

Иммуногенные свойства изолятов и штаммов *Avibacterium paragallinarum* серогруппы В

М. С. Фирсова¹, В. А. Евграфова², А. В. Потехин³, Р. В. Яшин⁴, О. В. Прунтова⁵, В. С. Русалеев⁶

ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных» (ФГБУ «ВНИИЗЖ»), г. Владимир, Россия

¹ ORCID 0000-0002-1531-004X, e-mail: firsova@arriah.ru

² ORCID 0000-0003-3053-6976, e-mail: evgrafova@arriah.ru

³ ORCID 0000-0002-3529-4809, e-mail: andrey@biokorm.cat

⁴ ORCID 0000-0002-1385-705X, e-mail: yashin@arriah.ru

⁵ ORCID 0000-0003-3143-7339, e-mail: pruntova@arriah.ru

⁶ ORCID 0000-0002-4972-6326, e-mail: rusaleev@arriah.ru

РЕЗЮМЕ

Инфекционное заболевание кур, вызываемое бактерией *Avibacterium paragallinarum*, остается одной из актуальных проблем птицеводческой отрасли, о чем говорят многочисленные сообщения о периодических вспышках инфекционного ринита кур в разных странах мира. Проведенные с 2014 по 2019 г. бактериологические исследования показали, что Российская Федерация эндемична по данному заболеванию, вызываемому *Avibacterium paragallinarum* серогруппы В. Представлены результаты исследования по изучению иммуногенных свойств антигенов 13 изолятов возбудителя инфекционного ринита кур, выделенных из патологического материала, доставленного в ФГБУ «ВНИИЗЖ» с птицефабрик Российской Федерации и Республики Беларусь. Для этого готовили образцы вакцины, содержащей в своем составе инактивированные формалином клетки *Avibacterium paragallinarum* и масляный адъювант. Птиц иммунизировали с последующим контрольным заражением гомологичными и гетерологичными изолятами. Степень проявления клинических признаков заболевания оценивали по методике, предложенной V. E. Soriano. Образец вакцины на основе антигена изолята АрВ08 индуцировал недостаточный иммунный ответ у птиц при инфицировании изолятами АрВ04 и АрВ12. В свою очередь, при заражении изолятом АрВ08 был показан высокий уровень защиты животных. Изоляты АрВ04, АрВ08 и АрВ12 были всесторонне изучены, определены как наиболее перспективные для производства вакцины против инфекционного ринита кур и депонированы в Государственную коллекцию штаммов микроорганизмов ФГБУ «ВНИИЗЖ» под номерами 1116, 5111 и 1818 соответственно. Также была проведена сравнительная оценка иммуногенной активности экспериментальной вакцины против инфекционного ринита кур, включающей антигены штаммов № 1116, 5111 и 1818, с двумя коммерческими препаратами. Экспериментальный препарат показал максимальный процент защиты птиц при заражении гомологичными штаммами *Avibacterium paragallinarum*.

Ключевые слова: инфекционный ринит кур, изоляты, штаммы, вакцина, контрольное заражение, *Avibacterium paragallinarum*.

Благодарность: Работа выполнена за счет средств ФГБУ «ВНИИЗЖ» в рамках тематики научно-исследовательских работ «Ветеринарное благополучие».

Для цитирования: Фирсова М. С., Евграфова В. А., Потехин А. В., Яшин Р. В., Прунтова О. В., Русалеев В. С. Иммуногенные свойства изолятов и штаммов *Avibacterium paragallinarum* серогруппы В. *Ветеринария сегодня*. 2020; 3 (34): 205–212. DOI: 10.29326/2304-196X-2020-3-34-205-212.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Для корреспонденции: Фирсова Маргарита Сергеевна, аспирант, ведущий ветеринарный врач лаборатории профилактики болезней свиней и рогатого скота ФГБУ «ВНИИЗЖ», 600901, Россия, г. Владимир, мкр. Юрьевец, e-mail: firsova@arriah.ru.

UDC 619:616.98:579.843.94:636.52/.58:615.371

Immunogenic characteristics of *Avibacterium paragallinarum* (serogroup B) isolates and strains

M. S. Firsova¹, V. A. Yevgrafova², A. V. Potekhin³, R. V. Yashin⁴, O. V. Pruntova⁵, V. S. Russaleyev⁶

FGBI "Federal Centre for Animal Health" (FGBI "ARRIAH"), Vladimir, Russia

¹ ORCID 0000-0002-1531-004X, e-mail: firsova@arriah.ru

² ORCID 0000-0003-3053-6976, e-mail: evgrafova@arriah.ru

³ ORCID 0000-0002-3529-4809, e-mail: andrey@biokorm.cat

⁴ ORCID 0000-0002-1385-705X, e-mail: yashin@arriah.ru

⁵ ORCID 0000-0003-3143-7339, e-mail: pruntova@arriah.ru

⁶ ORCID 0000-0002-4972-6326, e-mail: rusaleev@arriah.ru

SUMMARY

Infectious disease of chickens caused by the bacterium *Avibacterium paragallinarum* remains one of the urgent problems of the poultry industry, as evidenced by numerous reports of recurrent infectious coryza outbreaks in chickens around the world. Bacteriological tests performed in 2014–2019 demonstrated that the disease caused by *Avibacterium paragallinarum* (serogroup B) is endemic in the Russian Federation. The paper presents the results of tests for immunogenic properties of antigens of 13 infectious coryza isolates recovered from the pathological material delivered to the FGBI "ARRIAH" from poultry farms of the Russian Federation and the Republic of Belarus. For this, samples of the vaccine containing formalin-inactivated *Avibacterium paragallinarum* cells and an oil adjuvant were prepared. The poultry was immunized followed by challenge with homologous and heterologous isolates. The degree of manifestation of the disease clinical signs was assessed according to the method proposed by V. E. Soriano. The vaccine sample based on the antigen of the ApB08 isolate induced an insufficient immune response in poultry when infected with the ApB04 and ApB12 isolates. Conversely, a high level of animal protection was demonstrated when infected with the ApB08 isolate. ApB04, ApB08 and ApB12 isolates were comprehensively studied, identified as the most promising for production of vaccines against infectious coryza in chickens, and deposited in the FGBI "ARRIAH" Microorganism Strain Collection under numbers 1116, 5111 and 1818, respectively. Also, a comparative assessment of potency of the experimental vaccine and two commercial products against infectious coryza, including antigens of strains No. 1116, 5111 and 1818, was performed. The experimental vaccine demonstrated maximum protection against infection with *Avibacterium paragallinarum* homologous strains.

Key words: infectious coryza, isolates, strains, vaccine, challenge infection, *Avibacterium paragallinarum*.

Acknowledgements: The work was carried out at the expense of the FGBI "ARRIAH" within the framework of the research topic "Animal disease freedom".

For citation: Firsova M. S., Yevgrafova V. A., Potekhin A. V., Yashin R. V., Pruntova O. V., Russaleyev V. S. Immunogenic characteristics of *Avibacterium paragallinarum* (serogroup B) isolates and strains. *Veterinary Science Today*. 2020; 3 (34): 205–212. DOI: 10.29326/2304-196X-2020-3-34-205-212.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

For correspondence: Margarita S. Firsova, Post-Graduate Student, Leading Veterinarian, Laboratory for Porcine and Horned Livestock Disease Prevention, FGBI "ARRIAH", 600901, Russia, Vladimir, Yur'evets, e-mail: firsova@arriah.ru.

ВВЕДЕНИЕ

Возбудителем такого инфекционного заболевания кур, как инфекционный ринит (гемофилез), является представитель семейства *Pasteurellaceae* бактерия *Avibacterium paragallinarum*, известная ранее как *Haemophilus paragallinarum*. Болезнь может возникать самостоятельно, а также проявляться в виде ассоциации с другими инфекционными заболеваниями [1–4].

Многочисленные сообщения о периодических вспышках гемофилеза кур в разных странах мира свидетельствуют об актуальности проблемы данного заболевания. Бактериологические исследования, проведенные в ФГБУ «ВНИИЗЖ» с 2014 по 2019 г., показали, что Российская Федерация эндемична по инфекционному риниту кур, вызываемому *Avibacterium paragallinarum* серогруппы В.

Экономические потери при возникновении инфекции могут быть значительными, в первую очередь они обусловлены оставанием цыплят в росте и снижением яйценоскости у кур на пике продуктивности до 40% в течение 2–3 недель [5, 6]. Заболевание характеризуется отеком гиподермы кожи головы и серозно-фибринозным воспалением инфраорбитальных синусов, воздухоносных мешков и слизистой оболочки верхних дыхательных путей. При ассоциативном течении может увеличиваться продолжительность и тяжесть заболевания. Нарушение микроклимата в птичнике может провоцировать появление инфекции, что впоследствии приводит к увеличению падежа птиц до 20–40% [7].

Источником инфекции являются больные особи. Возбудитель может циркулировать в стаде длительное время, это особенно актуально для небольших ферм, содержащих птицу разных возрастов. При возникновении заболевания в таких хозяйствах очень трудно избавиться от патогена или контролировать его. Воз-

будитель передается аэрогенно и с питьевой водой. Инкубационный период составляет от 1 до 10 сут при продолжительности заболевания от 14 до 21 сут.

Одной из наиболее эффективных мер борьбы с инфекционным ринитом кур является специфическая профилактика. Вакцинация позволяет снизить зависимость от постоянного применения антибактериальных препаратов, что, в свою очередь, обеспечивает экономию средств, а также предотвращает проблемы, связанные с антибиотикорезистентностью микроорганизмов или остаточными количествами антибиотиков в продукции птицеводства. Однако основным препятствием при изготовлении эффективной инактивированной вакцины является выбор производственных штаммов возбудителя, при этом следует учитывать, что антигенная структура *A. paragallinarum* сложна и разнообразна, а индуцируемый иммунный ответ у кур является серотипспецифическим, с частичной перекрестной защитой между отдельными серотипами.

Серологическое типирование *A. paragallinarum* наиболее часто проводят по двум взаимосвязанным схемам. По схеме Л. Пейджа в реакции агглютинации определяют три серогруппы возбудителя – А, В и С, по схеме К. Кумэ в реакции торможения гемагглютинации – девять серотипов (А1–А4, В-1 и С1–С4) [8, 9].

В настоящее время в Российской Федерации зарегистрирован ряд зарубежных препаратов для специфической профилактики инфекционного ринита кур, которые различаются по составу, технологии производства, схеме применения и эффективности. Большинство из них обеспечивают защиту против наиболее распространенных серотипов возбудителя, что является их несомненным достоинством. Универсальность препаратов обусловлена наличием перекрестной защиты между серотипами внутри серогруппы А, а также

между отдельными серотипами серогруппы С. Намного сложнее обстоит дело с выбором штамма серогруппы В. По схеме, предложенной К. Кумэ, в серогруппе В имеется только один серотип (В-1), однако по уровню иммуногенной активности между отдельными штаммами/изолятами наблюдается лишь частичная перекрестная защита [10–12].

В последние годы в Европе и Азии участились вспышки, обусловленные *A. paragallinarum* серотипа В-1, иногда на фоне использования коммерческих вакцин против инфекционного ринита кур [5]. При этом причина слабой перекрестной защиты между различными штаммами серотипа В-1 до сих пор не установлена. По данным ряда исследователей, данный серотип получил широкое распространение в Аргентине, Бразилии, Китае, Эквадоре, Египте, Индонезии, Мексике, Перу, Южной Африке, Испании, Соединенных Штатах Америки и Зимбабве, на Филиппинах [6, 11].

Поскольку различные штаммы серотипа В-1 обеспечивают лишь частичную перекрестную защиту между собой, то априори можно предполагать, что эффективная вакцина может быть изготовлена только из нескольких штаммов, выделенных в конкретном географическом регионе, где данный серотип является эндемичным. Кроме того, эффективными могут оказаться и коммерческие вакцины, содержащие в составе антигены нескольких вариантов штаммов серотипа В-1.

Слабая перекрестная защита между различными штаммами/изолятами серогруппы В, возможно, связана с их высокой вирулентностью и ведущей ролью различных факторов патогенности [3, 13].

При исследовании патологического материала от птиц, доставленного в период с 2014 по 2018 г. в ФГБУ «ВНИИЗЖ» из различных регионов Российской Федерации и Республики Беларусь, бактериологическим методом было получено 13 изолятов возбудителя

инфекционного ринита кур. Анализ серологического профиля патогена показал преобладание циркуляции *A. paragallinarum* серогруппы В [3].

В 2016 г. на двух крупных птицефабриках Российской Федерации, неблагополучных по гемофилеу и применявших коммерческую трехвалентную эмульсионную вакцину против инфекционного ринита кур, при серологическом типировании изолятов, выделенных из материала от больной птицы, была установлена их принадлежность к серогруппе В. Данный факт позволяет усомниться в универсальности используемой вакцины на территории нашей страны. Поэтому проведение исследований по поиску перспективных штаммов *A. paragallinarum* серогруппы В будет способствовать созданию конкурентоспособной отечественной вакцины.

Целью данных исследований явилось изучение иммуногенных свойств изолятов и штаммов *A. paragallinarum* серогруппы В, выделенных на территории Российской Федерации и Республики Беларусь, и возможность их использования при разработке вакцинных препаратов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Изоляты возбудителя. В работе использовали 13 изолятов (АрВ01–АрВ13) *A. paragallinarum* серогруппы В, выделенных в ФГБУ «ВНИИЗЖ» из материала от кур с птицефабрик Российской Федерации и Республики Беларусь [3]. Происхождение изолятов представлено в таблице 1.

Культивирование изолятов. В качестве ростовой среды для культивирования *A. paragallinarum* использовали агар и бульон Колумбия (Becton Dickinson and Co., США), содержащие такие факторы роста: 20 мкг/мл никотинамидадениндинуклеотида (NAD, AppliChem, Германия) и 5% сыворотки крови лошади.

Таблица 1
Происхождение изолятов *A. paragallinarum*

Table 1
***A. paragallinarum* isolate origin**

Наименование изолята	Локализация возбудителя при выделении	Год выделения	Регион
АрВ01	Подглазничные синусы	2014	Костромская область
АрВ02	Конъюнктивный мешок	2014	Московская область
АрВ03	Подглазничные синусы	2015	Московская область
АрВ04	Подглазничные синусы	2015	Республика Беларусь
АрВ05	Подглазничные синусы	2016	Республика Татарстан
АрВ06	Легкие	2016	Владимирская область
АрВ07	Подглазничные синусы	2016	Ярославская область
АрВ08	Подглазничные синусы	2016	Оренбургская область
АрВ09	Подглазничные синусы	2017	Ульяновская область
АрВ10	Подглазничные синусы	2017	Московская область
АрВ11	Подглазничные синусы	2017	Владимирская область
АрВ12	Подглазничные синусы	2018	Республика Мордовия
АрВ13	Подглазничные синусы	2018	Ярославская область

Культивирование бактерий на агаровой среде проводили при температуре 37 °C в течение 24 ч в условиях повышенного содержания углекислого газа, в жидкой питательной среде – при температуре 37 °C в течение 18 ч в условиях обычной атмосферы в орбитальном шейкере-инкубаторе при 150 об/мин.

Получение антигенов. Инактивацию изолятов *A. paragallinarum* проводили раствором формальдегида при температуре 37 °C в течение 48 ч, при этом конечная концентрация формалина составляла 0,2% по объему. Затем клетки осаждали центрифугированием при 3000 g в течение 20 мин при температуре 4 °C, осадок ресуспендировали в стерильном фосфатно-солевом буферном растворе с pH 7,4 до концентрации 100 ед. (10^{10} м. к./см³) по оптическому стандарту мутности. Полученные антигены хранили при температуре (2–8) °C [3].

Подопытная птица. В работе использовали кур 10-недельного возраста кросса Хайсекс Браун. Птицы были доставлены из хозяйства, благополучного по инфекционному риниту кур. Во всех экспериментах количество птиц в опытных и контрольных группах составляло по 10 голов.

Все эксперименты на подопытных птицах проводились в строгом соответствии с межгосударственными стандартами по содержанию и уходу за лабораторными животными ГОСТ 33216-2014 и ГОСТ 33215-2014, принятыми Межгосударственным советом по стандартизации, метрологии и сертификации, а также согласно требованиям Директивы 2010/63/EU Европейского парламента и Совета Европейского союза от 22.09.2010 по охране животных, используемых в научных целях.

Изготовление и применение образцов вакцин. Для изготовления опытных моно- и полиштаммовых образцов вакцин использовали антигены 13 изолятов *A. paragallinarum*. Суспензии антигенов смешивали с масляным адъювантом Montanide ISA 70 VG (Seppic, Франция) в соотношении 30:70 по весу на лабораторном гомогенизаторе Silverson L4RT. Концентрация каждого антигена в прививной дозе 0,5 см³ составляла 5×10^8 м. к. по оптическому стандарту мутности. Препараты вводили двукратно с интервалом 21 сут подкожно, в область средней трети шеи с дорсальной стороны в каудальном направлении.

В качестве сравнительного контроля использовали две коммерческие вакцины, зарегистрированные на территории Российской Федерации.

Определение иммуногенных свойств образцов вакцин. Иммуногенные свойства антигенов определяли методом вакцинации и последующего контрольного заражения иммунизированных птиц гомологичным и гетерологичными изолятами. Кур заражали интраназально суточными бульонными культурами изолятов в дозе 0,5 см³, содержащей 10^8 КОЕ возбудителя.

Учет результатов заражения. Степень проявления клинических признаков заболевания оценивали по методике, предложенной V. E. Soriano [14].

Тяжесть поражения верхних дыхательных путей у зараженной птицы оценивали по балльной системе:

- 0 – отсутствие клинических признаков;
- 1 – слабые истечения из носовых ходов и/или незначительное опухание области подглазничных синусов;
- 2 – умеренное истечение из носовых ходов и/или умеренное опухание области подглазничных синусов;
- 3 – обильные носовые истечения и/или выраженное опухание подглазничных синусов;

4 – обильные носовые истечения и выраженное опухание подглазничных синусов, хрипы.

Проводили ежедневный учет клинических признаков у каждой птицы. Через 7 сут после заражения суммировали баллы по каждой группе, которые делили на общее количество зараженных птиц.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Используемые в работе изоляты АрВ01–АрВ13 *A. paragallinarum* были выделены в период с 2014 по 2018 г. от птиц с респираторной патологией в возрасте от 38 до 211 сут из хозяйств Владимирской, Костромской, Московской, Оренбургской, Ульяновской и Ярославской областей, республик Мордовия и Татарстан, один изолят был выделен от птиц из Республики Беларусь.

Изоляты АрВ04 и АрВ08 были выделены при вспышке инфекционного ринита от кур спустя 1–2 мес. после применения коммерческих вакцин, содержащих в составе антигены серогрупп А, В и С.

В большинстве случаев клинические признаки у больных кур были однотипны и проявлялись в виде опухания подглазничных синусов и конъюнктивальных мешков, иногда наблюдали водянистые истечения из носовых отверстий. У некоторых особей отмечали ротовое дыхание с хрипами вследствие закупорки носовых ходов. Большинство изолятов *A. paragallinarum* были выделены от птиц яичного направления продуктивности. Основным местом локализации возбудителя были подглазничные синусы. На агаровых средах через 24 ч инкубирования культуры формировали колонии круглой и выпуклой формы, с ровными краями и гладкой поверхностью, серого цвета, диаметром 0,5–1,0 мм (S-форма). Характерным признаком 24-часовых культур являлась флуоресценция колоний в косопроходящем свете, что свидетельствовало о наличии капсулы у бактерий.

В предыдущих исследованиях мы проводили изучение вирулентных свойств изолятов *A. paragallinarum* серогруппы В для кур. При заражении птиц различными изолятами *A. paragallinarum* отмечали одинаковую продолжительность периодов течения заболевания. У больных кур наблюдали сходные клинические признаки, проявляющиеся ринитом, синуситом и конъюнктивитом [1].

При изучении иммуногенных свойств изолятов вначале была проведена пробная иммунизация ($n = 1$) цыплят образцом вакцины с антигеном АрВ08 с наименьшим заражением гомологичным и гетерологичными изолятами. Выбор данного изолята был обусловлен тем, что при культивировании на питательной среде он накапливался в высокой концентрации с сохранением стабильной гемагглютинирующей активности и высокого уровня вирулентности.

Результаты заражения птиц, иммунизированных образцом вакцины с антигеном изолята АрВ08, представлены в таблице 2.

Эксперимент показал, что иммунизация образцом вакцины с антигеном изолята АрВ08 обеспечивала защиту птиц на уровне не менее 80% при заражении гомологичным и гетерологичными изолятами, кроме АрВ04 и АрВ12. При заражении птиц контрольных групп наблюдали заболеваемость на уровне не менее 80% с развитием типичных для инфекционного ринита симптомов. Первые клинические признаки у птиц

Таблица 2

Иммуногенные свойства антигена ApB08 при заражении кур гомологичным и гетерологичными изолятами ($n = 1$)

Table 2

Immunogenic characteristics of ApB08 antigen when infecting chickens with the homologous and heterologous isolates ($n = 1$)

Изолят \ Группа	Вакцина с антигеном изолята ApB08		Контроль	
	% P	S	% D	S
ApB01	100	0	100	1,8
ApB02	100	0	80	1,8
ApB03	80	0,8	100	2,2
ApB04	20	2,8	100	3,0
ApB05	100	0	100	1,6
ApB06	100	0	100	1,8
ApB07	80	0,6	90	1,2
ApB08	100	0	100	2,2
ApB09	80	0,8	100	2,4
ApB10	100	0	100	1,8
ApB11	100	0	100	1,6
ApB12	0	3,0	100	3,2
ApB13	80	0,8	100	2,4

% P – процент защиты, наблюдаемый при заражении (protection rate observed at the infection);

% D – процент заболевших животных при заражении (percent of the diseased animals at the infection);

S – тяжесть проявления клинических признаков (severity of the manifested clinical signs) (no V. E. Soriano [12]).

наблюдали через 24–48 ч после заражения. Клинически заболевание проявлялось водянистым истечением из носовых отверстий и незначительным одно- или двусторонним опуханием подглазничных синусов. В ряде случаев клинические признаки ограничивались указанными симптомами. У некоторых птиц экссудат постепенно мутнел и приобретал слизистую консистенцию, вследствие чего obturated носовые отверстия, и птица начинала дышать через рот. У большинства зараженных птиц заболевание сопровождалось выраженным опуханием подглазничных синусов и конъюнктивальных мешков, при этом у больных кур отмечали угнетение, сонливость и плохое поедание

корма. Иногда, вследствие закупорки слезно-носового канала, экссудат через небную щель проникал в ротовую полость. Вытекающим экссудатом загрязнялись перья в области шеи и крыльев. У некоторых птиц развивался односторонний или двусторонний катаральный конъюнктивит, впоследствии в экссудате появлялся фибрин, веки опухали, глазная щель сужалась. При локализации инфекции в более глубоких отделах респираторного тракта у некоторых особей дыхание сопровождалось хрипами. Самые тяжелые симптомы заболевания наблюдали у птиц в группах, зараженных изолятами ApB03, ApB04, ApB08, ApB09, ApB12 и ApB13.

Таблица 3

Иммуногенные свойства антигенов ApB04, ApB08, ApB12 при контрольном заражении гомологичными и гетерологичными изолятами ($n = 3$)

Table 3

Immunogenic characteristics of ApB04, ApB08, ApB12 antigens at the control challenge with the homologous and heterologous isolates ($n = 3$)

Группа птиц	Антиген изолята	% защиты птиц при контрольном заражении изолятом		
		ApB04	ApB08	ApB12
Иммунизированные	ApB04	93,3 ± 13,1	20,0	26,7 ± 13,1
	ApB08	6,7 ± 13,1	86,7 ± 13,1	6,7 ± 13,1
	ApB12	13,3 ± 13,1	20,0	93,3 ± 13,1
Интактные	—	0	0	6,7 ± 13,1

Таблица 4

Сравнительная оценка иммуногенности коммерческих поливалентных вакцин и экспериментальной моновалентной вакцины после заражения штаммами № 1116, 5111, 1818 *A. paragallinarum* ($n = 3$)

Table 4

Comparative assessment of potency of the commercial polyvalent vaccines and the experimental monovalent vaccine after infection with *A. paragallinarum* strains No. 1116, 5111, 1818 ($n = 3$)

Вакцина	% защиты птиц при контрольном заражении штаммом		
	№ 1116	№ 5111	№ 1818
Коммерческая вакцина 1	46,6 ± 13,1	86,6 ± 6,5	53,3 ± 17,3
Коммерческая вакцина 2	40,0 ± 11,3	90,0 ± 11,3	53,3 ± 13,1
Вакцина ФГБУ «ВНИИЗЖ»	96,6 ± 6,5	100	90,0 ± 11,3
Контроль	0	0	0

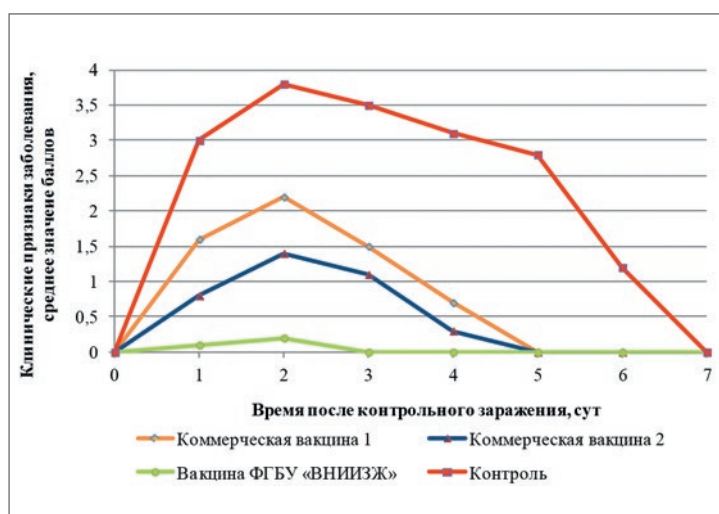


Рис. 1. Клинические профили вакцинированных и невакцинированных птиц при заражении штаммом № 1116 *A. paragallinarum*

Fig. 1. Clinical profiles of vaccinated and non-vaccinated poultry infected with *A. paragallinarum* strain No. 1116

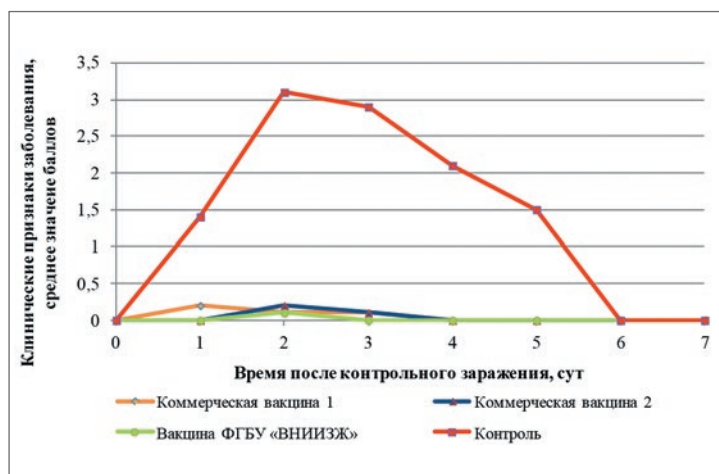


Рис. 2. Клинические профили вакцинированных и невакцинированных птиц при заражении штаммом № 5111 *A. paragallinarum*

Fig. 2. Clinical profiles of vaccinated and non-vaccinated poultry infected with *A. paragallinarum* strain No. 5111

Для подтверждения выявленных различий протективных свойств антигенов АрВ04, АрВ08 и АрВ12 был проведен дополнительный эксперимент по иммунизации с последующим контрольным заражением гомологичными и гетерологичными изолятами (табл. 3).

При заражении иммунизированной птицы гомологичными изолятами процент защиты составлял не менее $86,7 \pm 13,1\%$, а при заражении гетерологичными изолятами – не превышал $26,7 \pm 13,1\%$ ($p \leq 0,05$). В результате проведенных исследований было установлено, что по иммуногенной активности образцы с изолятами АрВ04, АрВ08 и АрВ12 существенно различаются между собой и поэтому являются перспективными для производства вакцины. Изоляты были всесторонне изучены и депонированы в Государственную коллекцию штаммов микроорганизмов ФГБУ «ВНИИЗЖ» как штаммы № 1116, 5111, 1818 соответственно.

На следующем этапе работы провели сравнительные испытания экспериментальной моновалентной вакцины производства ФГБУ «ВНИИЗЖ», включающей антигены штаммов № 1116, 5111, 1818, с двумя коммерческими поливалентными вакцинами (табл. 4).

Результаты проведенных исследований показали, что обе коммерческие вакцины вызывают недостаточный иммунный ответ у птиц при заражении штаммами № 1116 и 1818.

Кроме определения иммуногенности исследуемых вакцин провели оценку клинического профиля вакцинированных и невакцинированных птиц, которая включала определение тяжести течения и продолжительности заболевания при заражении штаммами № 1116, № 5111 и 1818 *A. paragallinarum* (рис. 1–3).

Как видно из рисунка 1, после контрольного заражения вакцинированных и невакцинированных птиц штаммом № 1116 инкубационный период заболевания составлял менее 24 ч. Максимальное развитие клинических признаков заболевания наблюдали спустя 48 ч после заражения. По данным ряда исследователей [8, 9, 11], при интраназальном заражении птиц инкубационный период составляет 24–48 ч, при контакте в клетках больной и здоровой птицы – 3 сут, а при аэрогенной передаче возбудителя – до 6 сут. На третьи сутки у птиц контрольной группы и иммунизированных коммерческими вакцинами наблюдали снижение выраженности симптомов заболевания, а в группе птиц, иммунизированных вакциной ФГБУ «ВНИИЗЖ» из гомо-

логичного штамма, – полное выздоровление. Продолжительность течения заболевания у птиц контрольной группы составляла 7 сут, а у кур, иммунизированных коммерческими вакцинами, – 5 сут.

Как видно на рисунке 2, инкубационный период заболевания у птиц контрольной группы составлял менее 24 ч, а максимальное развитие клинических признаков заболевания наблюдали через 48 ч после заражения, при этом величина среднего балла составила 3,1. Вакцина ФГБУ «ВНИИЗЖ» обеспечила выраженную защиту птиц при контрольном заражении штаммом № 5111. Обе коммерческие вакцины также показали высокую степень защиты при заражении штаммом № 5111, что свидетельствует о наличии перекрестного иммунитета между штаммами.

Как видно из рисунка 3, результаты заражения штаммом № 1818 во многом сходны с таковыми для штамма № 5111. Наиболее выраженное развитие клинических признаков заболевания у птиц контрольной группы наблюдали спустя 48 ч после заражения, при этом средний балл составил 3,8. У большинства заболевших птиц клинические признаки ограничивались слабым, умеренным или выраженным опуханием подглазничных синусов и конъюнктивальных мешков, у больных кур отмечали угнетение, сонливость и плохое поедание корма. На третьи сутки после заражения у птиц контрольной и опытных групп наблюдали снижение выраженности симптомов заболевания. Продолжительность течения заболевания у птиц контрольной группы составила 7 сут, у кур, иммунизированных коммерческими вакцинами, – 4 и 5 сут соответственно, а у птиц, привитых вакциной ФГБУ «ВНИИЗЖ», – 3 сут. По данным ряда исследователей [7, 8, 11], длительность заболевания кур в естественных условиях обычно составляет 2–3 недели, а при экспериментальной инфекции – 5–7 сут.

Частичная перекрестная защита между вакцинным штаммом и полевыми изолятами *A. paragallinarum* серогруппы В не обеспечивает положительного эффекта при иммунизации птиц [10, 11, 12, 13]. Поэтому в связи с вероятностью отсутствия перекрестного защитного механизма между штаммами *A. paragallinarum* серогруппы В наиболее предпочтительными являются вакцины, содержащие максимально возможный набор штаммов возбудителя, актуальных для региона применения. Кроме того, практика многих стран показывает, что наиболее эффективным в данной ситуации является применение аутогенных вакцин, с помощью которых удастся получить эффект против любого циркулирующего серотипа возбудителя [11].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Изучение иммуногенных свойств антигенов 13 изолятов *A. paragallinarum* серогруппы В, выделенных из патологического материала от кур, доставленного в ФГБУ «ВНИИЗЖ» с птицефабрик Российской Федерации и Республики Беларусь, показало, что образцы вакцины на основе антигенов изолятов АрВ04, АрВ08 и АрВ12 индуцировали недостаточный иммунный ответ у птиц при перекрестном заражении гетерологичными изолятами. Процент защиты составил $26,7 \pm 13,1\%$, в свою очередь, при заражении гомологичными изолятами был показан высокий уровень защиты – $86,7 \pm 13,1\%$ ($p \leq 0,05$). Изоляты АрВ04, АрВ08 и АрВ12 были всесторонне изучены, определены как наиболее

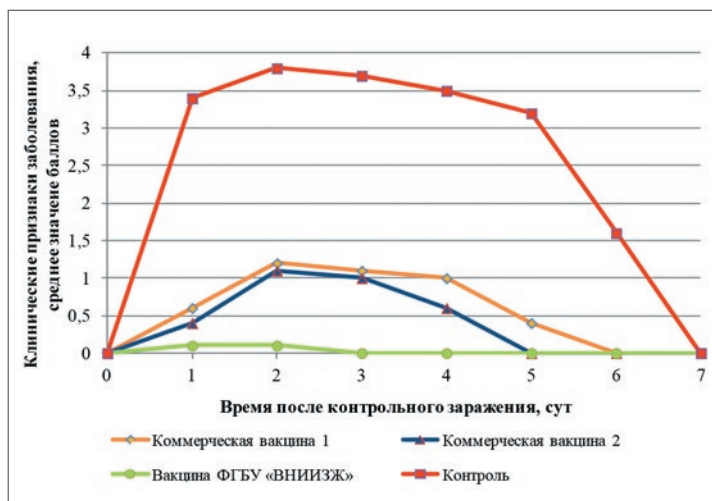


Рис. 3. Клинические профили вакцинированных и невакцинированных птиц при заражении штаммом № 1818 *A. paragallinarum*

Fig. 3. Clinical profiles of vaccinated and non-vaccinated poultry infected with *A. paragallinarum* strain No. 1818

перспективные для производства вакцины против инфекционного ринита кур и депонированы в коллекцию штаммов микроорганизмов ФГБУ «ВНИИЗЖ» под номерами 1116, 5111 и 1818 соответственно.

При проведении сравнительной оценки иммуногенной активности экспериментальной вакцины против инфекционного ринита кур, включающей антигены штаммов № 1116, 5111 и 1818, с двумя коммерческими препаратами установлено, что вакцина производства ФГБУ «ВНИИЗЖ» показала уровень защиты птиц при заражении гомологичными штаммами *A. paragallinarum* не менее $90,0 \pm 11,3\%$, а коммерческие биопрепараты – $46,6 \pm 13,1\%$ и $53,3 \pm 17,3\%$ соответственно.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ (п. п. 6–14 см. REFERENCES)

- Евграфова В. А., Потехин А. В. Вирулентность изолятов возбудителя инфекционного ринита кур. *Ветеринария сегодня*. 2017; 4 (23): 28–32. Режим доступа: <https://veterinary.arriah.ru/jour/article/view/329>.
- Болезни домашних и сельскохозяйственных птиц. Под ред. Б. У. Кэлнека. М.: Аквариум; 2011. 1232 с.
- Потехин А. В., Евграфова В. А., Андрейчук Д. Б. Гемагглютинирующие и антигенные свойства изолятов *Avibacterium paragallinarum*, выделенных на территории Российской Федерации и Республики Беларусь. *Ветеринария сегодня*. 2018; 4 (27): 31–38. DOI: 10.29326/2304-196X-2018-4-27-31-38.
- Рождественская Т. Н., Кононенко Е. В., Емельянова С. А., Яковлев С. С., Теймуразов М. Г., Светоч Э. А. и др. Гемофилез птиц и птицепродукты. 2016; 4: 50–53. eLIBRARY ID: 26538824.
- Толстых Н. А., Юшков Ю. Г., Городов В. С., Леонов С. В. Гемофилез птиц: диагностика и профилактика. *Актуальные проблемы сельского хозяйства горных территорий: материалы VI Междунар. научно-практ. конф.* Горно-Алтайск; 2017: 274–277. eLIBRARY ID: 30313013.

REFERENCES

- Evgrafova V. A., Potekhin A. V. Virulence of infectious coryza causative agent isolates. *Veterinary Science Today*. 2017; 4 (23): 28–32. Available at: <https://veterinary.arriah.ru/jour/article/view/329>. (in Russian)
- Diseases of backyard and commercial poultry. Ed. by of B. U. Kelneck, M.: Aquarium; 2011. 1232 p. (in Russian)
- Potekhin A. V., Yevgrafova V. A., Andreychuk D. B. Hemagglutination and antigenic properties of *Avibacterium paragallinarum* isolates recovered in the Russian Federation and Republic of Belarus. *Veterinary Science Today*. 2018; 4 (27): 31–38. DOI: 10.29326/2304-196X-2018-4-27-31-38.
- Rozhdestvenskaya T. N., Kononenko Ye. V., Yemelyanova S. A., Yakovlev S. S., Teimurazov M. G., Svetoch E. A., et al. Glasser's disease [Gemofilez

ptic]. *Poultry and Poultry Products*. 2016; 4: 50–53. eLIBRARY ID: 26538824. (in Russian)

5. Tolstich N. A., Ushcov U. G., Gorodov V. S., Leonov S. V. Infectious coryza: diagnosis and prevention. *Current problems of agriculture in mountainous areas [Aktual'nye problemy sel'skogo khozyajstva gornyh territorij]: materials of the VI International Scientific and Practical Conf. Gorno-Altaysk*; 2017: 274–277. eLIBRARY ID: 30313013. (in Russian)

6. Blackall P. J., Soriano-Vargas E. Infectious coryza and related bacterial infections. In: *Diseases of Poultry*. Ed. by D. E. Swayne. 13th ed. Ames, IA, USA; 2013; Chap. 20: 859–873. DOI: 10.1002/9781119421481.ch20.

7. Blackall P. J. Infectious coryza: overview of the disease and new diagnostic options. *Clin. Microbiol. Rev.* 1999; 12 (4): 627–632. PMID: PMC88928.

8. Blackall P. J., Eaves L. E., Rogers D. J. Proposal of a new serovar and altered nomenclature for *Haemophilus paragallinarum* in the Kume hemagglutinin scheme. *J. Clin. Microbiol.* 1990; 28: 1185–1187. PMID: PMC267902.

9. Kume K., Sawata A., Nakai T., Matsumoto M. Serological classification of *Haemophilus paragallinarum* with a hemagglutinin system. *J. Clin. Microbiol.* 1983; 17 (6): 958–964. PMID: PMC272783.

10. Yamaguchi T., Blackall P. J., Takigami S., Iritani Y., Hayashi Y. Immunogenicity of *Haemophilus paragallinarum* serovar B strains. *Avian Dis.* 1991; 35 (4): 965–968. DOI: 10.2307/1591636.

11. Jacobs A. A., van den Berg K., Malo A. Efficacy of a new tetravalent coryza vaccine against emerging variant type B strains. *Avian Pathol.* 2003; 32 (3): 265–269. DOI: 10.1080/0307945031000097859.

12. Terzolo H. R., Sandoval V. E., Pondal F. G. Evaluation of inactivated infectious coryza vaccines in chickens challenged by serovar B strains of *Haemophilus paragallinarum*. *Avian Pathol.* 1997; 26 (2): 365–376. DOI: 10.1080/03079459708419219.

13. Morales-Erasto V., Posadas-Quintana J. de J., Fernández-Díaz M., Saravia L. E., Martínez-Castañeda J. S., Blackall P. J., Soriano-Vargas E. An evaluation of serotyping of *Avibacterium paragallinarum* by use of a multiplex polymerase chain. *J. Vet. Diagn. Invest.* 2014; 26 (2): 272–276. DOI: 10.1177/1040638714523612.

14. Soriano V. E., Longinos G. M., Fernández R. P., Velásquez Q. E., Ciprián C. A., Salazar-García F., Blackall P. J. Virulence of the nine serovar reference strains of *Haemophilus paragallinarum*. *Avian Dis.* 2004; 48 (4): 886–889. DOI: 10.1637/7188-033104R1.

Поступила 14.06.2020

Принята в печать 28.07.2020

Received on 14.06.2020

Approved for publication on 28.07.2020

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ / INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Фирсова Маргарита Сергеевна, аспирант, ведущий ветеринарный врач лаборатории профилактики болезней свиней и рогатого скота ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия.

Евграфова Валерия Андреевна, кандидат ветеринарных наук, заведующий сектором лаборатории профилактики болезней свиней и рогатого скота ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия.

Потехин Андрей Владимирович, кандидат ветеринарных наук, технический специалист Biokorm International, Испания.

Яшин Роман Владимирович, кандидат биологических наук, заведующий лабораторией профилактики болезней свиней и рогатого скота ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия.

Прунтова Ольга Владиславовна, доктор биологических наук, профессор, главный эксперт информационно-аналитического центра ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия.

Русалеев Владимир Сергеевич, доктор ветеринарных наук, профессор, ученый секретарь ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия.

Margarita S. Firsova, Post-Graduate Student, Leading Veterinarian, Laboratory for Porcine and Horned Livestock Disease Prevention, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia.

Valeria A. Yevgrafova, Candidate of Science (Veterinary Medicine), Head of Sector, Laboratory for Porcine and Horned Livestock Disease Prevention, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia.

Andrey V. Potekhin, Candidate of Science (Veterinary Medicine), Technical Specialist, Biokorm International, Spain.

Roman V. Yashin, Candidate of Science (Biology), Head of Laboratory for Porcine and Horned Livestock Disease Prevention, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia.

Olga V. Pruntova, Doctor of Science (Biology), Professor, Chief Expert of the Information and Analysis Centre, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia.

Vladimir S. Russaleyev, Doctor of Science (Veterinary Medicine), Professor, Scientific Secretary, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia.