

УДК: 619:616.98:579.842.14:615.371:636.5

ІМУНОГЕННІ ВЛАСТИВОСТІ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ СЕРІЇ ВАКЦИНИ ІНАКТИВОВАНОЇ ПРОТИ САЛЬМОНЕЛЬОЗІВ ПТИЦІ

Стегній Б. Т., Майборода О. В., Музика Д. В., Рула О. М., Вовк С. І.

Національний науковий центр «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини», м. Харків, Україна, e-mail: admin@vet.kharkov.ua

Богач М. В.

Одеська дослідна станція Національного наукового центру «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини», м. Одеса, Україна

У статті представлені результати щодо вивчення антигенних, реактогенних та імуногенних властивостей експериментальної серії вакцини інактивованої проти сальмонельозів птиці.

Встановлено, що розроблена нами технологія виготовлення дозволяє отримати стерильний, повністю інактивований та нешкідливий препарат. Вакцина призводить до формування у щепленій птиці напруженого специфічного імунітету до збудників *Salmonella Enteritidis* та *Salmonella Typhimurium*. Рівень специфічних антитіл через 14 днів після вакцинації становить 3,72 Іg (в ІФА) і стабільно утримується на цьому рівні до 51-ї доби (період спостереження). Експериментальна серія вакцини за умов ревакцинації курей яєчного напрямку забезпечує 95 % захист від контрольного інфікування штамами *Salmonella Enteritidis* та *Salmonella Typhimurium*. Введення вакцини не призводить до імуносупресії в організмі птиці.

Ключові слова: сальмонельоз птиці, інактивовані вакцини, імуногенність

Сальмонельоз птиці – інфекційна бактеріальна хвороба, яка є однією з найактуальніших проблем сучасного птахівництва у всіх країнах світу. Завдяки особливостям біології [1, 2, 3]: наявність широкого спектру факторів патогенності, унікальні ферментативні властивості та здатність зберігатися в зовнішньому середовищі впродовж тривалих строків забезпечує умови для широкого розповсюдження цих збудників серед сільськогосподарських і диких тварин (сальмонели – убіквітарні патогени).

У зв'язку з тим, що збудники сальмонельозів птиці здатні викликати тяжкі токсикоінфекції у людей, це захворювання має величезне епідеміологічне значення. В Європейському Союзі щороку реєструють більш як 100 тис випадків захворювання людей на сальмонельоз. Загальні економічні збитки від захворювання сягають 3 млрд євро на рік. В Україні серед етіологічно розшифрованих гострих кишкових інфекцій сальмонельоз займає друге місце після ротавірусної інфекції. Середній інтенсивний показник по Україні – у межах 21,88–53,32 % на 100 тис. населення, випадки сальмонельозу реєструють майже на всіх адміністративних територіях [4].

Важливість сальмонельозів в епідеміологічному та епізоотологічному аспекті спонукає науковців у всьому світі величезну увагу приділяти моніторингу, розробці засобів діагностики, профілактики та лікування. Важливою складовою контролю цього захворювання є його профілактика у птахівництві. Розробка ефективних засобів профілактики сальмонельозів птиці повинна базуватися на даних поглибленого вивчення біологічних властивостей збудників цих хвороб.

На даний час в Україні офіційно зареєстровано зарубіжні інактивовані полівалентні вакцини проти сальмонельозів птиці [5], що містять інактивовані антигени *Salmonella Enteritidis*, *Salmonella Typhimurium*. Вітчизняних препаратів на сьогоднішній день немає. Таким чином можна вважати актуальним напрям досліджень щодо розробки вітчизняних вакцин проти сальмонельозу птиці.

Мета нашої роботи: вивчити антигенні, реактогенні та імуногенні властивості експериментальної серії вакцини інактивованої проти сальмонельозів птиці на ремонтному молодняку курей-несучок.

Матеріали та методи. Бактеріологічні дослідження проводили згідно загально прийнятих вимог [6] та згідно рекомендацій МЕМБ [7]. Для виготовлення експериментальної серії вакцини використані штами *Salmonella Enteritidis M* та *Salmonella Typhimurium B*. Бактерійну масу кожного штаму накопичено окремо на МПБ із додаванням 10 % сироватки ВРХ та 1 % глюкози (режим інкубування 48 год за температури 37 °С), інактивація (додавання 1 % формаліну, режим інактивації 24 год за температури 37 °С). Завис сальмонел був осаджений центрифугуванням та двічі відмитий стерильним ФБФР (режим центрифугування 3 тис.об/хв. впродовж 20 хв). З осаду було виготовлено суспензію з концентрацією 6 млрд. КУО/см³. Обидві інактивовані бакмаси із музейних штамів сальмонел були об'єднані у співвідношенні 1:1, після чого до неї додано 70 % ад'юванту (Montanide ISA-70).

Виготовлена експериментальна серія інактивованої вакцини проти сальмонельозів птиці підлягала контролюванню на відсутність контамінації сторонньою мікрофлорою, мікоплазмами та повноту інактивації. Встановлено, що експериментальна серія препарату не контамінована сторонньою мікрофлорою, мікоплазмами та повністю інактивована.

Для визначення імуногенних властивостей експериментальної серії вакцини інактивованої проти сальмонельозів птиці із штамів *Salmonella Enteritidis M* та *Salmonella Typhimurium B* на базі Одеської дослідної станції ННЦ «ІЕКВМ» було сформовано 4 групи курчат по 20 голів кожна за принципом аналогів. Тривалість досліду – 109 днів.

1 група (дослідна). Птиця імунізована експериментальною серією інактивованої вакцини у віці 30 днів та ревакцинована через 14 днів. Через 28 днів після вакцинації птицю інфікована дозою контрольних штамів *Salmonella Enteritidis M* та *Salmonella Typhimurium B* у співвідношенні 1:1 (не менш 2×10^9 КУО кожного штаму у дозі).

2 група (дослідна). Птиця щеплена експериментальною серією інактивованої вакцини у віці 30 днів та ревакцинована через 14 днів.

3 група (контрольна). Не щеплена птиця. У віці 58 днів інфікована дозою контрольних штамів *Salmonella Enteritidis M* та *Salmonella Typhimurium B* у співвідношенні 1:1 (не менш 2×10^9 КУО кожного штаму у дозі).

4 група (контрольна). Не щеплена та не інфікована.

Для серологічних досліджень від дослідної та контрольної груп птиці відбирали проби крові до щеплення на 7, 14, 21 і 51 добу після ревакцинації, а для бактеріологічних досліджень на 7, 14, 21 та 51 добу після ревакцинації із кожної групи відбирали від 3-х голів внутрішні органи. Наприкінці досліду птицю евтаназували. Схема досліду наведена у таблиці 1.

Таблиця 1 – Схема досліду щодо визначення імуногенної активності

Вік птиці	Групи птиці			
	№ 1 (дослід, птиця щеплена та інфікована)	№ 2 (дослід, птиця щеплена)	№ 3 (контроль, інфікований контроль)	№ 4 (контроль, інтактний контроль)
29-добового віку	Відбір крові (визначення фону)			
30-добового віку	щеплення птиці		маніпуляції відсутні	
44-добового віку	ревакцинація птиці		маніпуляції відсутні	
58-добового віку	контрольне зараження, відбір крові	відбір крові	контрольне зараження, відбір крові	відбір крові
65-добового віку	відбір крові, евтаназія по 3 птиці			
72-добового віку	відбір крові, евтаназія по 3 птиці			
79-добового віку	відбір крові, евтаназія по 3 птиці			
109-добового віку	відбір крові, евтаназія птиці			

При проведенні досліду враховували: клінічний стан птиці; приріст маси тіла; наявність/відсутність місцевих реакцій на введення вакцини; наявність АТ визначали в ІФА за допомогою комерційного набору «Chicken salmonella Antibody Test Kit (LPS B and D combined)» (виробник – «BioChec», Голандія); наявність збудників у інфікованої птиці визначали бактеріологічним методом.

Експериментальні дослідження на тваринах проведені з урахуванням основних принципів біоетики. Утримання, догляд за тваринами та їх годівля здійснені згідно з нормами та раціонами, рекомендованими для даного виду лабораторних тварин. Евтаназія тварин проведена шляхом інгаляційного хлороформного наркозу.

Результати досліджень. Для дослідження була використана вакцина інактивована проти сальмонельозів птиці експериментальної серії № 1.

Імуногенні властивості експериментальної серії вакцини були вивчені в досліді за контрольним інфікуванням щепленої птиці. На 14 добу після другого введення вакцини птиця дослідної (вакцинованої) і контрольної (інтактої) груп були інфіковані перорально дозою штамів *Salmonella Enteritidis* та *Salmonella Typhimurium* (у співвідношенні 1:1 не менш 2×10^9 КУО кожного штаму у дозі). Спостерігали за птицею впродовж 51 доби. На 2-гу добу у птиці контрольної групи були відмічені типові клінічні ознаки гострої сальмонельозної інфекції (пригнічення, відмова від корму, виснажуюча діарея, лихоманка). Вищезазначені ознаки захворювання спостерігали впродовж 21-ї доби після контрольного інфікування. У дослідній групі відхилень від фізіологічного стану не відмічали.

Для проведення серологічних досліджень щодо виявлення антитіл до сальмонельозу у дослідних і контрольних груп птиці було відібрано проби крові за схемою досліду (табл. 1). Досліджували проби крові від птиці як до щеплення, так і впродовж усього терміну спостереження. Так, при дослідженні в ІФА сироваток крові птиці до контрольного інфікування (29 доба спостереження) у групі № 1 та № 2 відмічалась 100 % серопозитивність до збудників сальмонельозів групи В та Д (табл. 2). У групах № 3 та № 4 антитіл до даних збудників не виявлено.

Через 7 днів після контрольного інфікування птиці проведено повторне дослідження крові, яке направлено на виявлення постінфекційних антитіл у контрольної групи. Так, у даної птиці (група № 3) середній титр антитіл становив 3,56 Іg, а титри коливались від 3,51 Іg до 3,59 Іg. У птиці щепленої та інфікованої контрольними штамми сальмонел ці показники були наступні: середній титр антитіл – 3,72 Іg, коливання титрів від 3,63 Іg до 3,77 Іg.

У щепленої птиці групи № 2 ці показники майже не відрізнялись від птиці з групи №1: середній титр антитіл – 3,71 lg, коливання титрів від 3,67 lg до 3,75 lg. Через 7 та 14 діб після ревакцинації у птиці з групи № 1, у порівнянні з попередніми дослідженнями, відмічено незначне зменшення титру антитіл – 3,53 lg та 3,55 lg відповідно, що можна пояснити взаємодією антигенів із антитілами.

На відміну від групи № 1, у групі № 2 відмічалось поступове збільшення цього рівня: 7 доба – 3,72 lg; 14 доба – 3,74 lg. У третій групі птиці відбувалося зростання титрів антитіл до збудників сальмонельозу починаючи з 72 доби від початку досліду. Це зумовлено гострим інфекційним процесом в організмі птиці внаслідок інфікування контрольними штамми сальмонел.

Таблиця 2 – Результати ІФА щодо наявності антитіл до збудників сальмонельозів групи В та Д у сироватках крові курей

Вік птиці	Група № 1 птиця щеплена та інфікована		Група № 2 птиця щеплена		Група № 3 інфікований контроль		Група № 4 інтактний контроль	
	n	lg	n	lg	n	lg	n	lg
29-добового віку	10	0	10	0	10	0	10	0
44-добового віку	10	3,65 3,54–3,70	10	3,72 3,71–3,74	10	0	10	0
58-добового віку	10	3,65 3,53–3,71	10	3,68 3,64–3,73	10	0	10	0
65-добового віку	10	3,72 ◊ 3,63–3,77	10	3,71 ◊ 3,67–3,75	10	3,56 3,51–3,59	10	0
72-добового віку	8	3,53 3,47–3,57	8	3,72 * 3,70–3,75	8	3,71 3,67–3,73	8	0
79-добового віку	6	3,55 3,47–3,59	6	3,74 * 3,63–3,77	6	3,71 3,65–3,76	6	0
109-добового віку	4	3,72 3,64–3,76	4	3,75 3,69–3,79	4	3,70 3,69–3,71	4	0

Примітки: 1. * – $p < 0,05$ за Вілкосоном порівняно із показниками 1 групи; 2. ◊ – $p < 0,05$ за Вілкосоном порівняно із показниками 3 групи

Як видно з таблиці 2, на 80 добу спостереження рівень постінфекційних і поствакцинальних антитіл по дослідним групам залишився майже на одному рівні: група № 1 – середній титр антитіл – 3,72 lg, коливання титрів від 3,64 lg до 3,76 lg; група № 2 – середній титр антитіл – 3,75 lg, коливання титрів від 3,69 lg до 3,79 lg; група № 3 – середній титр антитіл – 3,70 lg, коливання титрів від 3,69 lg до 3,71 lg. У контрольній не імунізованій та не інфікованою контрольними штамми сальмонел антитіл не виявлено.

По закінченню досліду птиця всіх груп була евтаназована. Після розтину з внутрішніх органів птиці контрольної (№ 3) групи (селезінка, печінка, жовчний міхур, кров із серця, трубчаста кістка, відрізки сліпих кишок) було ізольовано культури *Salmonella Enteritidis* та *Salmonella Typhimurium*.

Висновки. 1. Встановлено, що експериментальна серія вакцини формує рівень специфічних антитіл у крові птиці до 3,72 lg, починаючи з 14-ї доби після другого введення та стабільно утримується на цьому рівні до 51-ї доби спостереження, тобто у птиці зберігається високий показник напруженості імунної відповіді.

2. Встановлено, що експериментальна серія вакцини із штамів *Salmonella Enteritidis M* та *Salmonella Typhimurium B* за умов 2-кратного введення сприйнятливій птиці (птиці яєчного напрямку) забезпечує захист 95 % імунізованих тварин від зараження інфікуючою дозою штамів *Salmonella Enteritidis* та *Salmonella Typhimurium*, препарат стимулює імунну відповідь та не чинить імуносупресивної дії на організм птиці.

3. Вакцина не викликає відхилень від клінічного стану після вакцинації.

Перспектива подальших досліджень полягає у проведенні подальшого бактеріологічного моніторингу з метою виявлення нових серотипів сальмонел, що може бути покладено до основи технології розробки біопрепаратів для діагностики та профілактики цих захворювань.

Список літератури

1. Болезни птиц: учебное пособие [Текст] / Б.Ф. Бессарабов [и др.] // СПб.: Лань. – 2007. – 448 с.
2. Thoms, C.J. Bacterial food-borne zoonoses [Text] / C.J. Thoms // Rev. sci. tech. Off. int. Epiz. – 2000. – Vol. 19, № 1. – P. 226-239.

3. Лнев, С.В. Мероприятия по профилактике сальмонеллеза птиц / II Междунар. вет. конгресс, VIII Междунар. вет. конгресс по птицеводству, г. Москва, 19-22 апреля 2012 г. – М, 2012. – С. 102-106.
4. Мех, Н. Хвороба вагою три мільярди євро / Н. Мех // Здоров'я тварин і ліки. [Текст] – 2016. – №11. – С. 14.
5. Singh, B.R. Salmonella Vaccines for Animals and Birds and Their Future Perspective [Text] / B.R. Singh // The Open Vaccine Journal – Vol. 2009, №2. – P. 100-112.
6. Определитель бактерий Берджи [Текст]: пер. с англ. /под ред. Дж. Хулта, Н. Крига, П. Снита [и др.]. – М.: Мир.
7. OIE Manual for Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals[Електр. ресурс] / Сносіб доступу: <http://www.oie.int>– Заголовок з екрану.

**IMMUNOGENIC PROPERTIES OF EXPERIMENTAL SERIES
OF INACTIVATED VACCINES AGAINST SALMONELLOSIS OF BIRDS**

Stegniy B. T., Maiboroda O. V., Muzyka D. V., Rula O. M., Vovk S. I.

National Scientific Center «Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine», Kharkiv, Ukraine

Bogach M. V.

Odessa Experimental Station of National Scientific Center “Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine”, Odessa, Ukraine

The aim of our work was study the antigenic, reactogenic and immunogenic properties of the experimental series of inactivated vaccine against salmonellosis of birds on laying hens.

Materials and Methods. For production of experimental series of vaccine Salmonella Enteritidis M and Salmonella Typhimurium B strains were used. Bacterial mass of each strain were accumulated separately in BEB with the addition of 10 % serum of cattle and 1 % of glucose (mode of incubation: 37 °C for 48 h), and then were inactivated (by adding 1 % formalin and incubating at 37 °C for 24 h). Salmonella bacterial suspension were precipitated by centrifugation and washed twice with sterile PBS (centrifugation mode: 3x10³ RPM for 20 minutes). A suspension with a concentration of 6x10⁶ CFU/ml was made from precipitate. Inactivated bacterial masses of each Salmonella strain were mixed in 1:1 ratio, and after that 70 % adjuvant (Montanide ISA-70) was added to it.

Results. First experimental serie of vaccine was used for the study.

Poultry were observed during 109 days from the beginning of the experiment. The results of clinical observations of the poultry during the experiment (body temperature, general state, presence /absence of local reactions to the vaccine); the results of conducted serological testing of poultry blood serum (by ELISA with Salmonella antigen before and after vaccination in dynamics).

Developed manufacturing technology gives a sterile, completely inactivated and harmless drug. The use of vaccine leads to the formation of high index specific immune responses to Salmonella Enteritidis ma Salmonella Typhimurium in vaccinated poultry. The use of vaccine causes generation of specific antibodies on to 3,72 lg level after 14 days and remains stable at this level until the 51 th day of observation.

The revaccination of laying hens with experimental series of vaccine provides protection for 95 % of the immunized poultry against control infection with Salmonella Enteritidis and Salmonella Typhimurium, the medication stimulates the formation of an immune response and does not cause immunosuppression effect on the bird organism.

Conclusions. 1. Was established that the use of experimental series of vaccine leads to generation of specific antibodies in the blood of birds on to 3,72 lg level, this process started from the 14-th day after the second vaccination and stable remains at this level until the 51-th day of observation, that mean that the immune response in birds stayed high.

2. Also was established that double vaccination with a series of experimental vaccines from strains of Salmonella Enteritidis M and Salmonella Typhimurium B of susceptible poultry (laying poultry) provides protection for 95 % of the immunized poultry against illnes after injection with infection doses of Salmonella Enteritidis and Salmonella Typhimurium strains, the medication stimulates the formation an immune response and does not cause immunosuppression effect on the bird organism.

3. The use of vaccine does not cause deviations from the clinical condition after vaccination.

Keywords: salmonellosis of poultry, inactivated vaccines, immunogenicity