

## ВИРУСНЫЙ ГЕПАТИТ УТОК

### РЕЗЮМЕ

*Вирусный гепатит уток (DHAV) обычно ассоциируется с острой, контагиозной инфекцией у восприимчивых уток в возрасте менее 6 недель и часто в возрасте менее 3 недель. Он не возникает у взрослых птиц. Болезнь, DHAV, традиционно делится на типы I, II, III.*

*DHAV тип I, может быть вызван, по крайней мере тремя серотипами вируса гепатита уток A (DHAV), членом рода Avihepatovirus семейства Picornaviridae. Наиболее патогенным и широко распространённым является DHAV-1, который ранее обозначался как вирус гепатита уток, тип 1, DHAV-2 и DHAV-3 являются двумя дополнительными генотипами в роде Avihepatovirus, которые в последствие были идентифицированы как дополнительные этиологические возбудители вирусного гепатита уток у утят.*

*DHAV тип II вызывает астровирус уток тип 1 (DAstV-1), член семейства Astroviridae. AstV-1 первоначально был обнаружен в Великобритании. Его обнаруживают у утят в возрасте от 10 дней до 6 недель и он вызывает патологические изменения подобные DHAV-1.*

*DHAV тип III вызывает астровирус уток тип 2 (DAstV-2), член семейства Astroviridae. Считается, что он отличается от DAstV-1 и он был обнаружен в Соединенных Штатах Америки. Он вызывает те же поражения печени у молодых утят, но он менее вирулентный по сравнению с DHAV.*

*Диагностика гепатита у утят основана на характеристике паттерна болезни в стае, серьезных патологических изменениях, выделении вируса у павших утят и воспроизведении болезни у восприимчивых утят.*

*Вирусы-возбудители DHAV не считаются зоонозными.*

**Идентификация агента:** *На основании результатов клинических исследований и патологических изменений является невозможным отличить DHAV I, DHAV II и DHAV III, но отличия могут быть выявлены на основании реакции утят и реакции в яйцах с развивающимися эмбрионами и культурах клеток на выделенные вирусы. В качестве альтернативы РНК DHAV может быть обнаружен посредством проведения одноэтапной полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией в утиной печени, аллантоисной жидкости и печени эмбриона из инокулированных утиных яиц. Молекулярные тесты так же были описаны для обнаружения DAstV-1u DAstV-2.*

**Серологические исследования:** *Серологические исследования имеют небольшое значение в диагностике острых инфекций, вызванных DHAV, DAstV-1 и DAstV-2.*

*В отношении трех вирусов использовалась реакция сывороточной нейтрализации in ovo, а в отношении DHAV-I были разработаны тесты in vitro. Эти тесты были использованы для идентификации вируса, анализа иммунного ответа на вакцинацию и эпизоотологического надзора.*

**Требования к вакцинам:** *Инфекции, вызываемые вирусом DHAV-I можно контролировать посредством использования живых аттенуированных вакцин и инактивированных вирус-вакцин. Их вводят племенным уткам для передачи утятам*

*пассивного иммунитета. Живые аттенуированные вирус-вакцины могут также активно иммунизировать односуточных утят, восприимчивых к DHAV-I.*

*Утята, восприимчивые к DHAV-I могут быть пассивно защищены антительными препаратами желтка куриного яйца.*

*Инфекции DAstV-2 можно контролировать посредством живых аттенуированных вирус-вакцин, введенных племенным уткам с целью передачи пассивного иммунитета утятам.*

## А. ВВЕДЕНИЕ

Болезнь, вирусный гепатит уток (DHAV) традиционно классифицируется на DHAV типов I, II, III. Ее вызывают, по крайней мере, три различных небольших РНК-вирусов, которые не имеют известной значимости для здоровья людей.

### 1. DHAV тип I (DHAV-1, DHAV-2, DHAV-3)

**DHAV тип I** вызывают виды вирусов, вирус гепатита уток А (DHAV) – *Avihepatovirus* из семейства *Piconaviridae*. Международный комитет по таксономии создал новый род, *Avihepatovirus*<sup>1</sup>. Род включает виды, вирус гепатита уток А (DHAV). Были идентифицированы три антигенно неродственных генотипов, DHAV-1, DHAV-2, DHAV-3 (Kim et al., 2006; Tseng & Tsai, 2007; Wang et al., 2008). Наиболее преобладающим и широко распространенным является DHAV-1. До недавних пор DHAV-1 ассоциировали только болезнью у кряквы и пекинских уток, но в настоящее время поступают сообщения о том, что он вызывает панкреатит и энцефалит у муксусной утки (Guerin et al., 2007). DHAV-2 так же документируют как N-DHAV (Tseng & Tsai, 2007). DHAV-2 был первоначально выделен из утенка кряквы и гусенка в Китайском Тайбэе (Tseng & Tsai, 2007). Смешанные инфекции DHAV-1 и DHAV-2, характерны для Китайского Тайбэя (Tseng & Tsai, 2007). Изоляты DHAV-3 были зарегистрированы в Корее (Республики Корея) (Kim et al., 2007a) и Китае (Народной Республике) (Fu et al., 2008). Ограниченная информация по патогенности DHAV-2 и DHAV-3 указывает на то, что клинические признаки схожи с DHAV-1.

DHAV вызывает высококонтагиозную инфекцию у уток. Болезнь является острой, быстро распространяющейся, обычно смертельной вирусной инфекцией у утят. Она обычно поражает утят в возрасте 6 недель и моложе. Клиническая форма болезни характеризуется летаргией и атаксией, за которыми следует опистотонус и смерть. Утята перед смертью теряют равновесие, падают в сторону, и у них наблюдаются конвульсии. Течение болезни быстрое и может продолжаться 1-2 часа. Практически смертность целой стаи наблюдается в течение 3-4 дней, большинство смертей наблюдается на второй день. Серьезные патологические изменения наблюдаются в основном в печени. Она увеличивается в размерах и на ней появляются четкие петехиальные и экхимотические кровоизлияния. Также наблюдается увеличение селезенки и увеличение почек с закупоркой ренальных кровеносных сосудов. Микроскопические изменения печени характеризуются обширным Гепатоцитным некрозом и гиперплазией желчных протоков, сопровождающиеся различной степенью воспалительных клеточных реакций и кровоизлиянием.

### 2. DHAV тип II (астровирус уток тип I (DAstV-1))

DHAV-1 вызывает вирус, астровирус уток-1 (DAstV-1) семейства *Astroviridae* (Gough et al., 1985; Koci & Schultz-Cherry, 2002). Вирионы имеют морфологию типичную для астровируса и составляют 28-30 нм в диаметре.

Инфицирование утят DAstV-1 было также зарегистрировано в Соединенном Королевстве (Asplin, 1965; Gough et al., 1985). Это острая, смертельная инфекция, вызывающая клинические и патологические признаки схожие с DHAV. Инфицированные птицы могут демонстрировать признаки полидипсии и обычно умирают в течение 1-2 часов после проявления симптомов.

Макроскопические патологические изменения включают многочисленные кровоизлияния, характеризующиеся как точечными, так и сплошными гемorragиями в печени, увеличенные бледные почки с закупоренными кровеносными сосудами и увеличенную селезенку. Пищеварительный тракт обычно пустой, хотя тонкий кишечник может содержать слизь и могут быть заметны геморрагические участки. На сердце иногда

<sup>1</sup> [http://www.ictvonline.org/taxonomyHistory.asp?taxnode\\_id=20140971&taa\\_name=Avihepatovirus](http://www.ictvonline.org/taxonomyHistory.asp?taxnode_id=20140971&taa_name=Avihepatovirus)

наблюдаются петехиальные геморрагии. Гистологические изменения в печени схожи с изменениями, которые наблюдаются при инфицировании DHAV; гиперплазия желчных протоков более серьезная чем при DHAV.

### 3. DVH тип III астровирус уток тип 2 (DAstV-2)

Вирус, вызывающий DVH тип III классифицируется как астровирус уток -2 (DAstV-2), отличающийся от DAstV-2 (Todd et al., 2009). DAstV-2 был зарегистрирован только в США. Потери составляют 20% у утят иммунизированных против DHAV-1 (Haider & Calnek, 1979; Toth, 1969). DAstV-2 вызывает острую инфекцию у утят, клинические признаки которой схожи с признаками, которые наблюдаются при инфекциях типа I. Макроскопическая патология, индуцированная DAstV-2 схожа с инфицированием DHAV. Поверхность печени бледная и покрыта красными полосами и петехиальными геморрагиями. Селезенка бледнее, но значительно не увеличена. В почках местами могут наблюдаться застои.

## В. МЕТОДЫ ДИАГНОСТИКИ

**Таблица 1** Методы тестирования, доступные для диагностики вируса гепатита уток А (DHAV) и их задача

Метод	Задача					
	Свобода популяции от инфекции	Свобода отдельного животного от инфекции до перемещения	Вклад в стратегии по искоренению	Подтверждение клинических случаев	Превалентность инфекции - надзор	Иммунный статус отдельных животных или популяций после вакцинации
<b>Идентификация возбудителя<sup>2</sup></b>						
Выделение вируса	+	++	+	++	++	-
Обнаружение антигена	+	++	+	++	++	-
ОТ-ПЦР <sup>a</sup>	++	+++	+++	+++	++	-
<b>Обнаружение иммунного ответа</b>						
ИФА	++	++	++	-	+	++
Вирус-нейтрализация	+++	+++	+++	-	+	+++

Разъяснение: +++= рекомендуемый метод, валидированный для указанных целей; ++=подходящий метод, в некоторых случаях может потребоваться дальнейшая валидация в отношении использования в образцах от живых животных, например, фекалиях; += может быть использован в некоторых ситуациях, но стоимость, надежность и другие факторы могут в значительной степени ограничить его применение; - = не подходит для данной задачи.

<sup>a</sup> - Использование ОТ-ПЦР (полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией) наиболее часто используется для тестирования подозрительных клинических образцов; обычно печени. Использование ОТ-ПЦР для обнаружения DHAV с использованием фекальных образцов требует дальнейшей валидации.

<sup>2</sup> Рекомендуется применение комбинации методов идентификации возбудителя на том же клиническом образце.

ИФА=иммуносорбентный ферментный анализ; VN – вирус-нейтрализация.

Таблица 2. Методы тестирования, доступные для диагностики астровируса уток тип 1 (DAstV-1) и их задача

Метод	Задача					
	Свобода популяции от инфекции	Свобода отдельного животного от инфекции до перемещения	Вклад в стратегии по искоренению	Подтверждение клинических случаев	Превалентность инфекции - надзор	Иммунный статус отдельных животных или популяций после вакцинации
<b>Идентификация возбудителя</b>						
Выделение вируса	+	++	+	++	++	-
Обнаружение антигена	++	++	++	++	++	-
ОТ-ПЦР <sup>a</sup>	+++	+++	+++	+++	+++	-
<b>Обнаружение иммунного ответа</b>						
ИФА	++	+	++	-	+	++

Разъяснение: +++= рекомендуемый метод, валидированный для указанных целей; ++=подходящий метод, в некоторых случаях может потребоваться дальнейшая валидация в отношении использования в образцах от живых животных, например, фекалиях; += может быть использован в некоторых ситуациях, но стоимость, надежность и другие факторы могут в значительной степени ограничить его применение; - = не подходит для данной задачи.

<sup>a</sup> - Использование ОТ-ПЦР наиболее часто используется для тестирования подозрительных клинических образцов; обычно печени. Использование ОТ-ПЦР для обнаружения DHAV с использованием фекальных образцов требует дальнейшей валидации.

ОТ-ПЦР – полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией; ИФА = иммуносорбентный ферментный анализ.

Таблица 3. Методы тестирования, доступные для диагностики астровируса уток тип 2 (DAstV-2) и их задача

Метод	Задача					
	Свобода популяции от инфекции	Свобода отдельного животного от инфекции до перемещения	Вклад в стратегии по искоренению	Подтверждение клинических случаев	Превалентность инфекции - надзор	Иммунный статус отдельных животных или популяций после вакцинации
<b>Идентификация возбудителя</b>						
Выделение вируса	+	++	+	++	++	-
Обнаружение антигена	++	++	++	++	++	-
ОТ-ПЦР	+++	+++	+++	+++	+++	-
<b>Обнаружение иммунного ответа</b>						
ИФА	++	+	++	-	+	++

Разъяснение: +++= рекомендуемый метод, валидированный для указанных целей; ++=подходящий метод, в некоторых случаях может потребоваться дальнейшая валидация в отношении использования в образцах от живых животных, например, фекалиях; += может быть использован в некоторых ситуациях, но стоимость, надежность и другие факторы могут в значительной степени ограничить его применение; - = не подходит для данной задачи.

ОТ-ПЦР – полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией; ИФА = иммуносорбентный ферментный анализ.

## 1. Идентификация возбудителя

### 1.1. DHAV- I (DHAV-1, DHAV-2, DHAV-3)

Клинические или патологические наблюдения в значительной степени свидетельствуют об инфицировании DHAV. DHAV может быть выделен из ткани печени посредством гомогенизации, как 20% (о/в) суспензия в забуференном растворе. Суспензию очищают, и затем ее можно обработать (по желанию) 5% хлороформом (в/в) в течение 10-15 минут при комнатной температуре. DHAV является устойчивым к такой обработке.

Присутствие DHAV обычно подтверждается одной или несколькими из процедур, перечисленных в Разделе В.1.1.1.

#### 1.1.1. Подтверждающие процедуры

- i) Посредством инокуляции первичной культуры клеток утиного эмбриона (DEL), которые являются особенно чувствительными. Разведения гомогената печени, содержащего DHAV тип 1 вызывают цитопатическое действие (CPE), которое характеризуется округлением клеток и некрозом. При покрытии поддерживающей средой, содержащей 1% агарозу (о/в), CPE порождает бляшки 1мм в диаметре.
- ii) Посредством инокуляции нескольких разведений гомогената печени в аллантоисный мешок утиного яйца (10-14 дней) или куриного яйца (8-10 дней) с развивающимся эмбрионом. Утиные эмбрионы умирают в течение 24-72 часов после инокуляции, в то время как у куриных эмбрионов наблюдается более варибельная и изменчивая ответная реакция. Обычно они умирают в течение 5-8 суток после инокуляции. Макроскопические патологические изменения у эмбрионов включают задержку развития и подкожные кровоизлияния по всему телу с опухолью в брюшном отделе и области задних конечностей. Печень эмбрионов может иметь красный или желтоватый цвет, она может быть увеличена в размерах и на ней могут наблюдаться некротические очаги. У эмбрионов, которые погибают через большой промежуток времени, зеленый цвет аллантоиса более выражен. Кроме того, становятся более заметными патологические изменения печени и задержка в росте.

#### 1.1.2. Иммунологические тесты

Существует антигенное различие между изолятами DHAV, включая гепатит утят. С точки зрения серологии перекрестной нейтрализации между DHAV-1 и DHAV-2 (Tseng & Tsai, 2007) ограниченной перекрестной нейтрализации между DHAV-1 и DHAV-3 (Kim et al., 2007a) не наблюдается. Вариант DHAV-1a, выделенный в США только частично вступает в реакцию с классическим вирусом DHAV-1 при применении перекрестной реакции сыворочной нейтрализации

(Sandhu et al., 1992; Woolcock, 2008b). Другие варианты были зарегистрированы в Индии и Египте, но дальнейшей информации о них не известно. Сообщения о болезни у мускусной утки из Франции (Guerin et al., 2007; Sandhu et al., 1992; Woolcock, 2008b) дают основания предполагать о значительно большем разнообразии DHA V, чем предполагалось ранее.

Иммунологические тесты не использовались широко в рутинной идентификации DHA V-I. Были описаны разные реакции нейтрализации вируса, которые приобретут большую значимость, если инфекции DHA V-I и DHA V-II станут более распространенными инфекциями. Описанные тесты (Chalmers & Woolcock, 1987; Woolcock, 1986;1991; 2008a) включают:

- i) Серийные десятикратные разведения вирусного изолята смешиваются с равными объемами гипериммунной DHA V-1 – специфичной сыворотки, разведенной между 1/5 и 1/10. Смеси выдерживают при комнатной температуре в течение часа и затем их вводят в восприимчивых утят (0,2 мл) подкожно, также через аллантоисную полость (0,2 мл) утиных яиц с развивающимися эмбрионами и на первичные монослойные культуры клеток печени утиных эмбрионов. В каждом случае контроли включают вирусный изолят, смешанный с контрольной сывороткой.

### 1.1.3. Методы распознавания нуклеиновой кислоты

Было опубликовано несколько работ по молекулярной структуре DHA V, указывающих на существование генотипических вариаций среди изолятов (Tseng et al., 2007; Wang et al., 2008). На основании филогенетического анализа известные изоляты подразделены на 3 генотипа (Wang et al., 2008). DHA V-1 является наиболее превалентным генотипом (Asplin, 1965; Ding & Zhang, 2007; Jin et al., 2008; Kim et al., 2006; Liu et al., 2008). DHA V -2 был зарегистрирован в Китайском Тайбее (Tseng & Tsai, 2007). DHA V-3 был зарегистрирован в Южной коре (Kim et al., 2007a; 2008) и Китае (Fu et al., 2008).

Для DHA V-I был описан одноэтапный ПЦР анализ с обратной транскриптазой с использованием праймеров к консервативному гену D (Kim et al., 2007b). Anchun et al. 2009 также сообщают о проведении ПЦР с обратной транскрипцией для выявления Китайских изолятов, но не ясно являются ли они DHA V-1 или DHA V-2. Было получено сообщение о разработке одноэтапного анализа Taqman ОТ-ПЦР в реальном времени, основанном на праймерах к консервативной области в 3D гене (Yang et al., 2008), но не ясно предназначен ли он для DHA V-1 или для DHA V-2; это сообщение не содержит ясного поэтапного протокола, который использовался для разработанного ими метода. Для одновременного обнаружения и дифференциации генотипов DHA V было разработано несколько мультиплексных ПЦР с обратной транскрипцией.

- i) Полимеразная цепная реакция

Суть метода была взята у Kim et al., (2007b). Он основан на праймерах, специально разработанных для амплификации области 3D гена DHAВ-1.

- ii) Обнаружение DHAВ-1 в органах утиных и куриных эмбрионов и выделение нуклеиновой кислоты

Супернатанты, приготовленные из утиной печени и инфицированные DHAВ-1 отбирают и фильтруют (0,2 мкм). Аллантоисная полость каждого из пяти 11-дневных утиных и 9-дневных куриных яиц с эмбрионами инокулируют 0.2 мл вирусного супернатанта. Образцы аллантоисной жидкости и печени отбирают у эмбрионов, инокулированных двумя эталонными штаммами и каждый образец печени (*часть текста отсутствует*) минут, супернатанты обрабатывают с использованием подходящего набора для экстракции вирусной ДНК/РНК в соответствии с инструкциями производителя. Нуклеиновые кислоты используются для одноэтапной ОТ-ПЦР. После измерения концентраций РНК с использованием образцы хранят при температуре -20°C.

- iii) **Олигонуклеотидные праймеры**

DHAВ-1 ComF (5'-AAG-AAG-GAG-AAA-ATY-[С или Т]-AAG-GAA-GG-3') и

DHAВ-1 ComR (5'- TTG-ATG-TCA-TAG-CCC-AAS-[С или G]-ACA-GC-3')

Фланкируют последовательностью ДНК 467bp в 3D гене.

Альтернативные праймеры, предложенные Fu et al. (2008):

Антисмысловые 501-519: 5'-CCT-CAG-GA-CTA-GTC-TGG-A-3'

Смысловые 270-285: 5'-GGA-GGT-GGT-GCT-GA-A-3'

- iv) **Одноэтапная ОТ-ПЦР**

Время и температура должны быть оптимизированы в соответствии с используемыми реактивами и наборами. Следующие представлены в качестве примеров. Одноэтапная ОТ-ПЦР проводится с использованием соответствующего набора, содержащего 1 Ед обратной транскриптазы OptiScript, 2,5 мМ дНТФ, 2,5 Ед ДНК полимеразы и буфер для проведения ОТ-ПЦР (50 мМ Tris/HCl и 75 мМ KCl). Кроме того в реакции используются следующие компоненты: 4 мкл (50 нг) матрица РНК или ДНК, 1 мкл (10 пмоль/мкл) каждого специфического праймера (DHAВ-1 ComF и DHAВ-1 ComR) и обработанная диэтилпирикарбонатом (DEPC) dH<sub>2</sub>O, добавленная для получения общего объема 20 мкл, необходимого для реакции.

Для проведения одноэтапной ПЦР используется Т-градиентный термоциклер. Обратная транскрипция проводится при 45°C в течение 30 минут. Затем фермент инактивируют в течение 5 минут при 94°C. Амплификация ПЦР проводится с использованием первоначальной



денатурации в течение 20 секунд при 94°C; затем следуют 40 циклов отжига при 52°C в течение 30 секунд, удлинение при 72°C в течение 30 секунд, денатурация при 94°C в течение 20 секунд; и окончательное удлинение при 72°C в течение 5 минут. Реакционная смесь хранится при 4°C.

**v. Обнаружение продуктов одноэтапной ОТ-ПЦР**

Продукты ПЦР (10мкл) отделяют при помощи электрофореза (100 V) в горизонтальных 1,5% агарозных гелях и трис-ацетатном буфере (40 mM трис-ацетата, 1 mM этилендиаминтетрауксусной кислоты). Гели окрашивают красителем нуклеиновой кислоты (0,5 мкг/мл), визуализируют в ультрафиолете или синем свете и фотографируют.

**vi. Интерпретация результатов**

Фрагмент ДНК 467 bp амплифицируют в ОТ-ПЦР с использованием РНК, выделенной из печени утят, инфицированных эталонными штаммами DHAV-1. РНК, являющуюся отрицательным контролем, получают из неинфицированной печени утят и не амплифицируют в тех же условиях.

**1.2. DHAV тип II (DAstV-1)**

Для обнаружения DAstV-1

DAstV-1 может быть выделен в 20% (в/о) гомогенизированных суспензиях печени в буферном растворе. Для инокуляции могут использоваться:

- i) Яйца с развивающимися эмбрионами кур или уток, как через амниотическую полость, так и через желточный мешок. У них может наблюдаться неустойчивая ответная реакция после 4х пассажей, но во время ранних пассажей случаев гибели не наблюдается. Признаки инфицирования проявляются у эмбрионов через 6-10 суток; когда это происходит, у эмбрионов наблюдается остановка роста, сопровождающаяся зелеными некротическими поражениям печени.

Был зарегистрирован рост DAstV-1 в первичной культуре клеток печени куриных эмбрионов (Baxendale & Mebatson, 2004); после 4-5 серийных пассажей на 5 день после инфицирования было обнаружено образование бляшек. Методы культивирования клеток не используются на регулярной основе, так как размножение DAstV-1 в культуре клеток обычно не приводит к размножению вируса до пределов, достаточных для проведения диагностических исследований.

**1.2.1 Иммунологические исследования**

Иммунологические исследования регулярно не проводились для обнаружения антигена DAstV-1. Однако для идентификации вируса DAstV-1 проводилась реакция нейтрализации посредством

инокуляции куриных эмбрионов через амниотическую полость смесью с неизменным содержанием сыворотки и варьирующим содержанием вируса.

### 1.2.2. Молекулярная характеристика

Полный геном DАstV-1 состоит из 7752 нуклеотидов и 3 ОРС, ОРС1а, ОРС 1 и ОРС2 (Chen et al., 2012)

Подтверждение идентичности гипотетических изолятов DАstV-1 можно провести с использованием ОТ-ПЦР, затем определением последовательности нуклеиновой кислоты и анализа амплифицированного фрагмента (Todd et al., 2009). ОТ-ПЦР, основанная на данном вырожденном праймере, амплифицирует приблизительно 434 нуклеотидов в ОРС 1b. Так как метод ОТ-ПЦР может амплифицировать другие утиные атровирусы в пробах, требуется проведение анализа последовательности амплифицированного продукта.

#### i) Обнаружение DАstV-1 при помощи ОТ-ПЦР (метод из Tod et al., 2009)

Выделить вирусную РНК из 200 мкл проб с использованием подходящего набора для экстрагирования РНК. Используются вырожденные олигонуклеотидные праймеры и подходящий набор одноэтапной ОТ-ПЦР. Прямой праймер 5'-GAY-TGG-ACI-MGI-TAY-GGI-ACI-ATI-CC-3' и обратный праймер 5'-YTT-IAC-ССА-САТ-ICC-RAА-3 амплифицирует фрагмент, состоящий из 434 нуклеотидов, который соответствует нуклеотидам 3799-4233 в геноме G4260 (номер доступа: АВ0333998). Условия проведения ОТ-ПЦР: первичная денатурация, 94°C в течение пяти минут, затем 45 циклов денатурации, 94°C в течение одной минуты; отжиг, 45°C в течение 1 минуты; и растяжение, 72°C в течение 90 секунд и затем окончательное растяжение, 72°C в течение пяти минут. Исследовать амплифицированный продукт с использованием электрофареза в 1% агарозном геле, обработанном нуклеиновой кислотой в качестве красителя и визуализированном посредством трансиллюминацией ультрафиолетом или синим светом. Необходимо провести секвенирование и сравнение последовательностей других ОРС1b последовательностей атровирусов.

### 1.3. ДНАV тип III (DАstV-2)

DАstV-2 можно выделить из гомогенизированных суспензий печени. Он является устойчивым к обработке 5% хлороформом. Вирус может быть выделен посредством:

- i) инокуляции изолята в хорионаллантоисную мембрану яиц с 10-суточными утиными эмбрионами. Ответная реакция колеблется, смерть эмбрионов всегда наступает в течение 7-10 суток. Мембраны становятся сухими и покрываются коркой, под которой образуется отек. У эмбрионов может наблюдаться задержка роста и отечность, сопровождающаяся кровоизлияниями. Печень, почки и селезенка увеличены.

Попытки культивировать вирус у куриных яиц были безуспешными. Попытки индуцировать ЦПД вирусом в культурах тканей были безуспешны, но вирус был выявлен посредством прямой иммунофлюоресценции в экспериментально инфицированных

культурах монослоя клеток DEL и почках утиных эмбрионов (DEK) (Haider & Calnek, 1979).

### **1.3.1. Молекулярная характеристика**

DHAV тип III был идентифицирован как астровирус (DAstV-2) с использованием данных последовательности нуклеиновой кислоты. Считается, что отличается от DHAV тип II (DAstV-1) (Todd et al., 2009). ОТ-ПЦР и молекулярный метод секвенирования, описанный для обнаружения DAstV-1 может также использоваться для идентификации DAstV-2.

## **2. Серологические тесты**

Данные тесты для обнаружения антител бесполезны для диагностики, так как клиническая болезнь является слишком острой для обнаружения ранней инфекции. Серологические тесты пригодны для идентификации вируса, эпизоотологических исследований болезни и титрования гуморального ответа на вакцинацию. Сравнительное исследование по оценке DAstV-1 вирус-нейтрализации, иммуноферментного анализа (ИФА) и иммунодиффузии в агаровом геле (AGID) показывало, что вирус-нейтрализация и ИФА имеют сравнительную чувствительность, но чувствительность AGID была очень низкой (Zhao et al., 1991). Для обнаружения антител DHAV-1 в сыворотке был описан VP1-ИФА, где использовался VP1 DHAV-1 в качестве сенсibilизирующего антигена. По сравнению с реакцией вирус-нейтрализации VP1-ИФА продемонстрировал зарегистрированную специфичность и чувствительность, равную 92,55 и 69,7% соответственно (Lui et al., 2010). Уровень обнаруживаемых антител после контрольного заражения вирусом DHAV-1 был низким. В то время как был зарегистрирован непрямой ИФА, экспрессирующий С-конец ORC2 белка DAstV-1, точная чувствительность и специфичность данного теста является неясной.

### **2.1. ИФА для обнаружения DHAV-1(процедура, описанная Zhao et al., 1991)**

Добавить 100мкл сенсibilизирующего антигена, разведенного в физиологическом растворе, забуференном карбоновой кислотой, (0,5M, рН 9,6) в каждую лунку ИФА планшета. Инкубировать в течение ночи при температуре 4°C. Промыть планшет 0,01 М ФБР (рН 7,4) содержащем 0,05% Твин20 (PBST), три раза. Добавить 100 мкл каждой исследуемой сыворотки, разведенной в PBST, содержащем 0,1% бычий сывороточный альбумин (PBST-BSA) для дублирования лунок в сенсibilизированном планшете. Инкубировать в течение двух часов при температуре 37°C во влажной камере. Промыть планшет вышеуказанным способом. Добавить 100 мкл кроличьего анти-утиного IgG, конъюгированного с пероксидазой хрена, разведенного в PBST-BSA, в каждую лунку. Инкубировать в течение двух часов при температуре 37°C. Промыть планшет вышеуказанным способом. В каждую лунку добавить 100 мкл раствора субстрата (24,3 мл 0,1М лимонной кислоты + 25,7 мл 0,2 М фосфата + 50 мл дистиллированной воды, перемешать и добавить 40 мг о-фенилендиамин-свободного основания или дигидрохлорид, а также 40мкл 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; использовать немедленно). Через 30 минут добавить 25 мкл 2,5 М H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> в каждую лунку. Прочитать абсорбцию при 490 нуклеотидов с использованием ридера ИФА.

Альтернативные хромогены могут быть использованы в подходящем разбавителе с соответствующими системами обнаружения.

## 2.2. Вирус-нейтрализация

DHAV, DastV-1 и DastV-2 были использованы в реакции вирус-нейтрализации *in ovo*. Их успех зависит от экспрессии вируса в используемой системе анализа; с DastV-1 и DastV-2 это может быть проблемой. Тесты *in-vitro* были разработаны для DHAV-1; они включают метод редукции бляшек и метод микротитрования (Woolcock, 1986;1991). Метод редукции бляшек можно проводить с использованием как первичных DEK, так и DEL клеток. Монослой первичных клеточных культур приготовлены в минимальной поддерживающей среде Игла (MEM), содержащей 5-10% фетальную телячью сыворотку (FCS). 2мМ глутамина, 0,17% бикарбонат натрия и гентамицин. Трипсинизированные клетки высевают в чашки Петри диаметром 5 см. Затем их инкубируют в 5% CO<sub>2</sub> атмосфере при 37°. Через 24-48 ч после посева монослой должны быть почти слитыми. Монослой промывают дважды бессывороточной минимальной питательной средой или буферным солевым раствором Хэнкса, чтобы удалить все следы фетальной телячьей сыворотки перед инфицированием DHAV-I. Равные объемы DHAV-I, суспендированные в бессывороточной питательной среде Игла, доведенной до 200 БОЕ на 0.1 мл, смешивают с равными объемами серийных разведений утиной сыворотки (двукратные разведения в минимальной питательной среде Игла). До начала теста образцы сыворотки должны быть термоинактивированы при 56°C в течение 30 мин. Смеси вируса /сыворотки инкубируют в течение 1 часа при 37°C; затем к конфлюэнтным клеточным монослоям добавляют аликвоты объемом 0,1 мл, три чашки на разведение. Планшеты оставляют на 30 мин при комнатной температуре (20-22°C), затем их покрывают агарозной поддерживающей средой (агарозная поддерживающая среда, содержащая 2% куриную сыворотку и 0,1 – 0,2% фетальную телячью сыворотку, в которую была добавлена агароза для получения конечной концентрации равной 1% (o/o). Затем планшеты помещают в 5% CO<sub>2</sub> атмосферу при температуре 37 °C. Через 48 ч инкубации регистрируют количество бляшек. Бляшки можно наблюдать при помощи косоугольного источника света или в качестве альтернативы монослой могут быть зафиксированы в 10% буферном растворе формалина и окрашены 1% кристаллическим фиолетовым. Сывороточные титры антител выражаются в виде величины обратной самому высокому разведению сыворотки, которое сокращает число бляшек на 50 %.

Реакция нейтрализации микротитров может проводиться с использованием первичных клеток почек утиных эмбрионов (DEK). Серийные двукратные разведения каждого образца сыворотки (термоинактивированного) готовят в 50 мкл бессывороточной базальной среде Игла в микротитровальных планшетах. В каждую лунку добавляют примерно 10<sup>2.0</sup> ТЦД (50% инфицирующая доза культуры клеток) DHAV-I в 50 мкл базальной среды Игла. Смеси должны вступить в реакцию в течение 1 часа при температуре 37°C.

Первичные клетки почек утиных эмбрионов суспендируют в базальной среде Игла с добавлением 10% триптозо-фосфатного бульона, 2 мМ L-глутамин, 0,17 % двууглекислого натрия и 2-4% куриной сыворотки и доведены до концентрации  $3 \times 10^5$  клеток/мл. Затем клетки помещают на планшеты, 100 мкл на лунку, после чего планшеты инкубируют в течение 96 часов при температуре 37°C в гумифицированной 5% CO<sub>2</sub> атмосфере. После инкубации клетки фиксируют в 10% буферном растворе формалина и окрашивают 1% кристаллическим фиолетовым. Чтение планшетов осуществляется с использованием микроскопа. Титр вирусонейтрализующей активности выражен в виде величины обратной самому высокому разведению сыворотки, при котором происходил рост монослоя, т.е. признаков ЦПД не наблюдается и, тем не менее, имеет место полная нейтрализация вируса. Титр равный  $4 \log_2$  считается отрицательным.

Данные реакции нейтрализации использовались для анализа гуморального иммунного ответа на вакцинацию и для эпизоотологических исследований, так же как и для идентификации вируса.

## С. ТРЕБОВАНИЯ К ВАКЦИНАМ

### 1. Обоснование

Руководящие принципы для производства ветеринарных вакцин освещены в Главе 1.1.8 *Принципы производства ветеринарных вакцин*. Принципы, изложенные здесь и в Главе 1.1.8, являются общими по своему характеру и могут быть дополнены национальными и региональными требованиями.

#### 1.1 Целесообразность и предполагаемое использование продукта

DHAV-I можно контролировать посредством применения живой аттенуированной противовирусной вакцины. Она вводится племенным уткам, чтобы иммунитет передавался только что вылупившимся утятам через желток. Живая противовирусная вакцина может также применяться для активной иммунизации только что вылупившимся утят, восприимчивых к DHAV-I (Crighton & Woolcock, 1978). Инактивированная вакцина против DHAV-I также является эффективной при условии, что она вводится племенным уткам, которые были примированы живой вакциной или которые первоначально подверглись воздействию живого DHAV-I в полевых условиях; потомство этих племенных уток обладает материнским иммунитетом (Woolcock, 1991). Утки могут быть пассивно защищены посредством инокуляции антител в куриный яичный желток.

Были описаны разработка и оценка вакцины против DHAV-3 для защиты утят в Корее (Kim et al., 2009). Используемые

методы сопоставимы с методами, описанными в данном тексте, когда речь идет о DHAV-I.

Аттенуированная живая DHV-II (DAstV-1) вирус-вакцина применялась для защиты утят только в экспериментальных условиях (Googh et al., 1985).

Контроль инфекции DAstV-2 осуществлялся посредством использования аттенуированных живых противовирусных вакцин, которые вводились племенным уткам, чтобы иммунитет передавался вылупившимся через желточный мешок.

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

### **2.1. Характеристика посевного вируса**

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

Посевой вакцинный вирус DHAV-I, применяемый в основном в Европе, получают из изолята, пассируемого в яйцах с развивающимися куриными эмбрионами 53-55 раз; Посевой вакцинный вирус DHAV-I, используемый в США живых и инактивированных вакцинах, пассируется 84-89 раз.

Посевой вакцинный вирус DAstV-2 был получен из изолята, аттенуированного 25 серийными пассажами в яйцах с развивающимися куриными эмбрионами (Asplin, 1965) и применялся только экспериментально в полевых условиях (R.E. Gough, pers. comm).

Посевой вакцинный вирус DAstV-2 был аттенуирован в 30 серийных пассажах в яйцах с развивающимися утиными эмбрионами, инокулированными через хорионаллантоисную мембрану.

#### **2.1.2. Показатели качества (стерильность, чистота, отсутствие посторонних агентов)**

Все посевные вирусы должны быть свободными от посторонних вирусов, которые являются патогенными для уток, кур и индеек. Они также должны быть свободными от микробиологической контаминации и контаминации грибами.

Идентичность типа вируса должна быть подтверждена посредством реакции вирусонейтрализации, проводимой с использованием специфической антисыворотки методом, когда содержание сыворотки неизменно, а содержание вируса варьируется. Что касается вирусов DHAV-1 и DAstV-1, то реакция проводится на яйцах с развивающимися куриными эмбрионами; что касается DAstV-2, то реакция

проводится в яйцах с развивающимися утиными эмбрионами. Антисыворотка должна снизить титр соответствующего вируса, по крайней мере, на  $10^{2.0}$ ЭЛД<sub>50</sub>(50% эмбриональная летальная доза).

## 2.2. Технология производства

### 2.2.1. Процедура

DHAV-1 и DАstV-1 обрабатывают схожим образом. Вакцину получают от 9-10- суточных СПФ яиц с развивающимися куриными эмбрионами, инокулированных через аллантоисную полость и инкубированных при температуре 37°C. В основном эмбрионы погибают в течение 2-3 дней в случае с DHAV-I, но что касается DАstV-1, то гибель эмбрионов не наступает до 6-10 дней после инокуляции, хотя их собирают на 3-5 день для максимального урожая вируса. Собранные эмбрионы гомогенизируют в забуференном растворе и осветляют центрифугированием на небольшой скорости. Раствор разводят соответствующим образом и наливают во флаконы, которые быстро замораживают при температуре -70°C или ниже. Затем их оставляют на хранение при температуре от -20°C до -40°C. Атенуированная вакцина против DHAV-I также может применяться в качестве лиофилизированного препарата, который можно хранить при температуре 2-8°C. Восстановленная вакцина может быть использована при добавлении или без добавления гидроксида алюминия в разбавитель.

В случае с инактивированной вакциной против DHAV-I, собранные эмбрионы гомогенизируют, осветляют центрифугированием на небольшой скорости и затем очищают посредством обработки хлорформом (конечная концентрация – 10% (o/o)). Затем данный препарат инактивируют с использованием свежеприготовленного бинарного этиленмина. Затем инактивированный вирус смешивают с подходящим адьювантом; 0.2% (o/o) формалин добавляют в качестве консерванта (Woolcock, 1991).

Вакцину против вируса DАstV-2 готовят с использованием СПФ яиц с развивающимися 10-суточными утиными эмбрионами, инокулированных через хорионаллантоисную полость аттенуированным вирусом DАstV-2 и инкубированных при температуре 37°C. В основном гибель эмбрионов наблюдается между 6м и 10м днем. Яйца с погибающими эмбрионами вместе с хорионаллантоисной мембраной собирают и гомогенизируют в забуференном растворе и осветляют центрифугированием на небольшой скорости. Препарат разводят надлежащим образом и разливают по флаконам, которые быстро замораживают при температуре -70°C или ниже.

### **2.2.2. Антитело яичного желтка**

Вирулентный DHAV-I, приготовленный с использованием утиной печени утят, или аттенуированный вирус может быть использован для гипериммунизации СПФ цыплят с целью продуцирования антител в яичном желтке. У гипериммунизированных птиц собирают яйца, которые кладут на хранение при температуре 4°C до времени начала продуцирования. Желтки отделяют, собирают в пул и смешивают с противовспенивающим веществом. Смесь разбавляют буферным раствором, содержащем не более 0.2% (о/о) формалина, используемого в качестве консерванта. Разлитый продукт хранится при температуре 4°C и его срок годности составляет 1 год. Тесты на стерильность с целью подтверждения отсутствия контаминантов проводятся обычным способом.

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

Все реагенты должны быть стерильными, а яйца должны быть доставлены из специального источника, свободного от патогенных организмов.

### **2.2.4. Контроль в процессе производства**

Любые случаи гибели эмбрионов в течение первых 24х часов после инокуляции считаются неспецифичными и погибшие эмбрионы отбраковываются.

### **2.2.5. Тестирование конечной партии продуктов**

- i) Стерильность и чистота  
Тесты на стерильность и отсутствие контаминации биологических материалов, предназначенных для ветеринарного использования, описаны в Главе 1.1.9.
- ii) Безопасность  
Группу восприимчивых к соответствующему типу вируса 1-3-суточных утят нужно инокулировать дозой аттенуированной вакцины, в 10 раз превышающей рекомендованную дозу, подкожно или внутримышечно (в случае DHAV-1 и DHAV-2)) или подкожно (в случае DAst2) и наблюдать в течение 10 и 21 дня на наличие побочных реакций. Аттенуированные живые вакцины должны быть стабильными и у них не должен наблюдаться возврат к вирулентности после обратных пассажей на восприимчивых утятах.  
Тест на безопасность инактивированной вакцины против DHAV-I проводится посредством введения группе односуточных утят рекомендуемой дозы (0.5л) внутримышечно; во время тестирования не должны наблюдаться побочные эффекты.



Тесты на безопасность антител в желтке проводятся посредством инокуляции 1 мл подкожно каждой группы утят, которых потом наблюдают в течение 3 дней на наличие признаков побочных эффектов.

i) Иммуногенность партии

Что касается вирусов DHA-V-I и DHA-V-II вирусный титр вакцины должен определяться в яйцах с 9-10-суточными куриными эмбрионами, инокулированными в аллантоисную полость и инкубированными при 37°C. Иммуногенность вакцины для утят, восприимчивых к вирусам DHA-V-I и DAsV-1 может быть оценена посредством подкожной инокуляции вирусной вакцины, минимум  $10^{3.3}$  ЭЛД<sub>50</sub> на утенка, и контрольного заражения вирулентным вирусом DHA-V-I или DHA-V-II подкожно через 72 часа,  $10^{3.3}$  ЛД<sub>50</sub> на утенка (Crighton & Woolcock, 1978). По крайней мере, 80% вакцинированных птиц должны выжить, а в случае с вирусом DHA-V-I, по крайней мере, 80% контрольных птиц должны погибнуть; что касается DAsV-1, 20% смертность контрольных птиц в большей степени соответствует действительности.

Иммуногенность инактивированной вакцины считается удовлетворительной, если после введения утятам, предварительно примированным живым аттенуированным вирусом DHA-V-I, наблюдается четырехкратное или большее увеличение титра нейтрализующих антител.

Что касается DAsV-2, титр вакцины должен определяться в яйцах с 10-суточными утиными эмбрионами, инокулированными в хорионаллантоисную полость. Тесты на иммуногенность, проводимые на утятах, вызвали трудность из-за разной патогенности контрольного вируса для утят.

Тесты на иммуногенность антител в желтке проводятся посредством определения индекса нейтрализации (NI) для продукта в яйцах с развивающимися куриными эмбрионами методом с неизменным количеством белка, но разным количеством вируса. Минимальный NI  $10^{3.0}$  считается удовлетворительным. Эффективность продукта определяется посредством введения рекомендованной дозы антител яичного желтка в группу восприимчивых утят. Вторую группу оставляют непривитой. Через 24 часа каждую группу контролей

заражают вирулентным вирусом DHAV-I. Продукт признают эффективным, если, по крайней мере, 80% привитых утят выживают а, по крайней мере, 80% контрольных утят погибают.

## **2.3. Требования к авторизации**

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

Группу восприимчивых к данному вирусу 1-3х суточных утят необходимо инокулировать подкожно или внутримышечно (в случае с типом DVAV-I и DastV-1) или подкожно (в случае с DastV-2) дозой аттенуированной вакцины, которая в 10 раз превышает рекомендуемую дозу, и наблюдают в течение 10-21 дня на случай возникновения любых нежелательных реакций. Аттенуированные живые вакцины должны быть стабильными и в обратных пассажах у восприимчивых утят не должен наблюдаться возврат к вирулентности.

Тест на безопасность инактивированной вакцины против DHAV-I проводят посредством инокуляции группы односуточных утят рекомендованной дозой (0,5 мл) внутримышечно; во время исследования не должно наблюдаться никаких побочных эффектов.

Тест на безопасность антитела желтка проводят посредством инокуляции каждой группе утят 1 мл подкожно. Затем утят наблюдают на признаки побочных эффектов в течение 3х дней.

#### **i) Безопасность целевых и нецелевых животных**

Вакцины и яичный желток предназначены только для использования с целью защиты утят от DHV и для иммунизации племенных уток таким образом, чтобы материнские антитела могли быть переданы потомству.

#### **ii) Возвращение к вирулентности аттенуированных и живых вакцин**

Существуют сведения о возвращении к вирулентности при проведении серийных пассажей на утятах (Woolcock & Crighton, 1979; 1981)

#### **iii) Воздействие на окружающую среду**

Отсутствует

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

#### **i) Животноводство**

Что касается вновь выведенных утят, то аттенуированный живой DHAV-I реплицируется очень быстро и иммунитет устанавливается в течение 48-72 часов после вакцинации.

Иммунитет сохраняется в течение восприимчивого периода жизни (Crighton & Woolcock, 1978). Однако у утят, защищенных посредством вакцинации их родителей, уровень материнского иммунитета уменьшается в первые две недели, но этих утят можно повторно иммунизировать аттенуированным вирусом подкожно или перорально в возрасте 7-10 дней (Hanson & Tripathy, 1976; Tripathy & Hanson, 1986). Иммунитет может быть усилен посредством введения как специфической гипериммунной сыворотки так и антитела яичного желтка, приготовленного из яиц, отложенных активно гипериммунизированными против DHAV-I курами.

Племенные утки, первично вакцинированные живым DHAV-I в возрасте 12 недель, а затем вакцинированные внутримышечно одной дозой инактивированной вакцины против DHAV-I в возрасте 18 недель, должны производить потомство с материнским иммунитетом в течение всего цикла яйцекладки (Woolcock, 1991).

ii) Контроль и искоренение

Племенные утки, вакцинированные живой аттенуированной вакциной против DHAV-I два или три раза на 12, 8, 4 неделе перед периодом яйцекладки, так же как и племенные утки, вакцинированные живой аттенуированной вакциной против DAsV-2 два раза на 12 и 4 неделе перед периодом яйцекладки, должны произвести потомство с пассивным иммунитетом в течение периода размножения. Однако обычно рекомендуется проводить повторную вакцинацию вакциной против DHAV-I каждые 3 месяца и вакциной против DAsV-2 каждые 6 месяцев после начала яйцекладки. Аттенуированную вакцину против DHAV-I можно поставлять в виде лиофилизованного препарата, который перед введением смешивают с разбавителем, содержащим гидроксид алюминия. Его вводят в возрасте 7 недель, а вторую его дозу за 2 недели до начала периода яйцекладки. Это должно обеспечить выведение потомства с материнским иммунитетом во время всего цикла яйцекладки. Информация об использовании вакцины против DAsV-1 отсутствует.

Живая аттенуированная вакцина против DHAV-I и DAsV-1, введенная внутримышечно или подкожно односуточным утятам защищает от болезни в течение периода времени, когда они являются восприимчивыми к болезни. Информация относительно использования вакцины с DAsV-2 с целью активной иммунизации односуточных утят отсутствует.

Племенные утки, первично вакцинированные живым DHAV-I в возрасте 12 недель, а затем вакцинированные внутримышечно одной дозой инактивированной вакцины с DHAV-I в возрасте 18 недель должны производить поколение

с материнским иммунитетом в течение всего периода яйцекладки (Woolcock, 1991).

Во время вспышки для пассивной иммунизации используется яичный белок. Но его эффективность краткосрочна.

### 2.3.3. Стабильность

Водные препараты живых аттенуированных вакцин против DHAV-I, DAstV-1 и DAstV-2 при хранении в замороженном состоянии при температуре -70°C или ниже должны оставаться стабильными в течение, по крайней мере, одного года. После оттаивания эти вакцины должны храниться при температуре 4°C и их необходимо использовать в течение 1 недели. Живые лиофилизированные вакцины можно хранить при температуре 2-8°C и они должны сохранять свою иммуногенность в течение, по крайней мере, одного года.

Инактивированную вакцину против DHAV-I смешивают с адьювантом. Ее можно хранить при температуре 4°C в течение, по крайней мере, 20 месяцев без потери иммуногенности.

Антитело яичного желтка можно хранить в течение 1 года при температуре 4°C.

## 3. **Вакцины, изготовленные посредством биотехнологий**

Отсутствуют.

## **СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

ANCHUN C., MINGSHU W., HONGYI X., DEKANG Z., XINRAN L., HAIJUN C., RENYONG J. & MIAO Y. (2009). Development and application of a reverse transcriptase polymerase chain reaction to detect chinese isolates of duck hepatitis virus type 1. *J. Microbiol. Methods*, 77, 332–336.

ASPLIN F.D. (1965). Duck hepatitis. Vaccination against two serological types. *Vet. Rec.*, 77, 1529–1530.

BAXENDALE W. & MEBATSION T. (2004). The isolation and characterization of Astroviruses from chickens. *Avian Pathol.*, 33, 364–370.

CHALMERS W.S. & WOOLCOCK P.R. (1984). The effect of animal sera on duck hepatitis virus. *Avian Pathol.*, 13, 727–732.

CHEN L., XU Q., ZHANG R., LI J., XIE Z., WANG Y., ZHU Y. & JIANG S. (2012). Complete genome sequence of a duck Astrovirus discovered in eastern China. *J. Virol.*, 86, 13833–13834.

CRIGHTON G.W. & WOOLCOCK P.R. (1978). Active immunisation of ducklings against duck virus hepatitis. *Vet. Rec.*, 102, 358–361.

- DING C. ZHANG D. (2007). Molecular analysis of duck hepatitis virus type 1. *Virology*, 361, 9–17.
- FU Y., PAN M., WANG X., XU Y., YANG H. & ZHANG D. (2008). Molecular detection and typing of duck hepatitis A virus directly from clinical specimens. *Vet. Microbiol.*, 131, 247–257.
- GOUGH R.E., BORLAND E.D., KEYMER I.F. & STUART J.C. (1985). An outbreak of duck hepatitis type II in commercial ducks. *Avian Pathol.*, 14, 227–236.
- GUERIN J.-L., ALBARIC O., NOUTARY V. & BOISSIEU C. (2007). A duck hepatitis virus type I is agent of pancreatitis and encephalitis in Muscovy duckling. In: *Proceedings of the 147th American Veterinary Medicine Association/50th American Association of Avian Pathologists Conference*, 14–18 July 2007, Washington, DC, USA, Abs 4585.
- HAIDER S.A. & CALNEK B.W. (1979). In-vitro isolation, propagation and characterisation of duck hepatitis virus type III. *Avian Dis.*, 23, 715–729.
- HANSON L.E. & TRIPATHY D.N. (1976). Oral immunisation of ducklings with an attenuated hepatitis virus. *Dev. Biol. Stand.*, 33, 357–363.
- JIN X., ZHANG W., ZHANG W., GU C., CHENG G. & HU X. (2008). Identification and molecular analysis of the highly pathogenic duck hepatitis virus type 1 in Hubei Province of China. *Res. Vet. Sci.*, 85, 595–598.
- KIM M.-C., KIM M.-J., KWON Y.-K., LINDBERG A.M., JOH S.J., KWON H.-M., LEE Y.-J. & KWON J.H. (2009). Development of duck hepatitis A virus type 3 vaccine and its use to protect ducklings against infections. *Vaccine*, 27, 6688–6694.
- KIM M.C., KWON Y.K., JOH S.J., KIM S.J., TOLF C., KIM J.H., SUNG H.W., LINDBERG A.M. & KWON J.H. (2007a). Recent Korean isolates of duck hepatitis virus reveal the presence of a new geno- and serotype when compared to duck hepatitis virus type 1 type strains. *Arch. Virol.*, 152, 2059–2072.
- KIM M.C., KWON Y.K., JOH S.J., KWON J.H., KIM J.H. & KIM S.J. (2007b). Development of one-step reverse transcriptase-polymerase chain reaction to detect duck hepatitis virus type 1. *Avian Dis.*, 51, 540–545.
- KIM M.C., KWON Y.K., JOH S.J., KWON J.H. & LINDBERG A.M. (2008). Differential diagnosis between type-specific duck hepatitis virus type 1 (DHV-1) and Korean DHV-1-like isolates using a multiplex polymerase chain reaction. *Avian Pathol.*, 37, 171–177.
- KIM M.C., KWON Y.K., JOH S.J., LINDBERG A.M., KWON J.H., KIM J.H. & KIM S.J. (2006). Molecular analysis of duck hepatitis virus type 1 reveals a novel lineage close to the genus Parechovirus in the family Picornaviridae. *J. Gen. Virol.*, 87, 3307–3316.
- KOCI M.D. & SCHULTZ-CHERRY S. (2002). Avian astroviruses. *Avian Pathol.*, 31, 213–227.
- LIU G., WANG F., NI Z., YUN T., YU B., HUANG J. & CHEN J. (2008). Genetic diversity of the VP1 gene of duck hepatitis virus type i (DHV-I) isolates from Southeast China is related to isolate attenuation. *Virus Res.*, 137, 137–141.

- LIU M., ZHANG T., ZHANG Y., MENG F., LI X., HOU Z., FENG X. & KONG X. (2010). Development and evaluation of a VP1-ELISA for detection of antibodies to duck hepatitis type 1 virus. *J. Virol. Methods*, 169, 66–69.
- SANDHU T.S., CALNEK B.W. & ZEMAN L. (1992). Pathologic and serologic characterisation of a variant of duck hepatitis type I virus. *Avian Dis.*, 36, 932–936.
- TODD D., SMYTH V.J., BALL N.W., DONNELLY B.M., WYLIE M., KNOWLES N.J. & ADAIR B.M. (2009). Identification of chicken enterovirus-like viruses, duck hepatitis virus type 2 and duck hepatitis virus type 3 as Astroviruses. *Avian Pathol.*, 38, 21–30.
- TOTH T.E. (1969). Studies of an agent causing mortality among ducklings immune to duck virus hepatitis. *Avian Dis.*, 13, 834–846.
- TRIPATHY D.N. & HANSON L.E. (1986). Impact of oral immunisation against duck viral hepatitis in passively immune ducklings. *Prev. Vet. Med.*, 4, 355–360.
- TSENG C.H. & TSAI H.J. (2007). Molecular characterization of a new serotype of duck hepatitis virus. *Virus Res.*, 126, 19–31.
- WANG L., PAN M., FU Y. & ZHANG D. (2008). Classification of duck hepatitis virus into three genotypes based on molecular evolutionary analysis. *Virus Genes*, 37, 52–59.
- WOOLCOCK P.R. (1986). An assay for duck hepatitis virus type I in duck embryo liver cells and a comparison with other assays. *Avian Pathol.*, 15, 75–82.
- WOOLCOCK P.R. (1991). Duck hepatitis virus type I: Studies with inactivated vaccines in breeder ducks. *Avian Pathol.*, 20, 509–522.
- WOOLCOCK P.R. (2008a). Duck hepatitis. In: *Diseases of Poultry*, 12th Edition, Saif Y.M., Fadly A.M., Glisson J.R., McDougald L.R., Nolan L.K. & Swayne D.E., eds. Blackwell Publishing, 373–384.
- WOOLCOCK P.R. (2008b). Duck hepatitis. In: *A Laboratory Manual for the Isolation, Identification and Characterization of Avian Pathogens*, 5th Edition, Dufour-Zavala L., Swayne D.E., Glisson J.R., Pearson J.E., Reed W.M., Jackwood M.W. & Woolcock P.R., eds. American Association of Avian Pathologists, Jacksonville, Florida, USA, 175–178.
- WOOLCOCK P.R. & CRIGHTON G.W. (1979). Duck virus hepatitis: serial passage of attenuated virus in ducklings. *Vet. Rec.*, 105, 30–32.
- WOOLCOCK P.R. & CRIGHTON G.W. (1981). Duck virus hepatitis: the effect of attenuation on virus stability in ducklings. *Avian Pathol.*, 10, 113–119.
- YANG M., CHENG A., WANG M. & XING H. (2008). Development and application of a one-step real-time taqman RTPCR assay for detection of Duck hepatitis virus type1. *J. Virol. Methods*, 153, 55–60.
- ZHAO X.L., PHILLIPS R.M., LI G.D. & ZHONG A.Q. (1991). Studies on the detection of antibody to duck hepatitis virus by enzyme-linked immunosorbent assay. *Avian Dis.*, 35, 778–78

НВ: ВПЕРВЫЕ ПРИНЯТ В 1989г. ПОСЛЕДНИЕ ПОПРАВКИ ПРИНЯТЫ В 2017г.