

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

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени кандидата
ветеринарных наук

Санкт-Петербург - 2017

Работа выполнена в отделе вирусологии и опухолевых болезней птиц Всероссийского научно-исследовательского ветеринарного института птицеводства – филиала Федерального государственного бюджетного научного учреждения Федерального научного центра «Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт птицеводства» Российской академии наук

Научный руководитель: доктор ветеринарных наук, профессор
Трефилов Борис Борисович

Официальные оппоненты: **Кушнир Анатолий Тимофеевич**, доктор ветеринарных наук, профессор, ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт ветеринарной вирусологии и микробиологии», старший научный сотрудник

Зуев Юрий Владиславович, кандидат ветеринарных наук, ФГБУ «Всероссийский государственный Центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов», заведующий лабораторией качества и стандартизации вирусных лекарственных средств

Ведущая организация: ГНУ «Уральский научно-исследовательский ветеринарный институт» Российской академии сельскохозяйственных наук

Защита диссертации состоится «15» марта 2018 года в 13.00 часов на заседании диссертационного совета Д 220.059.03 при ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургская государственная академия ветеринарной медицины» по адресу: 196084, Санкт-Петербург, ул. Черниговская, 5, тел./факс (812) 388-10-55.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургская государственная академия ветеринарной медицины» и на сайте <https://spbgavm.ru/academy/scince/dissertationalcouncil/d-220-059-03/leonov-ilya-konstantinovich/>

Автореферат разослан «___» 2018 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета

Белова Лариса Михайловна

1 Общая характеристика работы

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 (Паникар И.И., 1987; Курилович А.М., 2003; Ding C., Zhang D., 2007; Kim M.C. et al., 2008, 2009; Todd D. et al., 2009).

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 %) (Паникар И.И., Належа А.Т., 1991; Курилович А.М., 2003; Бубашко О.А., 2005а; Князев В.П., 2010; Kim M.C. et al., 2007).

Это связано с эпизоотологическими особенностями, стационарностью очагов, значительной устойчивостью возбудителя, его принадлежностью различным генотипам и трудностью оздоровления хозяйств (Бессарабов Б.Ф., 1974; Паникар И.И., 2001; Бубашко О.А., 2005б). Для профилактики болезни в Российской Федерации депонированы аттенуированные вакциные штаммы ВГНКИ-К и ЗМ-УНИИП вируса гепатита утят типа I. В настоящее время изготавливается вирусвакцина из штамма ВГНКИ-К вируса гепатита (Кис Т.Б., Смоленский В.И., 1996; Ирза В.Н. и др., 2009).

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 (Ирза В.Н. и др., 2009; Князев В.П., 2010).

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 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 Стюдента 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 аprobация 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.

2 Основное содержание работы

2.1 Материалы и методы

Вирус: производственные вакциные штаммы ВГНКИ-К и ЗМ-УНИИП вируса гепатита утят.

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

Инкубационные яйца, эмбрионы и утят: яйца уток фермерского хозяйства, 450 штук; эмбрионы уток, инкубированные на базе ВНИИП, 300 штук; эмбрионы кур «Синявинская птицефабрика»; утят 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 МЕМ или ДМЕМ, жидккая, 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».

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. (В.Н. Сюрин и др., 1991).

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

Титрование вируса на культуре клеток по цитопатогенному действию (ЦПД) проводили в чувствительных клеточных культурах методом десятикратных разведений и с соответствующими контролями. Величину титра вычисляли по методу Reed L.J. & Muench H. и выражали в $\lg TCD_{50}$ в 1.0 см^3 .

Определение терморезистентности. Вируссодержащую жидкость разливали в пробирки по $1,0 \text{ см}^3$, а затем помещали в водяную баню с температурой 56°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. На основании результатов опытов определяли снижение титра вируса после обработки и выражали отношением: $\lg V_t/V_o$, где V_o – титр вируса до обработки; V_t – титр вируса после обработки в течение определенного времени.

Константу скорости инактивации вычисляли, пользуясь формулой: $K = 2,3 \cdot P_t/P_o : t$, где 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 Rct^{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 ЦПД₅₀ на клетку. После 2, 3 и 5-го пассажа определяли инфекционный титр вируса методом титрования и выражали в $\lg TCD_{50}/\text{см}^3$.

Rct^{TC} признак штаммов вируса определяли по методу М. Беньеш-Мельник, Дж.Л. Мельник, в основе которого лежит вычисление разности между титрами изучаемых штаммов вируса при 37 и 32°C или 37 и 40°C. Так, $rct_{32^\circ}^- / rct_{40^\circ}^-$ - разница титров вируса / в $\lg TCD_{50}/\text{см}^3$ / при 37 и 32°C больше 4; $rct_{32^\circ}^+ / rct_{40^\circ}^+$ - разница титров вируса при 37 и 32°C меньше 2; $rct_{32}^{0\pm} / rct_{40}^{0\pm}$ - разница 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 ТЦД₅₀ на клетку. Через различные сроки после инокуляции отбирали пробы культуральной жидкости из матрацев, 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 см³ каждого разведения вносили в 4 пробирки с культурой куриных фибробластов, предварительно удалив ростовую среду. Через 24 часа в пробирки вносили по 0,2 см³ (100 ТЦД₅₀) 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 (Н.И. Троценко и др., 2000).

Антигенную специфичность (Ag-признак) и степень нейтрализации штаммспецифичной антисыворотки (An-признак) вируса изучали по методу McBride W.D. в модификации Gard S.

Получение штаммспецифической сыворотки. Гипериммунные сыворотки к изучаемым штаммам вируса гепатита утят типа I получали на 10-суточных утятках в камеральных условиях.

Статистическая обработка данных. Все полученные результаты исследований обработаны статистически общепринятыми методами (Терентьев П.В., Ростова Н.С., 1977)

2.2 Патогенные свойства вакцинных штаммов вируса гепатит утят типа I (Р-признак).

2.2.1 Изучение патогенности для развивающихся куриных и утиных эмбрионов (Р_{che}- и Р_{de}- признаки).

Заражение эмбрионов проводили в аллантоисную полость и желточный мешок оттитрованным вирусом в дозе 3,0 lg ЭЛД₅₀ в 0,2 см³. Инфицированные и контрольные эмбрионы инкубировали при температуре (37,5±0,5)°С в течение 3-4 сут при ежедневном овоскопировании.

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 аллантоисную полость и 30-90% при инфицировании в желточный мешок штаммом ЗМ-УНИИП и в 5-15% и 10-30% соответственно при инокуляции штамма ВГНКИ-К (табл. 1).

Таблица 1
Патогенность вакцинных штаммов 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
Куриные эмбрионы											
ВГНКИ-К	9	5*	5	10	12	15	10	12	14	15	30
ЗМ-УНИИП	9	20	40	40	50	60	30	50	80	85	90
Утиные эмбрионы											
ВГНКИ-К	11-12	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

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 хориоаллантоисная жидкость. У павших утиных эмбрионов отмечали интенсивные геморрагические явления, дистрофические изменения печени, она уплотнена, желтовато-коричневого цвета. Степень репродукции штаммов вируса определяли титрованием на куриных и утиных эмбрионах. Данные приведены в табл. 2.

Таблица 2
Биологическая активность вакцинных штаммов вируса на куриных и
утиных эмбрионах ($P<0,05$)

Штамм вируса	Инфекционный титр вируса, $lg \text{ЭЛД}_{50} / 0,2 \text{ см}^3$					
	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
3М- 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 2, показывают, что биологическая активность вакцинных штаммов 3М-УНИИП и ВГНКИ-К ВГУ на утиных эмбрионах на 1,5 и 3,7 $lg \text{ЭЛД}_{50} / 0,2 \text{ см}^3$ соответственно выше, чем на куриных эмбрионах. Степень репродукции штамма 3М-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 вакцинныe штаммы ВГНКИ-К и 3М-УНИИП характеризовались соответственно, как P_{che}^\pm , P_{de}^+ и P_{che}^+ , P_{de}^+ штаммы вируса.

2.2.2 Изучение патогенности для утят (P_d - признак)

Патогенность вакцинных штаммов ВГНКИ-К и 3М-УНИИП вируса

гепатита утят изучали на 70 утятах 2 – суточного возраста, которых инфицировали внутримышечно, подкожно и интраназально в дозе 3,0 Ig ЭЛД₅₀. Клинические наблюдения за утятами контрольной и подопытных групп продолжались в течение месяца при ежедневном осмотре за общим состоянием птицы (табл. 3). Результаты опытов показывают, что испытуемые вакциновые штаммы ВГНКИ-К и ЗМ-УНИИП вируса гепатита при внутримышечной, подкожной и интраназальной инокуляциях не вызывали клинического проявления болезни у утят.

Таблица 3

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

Штамм вируса	Множественность заражения, Ig ЭЛД ₅₀	Метод заражения			Характеристика штамма
		внутри мышечный	подкожный	интраназальный	
		заболело/заражено	заболело/заражено	заболело/заражено	
ВГНКИ-К	3,0	0/10	0/10	0/10	P _d ⁻
ЗМ-УНИИП	3,0	0/10	0/10	0/10	P _d ⁻

Примечание: 0 – утят не заболели

Морфологические исследования печени утят показали наличие плазмоцитарно-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.

2.3 Биологические свойства вируса гепатита утят, связанные с особенностями внутриклеточной репликации

2.3.1 Изучение цитопатогенной активности вакциновых штаммов вируса гепатита утят типа I

Способность испытуемых штаммов ВГНКИ-К и ЗМ-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 в дозах 0,1 – 1,0 ТЦД₅₀ на клетку.

Установлено, что вакцинныe штаммы ВГНКИ-К и 3М-УНИИП вируса гепатита утят вызывали 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. Латентная фаза штамма ВГНКИ-К составила 24 часа и 48 часов штамма 3М-УНИИП соответственно (табл.4).

Таблица 4
Биологическая активность вакцинных штаммов ВГНКИ-К и 3М-УНИИП вируса гепатита утят в культурах клеток

Штамм вируса	Активность штаммов, Ig ТЦД ₅₀ , М±м*			
	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±м – среднее значение титров штамма вируса.

Результаты исследований показали, что вакцинныe 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. Показано, 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 Ig ТЦД₅₀ по сравнению с активностью штамма 3М-УНИИП. Штаммы 3М-УНИИП и ВГНКИ-К вируса характеризовались как ТС_{che}[±], ТС_{de}⁺, ТС_{de}^{H+}, ТС_{de}^{N+} штаммы вируса гепатита утят.

2.3.2 Изучение способности вакцинных штаммов ВГНКИ-К и 3М-УНИИП вируса гепатита утят типа I к репликации в культуре клеток при различной температуре (Rct^{TC} – признак)

Исследования показали, что вакцинныe 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. Характеристика штаммов представлена в табл.5.

Таблица 5

Характеристика вакцинных штаммов вируса гепатита утят по Rct^{TC} – маркеру

Штамм вируса	Титр вируса, lg ТЦД ₅₀ /см ³							
	Температура культивирования							
	$Rct^{TC}_{32^\circ}$	Индекс подавления репликации вируса, lg ТЦД ₅₀ 37°- lg ТЦД ₅₀ 32°	Характеристика штамма по rct_{32°	$Rct^{TC}_{37^\circ}$	Характеристика штамма по rct_{37°	$Rct^{TC}_{40^\circ}$	Индекс подавления репликации вируса, lg ТЦД ₅₀ 37°- lg ТЦД ₅₀ 40°	Характеристика штамма по rct_{40°
ВГНКИ-К	3,00±0,5	2,75±0,3	±	5,75±0,2	+	4,00±0,2	1,75±0,1	+
3М-УНИИП	2,75±0,3	1,92±0,1	+	4,67±0,3	+	3,2±0,6	1,47±0,3	+

Суммируя полученные результаты следует отметить, что вакцинныe штаммы ВГНКИ-К и 3М-УНИИП вируса гепатита утят различались по способности к репликации при пониженной температуре и характеризовались как $Rct^{TC}_{32^\circ}\pm$ и $Rct^{TC}_{32^\circ}+$ штаммы соответственно. Индексы подавления репликации их при температуре 32°C равнялись 2,75±0,3 и 1,92±0,1 lg ТЦД₅₀. В то время как при температуре 40°C степень репликации штаммов была выше и

характеризовалась как $Rct^{TC}_{40^\circ}+$ 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.

2.3.3 Изучение способности вакцинных штаммов вируса к индукции интерферона и их чувствительности к действию экзогенного интерферона

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 TCD_{50} на клетку и температуре культивирования ($37 \pm 0,5$) $^\circ C$.

В каждый срок (интервал 24 ч) исследования из флаконов PS с испытуемыми штаммами брали пробы по $3,0 \text{ см}^3$ культуральной жидкости, которую замещали равным объемом поддерживающей среды Игла МЕМ + 199. В полученных пробах титровали интерферон. Результаты представлены в табл 6.

Таблица 6

Интерфероногенная активность вакцинных штаммов вируса гепатита утят типа I

Штамм вируса	Множественность вируса, TCD_{50}	Титр интерферона, $\text{ЦЭПД}_{50}/\text{см}^3$				
		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_{50} – средняя доза интерферона, подавляющая цитопатический эффект.

Данные опытов, приведенные в таблице 6, 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.

Изучаемые вакцинныe штаммы по интерферирующей активности существенно не отличались, однако при дозах 0,1 и 1,0 ТЦД₅₀ штамма 3М-УНИИП вируса она была выше. Вакцинныe штаммы ВГНКИ-К и 3М-УНИИП характеризовались как Int⁺ штаммы.

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 3М-УНИИП) в дозе 100 ТЦД₅₀ вносили через 24 часа после добавления интерферона в 128 ЦЭПД₅₀/см³. Определение чувствительности штаммов вируса к ингибирующему действию интерферона проводили по подавлению цитопатического эффекта вируса на клетки и отсутствию гибели эмбрионов. Установлена чувствительность штаммов вируса гепатита к ингибирующему действию интерферона (Sint⁺-признак).

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

2.4.1 Изучение термостабильности (t₅₆-признак) вируса гепатита утят.

Вирусодержащую культуральную жидкость помещали в водяную баню в пробирках по 1,0 см³. 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. Данные опытов представлены в табл. 7.

Результаты, приведенные в таблице 7, показывают, что вакцинныe 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 (lgVt/V0) 0,41 и константа скорости инактивации (lg Кин=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.

Таблица 7
Сравнительная характеристика штаммов вируса гепатита по термостабильности

Штамм вируса	Темпера тура инактива ции, °C	Титр вируса, lg ТЦД ₅₀ /см ³				Константа скорости инактивац ии, lg K _{ин}	
		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	
3М-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	

2.4.2 Изучение устойчивости вируса гепатита утят к действию формальдегида.

Действие формальдегида изучали в конечных концентрациях 0,02; 0,05; 0,1% при температуре (37,5±0,5)°C в течение 24 ч при pH 7,2-7,4. Через каждые 6 ч отбирали пробы вирусодержащей жидкости одновременно с контролем для определения инфекционного титра вируса. Остаточный формальдегид нейтрализовали 2M раствором бисульфита натрия до конечной его концентрации 0,01-0,03 М/дм³. Полученные результаты приведены в табл.8. Данные опытов 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 $9,9 \times 10^{-4}$ и $6,06 \times 10^{-4}$ 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.

Таблица 8

Чувствительность вакциновых штаммов вируса к действию формальдегида

Штамм вируса	Концентрация формальдегида	Инфекционный титр вируса, Ig ЭЛД ₅₀ /0,2 см ³				Константа скорости инактивации через 24 ч, Ig	
		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 ⁻⁴	
	0,05	6,75±0,2	6,0±0,2	5,0±0,1	2,5±0,3	6,06×10 ⁻⁴	
	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		
3М-УНИИП	0,02	7,5±0,1	6,75±0,1	5,75±0,2	3,75±0,1	9,2×10 ⁻⁴	
	0,05	6,5±0,2	6,3±0,3	5,3±0,3	2,0±0,3	4,9×10 ⁻⁴	
	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		

2.4.3 Изучение антигенных свойств вируса гепатита утят типа I.

Антигенные свойства изучаемых вакциновых 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 α - и β -вариантах в культуре утиных фибробластов (табл. 9).

Таблица 9

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

Штамм вируса	Активность сыворотки		P<
	α -вариант, Ig	β -вариант, log2	
ВГНКИ-К	2,7±0,2	8,0±0,25	0,05
3М-УНИИП	3,0±0,15	8,5±0,3	0,05

Результаты серологических исследований, представленные в таблице 9, показывают, что антигенная активность штамма 3М УНИИП значительно выше, чем штамма ВГНКИ-К, что подтверждали значения титров антител в α - и β -вариантах реакции нейтрализации.

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 (1950). Результаты представлены в табл. 10.

Таблица 10
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±0,3	2,0±0,15
ЗМ-УНИИП	3,0±0,25	2,5±0,35

Данные, приведенные в таблице 10, 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.

2.5.3.1 Изучение антигенной специфичности вакцинных штаммов вируса гепатита утят.

Для дифференциации штаммов вируса применяли метод Gard и кинетический метод, предложенный McBride, в реакции нейтрализации α -варианте в культуре клеток. При изучении степени или скорости нейтрализации штаммов (Ан-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. 11.

Таблица 11

Результаты перекрестной реакции нейтрализации вакцинных штаммов со специфическими сыворотками

Штамм вируса	Сыворотка к штамму:					
	ВГНКИ-К			3М-УНИИП		
	ИН, Ig ТЦД ₅₀	Показатель достоверности	К по McBride	ИН, Ig ТЦД ₅₀	Показатель достоверности	К по McBride
ВГНКИ-К	1,75±0,3	>2	13,8	1,25±0,2	>2	12,07
3М-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 3М-УНИИП вируса гепатита утят типа I нейтрализовались в большей степени за время $t=15$ мин контакта при 37°C с гомологичной сывороткой по сравнению с гетерологичной. Так, индекс нейтрализации штамма ВГНКИ-К штаммспецифической сывороткой равнялся 1,75 Ig, а гетерологичной 1,25 Ig. Аналогичную картину отмечали в отношении штамма 3М-УНИИП. Значения констант (К) скорости течения реакции нейтрализации свидетельствовали о достоверности полученных результатов ($P>2$).

Таким образом, применяя метод Gard, основанный на выявлении разницы в титрах при нейтрализации штаммспецифической сывороткой гомологичного и гетерологичного штаммов вируса, и кинетический метод, предложенный McBride, 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-маркер), так и в антигенной специфичности (Ag-маркер) между изучаемыми штаммами вируса гепатита утят типа I.

3 Заключение

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.

Вакцинныe 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.

Вакцинныe 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.

Вакцинныe 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.

Вакцинныe 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.

Вакцинныe штаммы ВГНКИ-К и 3М-УНИИП вируса гепатита термостабильны ($ts_{56^{\circ}}^+$) и чувствительны к инактивирующему действию формальдегида (F^+).

Вакцинныe штаммы ВГНКИ-К и 3М-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 Практические предложения

Разработаны и одобрены Ученым советом Всероссийского научно-исследовательского ветеринарного института 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.

5 Список опубликованных работ по теме диссертации

Статьи в журналах, рекомендованных ВАК Минобразования и науки РФ:

1. Трефилов, Б.Б. Культуральные и антигенные свойства вируса гепатита утят / Трефилов Б.Б., Леонов И.К., Никитина Н.В.// Вопр. нормативно-правового регулирования в ветеринарии. – СПб, 2015. – N 4. – С. 35-38.
2. Трефилов, Б.Б. Антигенная специфичность вакцинных штаммов вируса гепатита утят типа I / Трефилов Б.Б., Леонов И.К., Никитина Н.В., Явдошак Л.И. // Вопр. нормативно-правового регулирования в ветеринарии. – СПб, 2015. – С. 47-49.
3. Трефилов, Б.Б. Репликация вируса гепатита утят при различных температурах / Трефилов Б.Б., Леонов И.К., Никитина Н.В. // Жур. Современные проблемы науки и образования, 2015. – N. 2 (часть 2); URL:<http://science-education.ru/tu/acticle/view?Id=22250>.

Статьи, опубликованные в сборниках материалов конференций:

4. Трефилов, Б.Б. Биологические свойства вакцинных штаммов вируса гепатита утят / Трефилов Б.Б., Леонов И.К. // Материалы междунар. конгр. – СПб, 2014. – С. 90-91.
5. Леонов, И.К. Способность к репликации вакцинных штаммов вируса гепатита утят в культурах клеток / Леонов, И.К. // Матер. XVIII междунар. конф.: Инновационное обеспечение яичного и мясного птицеводства России. – Сергиев Посад, 2015. – С. 483-484.
6. Леонов, И.К. Культуральные маркеры вакцинных штаммов вируса гепатита утят / Леонов, И.К. // Матер. II Междунар. Вет. Конгр. VETistanbul Group – 2015. – СПб, 2015. – С. 256-257.
7. Трефилов Б.Б. Интерфероногенная активность вируса гепатита утят типа I / Б.Б. Трефилов, Никитина Н.В., Леонов И.К. // Матер.междунар. научн.-прак. конф. Фундаментальные и прикладные вопросы науки и образования. - Смоленск, 2016. – Часть 1. - С. 10-13.