_i - M)^2}{(n-1)}} \quad (3)$$

Среднюю величину считали достоверной, если уровень значимости  $P < 0.05$  и недостоверной, если  $P > 0.05$ .

**Определение терморезистентности.** Культуральную вирусосодержащую суспензию центрифугировали при 3000 об/мин в течение 15 мин. Надосадочную жидкость использовали как исходный материал. Особое внимание обращали на то, чтобы вирусосодержащая жидкость была использована сразу после получения без предварительного хранения при  $+4^\circ\text{C}$ , так как по данным Kaplan [164], Woodrooffe [219], Hohon и Kosikowki [152] при хранении с соблюдением этой температуры часть вирусных частиц становится более термостабильной.

Вирусосодержащую жидкость разливали в пробирки по  $1,0 \text{ см}^3$ , а затем помещали в водяную баню с температурой  $56^\circ\text{C}$ . Инактивацию проводили в течение 5, 10 и 30 мин. По истечению указанных сроков пробирки с материалом немедленно охлаждали при температуре таящего льда. После чего проводили титрование прогретого и непрогретого вируса в культуре ФЭУ. Метод титрации описан выше. На основании результатов опытов определяли снижение титра вируса после обработки и выражали отношением:

$$\lg V_t/V_o, \text{ где} \quad (4)$$

$V_o$  – титр вируса до обработки;

$V_t$  – титр вируса после обработки в течение определенного времени.

Константу скорости инактивации вычисляли, пользуясь формулой:

$$K = 2,3 \cdot P_t/P_o : t, \text{ где} \quad (5)$$

2,3 – основание натуральных логарифмов;

$P_o$  – исходный титр вируса;

$P_t$  – титр обработанного вируса ко времени;

$t$  – время обработки вируса (мин).

**Обработка вируса формальдегидом.** Действие формальдегида изучали в конечных его концентрациях 0,02; 0,04 и 0,1% при температуре 37°C в различных экспозициях. По окончании времени обработки формальдегид нейтрализовали бисульфитом натрия. Инфекционную активность обработанного и контрольного вируса определяли методом титрования в культуре ФЭУ, а снижение титра после обработки выражали в  $\lg V_t/V_0$ .

**Определение  $R_{ct}^{TC}$  признака.** Способность вакцинных штаммов к репликации при неоптимальных температурах изучали путем 5 – кратного пассирования в культуре ФЭУ. Культивирование зараженных и контрольных клеток проводили при температурах 32 и 40°C, учитывая время наступления и характер ЦПД в культуре клеток. Инфицирование культуры ФЭУ проводили в дозе 1,0 ЦПД<sub>50</sub> на клетку.

После 2, 3 и 5-го пассажа определяли инфекционный титр вируса методом титрования и выражали в  $\lg$  ТЦД<sub>50</sub>/см<sup>3</sup>.

$R_{ct}^{TC}$  признак штаммов вируса определяли по методу М.Беньеш-Мельник, Дж.Л. Мельник [7], в основе которого лежит вычисление разности между титрами изучаемых штаммов вируса при 37 и 32°C или 37 и 40°C. Так,  $rct_{32}^- / rct_{40}^-$  - разность титров вируса / в  $\lg$  ТЦД<sub>50</sub>/см<sup>3</sup>/ при 37 и 32°C больше 4;  $rct_{32}^+ / rct_{40}^+$  - разность титров вируса при 37 и 32°C меньше 2;  $rct_{32}^{0\pm} / rct_{40}^{0\pm}$  - разность титров вируса при 37 и 32°C от 2,1 до 4.

**Получение интерферона.** Интерферон получали в культуре клеток утиных эмбрионов, зараженных вакцинными штаммами вируса в дозах 0,01; 0,1 и 1,0 ТЦД<sub>50</sub> на клетку. Через различные сроки после инокуляции отбирали пробы культуральной жидкости из матрасов, которые осветляли центрифугированием при 2000 об/мин в течение 15 минут. Для инактивации вируса культуральную жидкость подвергали 60-минутному прогреванию при температуре 60°C. Обработанные, таким образом, пробы использовали как готовые препараты интерферона. Полноту инактивации



вируса проверяли заражением культуры ФЭУ неразведенным препаратом интерферона.

Контролем на неспецифическую ингибицию служила культуральная жидкость, полученная из незараженной культуры ФЭУ, подвергнутая аналогичной обработке.

**Определение титра интерферона.** Для определения биологической активности интерферона готовили 2-кратные разведения его на среде Игла МЕМ. По 1.0 см<sup>3</sup> каждого разведения вносили в 4 пробирки с культурой куриных фибробластов, предварительно удалив ростовую среду.

Через 24 часа в пробирки вносили по 0,2 см<sup>3</sup> (100 ТЦД<sub>50</sub>) индикаторного вируса везикулярного стоматита. Контролем служили пробирки с культурой клеток, инокулированной той же дозой вируса везикулярного стоматита в присутствии нормальной культуральной жидкости, взятой вместо препарата интерферона.

Активность интерферона учитывали через 48 часов после внесения вируса-индикатора при полной дегенерации контрольных культур. Ингибирующее действие интерферона определяли по подавлению цитопатогенного действия вируса в опытных и проявляющихся четко выраженной клеточной дегенерацией в контрольных пробирочных культурах.

Титром интерферона считали последнее его разведение, ингибирующее в 50% клеточных культур ЦПД индикаторного вируса.

**Реакция нейтрализации (РН).** В основу РН брали стандартный, классический метод, описанный в руководстве по вирусологии [102].

РН ставили в культуре клеток со штаммспецифическими сыворотками, полученными от иммунизированных утят.

Вариантами реакции были:

прямая РН с постоянной дозой гомологической сыворотки и десятикратным разведением вируса ( $\alpha$ -вариант);

прямая РН с постоянной дозой вируса 100 или 1000 ТЦД<sub>50</sub> с двукратными разведениями гомологичной сыворотки ( $\beta$ -вариант);

перекрестная РН в  $\alpha$ - или  $\beta$ -вариантах.

**Техника постановки РН.** Сыворотки перед началом исследований освобождали от термолабильных неспецифических ингибиторов прогреванием в водяной бане при температуре 56°C в течение 30 мин. Смеси равных объемов вируса и сыворотки в соответствующих разведениях выдерживали при комнатной температуре в течение 60 мин, а затем в объеме 1,0 см<sup>3</sup> вводили в 4 пробирочные культуры.

Титр вируса и конечную точку нейтрализации вычисляли по Reed L.J. & Muench H. [92] на основании ЦПД в культуре клеток через 6-7 суток инкубации после инокуляции вируса.

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

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

Антигенную специфичность (Ag-признак) и степень нейтрализации штаммспецифичной антисыворотки (An-признак) вируса изучали по методу McBride W.D. [180] в модификации Gard S. [134]. Антигенный характер каждого штамма вируса является специфичным и высокостабильным свойством и не зависит от той чувствительности системы, в которой репродуцируется вирус. Для характеристики Ag-признака по методу McBride применили величину K, которая вычисляется по формуле:

$$K = D \times 2.3 \times \lg \left( \frac{V_0}{V_t} \right), \text{ где} \quad (6)$$

$D$  - рабочее разведение сыворотки;

$V_0$  - исходная активность вируса;

$V_t$  - активность вируса ко времени;

При сравнении Ag-признака штаммов использовали так называемую нормальную величину K (NK). При этом абсолютную величину стандартного штамма, нейтрализованного гомологичной сывороткой, принимали за 100%, а

величину НК других изучаемых штаммов выражали в процентах по отношению к величине К стандартного штамма.

**Получение штаммспецифической сыворотки.** Гипериммунные сыворотки к изучаемым штаммам вирусного гепатита утят получали на 10-суточных утятах в камеральных условиях. Вируссодержащий материал (культурная жидкость) в дозе  $10^5$  ТЦД<sub>50</sub>/см<sup>3</sup> вводили подкожно в область нижней трети шеи двукратно с интервалом 10 сут. После 20-суточного перерыва вирусный антиген, адсорбированный на 0,3% гидроокиси алюминия, инокулировали в объеме 1 см<sup>3</sup> подкожно. На 28-30 сут. у утят из сердца брали кровь для получения сыворотки, их освобождали от термолабильных неспецифических ингибиторов и хранили во флаконах по 10 см<sup>3</sup> при температуре 2-4°C.

## **2.2 Результаты собственных исследований**

### **2.2.1 Патогенные свойства вакцинных штаммов вируса гепатита**

#### **утят типа I (Р-признак)**

Оценка пригодности вирусного штамма в качестве вакцинного может базироваться только на основе изучения комплекса биологических свойств (генетических маркеров), среди которых одни могут иметь главное, а другие второстепенное значение.

Изучение патогенности, помимо теоретического значения, представляет, несомненно, практический интерес. Действительно, одной из важнейших проблем в вирусологии является изучение вариантов (мутантов) вирусов, которые можно использовать в качестве вирусвакцин. Основные свойства таких штаммов - безопасность и иммуногенность. Однако при предварительном исследовании вариантов вирусов в лаборатории весьма важно располагать определенными критериями, на основании изучения свойств вирусов *in vivo* отдавать предпочтение определенным штаммам, как наиболее подходящим для использования в качестве вакцинных.

### 2.2.1.1 Изучение патогенности для развивающихся куриных и утиных эмбрионов ( $P_{che}$ - и $P_{de}$ - признаки)

Заражение эмбрионов проводили в аллантаисную полость и желточный мешок оттитрованным вирусом в дозе  $3,0 \lg \text{ЭЛД}_{50}$  в  $0,2 \text{ см}^3$ . Инфицированные и контрольные эмбрионы инкубировали при температуре  $(37,5 \pm 0,5) ^\circ\text{C}$  в течение 3-4 сут при ежедневном овоскопировании. При вскрытии учитывали характер патологоанатомических изменений.

Утиные эмбрионы оказались более чувствительными, гибель их наступала чаще 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 штаммом 3М-УНИИП и в 5-15% и 10-30% соответственно при инокуляции штамма ВГНКИ-К (табл. 2). 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. Почки увеличены, светлого цвета. У павших эмбрионов печень была светло-коричневого цвета. У эмбрионов на 5-6 сут после инокуляции печень часто имела зеленый или охряно-зеленый цвет. В таких случаях зеленоватое окрашивание приобретала хориоаллантаисная жидкость (рис. 3).

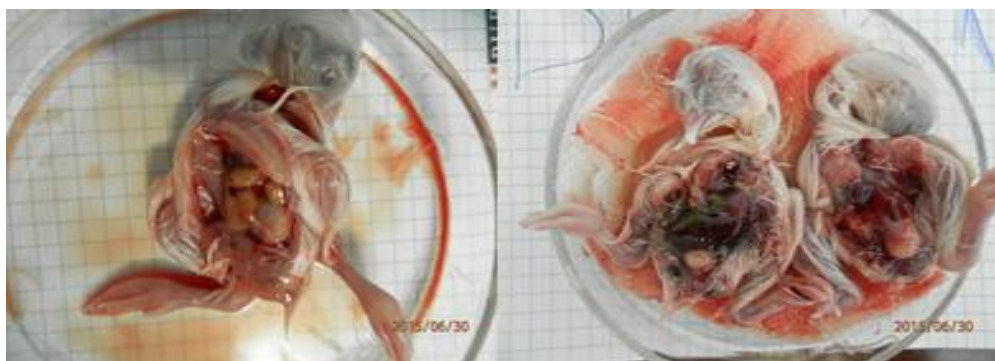


Рисунок 3. Куриные эмбрионы, зараженные вирусом гепатита утят

У павших утиных эмбрионов отмечали интенсивные геморрагические явления, дистрофические изменения печени, она уплотнена, желтовато-коричневого цвета (рис. 4).



Рисунок 4. А – утиный эмбрион контроль, В, С – утиные эмбрионы, зараженные вирусом гепатита утят.

При патоморфологическом исследовании инфицированных утиных эмбрионов через 60ч установили:

- в головном мозге – выраженные некробиотические изменения с периваскулярно-перичеселлюлярным отеком и дистрофией нейроцитов. Мягкие мозговые оболочки с мононуклеарной инфильтрацией, выраженным отеком, эктазированными полнокровными сосудами со стазами и мелкоочаговыми периваскулярными кровоизлияниями.

- в сердце – очаговый аутолиз, миокард с выраженным межмышечно-межклеточным отеком, зернистой дистрофией кардиомиоцитов. Сосуды эктазированы, полнокровны с эритроцитарными стазами. Точечные кровоизлияния под эпикардом.

- в печени – очаговый аутолиз, капсула отечная, субтотальная дисконкомплексация балок. Строма портальных трактов, сосудистые стенки с умеренным отеком, полнокровием сосудов со стазами, очаговыми экстравазатами, перипортальной и периваскулярной густой диффузной лимфоцитарно-плазмоцитарной инфильтрацией. Центральные вены и синусы умеренно полнокровны. Мелкоочаговые кровоизлияния в капсулу.

– в почках – очаговый аутолиз, эпителий канальцев с умеренным отеком и дистрофическими изменениями; в просвете канальцев слущенный эпителий. Строма с выраженным отеком, полнокровием сосудов со стазами и очаговыми кровоизлияниями преимущественно в мозговое вещество. Капсула с мелкоочаговой моноклеарной инфильтрацией.

Таблица 2

Патогенность вакцинных штаммов ВГНКИ-К и ЗМ-УНИИП для развивающихся куриных и утиных эмбрионов

Штамм вируса	Возраст куриных эмбрионов, сут	Метод инокуляции									
		Аллантоисная полость					Желточный мешок				
		Число пассажей									
		1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
ВГНКИ- К	9	Куриные эмбрионы									
		5*	5	10	12	15	10	12	14	15	30
ЗМ- УНИИП	9	20	40	40	50	60	30	50	80	85	90
ВГНКИ- К	11-12	Утиные эмбрионы									
		50	60	100	100	100	н.и.	н.и.	н.и.	н.и.	н.и.
ЗМ- УНИИП	11-12	50	70	100	100	100	н.и.	н.и.	н.и.	н.и.	н.и.

Примечание: \* - гибель эмбрионов в процентах; н.и. – не исследовали

Степень репродукции штаммов вируса определяли титрованием на куриных и утиных эмбрионах. Данные приведены в табл.3.

Таблица 3

Биологическая активность вакцинных штаммов вируса на куриных и утиных эмбрионах ( $P < 0,05$ )

Штамм вируса	Инфекционный титр вируса, lg ЭЛД <sub>50</sub> / 0,2 см <sup>3</sup>					
	Число пассажей					
	Куриные эмбрионы			Утиные эмбрионы		
	1	3	5	1	3	5
ВГНКИ-К	2,5±0,25	3,25±0,3	3,75±0,15	6,5±0,1	6,66±0,3	7,5±0,2
ЗМ-УНИИП	3,75±0,5	4,5±0,1	5,33±0,2	5,75±0,3	6,33±0,15	6,75±0,5

Результаты, представленные в таблице 3, показывают, что биологическая активность вакцинных штаммов ЗМ-УНИИП и ВГНКИ-К ВГУ на утиных эмбрионах на 1,5 и 3,7 lg ЭЛД<sub>50</sub> / 0,2 см<sup>3</sup> соответственно выше, чем на куриных эмбрионах. Степень репродукции штамма ЗМ-УНИИП в куриных эмбрионах выше по сравнению со штаммом ВГНКИ-К и наоборот в утиных эмбрионах. С увеличением числа пассажей штаммов вируса их биологическая активность существенно повышается, что коррелирует с патогенностью для развивающихся эмбрионов. Испытуемые вакцинные штаммы ВГНКИ-К и ЗМ-УНИИП характеризовались соответственно, как  $P_{che\pm}$ ,  $P_{de+}$  и  $P_{che+}$ ,  $P_{de+}$  штаммы вируса [100].

### 2.2.1.2 Изучение патогенности для утят ( $P_a$ - признак)

Известно, что патогенность вируса для восприимчивого хозяина – весьма сложное свойство, представляющее собой суммарное проявление многих наследственно закрепленных особенностей вируса.

При изучении патогенности вакцинных штаммов вируса гепатита для утят, как генетического признака, необходимо учитывать метод заражения, поскольку

каждый способ инфицирования характеризует особое свойство штамма вируса, который предполагается использовать в качестве вакцинного.

Признак патогенности вакцинных штаммов ВГНКИ-К и 3М-УНИИП вируса гепатита утят исследовали на 70 утятах 2 – суточного возраста, которых инфицировали внутримышечно, подкожно и интраназально в дозе 3,0 lg ЭЛД<sub>50</sub>. Клинические наблюдения за утятами контрольной и подопытных групп продолжались в течение месяца при ежедневном осмотре за общим состоянием птицы (табл. 4).

Таблица 4

Сравнительная характеристика по признаку патогенности вакцинных штаммов вируса гепатита для 2-суточных утят при различных способах инфицирования

Штамм вируса	Множественно сть заражения, lg ЭЛД <sub>50</sub>	Метод заражения			Характеристика штамма
		внутримышечный	подкожный	интраназальный	
		заболело/ заражено	заболело/ заражено	заболело/ заражено	
ВГНКИ-К	3,0	0/10	0/10	0/10	P <sub>d</sub> <sup>-</sup>
3М-УНИИП	3,0	0/10	0/10	0/10	P <sub>d</sub> <sup>-</sup>

Примечание: 0 – утята не заболели

Результаты опытов, приведенные в таблице 4, показывают, что испытуемые вакцинные штаммы ВГНКИ-К и 3М-УНИИП вируса гепатита при внутримышечной, подкожной и интраназальной инокуляциях не вызывали клинического проявления болезни у утят.

При патологоанатомическом вскрытии вынужденно убитой птицы изменений со стороны паренхиматозных органов не обнаружено.



Морфологические исследования печени утят показали наличие плазмодитарно-лимфоцитарных пролифератов, которые располагались в прослойках рыхлой соединительной ткани преимущественно со стороны адвентиции. Паренхима печени была хорошо сохранена, ясно выражена, гепатоциты имели четкие границы с центрально расположенным ядром, обогащенным хроматином.

### **2.2.2 Биологические свойства вируса гепатита утят, связанные с особенностями внутриклеточной репликации**

Способность вируса гепатита, наряду с репликацией, вызывать цитопатический эффект в чувствительных культурах клеток является их наследственным биологическим признаком. Исследования многих авторов свидетельствуют о неодинаковой чувствительности различных клеточных культур к вирусу гепатита утят.

Так, Л.А. Белецкая [6], А.Д. Майборода [62], Hwang G. [156] показали, что вирус гепатита утят вызывал цитопатический эффект в культурах фибробластов куриных и утиных эмбрионов, а А.Д. Майборода [61], Fitzgerald J.E., Hanson L.E. [130] – в клетках печени и почек утиных и гусиных эмбрионов. Авторы наблюдали образование симпластов, вакуолизацию пораженных клеток и деструкцию монослоя.

#### **2.2.2.1 Изучение цитопатогенной активности вакцинных штаммов вируса гепатита утят типа I**

Способность испытуемых штаммов ВГНКИ-К и 3М-УНИИП вируса гепатита к репликации в клеточных культурах изучали в первично-трипсинизированных культурах фибробластов куриных и утиных эмбрионов, в клетках почки и печени утиных эмбрионов.

При изучении характера цитопатических изменений культуры клеток инокулировали штаммами вируса гепатита в дозе 0,1 – 1,0 ТЦД<sub>50</sub> на клетку.

При культивировании вируса выявлено, что вакцинные штаммы ВГНКИ-К и 3М-УНИИП вируса гепатита утят вызвали 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 часов после инокуляции, а на последней стадии репликации вируса формированием синцития и дегенерацией клеточного монослоя через 96-120 часов культивирования (рис. 5).

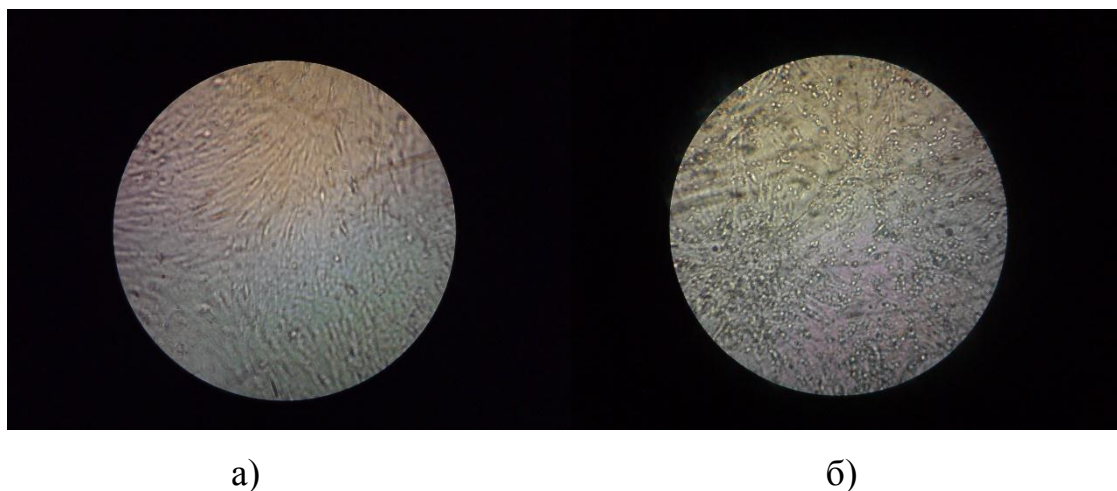


Рис.5. Культура клеток утиных эмбрионов: а) контрольная культура клеток; б) культура клеток, зараженная вакцинным штаммом вируса гепатита утят через 72 часа.

Латентная фаза штамма ВГНКИ-К составила 24 часа и 48 часов штамма 3М-УНИИП соответственно. Данные определения активности штаммов в различных первично-трипсинизированных культурах клеток представлены в табл. 5.

Биологическая активность вакцинных штаммов ВГНКИ-К и 3М-УНИИП  
вируса гепатита утят в культурах клеток

Штамм вируса	Активность штаммов, lg ТЦД <sub>50</sub> , М±m*			
	Культура клеток			
	ФЭК	ФЭУ	Почки утиного эмбриона	Печени утиного эмбриона
ВГНКИ-К	3,75±0,5	5,66±0,3	6,00±0,1	6,67±0,25
3М-УНИИП	3,25±0,15	4,6±0,25	5,00±0,2	5,25±0,3

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

Результаты исследований показали, что вакцинные штаммы ВГНКИ-К и 3М-УНИИП вируса гепатита утят способны к репликации в культурах фибробластов куриных и утиных эмбрионов и в культурах клеток почек и печени утиного эмбриона, вызывая цитопатогенное действие различной интенсивности. Установлено, что культуры клеток утиных эмбрионов были более чувствительны к штаммам вируса по сравнению с культурой фибробластов куриных эмбрионов. Активность штамма ВГНКИ-К вируса гепатита утят в культурах утиного эмбриона была выше 1-1,5 lg ТЦД<sub>50</sub> по сравнению с активностью штамма 3М-УНИИП.

По биологической активности штаммы вируса отличаются в зависимости от вида клеток. В процессе изучения культуральных свойств штаммов вируса гепатита утят была определена чувствительность различных клеточных культур относительно клеток печени утиных эмбрионов, которую выражали в индексе чувствительности (И) и вычисляли по формуле:

$I = T/P$ , где Т – обратная величина конечного разведения вируса, при котором ЦПД регистрируется в 50% пробирок с испытуемым монослоем; Р – обратная

величина конечного разведения вируса, при котором ЦПД регистрируется в 50% пробирок с культурой клеток печени. Результаты представлены в табл. 6.

Таблица 6

**Чувствительность клеточных культур к вакцинным штаммам  
вируса гепатита утят**

Наименование культуры клеток	Индекс чувствительности, И	
	Вакцинные штаммы:	
	ВГНКИ-К	ЗМ-УНИИП
Клетки печени	1	1
Клетки почки	0,9	0,93
ФЭУ	0,85	0,63
ФЭК	0,56	0,65

Данные, приведенные в таблице 6, показали, что культура клеток печени утиного эмбриона наиболее чувствительна к изучаемым вакцинным штаммам вируса гепатита утят.

Таким образом, проведенные исследования показали, что цитопатогенная активность, как биологический признак, вакцинных штаммов вируса гепатита утят типа I в отношении чувствительности изучаемых клеточных культур оказалась весьма стабильной. Штаммы ЗМ-УНИИП и ВГНКИ-К вируса характеризовались как  $TC_{che}^{\pm}$ ,  $TC_{de}^{+}$ ,  $TC_{de}^{H+}$ ,  $TC_{de}^{N+}$  штаммы вируса гепатита утят [97,100].

**2.2.2.2 Изучение способности вакцинных штаммов ВГНКИ-К и ЗМ-УНИИП вируса гепатита утят типа I к репликации в культуре клеток при различной температуре ( $Rct^{TC}$  – признак)**

В последнее время работами ряда исследователей была показана возможность культивирования вирусов в культуре клеток при пониженной и повышенной температурах [14,79,96,183].

Возможность успешного применения данного метода, как  $Rct$  маркера (от reproductive capacity temperature), в качестве критерия при контроле стабильности биологических свойств вакцинных штаммов вируса и их аттенуации оказалась тесно

связанной с глубоким изучением способности вирусов к репликации при определенной температуре.

Зависимость между rct – признаком и патогенностью составляет в настоящее время сущность теоретического обоснования применения метода пассажей в клеточных культурах при неоптимальных температурах для получения вирусных вакцин с измененными биологическими свойствами.

Учитывая, что в литературе не освещен вопрос о способности вируса гепатита утят типа I к репликации при измененной температуре, мы провели изучение rct-признака вакцинных штаммов вируса.

Опыты по изучению rct-признака штаммов ВГНКИ-К и 3М-УНИИП ВГУ проводили в культуре фибробластов утиных эмбрионов при температурах культивирования 32, 37 и 40°C в процессе 5 пассажей при ежедневном контроле наступления цитопатогенного действия вируса.

Для первого пассажа вируса при измененных температурах использовали штаммы вируса, культивируемые при температуре  $(37,5 \pm 0,5)$  °C, с множественностью инфицирования 1,0 ТЦД<sub>50</sub> на клетку.

Вирусосодержащий материал 1, 3 и 5 пассажей использовали для определения цитопатогенной активности (степени накопления) штаммов вируса методом титрования. Определение rct-признака проводили по методу М. Бенъеш-Мельник, Дж. Мельник (описан выше).

Исследования показали, что вакцинные штаммы ВГУ вызывали острую форму вирусной инфекции в культуре клеток при температурах культивирования 32, 37 и 40°C, ЦПД вируса сопровождалось округлением клеток, появлением симпластических образований с зернистостью в цитоплазме клеток на ограниченных участках монослоя через 72 – 96 ч после инокуляции, а на последней стадии репликации вируса формированием синцития и с последующей дегенерацией монослоя через 96 – 120 ч культивирования. Латентная фаза штаммов ВГНКИ-К и 3М-УНИИП при температурах 32 и 40°C равнялась 72 и 48 ч соответственно.

Результаты титрования в процессе пяти пассажей при различных температурах культивирования представлены в табл. 7.

Таблица 7

Биологическая активность вакцинных штаммов вируса гепатита утят при различных температурах культивирования

Пассаж	ВГНКИ-К			Пассаж	ЗМ-УНИИП		
	Титр вируса, lg ТЦД <sub>50</sub> /см <sup>3</sup>				Титр вируса, lg ТЦД <sub>50</sub> /см <sup>3</sup>		
	Температура культивирования				Температура культивирования		
	32°С	37°С	40°С		32°С	37°С	40°С
1	2,25±0,1	5,66±0,5	2,75±0,5	1	1,75±0,2	4,5±0,25	2,5±0,2
3	2,75±0,2	5,75±0,1	3,25±0,7	3	2,00±0,5	4,75±0,5	3,00±0,5
5	3,00±0,5	5,75±0,2	4,00±0,2	5	2,75±0,3	4,67±0,3	3,2±0,6

Данные титрации штаммов вируса свидетельствуют о том, что в процессе пассирования происходила адаптация к измененным температурным условиям культивирования, о чем констатировало повышение активности вируса с увеличением числа пассажей. Результаты определения принадлежности штаммов ВГНКИ-К и ЗМ-УНИИП вируса гепатита утят по  $rct^{TC}$  – признаку представлены в табл. 8.

**Характеристика вакцинных штаммов вируса гепатита утят по  $R_{ct}^{TC}$  – маркеру по (5-ому пассажу)**

Штамм вируса	Титр вируса, $lg\ TCD_{50}/cm^3$							
	Температура культивирования							
	$R_{ct}^{TC}_{32^\circ}$	Индекс подавления репликации вируса, $lg\ TCD_{50}^{37^\circ} - lg\ TCD_{50}^{32^\circ}$	Характеристика штамма по $r_{ct}^{32^\circ}$	$R_{ct}^{TC}_{37^\circ}$	Характеристика штамма по $r_{ct}^{37^\circ}$	$R_{ct}^{TC}_{40^\circ}$	Индекс подавления репликации вируса, $lg\ TCD_{50}^{37^\circ} - lg\ TCD_{50}^{40^\circ}$	Характеристика штамма по $r_{ct}^{40^\circ}$
ВГНКИ-К	$3,00 \pm 0,5$	$2,75 \pm 0,3$	$\pm$	$5,75 \pm 0,2$	+	$4,00 \pm 0,2$	$1,75 \pm 0,1$	+
ЗМ-УНИИП	$2,75 \pm 0,3$	$1,92 \pm 0,1$	+	$4,67 \pm 0,3$	+	$3,2 \pm 0,6$	$1,47 \pm 0,3$	+

Суммируя полученные результаты следует отметить, что вакцинные штаммы ВГНКИ-К и ЗМ-УНИИП вируса гепатита утят различались по способности к репликации при пониженной температуре и характеризовались как  $R_{ct}^{TC}_{32^\circ \pm}$  и  $R_{ct}^{TC}_{32^\circ +}$  штаммы соответственно. Индексы подавления репликации их при температуре 32°C равнялись  $2,75 \pm 0,3$  и  $1,92 \pm 0,1\ lg\ TCD_{50}$ . В то время как при температуре 40°C степень репликации штаммов была выше и характеризовалась как  $R_{ct}^{TC}_{40^\circ +}$  штаммы, их индексы подавления были  $1,75 \pm 0,1$  и  $1,47 \pm 0,3\ lg\ TCD_{50}$ . Различия в цитопатогенной активности вакцинных штаммов вируса гепатита были выявлены при культивировании их в условиях пониженной температуры [99].

### **2.2.2.3 Изучение способности вакцинных штаммов вируса к индукции интерферона и их чувствительности к действию экзогенного интерферона**

Благодаря открытию Isaacs A., Lindenmann J. [161] интерферона и последующей идентификации естественных иммуностимуляторов, названных в

1979 г интерлейкинами, наступил новый этап в ветеринарной вирусологии. Интерфероны и интерлейкины в перспективе будут эффективными средствами профилактики инфекционных болезней животных.

Интерфероны (ИФ) представляют собой гармоноподобные растворимые белки, полипептиды, участвующие в процессах иммунорегуляции. На основе антигенных, физико-химических и биологических свойств различают интерфероны 1-го типа – альфа ( $\alpha$ ) и бета ( $\beta$ ) и 2-го типа – гамма ( $\gamma$ ).  $\alpha$  ИФ имеет 20 подтипов,  $\beta$  ИФ – 2 подтипа,  $\gamma$  ИФ – 3 подтипа.  $\alpha$  и  $\beta$  ИФ действуют через рецепторы клеточной мембраны в отличие от  $\gamma$  ИФ.  $\alpha$  ИФ синтезируются лейкоцитами и макрофагами, а также лимфобластоидными клетками.  $\beta$  ИФ продуцируют, главным образом, фибробласты, а  $\gamma$  ИФ – только Т-лимфоцитами [221].

Способность различных вирусов индуцировать образование ИФ в определенных типах клеток в системах *in vivo* или *in vitro* является характерным генетически обусловленным признаком вируса. Наряду с этим было изучено еще одно биологическое свойство – чувствительность к ингибирующему действию ИФ, степень которой неодинакова у разных вирусов. Ю.З. Гендон [28], De Maeyrs E., Enders J. [120] показали, что аттенуированные штаммы вируса являются более активными индукторами образования интерферона, чем вирулентные штаммы.

Синтез интерферона находится в прямой зависимости от множественности вируса, температуры культивирования инфицированных клеток, pH среды роста и возраста культуры клеток [45,46,121].

Способность вакцинных штаммов ВГНКИ-К и ЗМ-УНИИП индуцировать образование интерферона изучали в культуре утиных фибробластов множественностью заражения 0,01; 0,1 и 1,0 ТЦД<sub>50</sub> на клетку и температуре культивирования (37±0,5) °С. Инфицирование культуры клеток описано выше.

В каждый срок (интервал 24 ч) исследования из флаконов PS с испытуемыми штаммами брали пробы по 3,0 см<sup>3</sup> культуральной жидкости, которую замещали равным объемом поддерживающей среды Игла MEM + 199. В полученных пробах титровали интерферон (описано выше). Результаты представлены в табл. 9.



Интерфероногенная активность вакцинных штаммов вируса  
гепатита утят типа I

Штамм вируса	Множественность вируса, ТЦД <sub>50</sub>	Титр интерферона ЦЭПД <sub>50</sub> /см <sup>3</sup>				
		Сроки проб, ч				
		24	48	72	96	120
ВГНКИ- К	0,01	0	8	16	16	8
	0,1	0	16	32	32	16
	1,0	4	64	128	128	64
ЗМ- УНИИП	0,01	0	16	32	32	16
	0,1	0	32	64	64	32
	1,0	4	64	256	256	128

Примечание: ЦЭПД<sub>50</sub> – средняя доза интерферона, подавляющая цитопатический эффект.

Данные опытов, приведенные в таблице 9, свидетельствуют о том, что интерфероногенная активность вируса находилась в прямой зависимости от множественности заражения штаммов-индукторов вируса. Максимальная концентрация его была через 72 ч после инфицирования, чему соответствует латентная фаза цитопатогенного действия вируса. На 4-е сут культивирования активность держалась на одинаковом уровне, а затем по мере дегенерации и гибели клеток монослоя продукция интерферона снижался.

Изучаемые вакцинные штаммы по интерферирующей активности существенно не отличались, однако при дозах 0,1 и 1,0 ТЦД<sub>50</sub> штамма ЗМ-УНИИП вируса она была выше. Вакцинные штаммы ВГНКИ-К и ЗМ-УНИИП характеризовались как Int<sup>+</sup> штаммы [101].

Чувствительность вакцинных штаммов к действию интерферона определяли по ингибирующему его действию в отношении штаммов вируса гепатита в культуре утиных фибробластов и утиных эмбрионах. Контрольный вирус (штаммы ВГНКИ-К и ЗМ-УНИИП) в дозе 100 ТЦД<sub>50</sub> вносили через 24 часа после добавления

интерферона в 128 ЦЭПД<sub>50</sub>/см<sup>3</sup>. Определение чувствительности штаммов вируса к ингибирующему действию интерферона проводили по подавлению цитопатического эффекта вируса на клетки и отсутствию гибели эмбрионов (табл.10).

Таблица 10

Чувствительность штаммов вируса гепатита к действию интерферона

Штамм вируса	Множественность вируса, ТЦД <sub>50</sub>	Титр интерферона, ЦЭПД <sub>50</sub> /см <sup>3</sup>	Признак Sint
ВГНКИ-К	100	128	Sint <sup>+</sup>
ЗМ-УНИИП	100	128	Sint <sup>+</sup>

Примечание: ЦЭПД<sub>50</sub> – доза интерферона, подавляющая цитопатический эффект; Sint – чувствительность к интерферону

Полученные результаты показали, что вакцинные штаммы ВГНКИ-К и ЗМ-УНИИП вируса гепатита утят оказались чувствительными к ингибирующему действию интерферона (Sint<sup>+</sup>-признак) [101].

### 2.2.3 Признаки вакцинных штаммов вируса гепатита утят типа I, обусловленные свойствами поверхностной структуры вируса.

Большая группа биологических признаков вируса гепатита утят, выявляемых с помощью физико-химических, серологических и других методов, обусловлена особенностями строения белковой оболочки вирусных частиц. Такие свойства вируса, как термостабильность, антигенная специфичность, чувствительность к различным ингибиторам, определяются свойствами поверхности вириона и, видимо, отражают особенности структуры вирусного капсида.

Ниже мы приводим результаты исследований некоторых признаков вакцинных штаммов вируса гепатита утят.

### 2.2.3.1 Изучение термостабильности ( $t_{56}$ -признак) вируса гепатита утят.

Различная устойчивость штаммов вируса гепатита к инактивирующему действию нагревания при определенных температурах является биологическим свойством, часто используемым при изучении их характеристики.

Вирусосодержащую культуральную жидкость помещали в водяную баню в пробирках по 1,0 см<sup>3</sup>. Учет времени начинался, когда температура в пробирках достигала температуры водяной бани. Материал выдерживали в течение 15, 30, 45 и 60 минут при температуре 56°C.

После пробирки с вирусосодержащей суспензией помещали в таящий лед. Затем вирус, прогретый и не прогретый (контроль), титровали в клетках утиных фибробластов. Полноту инаktivации инфекционных свойств вируса проверяли 3-кратными «слепыми» пассажами в культуре клеток. Данные опытов представлены в табл. 11 и на рис.6.

Таблица 11

Сравнительная характеристика штаммов вируса гепатита по термостабильности

Штамм вируса	Темпера тура инактиваци и, °С	Титр вируса, lg ТЦД <sub>50</sub> /см <sup>3</sup>				Констан та скорост и инактив ации, lg К <sub>ин</sub>
		Время обработки, мин				
		15	30	45	60	
ВГНКИ- К	56	$\frac{3,5 \pm 0,1}{5,66 \pm 0,3}$	$\frac{2,33 \pm 0,2}{5,66 \pm 0,3}$	$\frac{1,25 \pm 0,15}{5,66 \pm 0,3}$	$\frac{0}{5,66 \pm 0,3}$	0,032
ЗМ- УНИИП	56	$\frac{3,0 \pm 0,1}{4,75 \pm 0,25}$	$\frac{1,75 \pm 0,3}{4,75 \pm 0,25}$	$\frac{> 0,76}{4,75 \pm 0,25}$	$\frac{0}{4,75 \pm 0,25}$	0,028

Результаты, приведенные в таблице 14, показывают, что вакцинные штаммы ВГНКИ-К и 3М-УНИИП вируса гепатита утят инактивировались при температуре нагревания 56°C в течение 60 минут, однако штамм 3М-УНИИП оказался наиболее чувствителен к действию повышенной температуры.

Снижение титра штамма ВГНКИ-К после 30-минутной термоинактивации составило  $(\lg V_t/V_0)$  0,41 и константа скорости инактивации  $(\lg K_{ин}=2,3\frac{P_t}{P_0}:t)$  равнялся 0,032, а у штамма 3М-УНИИП эти показатели были 0,37 и 0,028 соответственно.

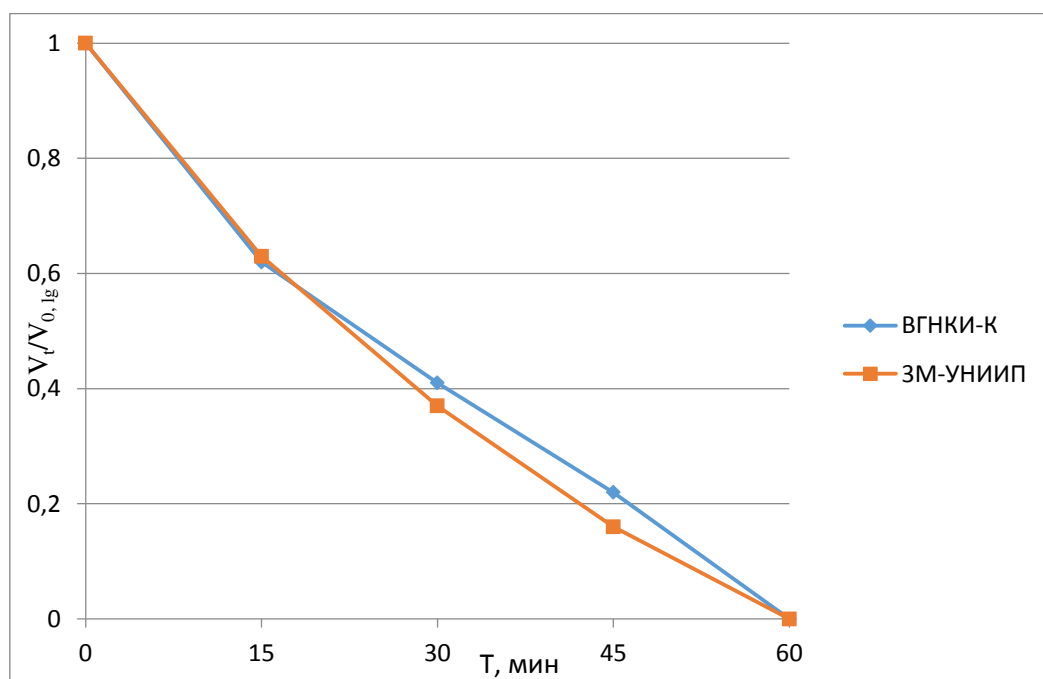


Рисунок 6. График термоинактивации вируса гепатита утят при  $t=56^{\circ}\text{C}$

Из рисунка 6 видно, что кривая инактивации у вакцинных штаммов оказалась двухкомпонентной: в течение 15 минут снижение титра инфекционности штамма ВГНКИ-К составило 38,2%, и последующие 45 минут – 61,8%, а штамма 3М-УНИИП в течение 30-минутной экспозиции оно равнялось 63,2%, и остальные 30 минут 36,8%. Проведенные опыты свидетельствовали о том, что вакцинные штаммы вируса были термостабильными ( $t_{56}^{+}$ ).

### 2.2.3.2 Изучение устойчивости вируса гепатита утят к действию формальдегида

Устойчивость вирусов к действию формальдегида является, по мнению ряда авторов, одним из биологических свойств вируса, связанных с особенностями структуры вирусного капсида [28,117].

В опытах по определению чувствительности вакцинных штаммов ВГНКИ-К и 3М-УНИИП вируса гепатита к формальдегиду использовали аллантоисную жидкость зараженных утиных эмбрионов. Действие формальдегида изучали в конечных концентрациях 0,02; 0,05; 0,1% при температуре  $(37,5 \pm 0,5)^\circ\text{C}$  в течение 24 ч при pH 7,2-7,4. Через каждые 6 ч отбирали пробы вирусосодержащей жидкости одновременно с контролем для определения инфекционного титра вируса. Остаточный формальдегид нейтрализовали 2М раствором бисульфита натрия до конечной его концентрации 0,01-0,03 М/дм<sup>3</sup>.

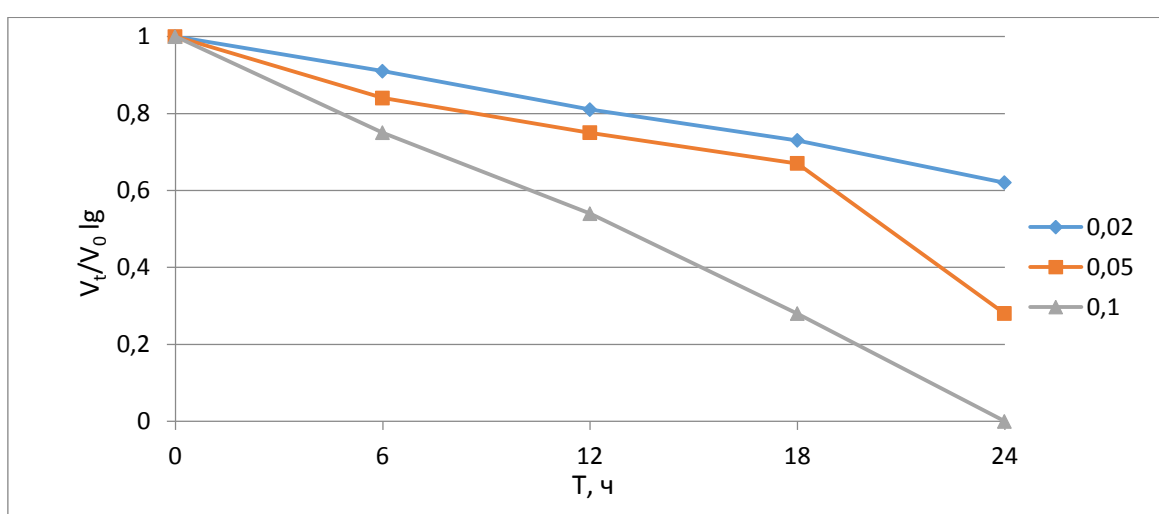
Полученные результаты приведены в табл. 12 и на рис. 7.

Таблица 12

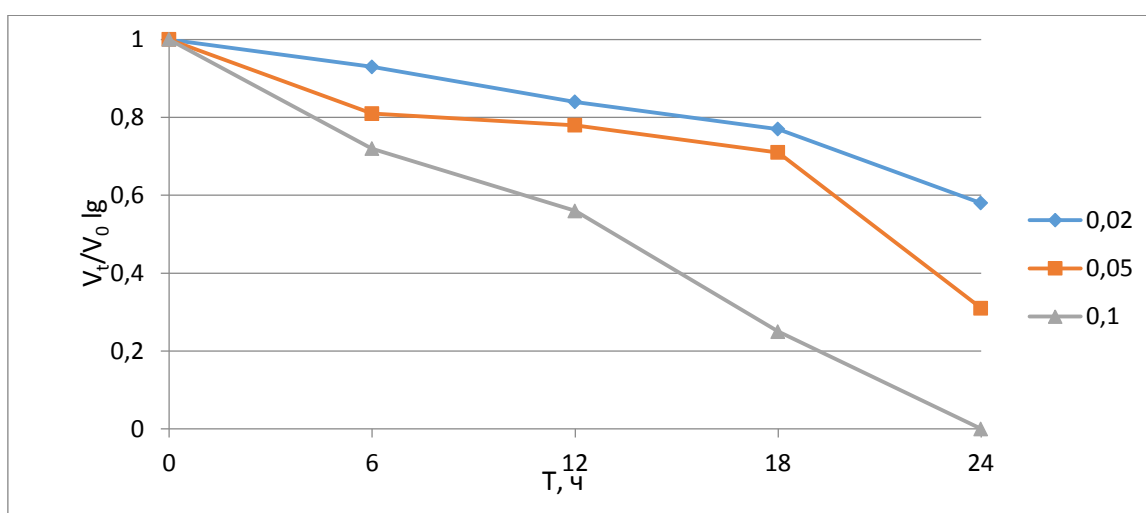
Чувствительность вакцинных штаммов вируса к действию формальдегида

Штамм вируса	Концент рация формаль- дегида, %	Инфекционный титр вируса, lg ЭЛД <sub>50</sub> /0,2 см <sup>3</sup>				Константа скорости инактивации через 24 ч, lg
		Экспозиция инактивации, ч				
		6	12	18	24	
ВГНКИ-К	0,02	7,25±0,1	6,5±0,15	5,5±0,3	4,0±0,2	9,9×10 <sup>-4</sup>
	0,05	6,75±0,2	6,0±0,2	5,0±0,1	2,5±0,3	6,06×10 <sup>-4</sup>
	0,1	6,0±0,5	4,3±0,1	2,1±0,3	0	0
Контроль вируса		8,0	8,0	7,5	6,5	
ЗМ- УНИИП	0,02	7,5±0,1	6,75±0,1	5,75±0,2	3,75±0,1	9,2×10 <sup>-4</sup>
	0,05	6,5±0,2	6,3±0,3	5,3±0,3	2,0±0,3	4,9×10 <sup>-4</sup>
	0,1	5,75±0,3	4,5±0,25	2,0±0,1	0	0
Контроль вируса		8,0	8,0	7,5	6,5	

Данные опытов, представленные в таблице 15, показывают, что формальдегид в концентрациях 0,02 и 0,05% инактивировал инфекционную активность ВГНКИ-К в течение 24 ч на 50,0 и 68,75%, а штамма 3М-УНИИП – 53,1 и 75,0% соответственно с кинетической скоростью инактивации  $9,9 \times 10^{-4}$ ;  $6,06 \times 10^{-4}$  lg/мин и  $9,2 \times 10^{-4}$ ;  $4,9 \times 10^{-4}$  lg/мин. Под действием 0,1%-ного формальдегида вирус гепатита утят при температуре 37°C в течение 24 часов полностью потерял инфекционную активность с кинетической скоростью инактивации равной  $5,3-5,9 \times 10^{-4}$  lg/мин при экспозиции 18 ч.



а) ВГНКИ-К



б) 3М-УНИИП

Рисунок 7. Кинетика инактивации вакцинных штаммов вируса гепатита утят формальдегидом

Из рисунков 7 видно, что инаktivация вакцинных штаммов вируса гепатита под действием формальдегида в указанных концентрациях происходила однотипно и следовала простой экспоненциальной кинетике.

Таким образом, полученные результаты кинетики инаktivации показали, что скорость инаktivации штаммов вируса повышалась по мере увеличения концентрации препарата в вируссодержащей жидкости и времени его воздействия.

### **2.2.3.3 Изучение антигенных свойств (антигенной специфичности Ag-признака и степени нейтрализации An-признака) вируса гепатита утят типа I.**

Известно, что антигенная структура является одним из наиболее стабильных биологических признаков вирусов, в частности, вируса гепатита утят. Однако в течение эпизоотического процесса или в период широких вакцинальных кампаний в результате пассирования вируса через иммунные организмы, а также в результате различных экспериментальных воздействий могут возникать изменения антигенного признака вируса.

Современная классификация вирусов гепатита утят основывается на антигенных взаимоотношениях, определяемых с помощью комплекса различных серологических реакций.

Антигенные свойства изучаемых вакцинных штаммов ВГНКИ-К и 3М-УНИИП вируса гепатита изучали на 10-суточных утятах путем получения штаммспецифических иммунных сывороток.

Вируснейтрализующую активность штаммспецифических сывороток определяли в реакции нейтрализации в  $\alpha$ - и  $\beta$ -вариантах в культуре утиных фибробластов (табл. 13).

Таблица 13

Сравнительная характеристика активности штаммспецифических сывороток в РН  
(n=5)

Штамм вируса	Активность сыворотки		P<
	$\alpha$ -вариант, Ig	$\beta$ -вариант, log <sub>2</sub>	
ВГНКИ-К	2,7 $\pm$ 0,2	8,0 $\pm$ 0,25	0,05
ЗМ-УНИИП	3,0 $\pm$ 0,15	8,5 $\pm$ 0,3	0,05

Результаты серологических исследований, представленные в таблице 13, показывают, что вируснейтрализующая активность сыворотки к штамму ЗМ-УНИИП значительно выше, чем к штамму ВГНКИ-К, что подтверждали значения титров антител в  $\alpha$ - и  $\beta$ -вариантах реакции нейтрализации.

Таким образом, вакцинный штамм ЗМ-УНИИП показал большую антигенность по сравнению со штаммом ВГНКИ-К вируса гепатита утят типа I.

Степень антигенного родства между вакцинными штаммами вируса гепатита утят типа I изучали в перекрестной реакции нейтрализации со штаммспецифическими сыворотками и вычисляли по формуле Archetti & Horsfall [92]. Результаты представлены в табл. 14.

Таблица 14

Антигенное родство вакцинных штаммов вируса  
гепатита утят типа I

Штамм вируса	Активность сыворотки к штаммам (ИН, Ig)	
	ВГНКИ-К	ЗМ-УНИИП
ВГНКИ-К	2,5 $\pm$ 0,3	2,0 $\pm$ 0,15
ЗМ-УНИИП	3,0 $\pm$ 0,25	2,5 $\pm$ 0,35

Данные, приведенные в таблице 14, свидетельствуют о том, что вакцинные штаммы ВГНКИ-К и ЗМ-УНИИП близкородственны, так как различия в значениях



индекса нейтрализации гомологичной и гетерологичной штаммспецифичной сыворотки положительны и не существенны [97].

**Изучение антигенной специфичности вакцинных штаммов вируса гепатита утят.** При изучении этиологии возникновения вирусного гепатита утят типа I в период массовой вакцинации, а также вопросов репликации вакцинных штаммов в организме и их распространения среди птиц, при исследовании генетической устойчивости вакцинных штаммов необходимы доказательства происхождения выделенных штаммов от вакцинных или эпизоотических.

Для решения этих вопросов следует:

- изучить патогенность штаммов вируса для утят;
- изучить культуральные свойства вируса;
- провести идентификацию штаммов при помощи их нейтрализации штаммспецифичными сыворотками.

С помощью изучения патогенности и культуральных свойств штаммов нельзя исчерпывающе решить вопрос о генетической природе изучаемых штаммов вируса. Полевые штаммы нередко имеют признаки, свойственные вакцинным, а вакцинные, в свою очередь, могут обладать некоторой изменчивостью характерных им признаков.

Антигенная специфичность (Ag-признак) и степень нейтрализации (An-признак) широко используются в качестве генетического маркера при изучении внутритиповых антигенных различий штаммов вирусов [14,29,79,96].

Антигенный характер каждого штамма является специфичным и высокостабильным свойством и не зависит от чувствительности системы, в которой репродуцируется вирус.

Для характеристики Ag-признака по методу McBride W.D. [180] применили величину  $K$ , которая вычисляется по формуле

$$K = D \times 2.3 \times \lg \left( \frac{V_0}{V_t} \right), \text{ где} \quad (7)$$

$K$  – константа нейтрализации;

$D$  - рабочее разведение сыворотки (4NE);

$V_0$  - активность вируса непосредственно после смешивания с сывороткой;

$V_t$  - активность вируса после 15-минутного контакта при температуре 37°C;

Удобнее при сравнении Ag-признака штаммов использовать, так называемую, нормальную величину  $K(NK)$ . При этом абсолютная величина стандартного штамма, нейтрализованного гомологичной сывороткой, принимается за 100%, а величина  $NK$  изучаемых штаммов выражается в процентах к величине  $K$  стандартного штамма. Значение констант скорости нейтрализации ( $K$ ) свидетельствовали о достоверности полученных результатов ( $>2$ ).

Gards S. [134] предложил модификацию теста определения Ag-признака, суть которого заключается в том, что сыворотка иммунизированного животного в состоянии нейтрализовать большее количество гомологичного вируса, чем гетерологичного.

В серологических исследованиях использовали штаммспецифические сыворотки, полученные на 10-суточных утятах путем иммунизации вакцинными штаммами вируса гепатита утят типа I. Активность иммунных сывороток определяли в реакции нейтрализации в  $\beta$ -варианте в культуре утиных фибробластов против 500 и 1000 ТЦД<sub>50</sub> вируса.

Для дифференциации штаммов вируса применяли метод Gard S. [134] и кинетический метод, предложенный McBride W.D. [180], в реакции нейтрализации  $\alpha$ -варианте в культуре клеток. При изучении степени или скорости нейтрализации штаммов (An-маркер) специфическую сыворотку брали с активностью 4NE.

Результаты изучения различий в скорости течения реакции нейтрализации штаммспецифической сывороткой гомологичных и гетерологичных штаммов вируса гепатита утят типа I кинетическим методом приведены в табл. 15.

Результаты перекрестной реакции нейтрализации вакцинных штаммов со  
специфическими сыворотками

Штамм вируса	Сыворотка к штамму:					
	ВГНКИ-К			ЗМ-УНИИП		
	ИН, lg ТЦД <sub>50</sub>	Показатель достовернос ти	К по McBride	ИН, lg ТЦД <sub>50</sub>	Показатель достовернос ти	К по McBride
ВГНКИ- К	1,75±0,3	>2	13,8	1,25±0,2	>2	12,07
ЗМ- УНИИП	1,0±0,1	>2	11,04	2,0±0,2	>2	14,44

Примечание: ИН – индекс нейтрализации;

К – константа нейтрализации.

Полученные данные свидетельствуют о том, что вакцинные штаммы ВГНКИ-К и ЗМ-УНИИП вируса гепатита утят типа I нейтрализовались в большей степени за время  $t=15$  мин контакта при  $37^{\circ}\text{C}$  с гомологичной сывороткой по сравнению с гетерологичной. Так, индекс нейтрализации штамма ВГНКИ-К штаммспецифической сывороткой равнялся 1,75 lg, а гетерологичной 1,25 lg. Аналогичную картину отмечали в отношении штамма ЗМ-УНИИП.

Значения констант (К) скорости течения реакции нейтрализации свидетельствовали о достоверности полученных результатов ( $P>2$ ).

Таким образом, применяя метод Gard S., основанный на выявлении разницы в титрах при нейтрализации штаммспецифической сывороткой гомологичного и гетерологичного штаммов вируса, и кинетический метод, предложенный McBride W.D., основанный на выявлении различий в скорости течения реакции нейтрализации штаммспецифической сывороткой гомологичного и гетерологичного

штаммов вируса, нам удалось обнаружить некоторые отличия, как в степени нейтрализации (An-маркере), так и в антигенной специфичности (Ag-маркере) между изучаемыми штаммами вируса гепатита утят типа I [105].

### 3 ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЙ

Проведение исследований с вирусными штаммами, обладающими стандартной биологической характеристикой, важно для решения как теоретических, так и практических задач.

В практическом аспекте значение генетических исследований трудно переоценить, обращаясь к проблеме создания и применения на практике живых вакцин. Применяемые в настоящее время аттенуированные вакцины являются мутантами [71], полученными чаще всего в результате специальных условий пассирования, которые характеризуются определенным стабильным фенотипом, связанным с изменением патогенности вируса для утят или чувствительной птицы.

В последнее время достигнут существенный прогресс в усовершенствовании специфической профилактики вирусного гепатита утят типа I. Однако ряд вопросов остается не изученным, в частности, в литературе отсутствуют работы, посвященные изучению генетических признаков вакцинных штаммов вируса гепатита, а также их стабильности и однородности штаммов, применяемых в производстве вакцин. Успешное разрешение этих вопросов во многом зависит от правильных представлений сущности наследственности и изменчивости вируса.

Следует подчеркнуть, что знание биологических свойств вакцинных штаммов вируса гепатита и их стабильности является наиболее важным вопросом, возникающим при производстве и применении аттенуированных вирусвакцин против вирусного гепатита утят типа I.

Целью наших исследований явилось изучение биологических свойств вакцинных штаммов ВГНКИ-К и ЗМ-УНИИП и их стабильности в процессе лабораторных пассажей, а также при вакцинации птицы.

При сравнительном изучении испытуемых штаммов вируса гепатита по некоторым маркерам было выявлено как их сходство, так и различие.

Исследования патогенности вакцинных штаммов вируса для 6-7-и 9-10 – суточных развивающихся куриных эмбрионов ( $P_{che}$ -признак) при инокуляции в желточный мешок и аллантоисную полость в дозе  $3,0 \lg \text{ЭЛД}_{50}/0,2 \text{ см}^3$  показали, что штамм ВГНКИ-К вызывал гибель (5-15) % и (10-30)%, а штамм ЗМ-УНИИП – (20-

60)% и (30-90)% соответственно. У павших эмбрионов отмечали отставание их в развитии, инъекцию сосудов желточного мешка, диффузную отечность зародыша и геморрагические явления на тельце. Печень увеличена, уплотнена, серовато-беловатого или серовато-зеленоватого оттенка с петехиями. У павших эмбрионов в поздние сроки зеленоватое окрашивание приобретала хориоаллантоисная жидкость.

Морфологические исследования органов павших утиных эмбрионов свидетельствовали выраженные дистрофические и некробиотические изменения с очаговыми кровоизлияниями.

Степень репродукции вакцинного штамма 3М-УНИИП в куриных эмбрионах более выражена ( $P_{che}^{+}$ ) по сравнению со штаммом ВГНКИ-К ( $P_{che}^{\pm}$ ). Патогенность изученных штаммов сильно выражена для утиных эмбрионов, на что указывают патологоморфологические изменения во внутренних органах эмбрионов. Следует отметить, что их патогенность с увеличением числа пассажей усиливается. Вакцинные штаммы вируса показали хорошие адаптационные свойства к куриным и утиным эмбрионам [100].

Полученные нами результаты культивирования вакцинных штаммов вируса гепатита утят на куриных и утиных эмбрионах, их адаптации и усиления патогенных свойств в связи с повышенной репликацией согласуются с данными других исследователей [4,19,22,180,207]. Авторы показали, что патогенность для эмбрионов и иммуногенность штаммов вируса свойства взаимосвязанные и штаммы вируса при длительном пассировании на эмбрионах становятся менее иммуногенны. В то же время штамм 3М-УНИИП обладал реверсильностью [4].

Признак патогенности для восприимчивого хозяина наиболее широко использовался исследователями при изучении экспериментальной изменчивости вируса гепатита утят [4,5,42] с целью создания аттенуированных вирусвакцин против вирусного гепатита.

При изучении патогенности вакцинных штаммов вируса гепатита для утят 2-суточного возраста, при применении различных методов заражения, в дозе  $3,0 \lg \text{ЭЛД}_{50}/0,2 \text{ см}^3$  не отмечено различий их патогенности. Утята не проявляли клинических признаков заболевания ( $P_d^{-}$  - признак).

Вакцинные штаммы вируса не оказывали отрицательного влияния на рост и развитие утят, их средняя живая масса не отличалась от массы утят в контрольной группе. Аналогичные данные по патогенности аттенуированных штаммов вируса для 2-3 – суточных утят получены Р.А. Зубцовой [40,41] и И.И. Паникаром [71].

Метод тканевых культур находит все большее применение в генетических исследованиях с вирусами животных, в том числе и с вирусом гепатита утят. С его помощью был изучен целый ряд важных биологических признаков вируса гепатита утят: цитопатогенность, бляшкообразование, чувствительность к действию различных температур и химических веществ и тем самым значительно расширены ранее существовавшие представления о его биологической характеристике [61,62,71,123,219,223,224].

Способность вируса гепатита наряду с репликацией вызывать цитопатический эффект в чувствительных культурах клеток является наследственным генетическим маркером, а изучение репродукции вакцинных штаммов в гомологичной культуре клеток (утиных фибробластах, клетках печени и почки) имеет важное значение в понятии патогенеза вакцинального процесса в организме иммунизированной птицы.

Нами установлена неодинаковая чувствительность утиных и куриных фибробластов к вакцинным штаммам ВГНКИ-К и 3М-УНИИП вируса гепатита утят. Так, репликация штаммов сопровождалась цитопатогенным действием (округлением клеток, зернистостью в цитоплазме клеток, появлением симпластических образований и формированием синцитий) и этот феномен обнаруживался через 48-72 ч и 96-120 ч соответственно, а латентная фаза составила 24 и 48 ч после инокуляции [59].

Степень репликации штаммов и их биологическая активность были различной в зависимости от типа культуры клеток. Наиболее чувствительными оказались клетки печени утиного эмбриона.

Цитопатогенная активность, как генетический признак, вакцинных штаммов ВГНКИ-К и 3М-УНИИП вируса гепатита утят типа I в отношении изучаемых клеточных культур была весьма стабильной и они характеризовались как  $TC_{che}^{\pm}$ ,  $TC_{de}^{+}$ ,  $TC_{de}^{H+}$ ,  $TC_{de}^{N+}$  штаммы [60, 97].

Большинству вирусов свойственна репликация в чувствительных клетках в определенной температурной зоне, что является наследственно закрепленным признаком, за пределами которой формирование зрелых вирусных частиц, обычно, не происходит. Особенность репродукции при различных температурах ( $rct$ -признак) вируса гепатита утят не изучалась.

Результаты наших исследований показали возможность использования  $rct^{TC}$  – признака при изучении стабильности вакцинных штаммов вируса гепатита утят. Штаммы вируса индуцировали цитопатогенное действие в культуре утиных фибробластов при температуре культивирования 32 и 40°C. Цитопатический эффект характеризовался округлением клеток, зернистостью в цитоплазме, образованием симпластов в ранней стадии и синцитиальных формаций на последней стадии репликации вируса.

По данным культивирования при пониженной (32°C) и повышенной (40°C) температурах вакцинные штаммы ВГНКИ-К и 3М-УНИИП характеризовались соответственно, как ( $rct_{32}^{TC\pm}$ ,  $rct_{40}^{TC+}$ ) и ( $rct_{32}^{TC+}$ ,  $rct_{40}^{TC+}$ ) штаммы вируса, а их инфекционные титры существенно не отличались. Индексы подавления их репликации в клетках при 32°C равнялись  $2,75\pm 0,3$  и  $1,92\pm 0,1$  lg, а при 40°C –  $1,75\pm 0,1$  и  $1,47\pm 0,3$  lg соответственно при  $P < 0,05$  [99].

Проведенное сравнение вакцинных штаммов по  $rct^{TC}$  признаку и степени накопления вируса в культуре утиных фибробластов показало, что дифференцирующей является температура 32°C [60].

Способность вакцинных штаммов ВГНКИ-К и 3М-УНИИП вируса гепатита утят к индукции интерферона в культуре утиных фибробластов изучали впервые. Количество индуцированного интерферона определяется видовыми и штаммовыми особенностями вируса, активностью их в данной культуре клеток и множественностью инфицирования.

В наших экспериментах определяли активность интерферона (ЦЭПД<sub>50</sub>) в культуре утиных фибробластов в зависимости количества внесенного вируса. Полученные данные показали, что продукция интерферона клетками, инокулированными испытуемыми штаммами находилась в прямой зависимости от



дозы внесенного вируса. Максимальное количество его продуцировалось при дозе штамма ВГНКИ-К 1,0 ТЦД<sub>50</sub>/кл активностью 1:128 ЦЭПД<sub>50</sub> и 3М-УНИИП – 1:256 ЦЭПД<sub>50</sub> через 72-96 часов после инокуляции культуры клеток [101].

Вакцинные штаммы вируса гепатита существенно не различались по способности индуцировать интерферон и характеризовались как Int<sup>+</sup> штаммы.

Известно, что скорость образования интерферона в системах вирус-клетка носит неодинаковый характер. Максимальная степень накопления интерферона после инфицирования клеточных культур вирусами, принадлежавших к различным семействам [14,24,58,95,177] имела место через 48-72 часа. Авторы установили, что аттенуированные штаммы вирусов обладали более высокой интерферогенной активностью, чем вирулентные.

Изучение динамики образования интерферона в культуре утиных фибробластов подтвердило результаты исследования других авторов о том, что максимальное количество интерферона продуцируется через 48-72 часа после инокуляции клеток [60].

Установлена чувствительность вакцинных штаммов вируса гепатита утят к действию экзогенного интерферона. Результаты исследований показали, что экзогенный интерферон в титре 1:128 полностью подавлял цитопатический эффект и гибель утиных эмбрионов 100 ТЦД<sub>50</sub> вакцинных штаммов (S<sub>int</sub><sup>+</sup>). Обсуждается роль интерферона в повышении действия вакцин в первые сутки после прививки [101].

Изучение чувствительности вакцинных штаммов вируса гепатита утят к некоторым физико-химическим факторам (повышенная температура, формальдегид) позволило выявить их чувствительность к действию указанных факторов.

Результаты исследований показали, что штаммы ВГНКИ-К и 3М-УНИИП вируса гепатита утят типа I инаktivировались при температуре нагревания 56°C в течение 60 минут. Кривая инаktivации их была двухкомпонентной. В течение первых 15 минут снижение инфекционного титра штаммов ВГНКИ-К составило 38,2%, а в последующие 45 минут скорость инаktivации существенно замедлилась (61,8%). Снижение титра после 30-минутной инаktivации составило 0,41 lg/мин, а

константа скорости инактивации была 0,032 lg. У штамма 3М-УНИИП скорость термоинактивации и константа скорости инактивации были соответственно 0,37 и 0,028 lg.

Полученные нами данные по терморезистентности аттенуированных штаммов вируса гепатита были сходны с результатами, описанными И.И. Паникар [71], Tauraso N. et al. [207], Dvorokova D. a. Kozusnik Z. [126], Davis D. [123].

Действие формальдегида на штаммы вируса находилось в прямой зависимости от концентрации препарата и времени воздействия. Вакцинные штаммы вируса гепатита полностью теряли цитопатогенную активность в культуре утиных фибробластов при воздействии препарата в конечной концентрации 0,1% в течение 24ч при температуре 37°C (F<sup>+</sup> - признак). Инактивация штаммов вируса происходила однотипно и следовала простой экспоненциальной кинетике.

Чувствительность вируса гепатита к формальдегиду отмечали А.А. Поляков, Г.Д. Волковский [76], Dvorokova D. a. Kozusnik Z. [126]. Авторы установили, что полная инактивация вируса наступала при действии 0,2 – 1% раствора формальдегида в течение 2ч при температуре 15-20°C.

Методы антигенной дифференциации штаммов вируса гепатита утят, выделенных в разных странах мира, при помощи типоспецифических сывороток применялись в различных модификациях многими авторами [73,194,220,227]. Они показали, что перекрестный иммунитет между некоторыми штаммами из серотипов вируса не является достаточно эффективным или вовсе может отсутствовать. Однако до настоящего времени остается неясным, связана ли большая нейтрализующая активность штаммспецифической сыворотки с тем, что для нейтрализации гомологичного штамма вируса требуется меньшее количество молекул антител, или же в основе этого феномена (явления) лежит какой-то другой механизм.

Использование различных вариантов реакции нейтрализации дало возможность И.И. Паникару [71], Hwang J. [157], Haider S.A. [145], Gough R.E. a. Spackman D. [137], Tripathy D.N. a. Hanson L.E. [213] доказать, что штаммы вируса гепатита утят типа I обеспечивают высокий перекрестный иммунный ответ.

Изучение способности испытуемых штаммов вируса гепатита индуцировать синтез антител показало, что активность штаммспецифической сыворотки к штамму ВГНКИ-К в реакции нейтрализации в культуре утиных фибробластов в  $\alpha$ - и  $\beta$ -вариантах была  $2,7 \pm 0,2 \lg$  и  $8,0 \pm 0,25 \log_2$  соответственно, а к штамму 3М-УНИИП равнялась  $3,0 \pm 0,15 \lg$  и  $8,5 \pm 0,3 \log_2$  [97].

Применяя метод Gard, основанный на выявлении разницы в титрах при нейтрализации штаммспецифической сывороткой гомологичного и гетерологичного штаммов вируса, и кинетический метод, предложенный McBride W.D., основанный на выявлении различий в скорости течения реакции нейтрализации штаммспецифической сывороткой гомологичного и гетерологичного штаммов, нам удалось обнаружить некоторые отличия, как в степени нейтрализации, так и в антигенной специфичности между вакцинными штаммами ВГНКИ-К и 3М-УНИИП вируса гепатита утят типа I. Полученные данные показывают, что гомологичный штамм ВГНКИ-К нейтрализовался штаммспецифической сывороткой в количестве  $1,75 \pm 0,3 \lg$  ТЦД<sub>50</sub>, а штамм 3М-УНИИП с гетерологичной сывороткой к штамму ВГНКИ-К в количестве  $1,25 \pm 0,2 \lg$  ТЦД<sub>50</sub> вируса. Значение констант скорости нейтрализации (K) свидетельствуют о достоверности полученных результатов ( $>2$ ).

Анализируя данные, необходимо подчеркнуть, что вакцинные штаммы ВГНКИ-К и 3М-УНИИП вируса гепатита утят типа I имеют различия как в антигенной специфичности (Ag-признаку), так и по степени нейтрализации (An-признаку). Штаммы нейтрализовались в больших логарифмах в присутствии гомологичной штаммспецифичной сыворотки в перекрестной реакции нейтрализации в культуре клеток [98].

Выяснение взаимосвязи между биологическими признаками вируса гепатита утят типа I (P-признаком) и маркерами, *in vitro* (rct, TC, ts – и другими) составляет одну из актуальных задач при селекции вакцинных штаммов.

Несмотря на то, что корреляция между отдельными генетическими маркерами вакцинных штаммов (rct<sub>40°</sub>, TC, ts<sub>56°</sub>) и патогенностью для эмбрионов (P<sub>che</sub> и P<sub>de</sub>) имеет место, необходимо учитывать, что эта корреляция является абсолютной и носит штаммовый характер.

В связи с этим при изучении свойств штаммов с целью отнесения их в группу патогенных или апатогенных нами был изучен комплекс признаков, коррелирующих с патогенностью как для развивающихся эмбрионов, так и для утят (табл. 16).

Таблица 16

Дифференциальные генетические маркеры вакцинных штаммов вируса гепатита утят типа I

Штамм вируса	Патогенность (Р-признак) для		Чувствительность к:		Антигенная специфичность (Ag-признак) и степень нейтрализации (An-признак)	Способность к репликации в культуре клеток:		
	куриных и утиных эмбрионов	2-суточных утят	температуре 56°C (ts <sub>56°</sub> -признак)	формальдегиду (F-признак)		Цитопатогенная активность (ТС-признак)	Репликация при измененной температуре (rct <sub>ТС</sub> -признак)	Интерферогенная активность (Int-признак) и чувствительность к интерферону (Sint-признак)
ВГНКИ-К	P <sub>che</sub> <sup>±</sup> P <sub>de</sub> <sup>+</sup>	P <sub>d</sub> <sup>-</sup>	ts <sub>56°</sub> <sup>+</sup>	F <sup>+</sup>	Ag <sup>+</sup> An <sup>±</sup>	TC <sub>che</sub> <sup>±</sup> TC <sub>de</sub> <sup>+</sup> TC <sub>de</sub> <sup>H+</sup> TC <sub>de</sub> <sup>N+</sup>	rct <sub>32°</sub> <sup>±</sup> rct <sub>40°</sub> <sup>+</sup>	Int <sup>+</sup> Sint <sup>+</sup>
3М-УНИИП	P <sub>che</sub> <sup>+</sup> P <sub>de</sub> <sup>+</sup>	P <sub>d</sub> <sup>-</sup>	ts <sub>56°</sub> <sup>+</sup>	F <sup>+</sup>	Ag <sup>+</sup> An <sup>±</sup>	TC <sub>che</sub> <sup>±</sup> TC <sub>de</sub> <sup>+</sup> TC <sub>de</sub> <sup>H+</sup> TC <sub>de</sub> <sup>N+</sup>	rct <sub>32°</sub> <sup>+</sup> rct <sub>40°</sub> <sup>+</sup>	Int <sup>+</sup> Sint <sup>+</sup>

Обобщенные данные, приведенные в таблице 16, показывают определенную корреляцию между генетическими маркерами. Обнаружена взаимосвязь между P<sub>che</sub>/rct<sub>40°</sub>/ts<sub>56°</sub>/ТС у исследуемых вакцинных штаммов. Высокая патогенность для утиных эмбрионов (P<sub>de</sub>), их репликация при повышенной температуре (rct<sub>40°</sub>) и термостабильность (ts<sub>56°</sub>) указывают на слабую аттенуацию вакцинных штаммов, хотя они не вызывали клинического проявления болезни у утят.

Вакцинный штамм ВГНКИ-К характеризовался следующими сочетаниями признаков: P<sub>che</sub><sup>±</sup>, P<sub>de</sub><sup>+</sup>, P<sub>d</sub><sup>-</sup>, TC<sub>che</sub><sup>±</sup>, TC<sub>de</sub><sup>+</sup>, TC<sub>de</sub><sup>H+</sup>, TC<sub>de</sub><sup>N+</sup>, rct<sub>32°</sub><sup>±</sup>, rct<sub>40°</sub><sup>+</sup>, ts<sub>56°</sub><sup>+</sup>, F<sup>+</sup>, Int<sup>+</sup>, Sint<sup>+</sup>, Ag<sup>+</sup>, An<sup>±</sup>, а штамм 3М-УНИИП – P<sub>che</sub><sup>+</sup>, P<sub>de</sub><sup>+</sup>, P<sub>d</sub><sup>-</sup>, TC<sub>che</sub><sup>±</sup>, TC<sub>de</sub><sup>+</sup>, TC<sub>de</sub><sup>H+</sup>, TC<sub>de</sub><sup>N+</sup>, rct<sub>32°</sub><sup>+</sup>, rct<sub>40°</sub><sup>+</sup>, ts<sub>56°</sub><sup>+</sup>, F<sup>+</sup>, Int<sup>+</sup>, Sint<sup>+</sup>, Ag<sup>+</sup>, An<sup>±</sup>.

#### 4 ВЫВОДЫ

Изученные биологические признаки вакцинных штаммов ВГНКИ-К и 3М-УНИИП вируса гепатита утят типа I являются стабильными и могут быть использованы для контроля при производстве и применении вакцин против вирусного гепатита утят, изготовленных из этих штаммов.

Вакцинные штаммы вируса гепатита существенно различаются по патогенности для куриных эмбрионов ( $P_{che}$ ), высоко патогенны для утиных эмбрионов ( $P_{de}$ ) и апатогенны для утят ( $P_d$ ). Штамм ВГНКИ-К характеризуется как  $P_{che}^{\pm}$ ,  $P_{de}^{+}$ ,  $P_d^{-}$ , а штамм 3М-УНИИП – как  $P_{che}^{+}$ ,  $P_{de}^{+}$ ,  $P_d^{-}$  вируса гепатита утят типа I.

Вакцинные штаммы ВГНКИ-К и 3М-УНИИП способны к репликации в культурах фибробластов куриных и утиных эмбрионов, клеток печени и почек эмбрионов уток, вызывая цитопатический эффект цитолитического типа с образованием синцитий и характеризуются как  $TC_{che}^{\pm}$ ,  $TC_{de}^{+}$ ,  $TC_{de}^{H+}$ ,  $TC_{de}^{N+}$  штаммы. Степень репродукции штаммов и их биологическая активность различаются в зависимости от типа клеточной культуры. Культуральный маркер вакцинных штаммов оказался весьма стабильным.

Вакцинные штаммы вируса гепатита утят способны к репликации в культуре утиных фибробластов при повышенной и пониженной температурах культивирования, инициируя цитопатогенное действие в клетках и характеризуются как  $rct_{32^{\circ}}^{\pm}$ ,  $rct_{40^{\circ}}^{+}$  (ВГНКИ-К) и  $rct_{32^{\circ}}^{+}$ ,  $rct_{40^{\circ}}^{+}$  (3М-УНИИП) штаммы вируса гепатита. Различия по  $rct$  признаку между штаммами вируса носят штаммовый характер и характеризуют неодинаковую степень аттенуации.

Вакцинные штаммы ВГНКИ-К и 3М-УНИИП обладают выраженной интерфероногенной активностью в культуре утиных фибробластов ( $Int^{+}$ ) и чувствительны к действию экзогенного интерферона ( $Sint^{+}$ ). Установлена коррелятивная зависимость между степенью накопления интерферона, индуцированного штаммом вируса, множественностью инфицирования клеток и временем после инокуляции культуры.

Вакцинные штаммы ВГНКИ-К и ЗМ-УНИИП вируса гепатита термостабильны ( $ts_{56^{\circ}}^{+}$ ) и чувствительны к инактивирующему действию формальдегида ( $F^{+}$ ).

Вакцинные штаммы ВГНКИ-К и ЗМ-УНИИП вируса гепатита утят индуцируют выработку специфических антител у иммунизированных утят, вызывая иммунологический сдвиг в организме. Установлено их близкородственное антигенное родство. Штаммы вируса различаются по антигенной специфичности ( $Ag$ ) и степени нейтрализации ( $An$ ) и характеризуются, как  $Ag^{+}$ ,  $An^{\pm}$  штаммы вируса.

#### **4.1 Практические предложения**

Разработаны и одобрены Ученым Советом Всероссийским научно-исследовательским ветеринарным институтом птицеводства и Координационным Советом по животноводству и ветеринарии СЗЦППО методические положения «Диагностика вирусного гепатита утят типа I».

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

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ВГУ – вирус гепатита утят

ИФ – интерфероны

ИФА – иммуноферментный анализ

КЭ – куриные эмбрионы

РДП – реакция диффузионной преципитации

РНГА – реакция непрямой гемагглютинации

РЗГА – реакция задержки гемагглютинации

РН – реакция нейтрализации

ТЦД<sub>50</sub> – 50% тканевая цитопатогенная доза

УЭ – утиные эмбрионы

ФЭК – фибробласты эмбрионов кур

ФЭУ – фибробласты эмбрионов уток

ЦПД – цитопатогенное действие

ЦЭПД<sub>50</sub> – средняя доза интерферона, подавляющая цитопатический эффект

ЭЛД<sub>50</sub> – 50% эмбриональная летальная доза

Ag – антигенная специфичность

An – степень нейтрализации специфической антисывороткой

Ig – логарифм по основанию 10

Int – интерфероногенная активность

F – чувствительность к формальдегиду

Rct – репликация при различной температуре

Sint – чувствительность к интерферону

T – терморезистентность

ТС – тканевая культура

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Акулов, А.В. Чувствительность гусят к вирусу гепатита уток / А.В. Акулов, Л.М. Контримавичус, А.Д. Майборода // Ветеринария. – 1972. – № 3. – С. 47.
2. Аугустинавичус, В. Борьба с вирусным гепатитом уток в рыбхозах Литвы / В. Аугустинавичус, В. Валента, И. Нарбутас // Птицеводство. – 1970. – №.1. – С.44.
3. Аугустинавичус, В. Эффективность вакцинации утят и уток против вирусного гепатита / В. Аугустинавичус, А. Лабутинас // Тр. Лит. НИВИ. – 1970. – Т.4. – С.27-33.
4. Безрукавая, И.Ю. Вакцина против вирусного гепатита утят из штамма 3М / И.Ю. Безрукавая // Пути обеспечения ветеринарного благополучия в промышленном животноводстве. – Киев. Южное отделение ВАСХНИЛ, 1978. – С. 90.
5. Безрукавая, И.Ю. Вопросы механизма иммунитета при вирусном гепатите утят / И.Ю. Безрукавая // Научно-технич. бюл. УНИИП. – Харьков, 1980.
6. Белецкая, Л.А. Выращивание вируса гепатита утят в тканевых культурах / Л.А. Белецкая // Сб. работ молодых ученых ВНИИП. – 1964. – Вып. 7.
7. Бенъеш-Мельник, М.Б. Маркирующие признаки вируса полиомиелита и их отношение к вирулентности штаммов вируса для обезьян / М.Б. Бенъеш-Мельник, Дж. Мельник // В сб.: «Полиомиелитная пероральная живая вакцина». – М., 1961. – С.210-223.
8. Бессарабов, Б.Ф. Некоторые эпизоотологические особенности вирусного гепатита утят / Б.Ф. Бессарабов // Матер. Всесоюзн. конф. по болезни молодняка с-х животных и птиц: Сборник МВА. – 1964. – С. 205.
9. Бессарабов, Б.Ф. Оценка способов лабораторной диагностики вирусного гепатита утят / Б.Ф. Бессарабов, // Тр. МВА. – 1967. – Т. 51. – С. 66.
10. Бессарабов, Б.Ф. Вирусный гепатит утят / Б.Ф. Бессарабов // М., 1974. – С. 482-486.



11. Боголепов, В.И. Патоморфологические изменения у куриных эмбрионов, зараженных вирусом гепатита утят / В.И. Боголепов // Тр. ВНИВИП. – 1964. – Т. 29. – С. 145-147.
12. Боголепов, В.И. Патоморфологические изменения и их значение в диагностике вирусного гепатита утят / В.И. Боголепов // Тр. ВНИТИП. – 1968. – Т. 30. – С. 163.
13. Бондаренко, В. Иммуноферментный метод диагностики вирусного гепатита утят / В. Бондаренко // Вет. мед. Украины. – 1998. – № 6. – С. 38-39.
14. Бочкарев, В.С. Иммунобиологические свойства вакцинных штаммов метапневмовируса птиц: автореф. дис. ... канд. вет. наук / В.С. Бочкарев. – Санкт-Петербург, 2013. – 22с.
15. Бубашко, О.А. Вирусный гепатит утят в Республике Беларусь и его профилактика / О.А. Бубашко // Эпизоотология, иммунология, фармакология и санитария. – 2005 а. – № 1. – С. 25-28.
16. Бубашко, О.А. Маркерные свойства штамма вирусного гепатита утят КМИЭВ-16 / О.А. Бубашко // Эпизоотология, иммунология, фармакология и санитария. – 2005 б. – № 1. – С. 46-49.
17. Буряківський, В.Д. До епізоотології вірусного гепатиту каченят/ В.Д. Буряківський // Тваринництво України. – 1965. – №7. С. 50-51.
18. Буряківський, В.Д. Вірусоносійство і вірусовідлення при інфекційному гепатиті каченят / В.Д. Буряківський // Вістник с-г науки. – 1966. – № 2. – С. 105-107.
19. Буряковский, В.Д. Субмикроскопические изменения в печени эмбрионов, инфицированных вирусом гепатита утят / В.Д. Буряковский, И.И. Паникар, Е.И. Ковалевский // Птицеводство. – Киев, 1966. – С. 118.
20. Буряковский, В.Д. Восприимчивость диких утят к вирусному гепатиту / В.Д. Буряковский // Птицеводство. – 1967 а. – № 5. – С. 30.
21. Буряковский, В.Д. Некоторые вопросы эпизоотологии вирусного гепатита утят и биологические свойства возбудителя: автореф. дис. ... канд. вет. наук. / В.Д. Буряковский. – Харьков, 1967 б. – 23с.

22. Буряковский, В.Д. Патоморфологические изменения в печени у диких и домашних утят при вирусном гепатите / В.Д. Буряковский, И.И. Паникар // Ветеринария. Киев, 1969. – № 20. – С. 24-27.
23. Вертинский, К.В. Патогенез и диагностика вирусного гепатита утят / К.В. Вертинский, Б.Ф. Бессарабов, А.Н. Куриленко // Ветеринария. – 1968. – № 7. – С. 27-29.
24. Вильнер, Л.М. Образование интерферона в культурах клеток в зависимости от условий инфекций / Л.М. Вильнер, М.П. Чумаков, М.М. Гольдфаро [и др.] // В кн.: «Актуальные проблемы вирусных инфекций». – М., 1965. – С. 382-285.
25. Волковский, Г. Д. Выживаемость вируса гепатита утят во внешней среде и разработка методов и режимов дезинфекции: автореферат дис. ... канд. ветеринарных наук / Г.Д. Волковский. – М., 1967. – 22 с.
26. Виноходов, О.В. Вирусные гепатиты птиц / О.В. Виноходов, В.О. Виноходов, Д.О. Виноходов // Архив вет. наук. – СПб, 1998. – С. 68-91.
27. Ганнушкин, М.С. Эпизоотология с микробиологией / М.С. Ганнушкин // изд. Колос. – М., 1965.
28. Гендон, Ю.З. Наследственность и изменчивость вирусов: автореф. дис. ... док. мед. наук / Ю.З. Гендон. – М., 1964. – 26с.
29. Данко, Л.Ю. Культуральные и антигенные свойства метапневмовируса птиц: автореф. дис. ... канд. биол. наук / Л.Ю. Данко. – СПб, 2011. – 21с.
30. Демаков, Г.П., Эффективность мероприятий при вирусном гепатите утят / Г.П. Демаков, С.Н. Осташев, А.П. Семеновых // Ветеринария. – 1973. – № 4. – С. 59-61.
31. Демаков, Г.П. Ускоренная диагностика вирусного гепатита утят с помощью непрямого метода флуоресцирующих антител / Г.П. Демаков // Профилактика и лечение с-х животных. – Пермь, 1975. – С. 13-17.
32. Демаков, Г.П. Применение реакции пассивной гемагглютинации для индикации вируса гепатита утят / Г.П. Демаков, В.Н. Огородникова // Профилактика и лечение болезней с-х животных. – Тр. Кировского с-х и-та. – 1980. – Т. 67. – С. 10.

33. Демаков, Г.П. Реакция встречного иммуноэлектрофореза при вирусном гепатите утят / Г.П. Демаков, В.Н. Пеньков, Л.В. Кокорина // Методы терапии и профил. внутр. незаразн. болезней с.-х. ж-ных. – 1985. – С. 9-12.
34. Дорошко, І.Н. Досвід одержання гіперімунної сироватки проти вірусного гепатиту каченят // І.Н. Дорошко, Ю.П. Сміян // Вісник с-г науки. – Київ, 1961. – №1. – С. 89-93.І
35. Дорошко, И.Н. Вирусный гепатит утят / И.Н.Дорошко, Ю.П. Смиян // Птицеводство. – 1962. – № 1. – С. 31.
36. Дорошко, И.Н. Вирусный гепатит утят / И.Н.Дорошко, Ю.П. Смиян // Ветеринария. – 1963. – № 7. – С. 38-40.
37. Дорошко, И.Н. Источник вирусного гепатита - переболевшая птица/ И.Н. Дорошко, В.Д. Буряковский // Птицеводство. – 1965. – №5 – С. 34.
38. Дорошко, И.Н. О хронической форме вирусного гепатита утят / И.Н. Дорошко, И.Ю. Безрукавая, И.П. Сконсманас // Ветеринария. – 1968. – № 2. – С. 63.
39. 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.
40. Зубцова, Р.А. Активная и пассивная иммунизация утят против вирусного гепатита / Р.А. Зубцова, Л.Ф. Кудрявцева // Ветеринария. – 1964. – № 3. – С. 42.
41. Зубцова, Р. А. Изыскание методов получения средств специфической профилактики вирусного гепатита утят: автореф. дис.... канд. вет. наук. / Р.А. Зубцова - Москва, 1969. – 21 с.
42. Зубцова, Р.А. Вирусный гепатит утят / Р.А. Зубцова // Ветеринарные препараты. – М.: Колос, 1981. – С. 135.
43. 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.
44. Каверин, Н.В. Пикорнавирусы / Н.В. Каверин // Общая и частная вирусология / под ред. В.М. Жданова, С.Я. Гайдамовича. – М., 1982.

45. Карпович, Л.Г. / Л.Г. Карпович, Л.М. Вильнер, Е.Н. Левкович [и др.] // В кн.: Интерфероны и интерфероногены. – М., 1967. – 159 с.
46. Карпович, Л.Г. / Л.Г. Карпович, Г.К. Усебаева, Е.Н. Левкович [и др.] // Матер. XV сессии Института полиомиелита и вирусных энцефалитов. – М., 1968. – С. 36.
47. Кис, Т.Б. Изучение антигенной и иммуногенной активности производственных серий культуральной вакцины против гепатита утят из штамма "ВГНКИ-К" / Т.Б. Кис, В.И. Смоленский // 100 лет Курской биофабрике и агробиол. пром-сти России: тез. докл. науч.-произв. конф. – Курск, 1996. – С. 141-144.
48. 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.
49. Князев, В.П. Болезни водоплавающих птиц: монография / В.П. Князев // Владимир, 2010. – 160с.
50. Контримавичус, Л.М. Эпизоотические и клинико-морфологические данные по вирусному гепатиту утят / Л.М. Контримавичус, М.Г. Золотарев // Ветеринария . – 1965. – № 3. – С.44-46.
51. Контримавичус, Л.М. Вирусный гепатит утят / Л.М. Контримавичус // М.:Колос. – 1971. – С. 71-77.
52. Корж, В.А. До питання про вірусний гепатит каченят в західних областях УРСР / В.А. Корж, П.П. Урбанович // Матеріали ХХ наук. конф.: Сборник // Львів. зоовет. н-т. Львів. – 1964. – С.166.
53. Корольков, В.И. Аэрогенный метод иммунизации утят против вирусного гепатита: Автореф. .... дис. канд. вет. наук / В.И. Корольков. – Минск. – 1975. – 23с.
54. Кот, С.И. Характеристика штаммов вируса гепатита утят, выделенных в хозяйствах Белоруссии / С.И. Кот // Сборник науч. работ Чувашской респ. вет. лаборатории. – 1970. – Вып. 4. – С. 130-131.

55. Куриленко, А.Н. Развитие вирусемии при экспериментальном гепатите утят / А.Н. Куриленко // Сб. работ молодых ученых / ВНИТИП. – Загорск, 1968. – Вып. 10. – С. 274-276.
56. Курилович, А.М. Иммуноморфогенез у утят, вакцинированных против вирусного гепатита, и влияние на него натрия тиосульфата : автореферат дис... канд. ветеринар. наук. / А. М. Курилович. – Витебск, 2003. – 20 с.
57. Курочка, М.В. Разработка средств специфической профилактики чумы уток: автореф. дис. ... канд. вет наук / Курочка М.В. – Покров, 1985. – 25 с.
58. Левкович, Е.Н. Генетика и эволюция арбовирусов / Е.Н. Левкович, Л.Г. Карпович, Г.Д. Засухина // Изд. Медицина. – Москва, 1971. – 264 с.
59. 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.
60. Леонов, И.К. Культуральные маркеры вакцинных штаммов вируса гепатита утят / И.К. Леонов // Матер. II Междунар. Вет. Конг. VETistanbul Group – 2015. – СПб, 2015. – С. 256-257.
61. Майборода, А.Д. Действие вируса гепатита утят на клетки тканевых культур почек цыплят и утиных эмбрионов/ А.Д. Майборода //Ветеринария. – 1965. – №8. – С. 28.
62. Майборода, А.Д. Формирование вируса гепатита уток в культуре клеток / А.Д. Майборода // Ветеринария. – 1972. – №8. – С. 50.
63. 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.
64. Малиновская, Г.В. Усовершенствование серологической диагностики вирусного гепатита утят и оценки поствакцинального иммунитета: автореф. ... канд. вет. наук./ Г.В. Малиновская. – Минск, 1981. – 21с.

65. Малиновская, Г.В. Изучение образования 19-s и 7-s антител при иммуногенезе и патогенезе вирусного гепатита утят / Г.В. Малиновская // Ветеринарная наука производству. – 1982. – Вып. 19. – С. 68-70.
66. Маловастая, А.А. Энтеральный метод вакцинации уток и утят против вирусного гепатита: автореф. дис. ... канд. вет. наук / Маловастая А.А. - 1989. – 21с.
67. Митропольский, А.С. Вирусный гепатит утят / А.С. Митропольский, Р.А. Зубцова, Я.Р. Голод [и др.] // Птицеводство. – 1963. – № 4. – С. 24.
68. Никитин, М.Г. Специфическая профилактика вирусного гепатита утят / М.Г. Никитин, И.И. Паникар // Ветеринария. – 1974. – № 6. – С. 51-52.
69. Отрыганьев, Г.К. Болезни эмбрионов птиц / Г.К. Отрыганьев, Б.Ф. Бессарабов, Ю.В. Исаев / М. : Россельхозиздат, 1981. – 136 с.
70. Паникар, И.И. Убитые и живые вакцины при вирусном гепатите утят / И.И. Паникар // Птицеводство. – 1966. – № 12. – С. 28-30.
71. Паникар, И.И. Вирусный гепатит утят и его профилактика / И.И. Паникар // М.: Россельхозиздат. – 1987. – 64с.
72. Паникар, И.И. Клинико-эпизоотологическая и патологоанатомическая диагностика вирусного гепатита утят, протекающая в ассоциации с другими болезнями / И.И. Паникар, А.Т. Належа // Интенсификация производства: сб. научн. Трудов. – Харьков, 1991. – С. 87-90.
73. 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.
74. 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. – Вып. 9 (33). – Ч. 1. – С. 24-27.
75. Покровская, М.П. Морфология и номенклатура иммунологически компетентных клеток лимфоидной ткани / М.П. Покровская, Н.А. Красина, В.И. Левинсов [и др.] // ИМЭИ. – 1965. – № 3. – С. 8-13.

76. Поляков, А.А. Выживаемость вируса гепатита утят во внешней среде и разработка режимов дезинфекции / А.А. Поляков, Г.Д. Волковский // Тр. ВНИИВС. – М., 1969. – Т. 34. – С. 278.
77. Прокофьева, М.Т. Заболевание маленьких утят – вирусный гепатит / М.Т. Прокофьева, И.Н. Дорошко // Птицеводство. – 1959. – № 5. – С. 38-40.
78. Прокофьева, М.Т. Вирусный гепатит утят / М.Т. Прокофьева, И.Н. Дорошко // Ветеринария. – 1960. – № 3. – С. 38-40.
79. Сарбаева, Н.В. Сравнительная характеристика вакцинного и эпизоотического штаммов реовируса теносиновита кур: автореф. дис. ... канд. биол. наук / Н.В. Сарбаева. – Москва, 1997. – 23с.
80. Сконсманас, И.П. Диагностика вирусного гепатита утят с помощью реакции преципитации в геле / И.Н. Сконсманас // Сб. работ молодых ученых// М., 1964. – Вып. 7. – С. 191-194.
81. Сконсманас, И. П. Использование хлороформенных экстрактов для лабораторной диагностики вирусного гепатита утят с помощью реакции диффузионной преципитации и биопроб./ И.П. Сконсманас // Сб. науч. тр. ВНИВИП. – 1965. – вып. 1(12). – С. 42.
82. Сконсманас, И.П. Скрытая форма вирусного гепатита утят / И.П. Сконсманас, И.И. Паникар // Птицеводство. – 1966. – № 7. - С. 30-31.
83. Скоробогатько, М.К. Значения активного імунітету у крачек проти вірусного гепатиту / М.К. Скоробогатько // Вісник с-г науки.Київ. – 1974. – № 11. – С. 65.
84. Сміян, Ю.П. Досвід діскування вірусного гепатиту каченят / Ю.П. Сміян, А.К. Галувіньський // Соціалістичне товариство. – Київ, 1963. – № 7. – С. 54.
85. Смян, Ю.П. Активная и пассивная иммунизация против вирусного гепатита / Ю.П. Смян // Ветеринария. – 1964. – №.3. – С. 40-41.
86. Смян Ю.П. Изучение вирусного гепатита утят и применение средств специфической профилактики: автореф. дис. ... канд. биол. наук / Ю.П. Смяню – Киев, 1965. – 17с.

87. Сорокин, В.В. Исследования по эпизоотологии и сывороточной терапии при вирусном гепатите утят / В.В. Сорокин, В.И. Боголепов // Тр. ВНИТИП. – 1964. – Т. 29. – С. 139-144.
88. Стрельников, А.П. Патоморфологическая характеристика вирусного гепатита утят/ А.П. Стрельников // Ветеринария. – 1964 а. – № 1. – С. 57.
89. Стрельников А.П. Патоморфология вирусного гепатита утят: автореф. дис. ... канд. вет. наук. А.П. Стрельников. – М., 1964 б. – 22с.
90. Стрельников, А.П. О плазмоцитарной реакции селезенки при вирусном гепатите утят / А.П. Стрельников //Новое в профилактике и лечении болезней птиц: Сб. науч. тр. ВНИВИП. – 1976. – Вып. 11 (22). – С. 104.
91. Султанян, М.Т. Результаты клинических и лабораторных исследований при вирусном гепатите утят / М.Т. Султанян, В.И. Щербатин, Р.А. Мухамеджин // Тез. научно-произв. конф. по болезням с/х жив. и птиц.// Псков, 1968. – С. 343-345.
92. Сюрин В.Н. Ветеринарная вирусология / В.Н. Сюрин, Р.В. Белоусова, Н.В. Фомина // М.: Агропромиздат, 1991. – С.376.
93. Сюрин, В.Н. Вирусные болезни животных / В.Н. Сюрин, А.Я. Самуйленко, Б.В. Соловьев [и др.] // М.: ВНИТИБП. – 1998. – 928 с.
94. Терентьев П.В. Практикум по биометрии: Учебное пособие /П.В.Терентьев, Н.С.Ростова// Л.: изд. Ленинградского ун-та, 1977. – С.37- 91.
95. Трефилов, Б.Б. Сравнительное изучение генетических признаков вакцинных штаммов вируса инфекционного ларинготрахеита птиц: автореф. дис. ... канд. биол. наук / Б.Б. Трефилов. – Тарту, 1972. – 27с.
96. Трефилов, Б.Б. Разработка и внедрение средств диагностики и специфической профилактики наиболее опасных вирусных болезней птиц (инфекционный ларинготрахеит, вирусный энтерит гусей, реовирусный теносиновит): дис. ... док. вет. наук / Б.Б. Трефилов. – Санкт-Петербург, 2000. – 42с.
97. 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, 2105. - № 4. – С. 35-38.



98. Трефилов, Б.Б. Антигенная специфичность вакцинных штаммов вируса гепатита утят типа I / Б.Б. Трефилов, И.К. Леонов, Н.В. Никитина [и др.] // *Вопр. нормативно-правового регулирования в ветеринарии*. – СПб, 2105. - № 4. – С. 47-49.
99. Трефилов, Б.Б. Репликация вируса гепатита утят при различных температурах // *Жур. Современные проблемы науки и образования*. – 2015. - № 2 (часть 2); URL:<http://science-education.ru/ru/article/view?Id=22250>.
100. Трефилов, Б.Б. Биологические свойства вакцинных штаммов вируса гепатита утят / Б.Б. Трефилов, И.К. Леонов // *Матер. междунар. конг.* – СПб, 2014. – С. 90-91.
101. Трефилов, Б.Б. Интерфероногенная активность вируса гепатита утят типа I / Б.Б. Трефилов, И.К. Леонов, Н.В. Никитина // *Матер. междунар. научн.-прак. конф. Фундаментальные и прикладные вопросы науки и образования*. – Смоленск, 2016. – Ч. I. – С. 10-13.
102. Троценко Н.И. Практикум по ветеринарной вирусологии / Н.И. Троценко, Р.В. Белоусова, Э.А. Преображенская // М.: «Колос», 2000. – С.272.
103. Чистяков И.А. Статистические методы в вирусологических исследованиях/ И.А.Чистяков// В кн.: «Руководство по вет. вирусол.» под ред. проф. В.Н.Сюрина. – М., 1966. – С.390-408.
104. Agrimi, P. L'epatite virale delle anatze (Levine e Fabricant, 1950). Segnalasicne di un episedeidentificasiene del virue e prove ditransmissione sperimentale / P. Agrimi // *Zooprofilassi*. – 1958. – An: 13. – Nr. 8. – P. 541-551.
105. Ahmed, A.A.S. Effect of experimental duck virus hepatitis infection on some biochemical constituents and enzymes in the serum of white Pekin ducklings / A.A.S. Abmed, Y.Z. El-Abdin, S. [Hamza et al.] // *Avian Dis.* – 1975. – V. 19. – P. 305-310.
106. 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. – N 5. – Vol. 27. – P. 27.
107. Armitage, P. Studies in the variability of rock counts / P. Armitage // *S. Hyg. (Camb.)*. – 1957. – N 55. – P. 564-565.

108. Asplin, F. Duck virus hepatitis / F. Asplin, G. McLauchlen // Vet. Rec. – 1954. – V. 66. – Nr 32. – P. 456-458.
109. Asplin, F. The production of duckling resistant to virus hepatitis / F. Asplin // Veter. Rec. – 1956. – V. 68. – Nr 26. – P. 412.
110. Asplin, F.D. An attenuated strain of duck hepatitis virus / F.D. Asplin // Vet. Rec. - 1958.a. – V. 70. – P. 1226-1230.
111. Asplin, F. Endevirus hepatitis / F. Asplin // Tijdschr. v. diegeneesir. – 1958.b. – V. 85. – S. 738-739.
112. Asplin, F.D. Notes on epidemiology and vaccination for virus hepatitis of duck / F.D. Asplin // Off. Int. Epizoot. Bull. – 1961. – V. 56. – P. 793-800.
113. Asplin, F.D. Duck hepatitis: Vaccination against two serological types / F.D. Asplin // Vet. Rec. - 1965. – V. 77. – P. 1529-1530.
114. Chalmers, W.S.K. Duck hepatitis virus and Chlamydia psittaci outbreak / W.S.K. Chalmers, H. Farmer, P.R. Woolcock // Vet. Rec. – 1985. – P. 116-223.
115. Chang, C.F. An outbreak of viral enteritis in goslings in Taiwan / C.F. Chang // J. Vet. Med. Anim. – 1983. – Vol. 42. – P. 37-46.
116. Cirend, H. (cit. Asplin F. 1950) // Bull. off. Int. Epiz. – 1961. – V. 56. P. 793-800.
117. Cooper, P. A transmissible interfering component of vesicular stomatitis virus preparations / P. Cooper, A.I. Bellet // I. Gen. Microbiol. – 1959. – V. 21. – P. 485-497.
118. Correa, W. Liver histology in virus hepatitis of ducklings./ W. Correa // Poultry Sci. – 1959. – V. 38. – P. 516.
119. Corriea, W.M. Hepatitis due to equine abortion virus. Comparison between the liver histology in human, canine, duckling, and equine viral hepatitis/ W.M. Correa, M.R. Nilsson //Can. J. Comp. Med. Vet. Sci. – 1966. – Apr. – V. 30. – N. 4. – P. 112-116.
120. De Maeyer, E An interferon appering in cell cultures infected with measles virus / E. De Mayer, J. Enders // Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1961. – V. 107. – P. 573-578.
121. De Maeyer, E Interference of pH on interferon production and activity/ E. De Mayer, D. De Somer // Nature. – 1962. – V.194. – P. 1252-1253.

122. Davis, D. Passage of duck hepatitis virus in cell cultures derived from avian embryos of different species / D. Davis, P.R. Woolcock // Res. Vet. Sci.- 1986. – V.41. – P.133-134.
123. Davis, D. Temperature and pH stability of duck hepatitis virus / D. Davis // Avian Pathol. – 1987.a. – Vol. 16. – P. 21-30.
124. Davis, D. Triple plaque purified strains of duck hepatitis virus and their potential as vaccines / D. Davis // Res. Vet. Sci. – 1987.b. – V.43. – P. 44-48.
125. Ding, C. Molecular analysis of duck hepatitis virus 1 / C. Ding, D. Zhang // Virology. – 2007. – V. 361. – P. 9-17.
126. Dvorakova, D. The influence of temperature and some disinfectants on duck hepatitis virus / D. Dvorakova, Z. Kozusnik // Acta Veterinariya. – Brno, 1970. – V.39. – P. 151-156.
127. Fabricant, J. The pathology of duck virus hepatitis / J. Fabricant, C. Ricard, P. Levine // Avian Dis. – 1957. – V. 1. – Nr. 3. – P. 256-274.
128. Fitzgerald, J. Cytopathic effect of duck hepatitis virus in duck embryo kidney cell structure / J. Fitzgerald, Hanson L. // Proc. Soc. Exp. Biol. Med. – 1963. – V. 114. – Nr 3. – P. 814-816.
129. Fitzgerald, J.E. The pathogenicity of duck hepatitis virus for duck cell cultures, chicken embryos and ducklings / J.E. Fitzgerald // Res. Froo. III. Agric. Exp. Scien., 1965.
130. Fitzgerald, J.E. Certain properties of a cell-culture-modified duck hepatitis virus/ J.E. Fitzgerald, L.E. Hanson // Avian Dis. – 1966. – V. 10. – N. 2. – 157-161.
131. 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.
132. Friend, M. Polychlorinated biphenyl: Interaction with duck hepatitis virus / M. Friend, D.O. Trainer // Science. – 1970. – V. 170. – P. 1314-1316.
133. Friend, M. Experimental duck virus hepatitis in the mallard / M. Friend, D.O. Trainer // Avian Dis. – 1972. – Vol. 16. – P. 696-699.

134. Gard, S. Genetic markers and serological identity of wild and attenuated strains of type 1 poliovirus, with special emphasis on strains isolated from patients during an epidemic in the Belgian Congo / S. Gard // Bull. Med. Heath. Org. – 1960. – V.22. – N. 3-4. – P.243-253.
135. Girend, E. (cit. Asplin F. 1950) / H. Girend // Bull. off. Int. Epiz. – 1961. – V. 56. – P. 793-800.
136. Golubnichi, V.P. Preparation of tissue culture antigens of duck hepatitis virus / V.P. Golubnichi, G.P. Tishchenko, V.L. Korolkov // Vet Nauk Proiz Tr (Minsk). – 1976. – V.14. – P. 88-90.
137. Gough, R.E. Studies with inactivated duck virus hepatitis vaccines in breeders ducks / R.E. Gough, D. Spackman // Avian Pathol. – 1981.- – V. 10. – P. 471-479.
138. Gough, R.E. An outbreak of duck hepatitis type II in commercial ducks / R.E. Gough, E.D. Borland, I.F. Keymer [et al.] // Avian Pathol. – 1985. – V. 14. – P. 227-236.
139. Gough, R.E. Duck hepatitis type 2 associated with an astrovirus / R.E. Gough // In J.B. McFerran and M.S. McNulty (eds) / Acute Virus Infections of Poultry.-Martinus Nijhoff, Dordrecht. – 1986.a. – P. 223-230.
140. Gough, R.E. Duck hepatitis virus type I and influenza in mallard ducks (*Anas platyrhynchos*) / R.E. Gough, A.S. Wallis // Vet. Rec. – 1986.b. – V. 119. – P. 602.
141. Greuel, B. Untersuchungen über die Fügung des Entenevrius zu Studien am Virus der infektiösen Hepatitis der Enten / B. Greuel // Naturwissenschaften. – 1960. – Bd. 47. – Nr 19. – S. 452.
142. Greuel, B. Vergleichende laboratoriumsuntersuchungen am Virus der infektiösen Hepatitis der Enten unter Verwundung von hühner und Entenembryonen sowie exembryonierten Eiern' als Kulturmedien. 2. Teil / B. Greuel // Mh. Tierheilk. – 1963. – Bd. 15. – Nr 1. – S. 14-23.
143. Guillon, T. Sur l'existence en France de l'epatite e Virus caneton / T. Guillon, L. Reneult // Bull. Acad. Veter. France. – 1960. – V. 33. – Nr 4. – P. 237-243.

144. Haider, S.A. In vitro isolation, propagation, and characterization of duck hepatitis virus type III // S.A. Haider, B.W. Calnek // Avian Dis. – 1979. – V. 23. – N. 3. – P. 715.
145. Haider, S.A. Duck virus hepatitis / S.A. Haider // In S.B. Hitchner. C.H. Domermuth, H.G Purchase. And J.E. Williams (eds) / Isolation and Identification of Avian Pathogens. 2nd ed. American Association of Avian Pathologists, Kennet Square, PA. – 1980. – P.75-76.
146. Hanson, L. Virus hepatitis in ducklings / L. Hanson, L. Alberts // G. Am. Vet. Ass. – 1956. – V.128. – Nr 1. – P. 37-38.
147. Hanson, L.E. Properties of duck hepatitis virus / L.E. Hanson, H.E. Rhoades, R.L. Schricker // Avian Dis. – 1964. – V.8. – P. 196-202.
148. 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. – N 52.
149. Hille, E. Uber die Virus hepatitis der entenkucken und ihr Auftreten im Besirk Leipsig. 1. Teil. / E. Hille // Mh. Vet. Med. – 1964.a. – 19 H. 1. – S. 11-18.
150. Hille, E. Uber die Virus hepatitis der entenkucken und ihr Auftreten im Besirk Leipsig. 21. Teil. / E. Hille // Mh. Vet. Med. – 1964.b. – 19 H. 2. – S. 67-75.
151. Hille, E. Uber die Virus hepatitis der entenkucken und ihr Auftreten im Besirk Leipsig. 3. Teil. / E. Hille // Mh. Vet. Med. – 1964.c. – 19 H. 3. – S. 99-102.
152. Hohon, N. Thermal inactivation studies with variola virus / N. Hohon, E. Kozikowski // J. Bact. – 1961. – V. 112. – P. 609-612.
153. Hwang, G. Serial passage of duck hepatitis virus in chickens embryos / G. Hwang, E. Dougherty III // Avian Dis. – 1962. – V. 6. – P. 435-440.
154. Hwang, G. Disribution and concentration of duck hepatitis virus in inoculated ducklings and chicken embryos / G. Hwang, E. Dougherty // Avian Dis. – 1964. – V.8. – Nr 12. – P. 264-268.
155. Hwang, G. A chicken embryo lethal strain of duck hepatitis virus / G. Hwang // Avian Dis. – 1965. – V. 9. – N. 3. – P. 417.
156. Hwang, G. Duck hepatitis virus in duck embryo liver cell cultures/ G. Hwang // Avian Dis. – 1966. – V.10. – P. 508-512.

157. Hwang, G. Duck hepatitis virus-neutralization test in chicken embryos / G. Hwang // Am. J. Vet. Res. - 1969. – V. 30. – P. 861-864.
158. Hwang, G. Immunizing breeder ducks with chicken embryo-propagated duck hepatitis virus for production of parental immunity in their progenies / G. Hwang // Am. J. Vet. Res. – 1970. – V. 31. – P.805-807.
159. Hwang, G. Active immunization against duck hepatitis virus / G. Hwang // Am. J. Vet. Res. – 1972. – V. 33. – P. 2539-2544.
160. Hwang, J. Susceptibility of poultry to duck hepatitis viral infection / J. Hwang // Am J Vet Res. – 1974. – V. 35. – P. 477-479.
161. Isaacs, A. Virus interference. 1. The interferon. 2. Some properties of interferon // A. Isaacs, I. Lindenmann // Proc. Roy. Soc. “B”. – 1957. – V. 147. – P.258-267.
162. Kaeberle, M.L. Cultivation of duck hepatitis virus in tissue culture / M.L. Kaeberle, J.W. Drake, L.E. Hanson // Proc. Soc. Exp. Biol. Med. – 1961. – V.106. – P. 755- 757.
163. 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.
164. Kaplan, C. The heat inactivation of vaccine virus / C. Kaplan // J. Gen. Microbiol. – 1958. – V. 18. – P. 58-63.
165. Kapp, P. On the pathogenesis of ducklings hepatitis / P. Kapp, F. Karsai, I. Veiner // Acta Vet. Acad. Sci. Hung. – 1969. – V. 19. – Nr 3. – P. 217-227.
166. Kapp, P. Response of thyriodectomised duck to virus hepatitis infection / P. Kapp, G. Pethes // Acta. Vet. Acad. Scient. Hung. – 1971. – V. 21. – Nr 4. – P. 445.
167. Keymer, I.F. Duck virus enteritis (anatid herpes virus infection) in mute swans (*Cygnus olor*) / I.F. Keymer, R.E. Gough // Avian Pathol. – 1986. – Vol. 15. – N. 1. – P. 161-170.
168. 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.

169. Kim, M.C. Differential diagnosis between type-specific duck hepatitis virus type I (DHV-1) and Korean DHV-1-like isolates using a multiplex polymerase chain reaction / M.C. Kim, Y.K. Kwon, S.J. Joh [et al.] // *Avian Pathol.* – 2007. – V. 37. – P. 171-177.
170. Kim, M.C. Differential diagnosis between type-specific duck hepatitis virus type 1 (DHV-1) and multiplex polymerase chain reaction / M.C. Kim, Y. K. Kwon, S.J. Joh [et al.] // *Avian Pathology.* – 2008. – V. 37. – P. 171-177.
171. Kim, M.C. Development of duck hepatitis A virus type 3 vaccine and it's use to protect ducklings against infections / M.C. Kim, M.J. Kim, Y.K. Kwon [et al.] // *Vaccine.* – 2009. – V. 27. – P. 6688-6694.
172. Kozusnik, L. Isolation and properties of the strain duck hepatitis virus in Czechoslovakia / L. Kozusnik, D. Dvorakova // *Acta. Vet. Brno*, 1970. – V. 39. – Nr 2. – S. 143.
173. Krivinka, G. Virusovo Sanet jater kachnat / G. Krivinka, L. Kozusnik // *Veterinarstvi.* – 1962. – V. 12. – Nr 7. – S. 208-210.
174. 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.
175. Levine, P. Duck virus hepatitis / P. Levine // *Disease of poultry.* – Gowa, 1962. – P. 622-626.
176. Luff, P.R. Live duck virus hepatitis vaccination of maternally immune ducklings / P.R. Luff, L.G. Hopkins // *Vet. Res.* – 1986. – Vol. 119. – P. 502-503.
177. Macherson, L. Duck virus hepatitis in Canada / L. Macherson, R. Avery // *Canada. G. Comp. Med. Vet. Sci.* – 1957. – V. 21. – Nr 2. – P. 26-31.
178. Mao Chieng-shen Dynamics of interferon production in chick embryo cell culture infected with infective RNA of Japanese B encephalitis virus / Mao Chieng-shen, Huang Chen-hsiang // *Acta microbiol. – Sinica*, 1965. – V.11. – N.3. – P. 326-329.
179. Mason, R.A. Growth of duck hepatitis virus in chicken embryos and in cell cultures derived from infected embryos / R.A. Mason, N.M. Tasraso, R.K. Gian // *Avian Dis.* – 1972. – V.16. – P. 973-979.

180. McBride, W.D. Antigenetic analysis of polioviruses by kinetic studies of serum neutralization / W.D. McBride // *Virology*. – 1959. – V.7. – N.1. – P.45-58.
181. Murty, D.K. A modified microgel diffusion method and its application in the study of the virus of duck hepatitis / D.K. Murty, L.E. Hanson // *Am. J. Vet. res.* – 1961. – V. 22. – P. 274-278.
182. Park, N.Y. Occurrence of duck virus hepatitis in Korea / N.Y. Park // *Korean J. Vet. Res.* – 1985. – Vol. 25. – P. 171-174.
183. Patnayak, D.P. Cold adapted avian pneumovirus for use as live, attenuated vaccine in turkeys / D.P. Patnayak, B.R. Gulati, M.A. Sheikh [et al.] / *Vaccine*. – 2003. – V.21. – P.1371-1374.
184. Polard, M. Propagation of duck hepatitis virus in tissue culture / M. Polard, J. Starr // *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* – 1959. – V. 101. – P. 521-524.
185. Pulg, M.P. Physiological cell permeability and pharmacological action of DMBO / M.P. Pulg, E.G. Martin // *Experientia*. – 1965. – V. 21. – Nr. 11. – P. 649-651.
186. Rahn, D.P. Susceptibility of turkeys to duck hepatitis virus and turkey hepatitis virus / MS Thesis, University of Illinois.- 1962.
187. Rao, J. Studies of duck virus hepatitis / J. Rao, N. Syer. // *Indian Vet. G.* – 1958. – V. 35. – Nr. 10. – S. 534-539.
188. Reuss, U. Virus biologische untersuchungen bei der Enten hepatitis / U. Reuss // *Lbi. Vet. Med.* – 1959.a. – Bd. 4. – H. 3. – S. 209-248.
189. Reuss, U. Versuche sur aktiven und passiven immunisierung bei der virushepatitis der Entenkuken / U. Reuss // *Lbi. Vet. Med.* – 1959.b. – Bd 6. – H.0. – S. 808-815.
190. Ruts, G. Die virushepatitis der Entenkuken / G. Ruts // *Eicrsucht*. – 1967. – V. 21. – Nr 2. – S. 104-107.
191. Richter, W.R. Electron microscopy of viruslike particles associated with duck viral hepatitis / W.R. Richter, E.J. Rdzok, S.M. Moize // *Virology* – 1964. – V. 24. – P. 114-116.
192. Rispiens, B. Some aspect of control of infections hepatitis in ducklings / B. Rispiens // *Avian Dis.* – 1969. – V. 13. – Nr 3. – P. 417-427.



193. Rossi, G. L'epatite da virus degli anatoceli / G. Rossi, A. Pini // Veter. Haliana. – 1957. – An. 8. – Nr 12. – S. 1175-1189.
194. Sandhu, T.S. Pathologic and serologic characterization of a variant of duck hepatitis type I virus / T.S. Sandhu, B.W. Calnek, L. Zeman // Avian dis. – 1992. – V.36. – N.4. – P.932-936.
195. Sasawa, H. Isolation and behavior of duck hepatitis virus in Japan / H. Sasawa, T. Sugimeri, T. Shimisu [et al.] // Hat. Inst. Animal Health. Quert. Tokyo. – 1963. – V. 3. – N 6. – P. 71-76.
196. Scheep, J. Uber die virushepatitis der Saten 1. Mitteilang: Kranheite und Seirtionsbild, Etiologic / J. Scheep, H. Staub // Mh. Tierheilk. – 1957.a. – Bd. 9. – S. 317-322.
197. Scheep, J. Uber die virushepatitis der Enten 2. Epidemiology / J. Scheep, H. Staub // Mh. Tierheilk. – 1957.b. – Bd. 9. – S. 328.
198. Schoop, G. Virus hepatitis of ducks. V. Attempted adaptation of the virus to chicken embryos / G. Schoop, H. Staub, K. Erguney // Monatsh Tierheilkd. – 1959. – V.11. – P. 99-106.
199. Schyans, P. L'epatite a virus da caneton / P. Schyans // Ana. Med. Veter. – 1957. – An. 101. – Nr 4. – S. 264-271.
200. Schat , K.A. Development of a polymerase chain reaction assay for the detection of duck enteritis virus / K.A. Schat, J. Friedman, T. Alefantis [et al.] // XI<sup>th</sup> Int. Congr. World Vet. Poultry Assoc.: Abstracts. - Budapest, 1997. – P. 58.
201. Shehata, H. Virus-hepatitis der Enten in Deutschland /H. Shehata, U. Reuss // Dtsch. Tierarstl. Wschr. – 1957. – Bd. 64. – Nr. 2. – S. 27-29.
202. Shehata, H. Weitere Untersuchungen uber die Virus-hepatitis der Enten in Deutschland / H. Shehata, U. Reuss // Dtsch. Tierarstl. Wschr. – 1958. – Bd. 65. – Nr 12. – S. 320-323.
203. Smits, W. Vooriopige mediling betreffende ecn virussiekte biy eedenkuikens / W. Smits // Tijdschr. V. Diergenesirunde. – 1957. – V. 82. – Nr 5. - S. 177-178.
204. Souirup, B. Virusova hepatitida kachen a joji probkematica / B. Souirup // Hydinarsky Priemysel. Bratislava. – 1969. – V. 11. – Nr 4. – S. 133-135.

205. Stoenescu, V. Hepatitis virotica a bobocior de rata / V. Stoenescu, A. Niculescu // Bolile paserilor. Bucharesti. – 1960. – S. 41.
206. 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.
207. Tauraso, N.M. Properties of the attenuated vaccine strain of duck hepatitis virus / N.M. Tauraso, G.E. Coghill, M.J. Klutch // Av. Dis., 1969. – V. 13. – P. 321-329.
208. 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.
209. Toth, T.E. Studies of an agent causing mortality among ducklings immune to duck virus hepatitis / T.E. Toth // Avian Dis. – 1969. – Vol. 13. – N 4. – P. 834.
210. Toth, T.E. Alum-precipitated and sodium-hydroxide-conjugated vaccines for duck virus hepatitis: serological responses of high-level parentally immune White Pekin ducklings / B. Toth // Avian Dis. – 1972. – V. 16. – Nr 4. – P. 774-773.
211. Toth, T.E. Duck virus hepatitis / T.E. Toth // In S.B. Hitchner, C.H. Domermuth, H.G. Purchase, and J.E. Williams (eds) / Isolation and Identification of Avian Pathogens. American Association of Avian Pathologists, College Station, Texas. – 1975. – P. 192-196.
212. Toth, T.E. Humoral immune response of the duck to duck hepatitis virus: virus-neutralizing vs. - virus-precipitating antibodies / T.E. Toth, N.L. Norcross // Avian Dis. – 1981. – Vol. 25. – P. 17-28.
213. Tripathy, D.N. Impact of oral immunization against duck viral hepatitis in passively immune ducklings / D.N. Tripathy, L.E. Hanson // Prevent Vet. Med. – 1986. – V.4. – P. 355-360.
214. Tseng, C.H. Molecular characterization of a new serotype of duck hepatitis virus / C.H. Tseng, H.J. Tsai // Virus Res. – 2007. – V. 126. – P. 19-31.
215. Ulbrich F., Significance of wild duck in the transmission of duck viral hepatitis / F. Ulbrich // Monatsh Veterinaarmed. – V. 26. – P. 629-631.

216. Vindel, J. Transmission naturelle ab eue du virus de l'epatite infectieuse du caneton / J. Vindel, J. Agcardi // C.R. Acad. Sci. Paris. – 1962. – T. 255. – Nr 4. – P. 800-801.
217. Vindel, J. Caracteristique biologiques et biochimiques du virus de et l'epatite infectieuse du caneton / J. Vindel // Kongressberichte XVII Welt. Tierarstekongress. – 1963. – V. 2. – S. 1439-1442.
218. Wachendorfer, G. Das Agar-prazipitationsver- fahren bei der Entenhepatitis, der Newcastle-Krankheit und besonders der klassischen Schweinepest-Seine Leistungs- fahigkeit und Grenzen in der Virusdiagnostik / G. Wachendorfer // Zentralbl Veterinaenned. – 1965. – V. 12. – P. 55-66.
219. Wallis, C. Different effects of  $MgCl_2$  and  $MgSO_4$  on the thermostability of viruses / C. Wallis, J.L. Melnick, F. Rapp // Virology. – 1965. – V. 26. – P. 694-699.
220. 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.
221. White, D.O. Antiviral Chemotherapy, Interferons and Vaccines / D.O. White // Parkville, Vic. Australia. – 1984. – 112p.
222. Woodroffe, G. The heat inactivation of vaccine virus / G. Woodroff // Virology. – 1960. – V. 10. – P. 379-382.
223. Woolcock, P.R. A plaque assay for duck hepatitis virus / P.R. Woolcock, W.S.K. Chalmers, D. Davis // Avian Pathology.- 1982. – V. 11. – P.607-610.
224. Woolcock, P.R. An Assay for duck hepatitis virus type I in duck embryo liver cells and a comparison with other assay / P.R. Woolcock // Avian Pathology.- 1986.a. – V. 15. – P. 75-82.
225. Woolcock, P.R. Duck hepatitis virus type I: studies with inactivated vaccines in breeder ducks / P.R. Woolcock // Avian Pathology. – 1986.b. – V. 20. – P.509-522.
226. Woolcock, P.R. Duck virus hepatitis / P.R. Woolcock, G. Fabricant // Diseases of Poultry. – Ames, Iowa, 1991. – P. 597-608.
227. Woolcock, P.R. Duck hepatitis / P.R. Woolcock, J. Fabricant // In Diseases of Poultry, Edt.X, edt by B.W. Calnek. – 1997. – P.661.

228. Yang, M. Development and application of a one-step real-time taqman RTPCR assay for detection of Duck hepatitis virus type 1 / M. Yang, A. Cheng, M. Wang [et al.] // J. Virol. Methods. – 2008. – V. 153. – P. 55-60.

229. 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.

230. Zuffa, A. Immuporofilaxia infekene zapalu pecene kacie / A. Zuffa, K. Cernik, V. Rajtar [et al.] // Veterinarstvi. – 1966. – R. 16. – C. 11. – S. 490-495.

## **ПРИЛОЖЕНИЕ**

**ФАНО РОССИИ**  
**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)**

УТВЕРЖДАЮ  
Директор ФНЦ «ВНИТИП» РАН  
Академик РАН  
  
В.И. Фисинин  
« 45 » января 2016г.

**ДИАГНОСТИКА ВИРУСНОГО ГЕПАТИТА УТЯТ ТИПА I**  
**(методические положения)**

**Санкт-Петербург- 2016**

В методических положениях «Диагностика вирусного гепатита утят типа I» изложены общие сведения о вирусном гепатите утят, средствах и методах диагностики и дифференциальной диагностики болезни. Методические положения предназначены для ветеринарных врачей лабораторий различного уровня, птицеводческих хозяйств и научно-исследовательских учреждений ветеринарного и биологического профиля, студентов ветеринарных факультетов и слушателей курсов повышения квалификации ветеринарных институтов.

**Методические положения разработали:**

**Трефилов Борис Борисович** – доктор ветеринарных наук, заведующий отделом вирусологии и опухолевых болезней птиц Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Всероссийский научно-исследовательский ветеринарный институт птицеводства»;

**Никитина Нина Васильевна** – кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник отдела вирусологии и опухолевых болезней птиц Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Всероссийский научно-исследовательский ветеринарный институт птицеводства»;

**Джавадов Эдуард Джавадович** – доктор ветеринарных наук, член-корреспондент РАН, директор Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Всероссийский научно-исследовательский ветеринарный институт птицеводства»;

**Явдошак Лариса Ивановна** - старший научный сотрудник отдела вирусологии и опухолевых болезней птиц Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Всероссийский научно-исследовательский ветеринарный институт птицеводства»;

**Леонов Илья Константинович** – аспирант отдела вирусологии и опухолевых болезней птиц Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Всероссийский научно-исследовательский ветеринарный институт птицеводства»;

**Дмитриев Константин Юрьевич** — аспирант отдела вирусологии и опухолевых болезней птиц Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Всероссийский научно-исследовательский ветеринарный институт птицеводства».

**Рецензенты:**

**Сухинин Александр Александрович** – доктор биологических наук, профессор, заведующий кафедры микробиологии и вирусологии ФГОУ ВПО «Санкт-Петербургская государственная академия ветеринарной медицины»;

**Данко Юрий Юрьевич** – доктор биологических наук, профессор кафедры эпизоотологии ФГОУ ВПО «Санкт-Петербургская государственная академия ветеринарной медицины».

Методические положения рассмотрены и одобрены на Ученом совете ФГБНУ ВНИВИП  
(29.10.2015 г., протокол № 12).



1 Вирусный гепатит утят типа I.....	98
1.1 Характеристика болезни и эпизоотологические особенности.....	98
1.2 Биологические свойства вируса гепатита утят типа I.....	100
1.3 Патогенез.....	102
1.4 Течение болезни, клиническая картина и патологоанатомические изменения.....	102
2 Диагностика вирусного гепатита утят типа I.....	104
2.1 Лабораторная диагностика.....	105
2.2 Техника отбора проб и обработка патологического материала.....	106
2.3 Выделение вируса на различных биологических системах.....	106
2.3.1 Выделение вируса на развивающихся эмбрионах.....	106
2.3.2 Выделение вируса на клеточных культурах.....	107
2.3.3 Обнаружение вируса с помощью обратной транскрипции – полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР).....	108
2.4 Идентификация вируса гепатита утят.....	108
2.5 Ретроспективная диагностика.....	111
3 Дифференциальная диагностика вирусного гепатита утят типа I.....	114

## **1 Вирусный гепатит утят типа I**

### **1. 1 Характеристика болезни и эпизоотологические особенности**

Вирусный гепатит утят типа I (инфекционный гепатит уток) – высоко контагиозная, сверхостро протекающая среди утят и латентно среди уток болезнь, с преимущественным поражением печени и большой смертностью молодняка. Вирусный гепатит утят (ВГУ) 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 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 до 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 также 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 утятами и инкубационными яйцами, завезенными из неблагополучных по ВГУ 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 здоровой и больной птицы. Возбудитель инфекции передается также с инфицированным кормом, водой, подстилкой, предметами ухода, транспортом и обслуживающим персоналом.

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 путем.

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.

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 нарушения условий содержания, неполноценное кормление птицы и кормовые токсикозы способствуют проявлению болезни.

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%.

## **1.2 Биологические свойства вируса гепатита утят типа I**

К настоящему времени известно, что возбудителями гепатитов утят могут быть три типа вируса: тип 1 — «классический», распространенный повсеместно; тип 2, выделенный в Англии, и тип 3, выделенный в США. Определено, что вирусы типа 1 и типа 3 — относятся к семейству пикорнавирусов. Вирус типа 1 репродуцируется в клеточных культурах и эмбрионах уток, кур и перепелок. Вирус типа 2 отличается от типа 1 тем, что хорошо репродуцируется в эмбрионах и организме уток, в культурах клеток печени и почек утенка, но его репродукция в культуре почек цыпленка и перепелки ограничена, а в эмбрионах кур он не репродуцируется. Важно отметить, что вирус типа 3 вызывает гепатит среди иммунных к вирусу типа 1 утят, то есть эти типы вируса имеют антигенные различия. Что касается вируса типа 2, то последние исследования показали, что он относится к астровирусам.

Возбудителем ВГУ типа 1 является РНК — содержащий вирус, относящийся к семейству Picornaviridae, роду — Avihepatovirus гепатита уток типа 1 (Duck hepatitis virus — DHV-1, синонимы: инфекционный гепатит уток, вирусный гепатит утят, Duck virus hepatitis, Duck hepatitis time 1).

**Физико-химические свойства вируса.** Электронно-микроскопическими исследованиями определено, что это специфические вирусные частицы округлой или шаровидной формы, размеры вируса — от 20 до 40 — 60 нм. Вирус устойчив к эфиру и хлороформу и различным рН среды: 4,8; 7,8; 3,0 и от 6,8 до 7,4. Вирус гепатита утят значительно устойчив к воздействию внешней среды: в кормушках выживает более 10 недель, в помете — 37 сут., воде — до 74 и в почве — от 105 до 131 -157 сут. Вирус гепатита утят сохранял патогенность при нахождении на поверхности стен птичников от 20 до 40 сут. в зависимости от температуры воздуха, в помете — 15 -20 сут. Вакцинный штамм 3М вируса гепатита утят был

жизнеспособен в аэрозоле при температуре в помещении 18- 20°C в течение 45 мин. Вирус выдерживает нагревание до 50 -56° С в течение 60 мин и более. При хранении в холодильнике при температуре минус 14 - 32°C вирус оставался жизнеспособным несколько лет.

Ультрафиолетовые лучи при расстоянии источника излучения 30 см убивали вирус за 3 мин, при расстоянии 60 см — за 10 мин.

Дезинфицирующие растворы ксилонафта, лизола, креолина и кальцинированной соды в обычных концентрациях не эффективны. Лучшим вирулицидными свойствами обладает 1%-ный раствор хлорамина. Оказывает влияние на вирус и температура дезинфицирующего раствора. Так, 4%-ный горячий и 5%-ный холодный растворы едкого натра инаktivировали вирус гепатита утят за одинаковое время — 6ч.

**Культивирование вируса на эмбрионах.** ВГУ культивируют на 10-12 — суточных утиных и 9-10 — суточных куриных эмбрионах путем заражения их в аллантоисную полость.

Эмбрионы гибнут через 2-6 сут. в 10-60% случаев, но некоторые из них развиваются до вывода и даже выводятся, что зависит от свойств вируса, метода заражения и возраста эмбриона. При пассировании вируса через эмбрионы его вирулентность возрастает. «Пик» вирулентности (до 100%) приходится на 53 пассаж, а концентрации вируса в аллантоисной жидкости через 48 (53-69) ч. Вирус накапливается в тельце зародыша до 7,5 lg, в ХАО — 5,79 lg и в аллантоисной жидкости — 3,62 lg.

У погибших эмбрионов аллантоисная жидкость и содержимое желточного мешка приобретают зеленоватый оттенок, на тельце зародыша отмечают кровоизлияния и отечность грудной и брюшной области с кровоизлияниями. Печень рыхлой консистенции серо-желтого цвета с очажками некроза.

**Культивирование вируса на клетках.** Вирус удается культивировать на первично-трипсинизированных клетках печени и почки эмбрионов уток, а также на фибробластах утиного и куриного эмбрионов с коллагеназой. Через 3-7сут наблюдают образование симпластов, появление зернистости в цитоплазме и

вакуолизацию пораженных клеток, а затем деструкцию монослоя.

**Вариабельность.** Вирус гепатита утят типа I обозначен как гепатит уток А и представлен 3 серотипами — типы 1, 2, 3. Исследования ряда авторов показали, что штаммы вируса, выделенные в различных регионах РФ, родственны и принадлежат к серотипу 1.

### **1.3 Патогенез**

Патогенез ВГУ изучен недостаточно. Вирус гепатита попадает в организм утят различными путями. В естественных условиях заражение происходит в основном через слизистые оболочки органов пищеварения и дыхания. Вирус, внедрившись в организм, быстро размножается и разносится кровью во многие органы, в первую очередь в печень и головной мозг. Титр вируса уже в первые часы после инфицирования в крови высокий, но постепенно к 48-72 ч снижается. В то же время титр вируса в печени и головном мозге к 48-72 ч после инфицирования повышается. Обезвреживающая барьерная функция печени снижается и токсичные продукты разносятся кровью по всему организму. Гибель утят происходит в результате необратимых изменений в печени и других органах. Погибают, как правило, утята с хорошей упитанностью, при явлениях интоксикации.

В печени инфицированных эмбрионов и заболевших утят развиваются гепатоз и гепатит, которые закономерно сопровождаются некробиозом и некрозом клеточных элементов, а также снижением уровня общего протеина и альбумина в сыворотке крови, снижением защитных свойств сывороточных коллоидов и уровня щелочной фосфатазы, глутамат-пируват-трансаминазы, билирубина и креатина. При хроническом течении вирусного гепатита изменения в органах носят тот же характер, но очаги некрозов в печени утят более обширные.

### **1.4 Течение болезни, клиническая картина и патологоанатомические изменения**

Вирусный гепатит утят протекает сверхостро; описаны хроническое течение и атипичная форма болезни. Инкубационный период при естественном заражении составляет 1-5 сут, а при искусственном инфицировании — 1-8 сут. Более короткий

инкубационный период при пероральном, интраназальном и аэрогенном инфицировании по сравнению с парентеральным методом.

В условиях неблагополучных хозяйств при остром течении болезни инкубационный период равняется 1-7 (реже 12-13) сут, а продолжительность болезни — 1-3 ч, реже 4-5 ч. Заболевание с видимыми клиническими признаками протекает быстро, и часто период предвестников болезни с первыми клиническими признаками гепатита остается незамеченным. Нередко в клинически здоровых с вечера стадах утром обнаруживают много погибших утят. При этом отмечено, что большинство утят выбегали из помещения на выгул, а некоторые утята сидели, нахохлившись или падали и гибли сразу с явлениями судорог.

При вирусном гепатите утят, в основном, развиваются однотипные признаки болезни: потеря аппетита, сонливость, малоподвижность, утята подолгу сидят, при движении нарушается координация движений; иногда отмечается понос, ринит, конъюнктивит; через 1- 2 ч, реже через 5 - 6 ч, с момента появления нервных признаков болезни, появляются судороги, при этом конечности вытянуты вдоль туловища, утята лежат на спине или на боку с запрокинутой назад головой (опистотонус), совершают плавательные движения. После нескольких приступов судорог наступает смерть. Утята выздоравливают полностью редко, иногда болезнь принимает хроническое течение, при этом птица отстаёт в росте и развитии.

Хроническое течение болезни, наблюдается обычно у 3-4 -недельного молодняка. Болезнь продолжается 10 — 20 сут, иногда и более и проявляется поносами. Утята становятся малоподвижными, у некоторых опухают суставы конечностей. Наблюдается пингвиноподобная походка — утята двигаются, сохраняя вертикальное положение тела.

Заболевание утят не всегда сопровождается клиническими признаками. Болезнь у таких утят протекает бессимптомно, или субклинически. Не все утята, проявившие первые признаки болезни, погибают, часть из них выздоравливает, и их нельзя отличить от здоровых. От этих утят можно выделить вирус, а также в сыворотке крови обнаружить вируснейтрализующие антитела.

Наблюдается ассоциированное течение вирусного гепатита с: сальмонеллезом,

гриппом, микоплазмозом, колисептициемией и аспергиллезом. При этом ведущим остается вирусный гепатит.

При вскрытии павших утят при остром течении характерные изменения находят в печени, которая выглядит заметно увеличенной в размере, охряно-желтого цвета, консистенция ее паренхимы дряблая, легко разрушается под давлением, в большинстве случаев ее поверхность усеяна кровоизлияниями, от точечных до пятнистых, геморрагии без четких границ. Желчный пузырь, как правило, переполнен желчью.

Почки набухшие, кровенаполненные. Изменения селезенки не однотипны и не характерны. Она бывает бледно — или темно-красная, нормальной величины или увеличена, иногда бугристая, крапчатая. Сердечная мышца в состоянии зернистой дистрофии, имеет вид вареного мяса, коронарные сосуды кровенаполнены, в перикардальной полости нередко отмечают повышенное количество серозной жидкости. Сосуды головного мозга полнокровны. У многих утят находят катаральное воспаление слизистой оболочки кишечника, что, в большей мере, соответствует осложнению гепатита бактериозами, прежде всего сальмонеллезом.

При хроническом течении болезни на вскрытии печень обычно увеличена в 1,5 раза, пятнисто окрашена, в ней обнаруживают гранулемы, сходные с лейкозными, а селезенка кровенаполнена.

## **2 Диагностика вирусного гепатита утят типа I**

Диагноз на ВГУ ставят на основании эпизоотологических данных, клинических признаков, патологоанатомических изменений и подтверждается лабораторными исследованиями.

**Эпизоотологические данные:** болеют утята в первые 3 — 4 недели жизни, заболевание проявляется внезапно, гибель в первичных очагах достигает 90% — 100%; быстрота распространения и характерная динамика гибели: основной падеж на 3 — 5-е сут вспышки в данном выводке утят.



**Клинические признаки:** при остром течении болезни отмечается быстрая гибель утят в течение 1-5 ч с явлениями судорог. Больные отказываются от корма, появляются парезы, параличи, утята падают на бок; совершают плавательные движения лапками. Характерная поза погибших: лапки и крылышки вытянуты вдоль туловища, голова запрокинута на спину.

**Патологоанатомические изменения:** печень охряно-желтого цвета, увеличена, у многих на поверхности органа четко выделяются точечные, реже пятнистые кровоизлияния, желчный пузырь растянут густым содержимым, селезенка имеет сетчатый рисунок, почки кровенаполнены. Сосуды головного мозга полнокровны.

## 2.1 Лабораторная диагностика

В условиях производственных лабораторий при проведении исследований используют методы ранней и ретроспективной диагностики.

### **Ранняя диагностика включает:**

- выделение вируса на 9-10-суточных куриных или 10-12 — суточных утиных эмбрионах с заражением в аллантоисную полость, культурах клеток (фибробласты куриных или утиных эмбрионов) с последующей идентификацией в реакции нейтрализации или в реакции диффузионной преципитации в агаровом геле (РДП) со стандартными специфическими сыворотками;
- обнаружение специфического вирусного антигена в реакции иммунофлуоресценции (РИФ) или РДП в агаровом геле;
- обнаружение вирусной РНК в различных тканях с помощью обратной транскрипции — полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР) с последующим рестрикционным анализом и секвенированием;
- постановка биопробы на 1-7 — суточных утятах.

### **Ретроспективная диагностика включает:**

- выявление специфических антител в сыворотке крови у больных или переболевших утят и уток в реакции нейтрализации, ИФА или РДП в агаровом геле.

## **2.2 Техника отбора проб и обработка патологического материала**

Для вирусологического исследования в лабораторию направляют 3-5 свежих трупов или клинически больных птиц.

При вскрытии трупов отбирают кусочки печени, головного мозга, селезенки. Кусочки органов растирают до гомогенной массы и готовят 10% суспензию на растворе Хенкса или физиологическом растворе, содержащем антибиотики в 1 см<sup>3</sup>: бензилпенициллина 1000 ЕД, 1000 мкг стрептомицина сульфата, 25 мкг амфотерицина В и выдерживают при комнатной температуре в течение 1-2 часов. Суспензию центрифугируют при 3000 об/мин в течение 10 мин. Контроль на стерильность суспензии проводят высевами на мясо-пептонный бульон (МПБ), мясо-пептонный агар (МПА), среду Китт-Тароцци и агар Сабуро, наблюдение в течение 10 суток. Для накопления вируса и очистки исследуемого патматериала можно проводить его обработку хлороформом.

Для серологического исследования отправляют парные сыворотки крови птиц в количестве 20-25 проб из каждого птичника в объеме 0,5 см<sup>3</sup> с интервалом 14 суток.

Пробы крови берут из подкрыльцовой вены в пробирки, увлажненные физиологическим раствором, помещают в термостат при температуре 37,5°C на 30 минут. После образования сгустка, кровь обводят спицей или пастеровской пипеткой, помещают в холодильник при температуре 2-8°C до следующего дня. Затем каждую пробу сыворотки отбирают в отдельную пробирку и ее инактивируют путем прогревания в водяной бане при температуре 56°C в течение 30 минут.

## **2.3 Выделение вируса гепатита утят на различных биологических системах**

### **2.3.1 Выделение вируса гепатита на развивающихся эмбрионах**

Для выделения вируса используют развивающиеся 9-10 — суточные куриные или 10-12 — суточные утиные эмбрионы из благополучных по инфекционным болезням хозяйств. Перед заражением эмбрионы овоскопируют и отбирают подвижные с хорошо развитой сосудистой системой. Инфицирование проводят в

аллантаисную полость суспензией патологического материала в объеме 0,2 см<sup>3</sup>. Для каждого материала (пробы) используют не менее 10 эмбрионов, контролем служат 5 незараженных эмбрионов. Эмбрионы инкубируют в течение 5-6 суток при температуре 37,5°C и относительной влажности 55-60% и ежедневно овоскопируют. Погибших в течение 24 часов выбраковывают, а павших в последующие сутки наблюдения и оставшихся живыми после 6 суток инкубации охлаждают при 4-6°C и вскрывают. От каждого эмбриона стерильно отбирают экстраэмбриональную жидкость. Для контроля на стерильность делают высевы на МПА, МПБ и агар Сабуро. Возможное присутствие вируса устанавливают по наличию следующих изменений в эмбрионе: гиперемия зародыша в различной степени, отечность в области головы и шеи, печень серовато-коричневого цвета с очажками некроза, отставание в росте и развитии зародыша. Проводят 2-3 пассажа на куриных или утиных эмбрионах.

### **2.3.2 Выделение вируса на клеточных культурах**

Для выделения и культивирования ВГУ используют первично-трипсинизированную культуру клеток, полученную из 10-11 – суточных куриных или 14-15 — суточных утиных эмбрионов.

Клеточные культуры используют как для первичного выделения вируса из патологического материала, так и для последующей адаптации эмбрионального изолята вируса.

Первично-трипсинизированную культуру клеток готовят из кожно-мышечной ткани развивающихся эмбрионов путем диспергирования в 0,25% растворе трипсина. Культуру выращивают в стационарных условиях в течение 2-3 суток до формирования ровного плотного монослоя в ростовой среде Игла MEM и среде № 199 в соотношении 2:1 с содержанием до 10% сыворотки крови крупного рогатого скота.

Перед заражением пробирочные культуры клеток освобождают от ростовой среды, отмывают поддерживающей средой без сыворотки крови, вносят суспензию из патологического материала (или аллантаисную жидкость) в объеме 0,2 см<sup>3</sup> и

оставляют культуру при  $(37,5 \pm 0,5)$  °C в течение 30-60 минут для адсорбции вируса. Затем в пробирки с инфицированной культурой вносят 1,8 см<sup>3</sup> поддерживающей среды.

Зараженные культуры инкубируют в течение 5-7 суток при температуре 37,5°C до появления выраженного цитопатогенного действия вируса.

Необходимо отметить, что ВГУ вызывает острую форму вирусной инфекции с характерным цитопатогенным действием:

- округление клеток и появление в них зернистости на отдельных участках монослоя клеток на 2-3 сутки после инфицирования культуры, формирование симпластов;
- дезинтеграция клеток значительной части монослоя и появление разрывов в нем;
- полная дегенерация монослоя и образование синцитиальных комплексов.

Цитопатический процесс развивается в течение 5-7 суток с длительной латентной фазой репликации вируса.

### **2.3.3 Обнаружение РНК вируса с помощью обратной транскрипции – полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР)**

Для обнаружения вирусной РНК используют патологический материал (печень, селезенка, почки, головной мозг) от больной птицы, а также эмбриональный или культуральный первичный изолят вируса.

Забор клинических образцов необходимо производить только в одноразовые пластмассовые пробирки или в стеклянные пробирки, предварительно обработанные в течение одного часа хромовой смесью, тщательно промытые дистиллированной водой и простерилизованные.

## **2.4 Идентификация изолята вируса гепатита утят типа I**

**Реакцию нейтрализации** ставят в α- варианте со стандартной специфической сывороткой на развивающихся эмбрионах или в культуре утиных фибробластов.

Для постановки реакции нейтрализации требуются изолят вируса, стандартная специфическая сыворотка к вирусу гепатита утят типа I и нормальная (отрицательная) сыворотка крови уток.

Готовят два ряда последовательных 10-кратных разведений изолята вируса от  $10^{-1}$  до  $10^{-6}$ . Ко всем разведениям вируса первого ряда добавляют равный объем специфической стандартной сыворотки, а второго ряда - нормальной сыворотки. Смесь вируса и сыворотки встряхивают и выдерживают в течение 60 мин при комнатной температуре. Каждой смесью изолята вируса и сыворотки инокулируют по 4 эмбриона или по 4 пробирки культуры клеток в объеме  $0,2 \text{ см}^3$ . Инфицированные эмбрионы и культуру клеток инкубируют при температуре  $37,5^\circ \text{C}$  в течение 5-6 сут. При этом учитывают гибель эмбрионов и наличие или отсутствие цитопатогенного действия в клетках. Вычисляют титр вируса в присутствии нормальной и специфической сыворотки. Затем определяют индекс нейтрализации, то есть разность показателей логарифмов титров вируса в присутствии нормальной и специфической сыворотки, она должна быть не менее 1,7 lg.

**Реакция диффузионной преципитации в геле.** Для постановки РДП требуются стандартная специфическая сыворотка, нормальная сыворотка, испытуемый изолят вируса, нормальный антиген, агар Дифко и хлорид натрия.

Специфическую сыворотку получают гипериммунизацией утят или кроликов вирусом гепатита утят. Антигеном служит экстраэмбриональная жидкость эмбрионов, инфицированных вирусом гепатита утят. Нормальные сыворотки получают от здоровых утят или кроликов, а нормальный антиген — от неинфицированных эмбрионов.

Постановка реакции. В центральную луночку вносят сыворотки (стандартную и нормальную), в периферические — испытуемый изолят вируса. После разлива реагентов чашки Петри накрывают крышками и ставят в термостат при температуре  $37,5^\circ \text{C}$  и выдерживают 24 - 72 ч.

Учет реакции проводят через 24 - 72 ч по степени выраженности линий

преципитации в крестах. Реакцию считают положительной при наличии четко выраженных линий преципитации (+++ и +++) между лунками с испытуемым изолятом вируса и специфической сывороткой и при отсутствии линий между испытуемым изолятом вируса и нормальной сывороткой.

**Реакция иммунофлюоресценции (РИФ)** диагностики вирусного гепатита утят позволяет обнаружить возбудителя непосредственно в патологическом материале от больных и павших утят, эмбрионов-задохликов и уток-вирусоносителей.

Для постановки РИФ требуются: специфический флюоресцирующий гамма-глобулин, мазки-отпечатки с патологического материала, забуференный физраствор, дистиллированная вода.

Мазки-отпечатки (три мазка — площадью 1x1 см) готовят из свежего патматериала, чаще из печени. Для контроля используют мазки соответственно из печени здоровых утят или эмбрионов. Мазки высушивают на воздухе, фиксируют в химически чистом ацетоне 15 мин. Фиксированные мазки можно хранить около двух недель.

Окраску мазков-отпечатков проводят прямым методом без контрастирования фона. На каждый мазок наносят 3-5 капель рабочего разведения флюоресцирующего гамма-глобулина. Мазки во влажной камере (чашки Петри с влажной фильтровальной бумагой или ватой) помещают в термостат при температуре 37,5°C на 30 мин. Затем мазки промывают дистиллированной водой и дважды забуференным физиологическим раствором, лучше охлажденным при 4°C, по 15 мин. После этого для удаления раствора мазки помещают в кювету с дистиллированной водой на 10 мин, слегка покачивая кювету. Промытые мазки сушат на воздухе или под вентилятором.

Просмотр мазков осуществляют с помощью люминесцентных микроскопов со светофильтрами: ФС-1, СЗС-7-2, БС-8-2. Диагноз на вирусный гепатит ставят при обнаружении в мазке не менее 10- 12 очагов свечения различной величины и конфигурации. За специфическое свечение принимают темно-зеленое или желтое-

зеленое свечение с оценкой не ниже двух крестов при четырех балльной системе. Специфический антиген в ядрах клеток флуоресцирует темно-зеленым цветом, а в цитоплазме наблюдается яркое желто-зеленое свечение. В мазках-отпечатках от неинфицированной птицы и эмбрионов свечение отсутствует или может быть незначительное, слабое по интенсивности общее свечение мазка.

**Биопробу** ставят на 1-7 — суточных утятах, полученных из благополучного по вирусному гепатиту и другим инфекционным болезням хозяйства. Утят инфицируют внутримышечно в дозе 0,2 - 0,5 см<sup>3</sup> или интраназально по 3-5 капель суспензией патматериала, приготовленной, как указано выше. Срок наблюдения за инфицированными утятами — 12 сут.

В положительных случаях часть или все инфицированные утята гибнут в течение 72 ч, реже — позже, с характерными клиническими признаками и патологоанатомическими изменениями. Гибель утят с наличием характерных изменений в печени при отрицательном бактериологическом исследовании служит показателем вирусного гепатита.

## 2.5 Ретроспективная диагностика

Антитела к вирусу гепатита утят выявляют с помощью:

- реакции нейтрализации в культурах клеток или на развивающихся эмбрионах (РН);
- реакция диффузионной преципитации (РДП);
- непрямого метода иммуноферментного анализа (ИФА).

Анализируя состояние ретроспективной диагностики в мире, нельзя не отметить внедрение в ветеринарную практику современных серологических методов, в частности ИФА. Он превосходит стандартные методы (РН, РДП) диагностики по чувствительности и специфичности. Быстрота получения, воспроизводимость и автоматизированный учет результатов реакции, возможность стандартизации условий постановки анализа делают ИФА наиболее эффективным,

удобным, экономичным и выгодным методом для массовых серологических исследований.

**Непрямой метод иммуноферментного анализа (ИФА).** Принцип ИФА, проводимого с целью выявления специфических антител, основан на взаимодействии антигена вируса гепатита утят, адсорбированного на поверхности полистиролового планшета, со специфическими антителами к вирусу гепатита в сыворотке крови утят с последующим выявлением образовавшегося комплекса с помощью антивидовых антител, меченых ферментами, активность которого проявляется хромогенным субстратом.

В лабораториях используют диагностические наборы для выявления антител к вирусу гепатита утят типа I в ИФА различных производителей, согласно инструкции по применению.

Инструментальный спектрофотометрический способ учета результатов может быть использован как при постановке ИФА в одном разведении, так и при разведении сыворотки крови. Он позволяет количественно оценить титры специфических антител в исследуемых пробах путем измерения значений оптической плотности, по которым вычисляют S/P-отношения:

$$S / P = \frac{\text{значение ОП испыт. сыворотки} - \text{средн. значение ОП отрицат. контроля}}{\text{средн. значение ОП полож. контроля} - \text{средн. значение ОП отрицат. контроля}}$$

Расчет титра сыворотки по одному разведению проводят по формуле:

$$\lg T = A(\lg S/P) + B$$

$$T = \text{antilg} (A (\lg S/P) + B)$$

A и B- коэффициенты линейной регрессии для lg S/P и lg T.

При постановке ИФА методом разведения титром испытуемой сыворотки считается последнее ее разведение, в котором оптическая плотность превышает таковую отрицательного контроля в 2,1 раза.

**Реакцию нейтрализации** ставят с постоянной дозой испытуемой сыворотки крови утят или уток и с 10- кратными разведениями стандартного вируса гепатита утят типа I.

**Реакцию диффузионной преципитации в агаровом геле** ставят со



стандартным антигеном вируса гепатита (центральная лунка) с испытуемыми пробами сыворотки крови утят или уток, специфической и нормальной сыворотками (по периферии). Учет реакции проводят по наличию или отсутствию линии преципитации между антигеном вируса и контрольными и испытуемыми сыворотками.

### **3 Дифференциальная диагностика вирусного гепатита утят типа I**

Вирусный гепатит утят следует дифференцировать от других остро протекающих инфекционных болезней, проявляющихся признаками поражения нервной системы и массовой гибелью, а также от острых отравлений. Отдельные клинические признаки и патологоанатомические изменения при вирусном гепатите сходны с таковыми при сальмонеллезе, колибактериозе, гриппе, коронавирусной болезни утят, аспергиллезе, чуме уток, пастереллезе, гипо — и авитаминозе А, эймериозе и массовых отравлениях ядохимикатами и компонентами кормов.

Наименование болезни	Эпизоотологические данные	Клинические признаки	Патологоанатомические и морфологические изменения	Лабораторная диагностика
Вирусный гепатит утят типа I	Возбудитель болезни — вирус из семейства Picornaviridae, род Avihepatovirus. Болеют утята в возрасте до 6 недель. Болезнь проявляется внезапно. Гибель в первичных очагах достигает 60-95%.	Больные утята отказываются от корма, появляются парезы, параличи, утята падают на бок, совершают плавательные движения лапками. Характерная поза погибших: лапки и крылышки вытянуты вдоль туловища, голова запрокинута на спину (опистотонус).	Токсическая дистрофия печени, увеличение селезенки, зернистая или жировая дистрофия почек, геморрагический диатез, очаговые некрозы печени и поджелудочной железы.	Выделение изолята вируса на куриных или утиных эмбрионах; биопроба на утятах; обнаружение антигена вируса в культуре клеток утиных эмбрионов, а также антигена вируса в клетках печени, селезенке, почек в РИФ; РНК вируса - в ПЦР; идентификация изолята вируса в РН, РДП. Ретроспективная диагностика — выявление антител в сыворотке крови утят или уток в РН, РДП или ИФА.
Вирусный гепатит утят типа II	Возбудитель болезни — вирус из семейства Picornaviridae, род Astrovirus I. Болезнь зарегистрирована в Англии среди утят, иммунных к вирусному гепатиту типа I. Гибель утят в первую неделю после вывода составляет 10- 50%.	Больные утята проявляют признак полидипсии и погибают в течение 1-2 часов. Чрезмерное выделение уратов, иногда конвульсии и сильный опистотонус	Множественные кровоизлияния в печени, почки опухшие, бледные, селезенка увеличена, на сердце наблюдаются точечные кровоизлияния.	Методы лабораторной диагностики аналогичны при вирусном гепатите утят типа I.

Вирусный гепатит утят типа III	Возбудитель болезни — вирус из семейства Picornaviridae, род Astrovirus II. Болезнь зарегистрирована в США, протекает остро только среди молодых утят. Гибель составляет 20-30% при заболеваемости 60%.	Больные утята проявляют признаки аналогичные вирусной инфекции типа I.	Видимые изменения похожи на инфекцию типа I. Печень бледная, пятнистая с многочисленными кровоизлияниями. Селезенка бледная не всегда увеличена, почки представляют собой неоднородную массу.	Выделение изолята вируса на утиных эмбрионах; биопроба на утятах; обнаружение антигена вируса в клетках печени и почек в РИФ; РНК вируса - в ПЦР; идентификация изолята вируса в РН.
Вирусный энтерит уток (чума уток)	Возбудитель болезни — вирус из семейства Herpesviridae. Болеют не только молодые, но и взрослые утки. Болезнь характеризуется внезапной гибелью, часто без проявления клинических признаков. Летальность может составлять 100%.	У больных утят наблюдается конъюнктивит, серозное истечение из глаз и носа, диарея, вялость, депрессия и исхудание.	Геморрагический диатез, фибринозное (дифтеритическое) воспаление слизистой оболочки пищевода и клоаки. Острый катаральный энтерит с кольцевыми утолщениями слизистой оболочки.	Изолируют вирус на 9-суточных куриных и 12-суточных утиных эмбрионах; культуре утиных фибробластов; биопроба на утятах; идентификация изолята вируса в РН, РДП.
Коронавирусная болезнь утят	Возбудитель болезни — вирус из семейства Coronaviridae. Болеют утята с 3-5 — суточного возраста. Отмечается 100% заболеваемость.	При остром течении болезнь проявляется внезапно. Больные утята передвигаются на плюснах («ползунки»). Наблюдается жажда, диарея, паралич конечностей. Гибель наступает через 1-3 сут от асфиксии. При хроническом - утята	Катарально-геморрагический дуоденит; очаговые кровоизлияния в слизистой оболочке прямой кишки и в клоаке; очаговая катаральная пневмония; острая венозная гиперемия и дистрофия печени и почек; Признаки асфиксии (не свернувшаяся кровь в сердце); отставание в росте	Диагноз подтверждают вирусологическими и серологическими исследованиями, биопробой.

		отстают в росте в 1,5-2 раза, плохо оперяются, развивается понос.	и развитии (гипотрофия); алопеции на коже в области спины и клоаки.	
Грипп утят	Возбудитель болезни — вирус из семейства <i>Ortomixoviridae</i> . Гриппом болеют утята 15-20 — суточного возраста, чаще осенних выводков. Гибель до 50% заболевшего молодняка. Передача возбудителя трансовариальная.	У больных утят отмечают угнетение, слезотечение, истечение из носа. Характерны судороги, после которых утенок погибает. Часто наступает паралич шеи, конечностей, крыльев.	Цианоз кожи в области головы; серозные отеки подкожной клетчатки головы и шеи; острый серозно-катаральный, фибринозный ринит и конъюнктивит; серозно-фибринозный синусит со скоплением в подглазничных синусах сгустков фибрина серо-желтого цвета; серозно-фибринозный перикардит; фибринозный перигепатит; геморрагический диатез; истощение.	Диагноз подтверждают вирусологическими и серологическими исследованиями, биопробой. Ставят РТГА, РН, РСК.
Сальмонеллез	Возбудитель болезни — <i>S. enteritidis</i> , <i>S. typhimurium</i> . Наиболее восприимчив молодняк 1-6 мес. возраста. Взрослая птица маловосприимчива. Регистрируется в любое время года. Характерна стационарность.	При остром течении болезни отмечают угнетение, жажду, судороги во время которых утята опрокидываются на спину, запрокидывают голову, появляются парезы, параличи ног и крыльев. Развивается понос, конъюнктивит. При хроническом течении наблюдают отставание в росте, истощение,	Катарально-фибринозный энтерит, тифлит, клоацит; гиперплазия селезенки, зернистая дистрофия печени и очаги некроза в ней; серозно-фибринозный перикардит, перигепатит, периспленит.	Бактериологическое исследование патматериала. Идентифицируют возбудителя в РА с монорецепторными сыворотками.

		хромота, парезы, параличи. У молодняка старше 1,5 мес возраста поражение легких.		
Колибактериоз	Возбудитель болезни — <i>E. coli</i> . Наиболее восприимчив молодняк в возрасте от 3- 140 — суточного возраста. Характерна стационарность.	Течение острое, подострое и хроническое. При остром течении болезни отмечают угнетение, вялость, малоподвижность, отказ от корма, жажду. Быстрая гибель утят с явлениями интоксикации. При подостром и хроническом течении — общая слабость, сильная жажда, профузный понос с примесью слизи и крови. Могут развиваться нервные явления и истощение.	Серозно- фибринозный перикардит, перигепатит, периспленит, перитонит, аэросаккулит; геморрагический диатез; острый катаральный энтерит; увеличение селезенки, зернистая дистрофия и цилиарные очаги некроза в печени. При хроническом течении наблюдают серозно-фибринозные артриты, истощение.	Бактериологическое исследование патматериала. Биопроба на 30 — суточных цыплятах.
Пастереллез	Возбудитель болезни — <i>P. multocida</i> , <i>P. haemolytica</i> / Чаще болеют утята в возрасте 45-50 сут. Характерна стационарность. Проявляется болезнь при снижении резистентности организма уток.	Основные признаки болезни: отказ от корма, угнетение, лихорадка, сильная жажда и судороги перед смертью. У многих утят наблюдается опухание конечностей, хромота, тяжелое с хрипом дыхание, понос.	Цианоз кожи головы; катарально-фибринозная пневмония; серозно-фибринозный плеврит и перикардит; геморрагический диатез; милиарные некрозы в печени и миокарде; острый катарально-геморрагический дуоденит; незначительное	Бактериологическое исследование патматериала. Биопроба на белых мышах.

			увеличение селезенки и милиарные некрозы в ней. При хроническом течении наблюдают катарально-фибринозная с очагами некроза пневмония; серозно- фибринозные и фибринозно-гнойные артриты.	
Аспергиллез	Возбудитель болезни — <i>A.fumigatus</i> . Чаще болеют утята в возрасте от 5 сут до 4 мес.	В острых случаях у больных отмечается повышенная жажда, учащенное дыхание, чихание, кашель. Затем развивается диарея и прогрессирующее истощение. Гибель утят происходит с нервными явлениями.	Рассеянная узелковая пневмония; множественные узелки-бляшки в брюшине, плевре, стенке воздухоносных мешков; катаральный ринит, ларингит, трахеит. На гистосрезе в центре аспергиллемы мицелий гриба, серозно-фибринозный экссудат, а вокруг скопление гистиоцитов, псевдоэозинофилов, лимфоцитов. По периферии — капсула из соединительной ткани.	Микологическое и гистологическое исследование патматериала. Биопроба на птице.
Эймериоз	Возбудитель болезни — <i>E. anatis</i> . Наиболее восприимчив молодняк в возрасте от 15 до 180 сут. Птица более старшего возраста переболевает без	При остром течении болезни отмечают угнетение, вялость, малоподвижность, при движении шаткость походки, отказ от корма,	Истощение павших утят. Катарально-геморрагический тифлит и проктит с изъязвлениями слизистой оболочки; геморрагический энтерит,	Исследование мазков содержимого кишечника.

	клинических признаков.	жажду, диарею. Помет с примесями слизи иногда крови. Гибель наступает через 3-4 сут.	сероватые паразитарные узелки в слизистой оболочке тонкого кишечника; зернистая дистрофия печени, почек и миокарда.	
Ботулизм	Возбудитель болезни — <i>Cl.botulinus</i> typ A и C. Болеет птица всех возрастов. Болезнь возникает внезапно при скормливании кормов, пораженных бациллами или их ядами.	Наблюдается понижение аппетита, понос, паралич крыльев, ног и шеи. Птица сидит, нахохлившись с полужакрытыми глазами, шея вытянута, крылья опущены, она упирается в пол клювом. Гибель наступает от комы.	Скопление непереваженного корма в железистом желудке; катарально-геморрагический энтерит; точечные кровоизлияния в миокарде и головном мозгу.	Токсикологическое исследование кормов и содержимого желудка.
Гипо- и авитаминоз А	Чаще возникает при недостаточности витамина А в кормах, при их неправильном хранении, при составлении рецептуры без учета совместимости с другими витаминами, а также при попадании в корм веществ, способствующих его разрушению.	У утят пропадает аппетит, задерживается рост, воспаляется слизистая оболочка глаз, появляется слезотечение, насморк; У взрослых уток снижается яйценоскость, отмечается бледность и анемичность кожи головы, ног, а также видимых слизистых оболочек; походка становится шаткой, оперенье взъерошенное.	Гиперкератоз кожи; фибринозный конъюнктивит; ксерофтальмия, кератомалация; катаральный ринит, ларинготрахеит; висцеральный мочекишный диатез и подагра; гидронефроз и нефросклероз.	Исследование кормов на содержание каротина и сыворотки крови на содержание витамина А.

«УТВЕРЖДАЮ»  
Врио директора ВНИВИП  
К.С. Налбандян  
«29» августа 2016г.



### Справка

о внедрении результатов диссертационной работы в учебный процесс

Результаты научно-исследовательской работы аспиранта отдела вирусологии и ОБП им. академика Коровина Р.Н. Всероссийского научно-исследовательского ветеринарного института птицеводства филиала Федерального научного центра Федерального государственного бюджетного научного учреждения Всероссийского научно-исследовательского и технологического института птицеводства Российской академии наук Леонова Ильи Константиновича на тему «Биологические свойства вакцинных штаммов вируса гепатита утят» 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  
кандидат ветеринарных наук



Дмитриева М.Е.