



# ВИРУЛЕНТНОСТЬ ИЗОЛЯТОВ ВОЗБУДИТЕЛЯ ИНФЕКЦИОННОГО РИНИТА КУР

В. А. Евграфова<sup>1</sup>, А. В. Потехин<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Ведущий ветеринарный врач, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: danilova@arriah.ru

<sup>2</sup> Заведующий лабораторией, кандидат ветеринарных наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: potehin@arriah.ru

## РЕЗЮМЕ

Определена вирулентность 10 изолятов возбудителя инфекционного ринита кур, выделенных от больных птиц в возрасте от 38 до 211 суток из хозяйств Владимирской, Московской, Костромской, Ярославской, Оренбургской и Ульяновской областей, а также Республик Мордовия и Татарстан; один изолят был выделен от птиц из Республики Беларусь. Критерием оценки вирулентности *Avibacterium paragallinarum* явилась балльная система, основанная на тяжести течения воспалительных процессов в верхних дыхательных путях у экспериментально зараженных кур. Девять из десяти изолятов оказались патогенными для птиц. При заражении кур различными изолятами *A. paragallinarum* отмечали одинаковую продолжительность периодов течения заболевания. У больных птиц выявляли сходные клинические признаки: ринит, синусит и конъюнктивит. Несмотря на однотипную динамику развития заболевания у зараженных птиц, вирулентность изолятов оказалась различной. Наиболее вирулентными оказались изоляты, выделенные из хозяйств Костромской и Оренбургской областей, а также Республик Татарстан и Мордовия. У больных птиц наблюдали обильные носовые истечения с выраженным опуханием области подглазничных синусов. Изоляты *A. paragallinarum*, выделенные из хозяйств Ярославской и Ульяновской областей, а также Республики Беларусь, проявили среднюю вирулентность. Признаки заболевания у кур проявлялись в виде умеренного истечения из носовых ходов с опуханием области подглазничных синусов. Низкой вирулентностью характеризовались изоляты, выделенные из хозяйств Московской области. У больных птиц регистрировали слабые истечения из носовых ходов с незначительным опуханием области подглазничных синусов. Изолят, выделенный из хозяйства Владимирской области, оказался авирулентным, при этом клинические признаки заболевания отсутствовали. С использованием предложенной схемы дифференциации показана неоднородность изолятов *A. paragallinarum* по проявлению вирулентных свойств.

Ключевые слова: инфекционный ринит (гемофилез) кур, изоляты, *Avibacterium paragallinarum*, вирулентность.

# VIRULENCE OF INFECTIOUS CORYZA CAUSATIVE AGENT ISOLATES

V. A. Evgrafova<sup>1</sup>, A. V. Potekhin<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Leading Veterinarian, FGBI "ARRIAH", Vladimir, e-mail: danilova@arriah.ru

<sup>2</sup> Head of Laboratory, Candidate of Science (Veterinary Medicine), FGBI "ARRIAH", Vladimir, e-mail: potehin@arriah.ru

## SUMMARY

Virulence of 10 isolates of infectious coryza agent recovered from diseased 38-211-day-old chicken on poultry farms in the Vladimir, Moscow, Kostroma, Yaroslavl, Orenburg and Ulyanovsk Oblasts, as well as the Republic of Mordovia and Tatarstan was determined. One isolate was recovered from poultry in the Republic of Belarus. The criteria for virulence determination of *Avibacterium paragallinarum* were assessed according to a point system based on severity of inflammatory processes in upper respiratory airways of experimentally infected chicken. Nine out of ten isolates were found pathogenic for poultry. Chicken infected with different isolates of *A. paragallinarum* demonstrated the same duration of the disease stages. Diseased poultry showed similar clinical signs: rhinitis, sinusitis and conjunctivitis. In spite of the typical dynamic of the disease in infected poultry, the virulence of the isolates was different. The most virulent were isolates recovered from poultry farms in the Kostroma and Orenburg Oblasts, as well as the Republic of Tatarstan and Mordovia. The diseased chicken demonstrated abundant nasal discharge with marked swelling of the infraorbital sinus. *A. paragallinarum* isolates recovered in the farms of the Yaroslavl and Ulyanovsk Oblasts, as well as the Republic of Belarus showed medium virulence. The infection was characterized by moderate nasal discharges with swelling in the area of the infraorbital sinuses. Isolates recovered from the farms in the Moscow Oblast had low virulence. Infected poultry demonstrated minor discharge from nasal passages with insignificant swelling in infraorbital sinuses. The isolate recovered in the Vladimir Oblast was found avirulent, the clinical signs were absent. Based on the suggested differentiation scheme the inhomogeneity of virulent properties of *A. paragallinarum* isolates was shown.

Key words: infectious coryza (Haemophilus infection) in chickens, isolates, *Avibacterium paragallinarum*, virulence.

## ВВЕДЕНИЕ

Инфекционный ринит (гемофилез) – контагиозное заболевание кур, вызываемое бактериями *Avibacterium paragallinarum*. Заболевание характеризуется катаральным воспалением слизистых оболочек носовой полости, конъюнктивы и воздухоносных пазух, а также подкожным отеком головы и, в редких случаях, пневмонией. Данная болезнь может возникать как самостоятельное заболевание, а также появляться при ухудшении условий содержания птицы в сочетании с другими патогенными агентами вирусной, микоплазмозной или бактериальной этиологии [3, 7, 10, 12]. В Российской Федерации, как и в большинстве стран мира с развитым птицеводством, инфекционный ринит кур эндемичен. В присутствии других патогенных микроорганизмов и при наличии стрессовых факторов может приводить к вспышкам заболеваний, сопровождающимся значительными экономическими потерями [1, 3, 6].

Источником возбудителя инфекции являются больные птицы, выделяющие патоген во внешнюю среду с истечениями из носовой полости и при чихании. Возбудитель передается аэрогенно или с питьевой водой. Механический путь передачи не играет существенной роли в распространении инфекции, кроме того, возбудитель не передается вертикальным путем [3, 6, 12].

В патогенезе инфекционного ринита кур существенную роль играет эндотоксин возбудителя – это липополисахарид, подобный эндотоксинам других грамотрицательных бактерий. Действием эндотоксина объясняется возникновение сильной экссудации, приводящей к развитию отеков [12]. К факторам патогенности возбудителя относят его капсулу. Все вирулентные штаммы имеют капсулу, бескапсульные – авирулентны. Наличие нейраминидазы и хондроитинсульфатазы у *A. paragallinarum* также рассматривают как фактор патогенности. Под действием этих ферментов происходит разрушение эпителиального слоя слизистой оболочки верхних дыхательных путей [3, 12]. Некоторые штаммы возбудителя не вызывают заболевания у кур при экспериментальном заражении, но способны колонизироваться и длительное время переживать в верхних дыхательных путях. У таких культур обнаруживают L-агглютиноген и L-гемагглютиноген в составе клетки. Авирулентные штаммы, имеющие антигены такого типа, по всей видимости, обеспечивают сохранение возбудителя в межэпизоотические периоды [3, 5].

В зависимости от окружающей среды штаммы *A. paragallinarum* могут изменять свой фенотипический статус и по-разному проявлять свои факторы вирулентности. В данном случае воспроизведение заболевания в экспериментальных условиях является абсолютным доказательством патогенности выделенного микроорганизма [4, 5, 8–10].

Целью данной работы было определение вирулентности изолятов возбудителя инфекционного ринита кур, выделенных на территории Российской Федерации и Республики Беларусь.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Изоляты.** В работе использовали 10 изолятов *A. paragallinarum*, выделенных от кур с респираторной патологией из птицеводческих хозяйств Российской Федерации и Республики Беларусь. Культурально-морфологические и биохимические свойства изолятов подробно описаны в предыдущей работе [2]. Изоляты хранили в лаборатории в лиофилизированном виде

при температуре 2–4 °С или в замороженном виде при температуре –50 °С.

**Животные.** Для экспериментального заражения использовали 55 голов молодняка кур кросса Хайсекс Браун в возрасте 10 недель. Птица была доставлена из хозяйства, благополучного по инфекционному риниту кур, без использования вакцинации против данного заболевания.

**Культивирование изолятов.** Для культивирования изолятов использовали агар и бульон колумбийский (Becton, Dickinson and Co.) с добавлением 20 мкг/мл НАД (AppliChem) и 5% сыворотки крови лошади. Культивирование бактерий на агаровой среде проводили в течение 24 ч при температуре 37 °С в условиях повышенного содержания углекислого газа. Отдельные колонии каждого изолята пересевали в жидкую питательную среду в конических колбах. Культивирование проводили в орбитальном шейкере-инкубаторе при 150 об/мин в течение 18 ч при температуре 37 °С в условиях обычной атмосферы.

**Доза и метод заражения.** Птиц заражали интраназально 18-часовыми бульонными культурами изолятов в дозе 0,2 см<sup>3</sup>. Количество жизнеспособных клеток в заражающей дозе определяли посевом серийных разведений бульонных культур на агаровые питательные среды. Средний титр колониеобразующих единиц (КОЕ) рассчитывали как среднюю взвешенную величину с вычислением по формуле

$$N = \Sigma C / (V \times (n_1 + 0,1 \times n_2 + 10^{-i} \times n_i) \times d,$$

где  $\Sigma C$  – сумма колоний, посчитанных во всех чашках;  $V$  – объем посевного материала, внесенного в каждую чашку, см<sup>3</sup>;  $n_1, n_2$  и  $n_i$  – число отобранных для подсчета чашек в каждом разведении;  $d$  – коэффициент разведения, соответствующий первому разведению.

**Вирулентность изолятов.** Оценку вирулентности изолятов проводили по методике, предложенной V. E. Soriano и соавт. [11]. Наличие и степень 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 5 сут после заражения определяли суммы баллов по каждой группе, которые делили на общее количество зараженных птиц. Спустя 21 сут после экспериментального заражения всех птиц подвергли вынужденному убою.

**Реизоляция возбудителя.** После патологоанатомического вскрытия птицы проводили бактериологический анализ содержимого подглазничных синусов.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Использованные в работе изоляты *A. paragallinarum* (табл. 1) были выделены в период с 2014 по 2016 г. из патологического материала от птиц в возрасте от 38 до 211 сут из хозяйств Владимирской, Московской, Ко-

**Таблица 1**  
Происхождение изолятов инфекционного ринита кур

Номер изолята	Локализация возбудителя при выделении	Возраст птицы, сут	Направление продуктивности птицы	Регион
1	Подглазничные синусы	53	яичное	Костромская область
2	Конъюнктивальный мешок	68	яичное	Московская область
3	Подглазничные синусы	190	яичное	Оренбургская область
4	Подглазничные синусы	38	мясное	Московская область
5	Подглазничные синусы	211	яичное	Республика Беларусь
6	Легкие	170	яичное	Владимирская область
7	Подглазничные синусы	76	яичное	Республика Татарстан
8	Подглазничные синусы	164	яичное	Ярославская область
9	Подглазничные синусы	114	яичное	Республика Мордовия
10	Подглазничные синусы	80	яичное	Ульяновская область

стромской, Ярославской, Оренбургской и Ульяновской областей, а также Республик Мордовия и Татарстан; один изолят был выделен от птиц из Республики Беларусь. Клинические признаки заболевания у кур обычно проявлялись в виде водянистого истечения из носовых отверстий. Иногда у птиц наблюдали опухшие подглазничные синусы и конъюнктивальные мешки. У некоторых кур, вследствие закупорки носовых ходов, отмечали ротовое дыхание с хрипами. Большинство изолятов возбудителя были выделены от птиц яичного направления продуктивности. Основным местом локализации возбудителя явились подглазничные синусы. О наиболее частых выделениях возбудителя инфекционного ринита кур из содержимого подглазничных синусов свидетельствуют результаты исследований ряда авторов [3, 5, 12]. Все изоляты через 24 ч инкубирования на агаровых средах формировали круглые,

с ровными краями, выпуклые, с гладкой поверхностью, серого цвета колонии диаметром 0,5–1,0 мм (S-форма). Через 48 ч культивирования размеры колоний увеличивались до 1,0–1,5 мм. Характерным признаком 24-часовых культур являлась флуоресценция колоний в ко-сопроходящем свете, что свидетельствовало о наличии капсулы у бактерий.

Для экспериментального заражения птиц использовали 18-часовые бульонные культуры возбудителя. Концентрация бактериальных клеток в исходных суспензиях составляла от  $3,5 \times 10^9$  до  $5,0 \times 10^9$  м.к./см<sup>3</sup> по оптическому стандарту мутности. Для получения единой стандартной концентрации бактерий, соответствующей  $2,5 \times 10^9$  м.к./см<sup>3</sup>, проводили разбавление суспензий стерильным фосфатно-буферным раствором с pH 7,2–7,4.

Результаты экспериментального заражения птиц изолятами *A. paragallinarum* представлены в таблице 2. Концентрация жизнеспособных клеток различных изо-

**Таблица 2**  
Патогенные свойства изолятов *A. paragallinarum*

Номер изолята, группа	Заражающая доза, КОЕ ( $\times 10^9$ )	Количество зараженных птиц	Количество заболевших птиц	% заболеваемости	% реизоляции возбудителя
1	5,23 ± 0,27	5	4	80	100
2	4,68 ± 0,34	5	2	40	80
3	4,92 ± 0,44	5	4	80	100
4	5,63 ± 0,38	5	4	80	100
5	5,81 ± 0,27	5	3	60	100
6	4,85 ± 0,21	5	0	0	60
7	4,67 ± 0,38	5	2	40	100
8	4,81 ± 0,24	5	5	100	100
9	4,98 ± 0,36	5	4	80	100
10	5,13 ± 0,15	5	4	80	80



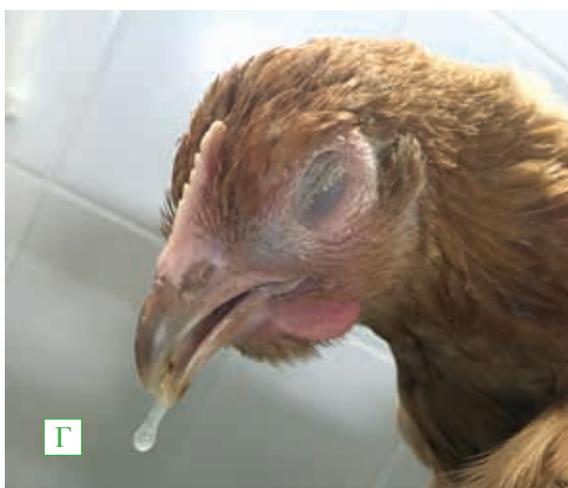
А



Б



В



Г

*Клинические признаки инфекционного ринита (гемофилеза) кур при экспериментальном заражении*

лятов возбудителя в заражающих дозах варьировала от  $(4,12 \pm 0,21) \times 10^8$  до  $(5,81 \pm 0,27) \times 10^8$  КОЕ, однако разница была статистически недостоверной ( $p > 0,05$ ).

Изоляты возбудителя инфекционного ринита кур по патогенности представляют собой неоднородную группу. Изолят № 6 оказался апатогенным для кур, в то же время при заражении изолятом № 8 заболеваемость птиц составила 100%. Спустя 21 сут после экспериментального заражения удалось реизолировать возбудителя из содержимого подглазничных синусов большинства птиц, независимо от наличия и тяжести проявления клинических признаков в период заболевания. Данный факт свидетельствует о сохранении *A. paragallinarum* на слизистых оболочках верхних дыхательных путей, что, вероятно, обуславливает бактерионосительство.

Первые клинические признаки заболевания у птиц наблюдали через 24–48 ч после заражения. Симптомы заболевания проявлялись в виде водянистого истечения из носовых отверстий и незначительного одно- или двустороннего опухания подглазничных синусов (рисунок, А, Б).

По данным ряда исследователей, при интраназальном заражении птиц инкубационный период составля-

ет 24–48 ч, при контакте больной и здоровой птицы – 3 сут, а при аэрогенной передаче возбудителя – до 6 сут [5, 9, 12].

В ряде случаев клинические признаки ограничивались указанными симптомами. У некоторых птиц экссудат постепенно мутнел и приобретал слизистую консистенцию, вследствие чего обтурировал носовые отверстия, и птица начинала дышать через рот. У большинства зараженных птиц заболевание сопровождалось выраженным опуханием подглазничных синусов и конъюнктивальных мешков (рисунок, В), при этом у больных кур отмечали угнетение, сонливость и снижение аппетита. Иногда вследствие закупорки слезно-носового канала экссудат через небную щель проникал в ротовую полость (рисунок, Г). Вытекающим экссудатом загрязнялись перья в области шеи и крыльев.

У некоторых птиц развивался односторонний или двусторонний катаральный конъюнктивит, иногда в экссудате появлялся фибрин, что приводило к опуханию век и сужению глазной щели. При локализации инфекции в более глубоких отделах респираторного тракта у отдельных птиц дыхание сопровождалось хрипами. В проведенных исследованиях период клинического проявления заболевания составил 3–4 сут.

Таблица 3  
Дифференциация изолятов *A. paragallinarum* по вирулентности

Сутки после заражения	Суммы баллов по группам										Контроль
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
1	0,8	0	1,2	1,4	0,8	0	0	1,0	0,8	0,8	0
2	1,2	0	0,8	1,2	0,6	0	0,4	1,6	1,0	1,0	0
3	1,2	0,4	1,2	1,4	0,6	0	0,2	1,4	1,2	1,0	0
4	1,0	0,4	1,0	1,4	0,4	0	0,4	1,0	1,0	0,6	0
5	0,6	0,2	0,8	1,0	0,4	0	0,4	0,6	1,0	0,4	0
Среднее значение ( $M \pm m$ )	0,9±0,2	0,2±0,2	1,0±0,2	1,2±0,2	0,5±0,1	0	0,2±0,2	1,1±0,3	1,0±0,2	0,5±0,3	0

По данным ряда исследователей, длительность заболевания в естественных условиях обычно составляет 2–3 недели, а при экспериментальной инфекции – 5–7 сут [3, 10, 12].

Из результатов, представленных в таблице 3, видно, что средние значения сумм баллов по группам варьировали в широком диапазоне. Наиболее вирулентными оказались изоляты № 3, 4, 8 и 9, где среднее значение сумм баллов составляло  $\geq 1,0$ . Изоляты № 1, 5 и 10 проявили среднюю вирулентность: среднее значение сумм баллов составило от 0,5 до 0,9. Низкой вирулентностью характеризовались изоляты № 2 и 7 со средним значением баллов  $< 0,5$ . Изолят № 6 оказался авирулентным.

Патологоанатомические изменения у птиц были выражены слабо и сосредоточены преимущественно в верхних отделах респираторного тракта. В подглазничных синусах обнаруживали серозный или серозно-гнойный экссудат. У отдельных птиц скопление экссудата в конъюнктивальном мешке приводило к смещению глазного яблока. Слизистая оболочка в подглазничных синусах вследствие воспаления была утолщена. В гортани и верхней половине трахеи иногда находили незначительное количество слизи в сочетании с невыраженной гиперемией слизистой оболочки.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

При экспериментальном заражении кур изолятами возбудителя инфекционного ринита, выделенными от птиц на территории Российской Федерации и Республики Беларусь, удалось воспроизвести клиническую форму заболевания. Девять из 10 изолятов оказались патогенными для птиц. При заражении кур различными изолятами *A. paragallinarum* отмечали одинаковую продолжительность периодов течения заболевания. У больных птиц выявляли сходные клинические признаки: ринит, синусит и конъюнктивит. Несмотря на однотипную динамику развития заболевания у зараженных птиц, вирулентность изолятов оказалась различной. С помощью метода, основанного на балльной системе оценки тяжести течения заболевания у экспериментально зараженных кур, удалось провести дифференциацию изолятов *A. paragallinarum* по вирулентности.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Гемофилез птиц / Т. Н. Рождественская, Е. В. Кононенко, С. А. Емельянова [и др.] // Ветеринарная медицина. – 2016. – № 4. – С. 50–53.
2. Данилова В. А., Потехин А. В., Степанова И. А. Особенности выделения и идентификации возбудителя инфекционного ринита (гемофилеза) кур // Ветеринария сегодня. – 2016. – № 3 (18). – С. 65–70.
3. Blackall P. J., Matsumoto M. Infectious coryza // Diseases of Poultry / ed. Y. M. Saif [et al.]. – 11<sup>th</sup> ed. – Ames, Iowa, 2003. – P. 691–703.
4. Bragg R. R. Effects of differences in virulence of different serovars of *Haemophilus paragallinarum* on perceived vaccine efficacy // Onderstepoort J. Vet. Res. – 2005. – Vol. 72, No. 1. – P. 1–6.
5. Evaluation of two experimental infection models for *Avibacterium paragallinarum* / Q. Zhao, Y. N. Sun, X. X. Zhang [et al.] // Vet. Microbiol. – 2010. – Vol. 141, No. 1–2. – P. 68–72.
6. Reclassification of *Pasteurella gallinarum*, [*Haemophilus*] *paragallinarum*, *Pasteurella avium* and *Pasteurella volantium* as *Avibacterium gallinarum* gen. nov., comb. nov., *Avibacterium paragallinarum* comb. nov., *Avibacterium avium* comb. nov. and *Avibacterium volantium* comb. nov. / P. J. Blackall, H. Christensen, T. Beckenham [et al.] // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. – 2005. – Vol. 55, No. 1. – P. 353–362.
7. Soriano-Vargas E., Terzolo H. R. *Haemophilus paragallinarum*: Etiology of infectious coryza // Vet. Méx. – 2004. – Vol. 35, No. 3. – P. 245–259.
8. The vaccination-challenge trial: the gold standard test to evaluate the protective efficacy of infectious coryza vaccines / A. García, F. Romo, A. M. Ortiz [et al.] // Avian Pathol. – 2008. – Vol. 37, No. 2. – P. 183–186.
9. Virulence characterization of *Avibacterium paragallinarum* isolates from Uganda / D. K. Byarugaba, U. M. Minga, P. S. Gwakisa [et al.] // Avian Pathol. – 2007. – Vol. 36, No. 1. – P. 35–42.
10. Virulence of South African isolates of *Haemophilus paragallinarum*. Part 3: Experimentally produced NAD-independent isolate / M. Taole, J. Albertyn, E. Van Heerden [et al.] // Onderstepoort J. Vet. Res. – 2002. – Vol. 69, No. 3. – P. 189–196.
11. Virulence of the nine serovar reference strains of *Haemophilus paragallinarum* / V. E. Soriano, G. M. Longinos, R. P. Fernández [et al.] // Avian Dis. – 2004. – Vol. 48, No. 4. – P. 886–889.
12. Yamamoto R. Infectious coryza // Diseases of Poultry / ed. B. W. Calnek [et al.]. – 9<sup>th</sup> ed. – Ames, Iowa, 1991. – P. 186–195.