

## ГЛАВА 3.3.7.

### ВИРУСНЫЙ ЭНТЕРИТ УТОК

---

#### РЕЗЮМЕ

*Вирусный энтерит уток или чума уток – острая контагиозная инфекция уток, гусей и лебедей (отряд Anseriformes), вызываемая альфа-герпесвирусом. Диагностика основана на сочетании оценки клинических признаков, макропатологии и гистопатологии, которая подкрепляется идентификацией вируса либо путем его выделения, либо с помощью полимеразной цепной реакции.*

**Идентификация возбудителя:** *Вирус может быть выделен из печени, селезенки и почек птиц, умирающих от инфекции. Вирус можно выделить путем инфицирования восприимчивых утят, в которых может быть воспроизведена болезнь; путем инокуляции на хориоаллантоисную оболочку эмбрионов мускусной утки; или путем инокуляции первичной культуры клеток утиных эмбрионов или эмбрионов мускусной утки. Идентификацию вируса подтверждают с помощью нейтрализующих тестов с использованием специфической антисыворотки для ингибирования патологических изменений в утиных эмбрионах или цитопатических эффектов в культурах клеток, а также с помощью реакции прямой и непрямой иммунофлюоресценции в инфицированных культурах клеток. В качестве альтернативы вирусную ДНК можно обнаружить в пищеводе, печени, селезенке птиц, инфицированных вирусом вирусного энтерита уток, а также в эмбрионах или клетках мускусной утки, используемых для выделения вируса, с помощью полимеразной цепной реакции.*

**Серологические тесты:** *Иммунологические тесты играют незначительную роль в диагностике острой формы инфекции. Реакцию нейтрализации сыворотки in ovo и in vitro используют для мониторинга подверженности вирусу дикой водоплавающей птицы.*

**Требования к биологическим продуктам:** *Для контроля вирусного энтерита уток у птиц старше 2 недель имеются живые аттенуированные вирусные вакцины. Для активации иммунитета вакцину вводят уткам подкожно или внутримышечно. Считается, что вакцинный вирус не передается от вакцинированного поголовья не вакцинированному. Сообщалось, что инактивированная вакцина показала свою действенность в ходе лабораторных испытаний, однако ее так и не разработали или не лицензировали для широкого применения.*

#### А. ВВЕДЕНИЕ

Вирусный энтерит уток – это острая, иногда хроническая, контагиозная вирусная инфекция, которая возникает естественным образом у уток, гусей и лебедей, всех членов семейства *Anatidae* отряда *Anseriformes*. Болезнь представляет потенциальную угрозу для коммерческой, домашней и дикой водоплавающей птицы. Этиологический агент, герпесвирус утиных 1 или вирус вирусного энтерита уток, является членом подсемейства

*Alphaherpesvirinae*, семейства *Herpesviridae*. Вирусный энтерит уток также называют чумой уток, герпесом утиных, утиной лихорадкой и peste du canard. О случаях инфекции у других видов птиц, млекопитающих или людей не сообщалось.

Что касается домашних уток и утят, сообщалось о случаях вирусного энтерита у птиц в возрасте от 7 дней, а также у зрелых особей. В восприимчивых стадах первые признаки зачастую появляются внезапно, при этом наблюдается высокая персистентная смертность и значительное снижение производительности в поголовье несушек. У домашних уток инкубационный период составляет от 3 до 7 дней. Смертность обычно наступает через 1-5 дней после появления клинических признаков и, как правило, имеет более тяжелую форму у восприимчивых зрелых уток-производителей. В хронически инфицированных стадах с частичным иммунитетом смерть возникает редко. Переболевшие птицы могут являться латентно инфицированными носителями и могут выделять вирус с фекалиями или на поверхности яиц в течение нескольких лет (Ritcher & Horzinek, 1993; Shawky & Schat, 2002). Вирусный энтерит уток, который поражает только мускусную утку, наблюдали в США (Campagnolo *et al.*, 2001; Davison *et al.*, 1993).

Клинические признаки и макропатология, ассоциируемые со вспышкой вирусного энтерита уток, варьируют в зависимости от вида, иммунного статуса, возраста и пола пораженной птицы, а также от вирулентности вируса. Аналогично, по мере того как вирус прогрессирует в стаде, наблюдается все больше клинических признаков. У уток-производителей признаки включают “внезапную смерть”, светобоязнь, связанную с частично закрытыми, слипшимися веками, полидипсию, потерю аппетита, атаксию и выделения из носа. У птиц часто можно наблюдать взъерошенные перья, водянистую диарею и загрязнения в области клоаки. Больные птицы могут поддерживать вертикальное положение, используя для поддержки крылья, но в целом их внешний вид указывает на слабость и угнетенное состояние. У утят в возрасте 2-7 недель смертельные случаи возникают реже, чем у более взрослых особей, а признаки, связанные с вирусным энтеритом уток, включают обезвоживание, потерю веса, конъюнктивит и серозные выделения из глаз, окрашивание клюва в синий цвет, а также пятна крови в области клоаки.

При вскрытии состояние тела павших взрослых особей обычно удовлетворительно. У зрелых самцов может наблюдаться выпадение пениса. У зрелых самок на овариальных фолликулах могут наблюдаться кровоизлияния. Обширные повреждения характеризуются повреждениями сосудов, с кровоизлияниями в тканях, наличием крови в полостях тела и в просвете кишечника, а также рядом поражений слизистой пищеварительного тракта. Данные последние поражения прогрессируют с течением болезни и включают первичные кровоизлияния и надрывы слизистой, а также интенсивный застой крови, который ведет к появлению псевдо-мембранных или дифтерийных поражений. Некротические дегенеративные изменения хорошо видны в лимфоидных и паренхиматозных органах. На печени они проявляются как неравномерно распределенные точечные кровоизлияния и белые очаги, которые в результате дают пестрый внешний вид. У утят поражения лимфоидных тканей более заметны, чем висцеральные кровоизлияния. В совокупности данные поражения патогномичны для вирусного энтерита уток. Патология и гистопатология вирусного энтерита уток была рассмотрена на белой пекинской утке (Sandhu & Metwally, 2008). Микроскопические поражения характеризуются

повреждениями сосудов и, как следствие, висцеральных органов. Как правило, присутствуют эозинофильные внутриядерные включения, а также цитоплазматические включения в эпителиальных клетках пищеварительного тракта. Считается, что птицы, переболевшие природной инфекцией, обладают иммунитетом к повторному инфицированию, однако признают латентность (в тригеминальном ганглии) и реактивацию вируса.

## **В. ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ**

### **1. Идентификация возбудителя**

Первичное выделение вируса лучше всего проводить в образцах тканей печени, селезенки или почек, гомогенизированных в буферном растворе, содержащем антибиотики и очищенном с помощью центрифугирования на низкой скорости (1800 g). Можно попытаться провести выделение путем инокуляции данных гомогенатов в культуры клеток, утят или утиные эмбрионы.

#### **1.1. Культуры клеток**

Сообщается, что культура клеток является наиболее предпочтительным методом выделения вируса вирусного энтерита уток, однако он может оказаться безуспешным. Если попытаться это сделать, выделение можно провести в первичных культурах клеток утиных эмбрионов (DEF) (Wolf *et al.*, 1976) или, желательнее, в первичных культурах клеток фибробластов эмбрионов мускусной утки (MDEF) (Gough & Alexander, 1990; Kocan, 1976). Клетки печени эмбриона мускусной утки считаются еще более чувствительными (R. E. Gough, личный комментарий). Клеточные монослои, выращенные в минимальной питательной среде Игла (MEM), содержащие 10% эмбриональную сыворотку телят (FCS), 2 ммоль глутамина, 0,17% бикорбанат натрия и гентамицин, промывают минимальной питательной средой Игла, свободной от сыворотки и затем инокулируют очищенным гомогенатом образца, в отношении которого имеется подозрение на вирус вирусного энтерита уток. После инкубирования в течение 1 часа при температуре 37°C для адсорбции вируса культуры поддерживают в минимальной питательной среде Игла, содержащей 2% эмбриональную сыворотку телят, 2 ммоль глутамина, 0,17% бикорбанат натрия и гентамицин, и инкубируют в атмосфере, содержащей 5% CO<sub>2</sub>. Цитопатическое действие характеризуется появлением округлых агглютинированных клеток, которые увеличиваются и становятся некротическими через 2-4 дня. Для идентификации вируса культуры необходимо окрасить конъюгатом для ИФА посредством прямого или непрямого метода (смотрите Раздел В.1.4). Клетки также можно зафиксировать и потом окрасить гематоксилином и эозином, чтобы показать образование синцитий, внутриядерных включений и выделяющихся цитоплазматических гранул. Сообщалось (Burgess & Yuill, 1981), что выделение вируса вирусного энтерита уток в первичных клетках фибробластов эмбрионов мускусной утки лучше проводить путем инкубирования при температуре от 39,5°C до 41,5 °C. Тем не менее, очевидно, что повышенная температура не является критически важной для выделения, которое обычно проводят при

температуре 37 °С. Для выделения вируса может потребоваться более одного пассажа. Метод выделения вируса может быть модифицирован в исследование бляшек путем перекрытия клеточного монослоя поддерживающей средой, содержащей 1% агарозу. Поскольку вирус может быть ассоциирован с клеткой, необходимо проведение последовательных пассажей путем трипсинизирования потенциально инфицированных клеток и их пересаживания. Также необходимо инокулировать свежие клетки супернатантом инфицированной культуры, полученном в ходе предыдущего пассажа.

## 1.2. Утята

Инокуляцию живым утятам следует проводить только в том случае, когда отсутствует возможность применения других методов диагностики. Необходимо соблюдать требования Кодекса МЭБ по наземным животным (Глава 7.8 Использование животных в исследованиях и при обучении). При внутримышечном введении 1-дневные утята погибают через 3-12 дней; при этом незараженные утята, которых содержат отдельно, являются контролем. Утята мускусной утки (*Caigina moscata*) являются более чувствительными, чем утята белой пекинской утки. При патологоанатомическом исследовании должны быть видны как макроскопические, так и микроскопические поражения, типичные для вирусного энтерита уток. Диагностику можно подтвердить либо путем вакцинации утят против вирусного энтерита уток и последующего контрольного заражения изолятом вируса, либо с помощью реакции иммунофлюоресценции. Однако существуют вирулентные штаммы вируса, против которых вакцина может оказаться неэффективной (Kisary & Zsak, 1983). Опыт автора в отношении естественной инфекции мускусной утки показывает, что выделение вируса является более чувствительным методом по сравнению с использованием культуры клеток.

## 1.3. Утиные эмбрионы

Первичное выделение вируса можно провести путем инокуляции в хориоаллантаоисную мембрану (САМ) 9-14-дневных эмбриональных яиц мускусной утки. Перед сбором урожая эмбриональные яйца необходимо охладить при температуре 4°С в течение 1 часа или в течение ночи, чтобы умертвить эмбрионы перед проведением дальнейших операций. Эмбрионы должны погибнуть, при этом спустя 4-10 дней после инокуляции в них должны наблюдаться обширные кровоизлияния. Прежде чем выделение станет возможным, может потребоваться проведение 2-4 слепых пассажей гомогенизированных хориоаллантаоисных мембран. Данный метод является не таким чувствительным, как использование однодневных восприимчивых утят.

Эмбриональные куриные яйца не слишком чувствительны к инфекции полевыми штаммами вирусного энтерита уток. Тем не менее, можно адаптировать вирус к куриным эмбрионам путем проведения серии пассажей. Чувствительность эмбрионов пекинской утки к штаммам вируса вирусного энтерита уток варьирует.

## 1.4. Иммунологические методы

Серологические методы, используемые для подтверждения идентификации вновь выделенного вируса, включают реакцию нейтрализации, которую проводят либо в эмбриональных яйцах, либо в культуре клеток. Описан анализ бляшкообразования для определения вируса вирусного энтерита уток в культуре клеток эмбриона (Dardiri & Hess, 1968). В лаборатории автора проводят микротитрование с использованием первичных клеток фибробластов или печени эмбрионов мускусной утки. В случае использования гипериммунной сыворотки с достаточно высоким титром метод флюоресцирующих антител (прямой и непрямой) для определения вирусного энтерита уток в фибробластах утиных эмбрионов, первичных клетках фибробластов или печени эмбрионов мускусной утки считается следующим наиболее чувствительным методом после выделения с использованием 1-9-дневных утят (Erickson *et al.*, 1974). Описана обратная реакция пассивной гемагглютинации для определения вирусного энтерита уток (Deng *et al.*, 1984), однако сообщается, что данный метод является менее чувствительным в сравнении с реакцией иммунофлюоресценции и анализом бляшкообразования. Также описан метод иммунопероксидазного окрашивания с применением комплекса авидин-биотин-пероксидаза, используемый для обнаружения антигена вируса вирусного энтерита уток в зафиксированных в формалине и залитых парафином кусочках печени и селезенки, полученных от экспериментально зараженных птиц (Islam *et al.*, 1983). Идентификацию вируса можно также подтвердить с помощью электронно-микроскопического метода (негативного окрашивания), однако с помощью только одного этого метода нельзя подтвердить, что наблюдаемый герпесвирус является вирусом вирусного энтерита уток. Недавно был разработан метод иммуноэлектронной микроскопии с использованием гипериммунной сыворотки к вирусу вирусного энтерита уток (Pearson & Cassidy, 1997).

## 1.5. Методы распознавания нуклеиновых кислот

Сообщается об обнаружении вируса вирусного энтерита уток с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР), включая количественную ПЦР в реальном времени (Hansen *et al.*, 1999; 2000; Plummer *et al.*, 1998; Pritchard *et al.*, 1999; Qi *et al.*, 2009; Wu *et al.*, 2011; Yang *et al.*, 2005). Идентифицированы праймеры для амплификации ДНК из вируса вирусного энтерита уток, присутствующего в различных тканях, включая пищевод, печень и селезенку, во время первой вспышки и после пассажа на эмбрионах мускусной утки. Ниже приведен пример протокола для методов ПЦР с целью обнаружения вируса вирусного энтерита уток; существуют также другие протоколы. Недавно был опубликован метод петлевой изометрической амплификации нуклеиновых кислот для обнаружения ДНК вируса вирусного энтерита уток (Ji *et al.*, 2009).

### 1.5.1. Метод ПЦР<sup>1</sup>

---

<sup>1</sup> Представлен д-ром W. R. Hansen, Геологический Комитет США, отдел биологических ресурсов, Национальный центр охраны здоровья дикой природы, 6006, Schroeder Road, Madison, WI 53711, USA. Для данной процедуры используют следующие коммерческие продукты: набор реагентов для ПЦР GeneAmp, содержащий дНТФ, буфер для амплификации 10× для ПЦР с использованием горячего старта, ДНК

Процедуру экстрагирования ДНК можно проводить, используя суспензию разделенных клеток, полученную из культуры ткани, инфицированной вирусом вирусного энтерита уток, 10% суспензию измельченной тканей или материал клоакального смыва в транспортировочной среде. Данный метод используют для подготовки ДНК вируса чумы уток для известных положительных контролей в ПЦР.

### 1.5.2. Экстрагирование вирусной ДНК

Примечание: Перемещение продуктов в ходе этапов i-v производится в боксе биологической безопасности.

- i) 10% суспензия измельченной ткани: добавляют 400  $\mu$ л в микроцентрифужную пробирку объемом 1,5 мл и проводят процедуру микроцентрифугирования при 16000 **g** в течение 5 минут. Супернатант переносят в новую пробирку и приступают к этапу ii.
- ii) Суспензии культуры ткани и материал клоакальных смывов: 400  $\mu$ л образца или супернатанта из этапа i, описанного выше, добавляют в пробирку объемом 1,5 мл и проводят процедуру микроцентрифугирования при 16000-20000 **g** в течение 45 минут, чтобы гранулировать вирус.
- iii) Супернатант сливают и гранулу ресуспендируют в 200  $\mu$ л EDTA-буфера (этилендиаминтетрауксусная кислота) (10 ммоль Трис/HCl, pH 8/0, 1 ммоль EDTA).
- iv) Добавляют 10  $\mu$ л раствора протеиназы К (5  $\mu$ г/ $\mu$ л), чтобы получить конечную концентрацию 0,2  $\mu$ г/ $\mu$ л, тщательно перемешивают и инкубируют при температуре 56°C в течение 1 часа.
- v) Добавляют 25  $\mu$ л раствора додецилсульфата натрия до получения концентрации додецилсульфата натрия 1%, тщательно перемешивают и инкубируют при температуре 37°C в течение 1 часа.
- vi) Добавляют 15  $\mu$ л 5 М NaCl до получения конечной концентрации 0,3 М и тщательно перемешивают.
- vii) В пробирку добавляют 300  $\mu$ л свежего фенола, забуференного с Трис/HCl, перемешивают, переворачивая пробирку 50 раз.
- viii) Проводят процедуру микроцентрифугирования пробирки в режиме 16000 **g** в течение 5 минут, верхний водяную фазу переносят в новую пробирку.
- ix) Еще раз повторяют этапы экстрагирования фенола vii и viii.

- x) В пробирку добавляют 500  $\mu$ л эфира, тщательно перемешивают и центрифугируют в режиме 16000 **g** в течение 1 минуты.
- xi) Верхнюю водную фазу (эфир) удаляют и повторяют этап экстрагирования эфира (этап x) еще один раз.
- xii) Открытую пробирку нагревают при температуре 56°C в течение 15 минут или до тех пор, пока не исчезнет запах эфира.
- xiii) Содержимое пробирки делят на две части и в каждую добавляют 100% этиловый спирт в объеме, в 2,25 раза превышающем объем образца. Содержимое пробирок перемешивают путем переворачивания пробирки несколько раз и оставляют при комнатной температуре (22°C) на 30 минут.
- xiv) Пробирки центрифугируют в режиме 16000 **g** в течение 45 минут и удаляют супернатант.
- xv) Добавляют 200  $\mu$ л 70% этилового спирта, аккуратно промывают гранулу и проводят центрифугирование в режиме 16000 **g** в течение 15 минут.
- xvi) Супернатант удаляют, а гранулу высушивают при температуре 56°C в течение 30-45 минут в открытой пробирке.
- xvii) ДНК ресуспендируют в 30  $\mu$ л дистиллированной воды, свободной от РНК-азы и ДНК-азы.
- xviii) Пробирку с образцом хранят при температуре 4°C до проведения тестирования (несколько дней) или при температуре -20°C (длительное хранение).

### 1.5.3. Полимеразная цепная реакция

“Нижнюю” реакционную смесь для ПЦР для обнаружения вируса вирусного энтерита уток, а также лямбда контроль готовят заранее в боксе биологической безопасности, следуя методу, рекомендованному производителем набора для ПЦР с горячим стартом. “Нижнюю” реакционную смесь распределяют по пробиркам, герметично запечатывают с помощью AmpliWax при температуре 80°C, согласно рекомендации производителя, и хранят при температуре 4°C в течение 1-2 месяцев.

Праймеры ПЦР к гену ДНК зависимой ДНК-полимеразы вируса вирусного энтерита уток

Последовательность праймеров 1: 5'-GAA-GGC-GGG-TAT-GTA-ATG-TA-3'  
(прямая)

Последовательность праймеров 2: 5'-CAA-GGC-TCT-ATT-CGG-TAA-TG-3'  
(обратная)

- i) “Верхнюю” реакционную смесь готовят в соответствии с инструкцией производителя в день проведения исследования и распределяют по

пробиркам с образцами, включая пробирки с вирусом вирусного энтерита уток и лямбда контролем.

- ii) В ПЦР пробирки с “нижней” реакционной смесью (которые маркированы соответствующим образом) вносят 10  $\mu$ л суспензии ДНК из хранимых пробирок с образцами.
- iii) В одну контрольную пробирку вносят известную ДНК вируса вирусного энтерита уток, разбавленную в соотношении 1 пг/10  $\mu$ л; в контрольную пробирку без ДНК вносят 10  $\mu$ л дистиллированной воды. В соответствующие пробирки с контролем лямбды вносят 10  $\mu$ л ДНК фага лямбда из набора и 10  $\mu$ л воды, соответственно.
- iv) Все пробирки помещают в термоциклер, запрограммированный следующим образом:

Один цикл: Удерживание температуры 94°C в течение 2 минут

Удерживание температуры 37°C в течение 1 минуты

Удерживание температуры 72°C в течение 3 минут

35 циклов: Удерживание температуры 94°C в течение 1 минуты

Удерживание температуры 55°C в течение 1 минуты

Удерживание температуры 72°C в течение 2 минут

Один цикл: Удерживание температуры 72°C в течение 7 минут

Удерживание температуры 4°C до хранения.

ПЦР пробирки хранят при температуре 4°C до исследования образцов на наличие продуктов амплификации.

#### **1.5.4. Электрофоретический анализ продуктов амплификации**

- i) Из 10 $\times$  производственного запаса для приготовления агарозного геля и заполнения электрофоретической камеры готовят свежий 1  $\times$  ТАЕ буфер (40 ммоль Трис ацетат, 1 ммоль EDTA, pH 8.3).
- ii) 1% агарозного раствора готовят в ТАЕ буфере, нагревают до растворения агарозы и после охлаждения заливают на подложку для геля.
- iii) Затвердевший гель помещают в электрофоретическую камеру и добавляют подвижный буфер ТАЕ.
- iv) Тестовые образцы ПЦР, включая контроль вируса вирусного энтерита уток и лямбду контроль, смешивают 1/10 в 1  $\mu$ л загрузочного буфера (0,25% [масса/объем] брофеноловый синий; 0,25% [масса/объем] ксиллол цианол; 0,1 М Трис/HCl, pH 8.0 и 50% [объем/объем] глицерол), затем в индивидуальные лунки с гелем вносят по 10  $\mu$ л каждого. На каждый



край геля наносят маркеры, молекулярный размер которых составляет 100 пар оснований.

- v) Проводят процедуру электрофореза при напряжении 120 В в течение 1 часа, затем окрашивание в 1% растворе бромид этидия в течение 20 минут (в качестве альтернативы для визуализации продуктов ПЦР можно использовать более безопасные продукты, например, RedSafe™ или GelRed™). Гель обесцвечивают в течение 45 минут в деионизированной воде и помещают на фильтр УФ трансиллюминатора. Гель фотографируют для фиксации результатов.

### **1.5.5. Интерпретация результатов**

Наличие полосы амплификации величиной в 500 пар оснований в образце лямбда контроля указывает на то, что ПЦР прошла успешно. Наличие полосы из 446 пар оснований в известном контроле ДНК вируса вирусного энтерита уток указывает на то, что праймеры для обнаружения вируса работают. Наличие полосы из 446 пар оснований в неизвестном тестовом образце указывает на присутствие вирусной ДНК. Продукты амплификации отсутствуют в контролях вируса вирусного энтерита уток, а также в контролях ДНК фага лямбда. Если в данных отрицательных контролях появляются полосы – это говорит о возникновении перекрестной контаминации во время проведения исследования. В этом случае требуется проведение повторного тестирования.

### **1.6. Вариабельность штамма**

Несмотря на то, что штаммы вируса вирусного энтерита уток значительно отличаются друг от друга по вариабельности, серологическая вариабельность отмечается редко.

## **2. Серологические исследования**

Серологические тесты не имеют большого значения для диагностики острых инфекций вирусом вирусного энтерита, однако исследования, основанные на нейтрализации сыворотки в эмбриональных яйцах и культурах клеток, используют для мониторинга антител после подвергания дикой водоплавающей птицы вирусу вирусного энтерита уток. Гуморальный ответ на естественную инфекцию вирусом вирусного энтерита уток часто имеет низкий уровень, а антитела могут характеризоваться непродолжительным существованием (Docherty & Franson, 1992); допускается, что клеточно-опосредованный иммунитет также играет роль при инфекции (Richter & Horzinek, 1993). Однако обнаружение антител, нейтрализующих вирус вирусного энтерита уток, в сыворотке возможно. Реакция вирус нейтрализации (Thayer & Beard, 1998) с использованием метода постоянная сыворотка/изменяющийся вирус можно провести с помощью куриных или утиных эмбрионов с применением вируса, адаптированного к эмбрионам, или с помощью культуры клеток. В лабораториях, не имеющих в распоряжении утиных эмбрионов, серологическую диагностику можно провести путем нейтрализации вируса, используя штамм вируса вирусного энтерита уток, адаптированный к фибробластам куриных

эмбрионов, и первичные клетки фибробластов куриных эмбрионов (CEF). Индекс нейтрализации (NI) (Thayer & Beard, 1998) в пределах 0 и 1,5 был обнаружен у домашней и дикой водоплавающей птицы, которая не была подвержена воздействию вируса вирусного энтерита уток; индекс нейтрализации  $\geq 1,75$  указывает на предшествующее воздействие вируса (Dardiri & Hess, 1967). В качестве альтернативы скрининг сывороток можно провести, используя метод постоянный вирус/изменяющаяся сыворотка. В лаборатории автора проводят реакцию нейтрализации в микропланшетах, используя первичные клетки фибробластов эмбрионов мускусной утки или первичные клетки фибробластов утиных эмбрионов. Серийные двукратные разведения каждого образца сыворотки (инактивированных при температуре 56°C) готовят в 50  $\mu$ л минимальной поддерживающей среды, свободной от сыворотки, в титрационных планшетах. В каждую лунку добавляют примерно  $10^{2.0}$  TCID<sub>50</sub> (доза инфекционного агента, инфицирующего 50% клеточной культуры) вируса вирусного энтерита уток в 50  $\mu$ л минимальной поддерживающей среды и проводят реакцию при температуре 37°C в течение 1 часа. Суспензию первичных клеток фибробластов эмбрионов мускусной утки или утиных эмбрионов в минимальной поддерживающей среде, обогащенную 2 ммоль L-глутамина, 0,17% бикарбонатом натрия и 10% фетальной телячьей сывороткой, доводят до концентрации  $3 \times 10^5$  клеток на мл. затем клетки вносят в планшеты (100  $\mu$ л на лунку) и планшеты инкубируют при температуре 37°C во влажной 5% атмосфере CO<sub>2</sub> до 96 часов. После инкубирования клетки просматривают ежедневно с помощью светового микроскопа, а затем фиксируют с помощью 10% раствора забуференного формалина и окрашивают 1%-м кристаллическим фиолетовым. Результаты считывают макроскопически. Титр нейтрализации вируса выражают как величину, обратную наивысшему разведению сыворотки, при котором вырос монослой, т.е. отсутствуют признаки ЦПД и произошла полная нейтрализация вируса. Титр ниже  $3 \log_2$  обычно считается отрицательным. Титр вирус нейтрализации, равный или выше 8, считается значительным и является свидетельством воздействия вируса вирусного энтерита уток (7). Вирус нейтрализующие антитела можно также обнаружить с помощью культуры клеток, путем смешивания сывороток в однократном разведении, т.е. 1/10, с 100-200 TCID<sub>50</sub> вирусом и затем исследуя инокулированные культуры клеток на не нейтрализованный вирус с помощью реакции иммунофлюоресценции. Несмотря на то, что данный метод не является количественным, он может оказаться целесообразным при скрининге большого количества сывороток. Данные последние описанные методы с использованием постоянного вируса/изменяющейся сыворотки являются более экономными с точки зрения расхода сыворотки, нежели методы определения индекса нейтрализации.

## **С. ТРЕБОВАНИЯ К ВАКЦИНАМ**

### **1. Общие сведения**

Руководства по производству ветеринарных вакцин изложены в Главе 1.1.8. *Принципы производства ветеринарных вакцин*. Руководства, представленные здесь и в главе 1.1.8 носят общий характер и могут быть дополнены национальными и региональными требованиями.

#### **1.1. Обоснованность и целевое применение продукта**

Для контроля вируса вирусного энтерита уток у птиц старше 2 недель можно использовать живую аттенуированную вакцину (Ritcher & Horzinek, 1993). Считается, что живой вакцинный вирус не распространяется через контакт между вакцинированными и не вакцинированными утятами. Уток, находящихся на откорме, или племенных уток можно вакцинировать подкожно или внутримышечно для стимулирования активного иммунитета. Сообщается, что материнский иммунитет у утят резко снижается, и потомство племенной птицы, вакцинированной живой аттенуированной вакциной, является полностью восприимчивым.

Сообщается, что живая аттенуированная вакцина, для изготовления которой вирус размножали в линии клеток фибробластов утиных эмбрионом, является эффективной (Mondal *et al.*, 2010).

Сообщается, что инактивированная вакцина является такой же действенной, как и модифицированная живая вакцина (Shawky & Sandhu, 1997). Данная вакцина прошла только лабораторные испытания; широкомасштабных исследований не проводилась, и она не лицензирована.

## **2. Схема производства и минимальные требования к традиционным вакцинам**

### **2.1. Характеристики посевного материала**

#### **2.1.1. Биологические характеристики**

Вакцину против вирусного энтерита уток можно изготовить из штамма вируса, аттенуированного путем проведения серии пассажей в эмбриональных куриных яйцах. Используемая в США производственная культура вакцинного штамма была изначально завезена из Голландии и прошла серию пассажей (41-46 раз).

Посевной вирус готовят в 8-11-дневных эмбриональных куриных яйцах, свободных от специфических патогенов (SPF), путем инокуляции в хориоаллантоисную мембрану, после чего инкубируют при температуре 37°C. Посевной материал можно хранить при температуре -70°C и ниже в форме гомогената эмбриональной хориоаллантоисной мембраны в забуференном растворе.

#### **2.1.2. Критерии качества (стерильность, чистота, свобода от посторонних агентов)**

Необходимо продемонстрировать, что посевной вирус свободен от посторонних вирусов, которые являются патогенными для уток, кур и индеек. Также он должен быть свободен от бактерий, грибов и контаминации микоплазмами.

Идентичность вируса подтверждают с помощью реакции нейтрализации вирусов, которую проводят со специфической антисывороткой методом постоянной сыворотка/изменяющийся вирус. Данное исследование проводят на эмбриональных куриных яйцах. Антисыворотка должна снизить титр вируса как

минимум на  $10^{1,75}$  ELD<sub>50</sub> (50% летальная доза, которая приводит к гибели 50% эмбрионов).

## **2.2. Метод производства**

### **2.2.1. Процедура**

Вакцину производят в 8-11-дневных СПФ-куриных эмбрионах, инокулированных в хориоаллантаоисную мембрану и инкубированных при температуре 37°C. Большинство эмбрионов погибает в промежутке от 48 до 96 часов после инокуляции. Собирают урожай эмбрионов, хориоаллантаоисных мембран и хориоаллантаоисной жидкости, объединяют в пулы и гомогенизируют в забуференном растворе, а затем очищают путем центрифугирования на низкой скорости (1800 g). Препарат разводят соответствующим образом и вводят стабилизатор. Затем распределяют по флаконам и подвергают быстрой заморозке (желательно) при температуре -70°C или ниже.

### **2.2.2. Требования к субстратам и средам**

Все реагенты должны быть стерильными, а яйца должны быть получены из источника, свободного от специфических патогенов.

### **2.2.3. Контроль в процессе производства**

Все эмбрионы, павшие в течение 24 часов после инокуляции должны быть отбракованы по причине неспецифической гибели.

### **2.2.4. Исследование партии конечной продукции**

#### **i) Стерильность и чистота**

Исследования биологических материалов на стерильность и свободу от контаминации можно найти в главе 1.1.9.

#### **ii) Безопасность**

Группе однодневных утят, восприимчивых к вирусу вирусного энтерита уток, вводят подкожно или внутримышечно вакцину в дозе в 10 раз превышающей рекомендуемую. Группу наблюдают в течение 7-14 дней на наличие признаков нежелательных реакций.

#### **iii) Иммуногенность партии**

Титр вируса вакцины определяют с помощью 9-11-дневных куриных эмбрионов, инокулированных в хориоаллантаоисную мембрану и инкубированных при температуре 37°C. Во время использования вакцины титр должен составлять как минимум  $10^{3,0}$  ELD<sub>50</sub> на дозу.

Иммуногенность вакцины можно оценить с помощью уток или утят, восприимчивых к вирусу вирусного энтерита, уток путем внутримышечного введения дозы вакцины и контрольного заражения (внутримышечно)

вирулентным вирусом вирусного энтерита уток через 21 день. Вакцинированные птицы должны выжить после контрольного заражения, в то время как не вакцинированные контроли - погибнуть. Данное исследование можно проводить в отношении исходного вакцинного вируса, и его необязательно проводить в отношении каждой производимой партии вакцины. Для выпуска последующих партий титр вируса должен быть достаточно высоким, чтобы обеспечить иммуногенность вакцины.

## **2.3. Требования к авторизации**

### **2.3.1. Требования к безопасности**

Группе однодневных утят, восприимчивых к вирусу вирусного энтерита уток, вводят подкожно или внутримышечно вакцину в дозе в 10 раз превышающей рекомендуемую. Группу наблюдают в течение 7-14 дней на наличие признаков нежелательных реакций.

- i) Безопасность целевых и нецелевых видов животных

Вакцина предназначена для использования исключительно в отношении утят и уток для защиты против вируса вирусного энтерита уток.

- ii) Возврат аттенуированных/живых вакцин к вирулентности

О возврате вакцины против вируса вирусного энтерита уток к вирулентности не сообщалось.

- iii) Воздействие на окружающую среду

Отсутствует.

### **2.3.2. Требования к эффективности**

- i) Для животноводства

Иммунитет у вакцинированных уток должен длиться в течение репродуктивного сезона. Рекомендуется ежегодно проводить повторную вакцинацию (Sandhu & Metwally, 2008).

- ii) Для контроля и искоренения

Считается, что вакцинный вирус не передается через контакт между вакцинированными и не вакцинированными утками, поскольку не вакцинированная птица остается восприимчивой к инфекции.

### **2.3.3. Стабильность**

При условии хранения при температуре  $-70^{\circ}\text{C}$  и ниже вакцина стабильна в течение 1 года. По окончании данного срока необходимо периодически проводить исследования на иммуногенность, используя аликвоту вакцины, чтобы определить, сохранился ли титр вируса. После размораживания вакцину

нельзя повторно замораживать, ее необходимо хранить в холодильнике при температуре 4°C не дольше 1 недели. Лиофилизированную вакцину хранят при температуре 4-8°C и используют до истечения указанного срока годности.

### **3. Вакцины на основе биотехнологий**

#### **3.1. Доступные вакцины и их преимущества**

Отсутствуют.

#### **3.2. Специальные требования к вакцинам на основе биотехнологий, если имеются**

Отсутствуют.

### **СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

BURGESS E.C. & YUILL T.M. (1981). Increased cell culture incubation temperatures for duck plague virus isolation. *Avian Dis.*, 25, 222–224.

CAMPAGNOLO E.R., BANERJEE M., PANIGRAHY B. & JONES R.L. (2001). An outbreak of duck viral enteritis (duck plague) in domestic Muscovy ducks (*Cairina moschata domestica*) in Illinois. *Avian Dis.*, 45, 522–528.

DARDIRI A.H. & HESS W.R. (1967). The incidence of neutralizing antibodies to duck plague virus in serums from domestic ducks and wild waterfowl in the United States of America. *Proceedings of the Annual Meeting of the United States Animal Health Association*, 225–237.

DARDIRI A.H. & HESS W.R. (1968). A plaque assay for duck plague virus. *Can. J. Comp. Med.*, 32, 505–510.

DAVISON S., CONVERSE K.A., HAMIR A.N. & ECKROADE R.J. (1993). Duck viral enteritis in domestic Muscovy ducks in Pennsylvania. *Avian Dis.*, 37, 1142–1146.

DENG M.Y., BURGESS E.C. & YUILL T.M. (1984). Detection of duck plague virus by reverse passive hemagglutination test. *Avian Dis.*, 28, 616–628.

DOCHERTY D.E. & FRANSON C.J. (1992). Duck Virus Enteritis. In: *Veterinary Diagnostic Virology*, Castro A.E. & Heuschele W.P., eds. Mosby Year Book, St Louis, Missouri, USA, 25–28.

ERICKSON G.A., PROCTOR S.J., PEARSON J.E. & GUSTAFSON G.A. (1974). Diagnosis of duck virus enteritis (duck plague). 17th Annual Proceedings of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Roanoke, Virginia, USA, 85–90.

GOUGH R.E. & ALEXANDER D.J. (1990). Duck virus enteritis in Great-Britain, 1980 to 1989. *Vet. Rec.*, 126, 595–597.

HANSEN W.R., BROWN S.E., NASHOLD S.W. & KNUDSON D.L. (1999). Identification of duck plague virus by polymerase chain reaction. *Avian Dis.*, 43, 106–115.

- HANSEN W.R., NASHOLD S.W., DOCHERTY D., E., BROWN S.E. & KNUDSON D.L. (2000). Diagnosis of Duck Plague in Waterfowl by Polymerase Chain Reaction. *Avian Dis.*, 44, 266–274.
- ISLAM M.R., NESSA J. & HALDER K.M. (1993). Detection of duck plague virus antigen in tissues by immunoperoxidase staining. *Avian Path.*, 22, 389–393.
- JI J., DU L.Q., XIE Q.M., CAO Y.C., ZUO K.J., XUE C.Y., MA J.Y., CHEN F. & BEE Y.Z. (2009). Rapid diagnosis of duck plagues virus infection by loop-mediated isothermal amplification. *Res. Vet. Sci.*, 87, 53–58.
- KISARY S. & ZSAK L. (1983). Comparative studies on duck viral enteritis (DVE) virus strains in geese. *Avian Path.*, 12, 395–408.
- KOCAN R.M. (1976). Duck plague virus replication in Muscovy duck fibroblast cells. *Avian Dis.*, 20, 574–580.
- MONDAL B., RASOOL T.J., RAM H. & MALLANNA S. (2010). Propagation of vaccine strain of duck enteritis virus in a cell line of duck origin as an alternative production system to propagation in embryonated egg. *Biologicals*, 38, 401–406.
- PEARSON G.L. & CASSIDY D.R. (1997). Perspectives on the diagnosis, epizootiology, and control of the 1973 duck plague epizootic in wild waterfowl at Lake Andes, South Dakota. *J. Wildl. Dis.*, 33, 681–705.
- PLUMMER P.J., ALEFANTIS T., KAPLAN S., O'CONNELL P., SHAWKY S. & SCHAT K.A. (1998). Detection of duck enteritis virus by polymerase chain reaction. *Avian Dis.*, 42, 554–564.
- PRITCHARD L.I., MORRISSY C., VAN PHUC K., DANIELS P.W. & WESTBURY H.A. (1999). Development of a polymerase chain reaction to detect Vietnamese isolates of duck virus enteritis. *Vet. Microbiol.*, 68, 149–156.
- QI X., YANG X., CHENG A., WANG M., GUO Y. & JIA R. (2009). Replication kinetics of duck virus enteritis vaccine virus in ducklings immunized by the mucosal or systemic route using real-time quantitative PCR. *Res Vet Sci.* 86, 63–67.
- RICHTER J.H.M. & HORZINEK M.C. (1993). Duck Plague. In: *Virus Infections of Birds*, McFerran J.B. & McNulty M.S., eds. Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam, the Netherlands, 77–90.
- SANDHU T.S. & METWALLY S.A. (2008). Duck Virus Enteritis (Duck Plague). In: *Diseases of Poultry*, 12 th Edition, Saif Y.M., Fadly A.M., Glisson J.R., McDougald L.R., Nolan L.K. & Swayne D.E., eds. Blackwell Publishing, 384– 393.
- SHAWKY S. & SCHAT K.A. (2002). Latency sites and reactivation of duck enteritis virus. *Avian Dis.*, 46, 308–313. SHAWKY S.A. & SANDHU T.S. (1997). Inactivated vaccine for protection against duck virus enteritis. *Avian Dis.*, 41, 461–468.

THAYER S.G. & BEARD C.W. (2008). Serologic procedures. In: Laboratory Manual for the Isolation, Identification and Characterization of Avian Pathogens, 5th Edition, Dufour-Zavala L., Swayne D.E., Glisson J.R., Reed W.M., Jackwood M.J. & Woolcock P.R., eds. The American Association of Avian Pathologists, Jacksonville, FL. 222– 229.

WOLF K., BURKE C.N. & QUIMBY M.C. (1976). Duck viral enteritis: a comparison of replication by CCL-141 and primary cultures of duck embryo fibroblasts. Avian Dis., 20, 447–454.

WU Y., CHENG A., WANG M., ZHANG S., ZHU D., JIA R., LU Q., CHEN Z. & CHEN X. (2011). Establishment of real-time quantitative reverse transcription polymerase chain reaction assay for transcriptional analysis of duck enteritis virus UL55 gene. Virol. J., 8, 266.

YANG F.L., JIA W.-X., YUE H., LUO W., CHEN X., XIE Y., ZEN W. & YANG W.Q. (2005). Development of quantitative real-time polymerase chain reaction for Duck Enteritis Virus DNA. Avian Dis., 49, 397–400.

\*

\* \*