

## 5. БІОТЕХНОЛОГІЯ

УДК 619:616.98:579.843.94:615.371:636.52/.58(477)

DOI 10.36016/VM-2023-109-15

### ВИВЧЕННЯ АНТИГЕННОЇ ТА ІМУНОГЕННОЇ АКТИВНОСТІ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ СЕРІЙ ІНАКТИВОВАНОЇ ЕМУЛЬСОВАНОЇ ВАКЦИНИ ПРОТИ ГЕМОФІЛЬОЗУ КУРЕЙ В ЛАБОРАТОРНИХ УМОВАХ

Колесников А. О., Стегній Б. Т.

Національний науковий центр «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини», Харків, Україна, e-mail: [artemon909@gmail.com](mailto:artemon909@gmail.com)

У всьому світі *Avibacterium paragallinarum* є етіологічним агентом інфекційного риніту свійської птиці. Вакцини є найкращим засобом контролю хвороби за рахунок зменшення клінічних ознак та колонізації цією бактерією організму господаря. Більшість вакцин ґрунтується на міжнародних еталонних штаммах без урахування сучасної епізоотичної ситуації щодо гемофільозу на відповідних територіях. Проведено ряд лабораторних дослідів із встановлення антигенної та імуногенної активності на дослідній птиці інактивованої трьохвалентної вакцини проти гемофільозу курей з використанням епізоотично актуальних ізолятів *Av. paragallinarum* (штам «SS 6/20», серотип А; штам «SS 7/20», серотип В; штам «SS 6/20», серотип С). Оптимальним інактивантом для отримання бактеріальної сировини є формальдегід у кінцевій концентрації 0,5 % та режиму — 48 год та температури 37 °С. Виготовлено три експериментальні зразки вакцини з використанням суміші інактивованих антигенів *Av. paragallinarum* трьох серотипів (1:1:1) та ад'ювантів (зразок № 1 – АГ + «ГОА»; № 2 – АГ + «ГОА+сапонін»; №3 – АГ + «Montanide ISA 70»). Для порівняння було використано комерційну вакцину, яка зареєстрована на території України. Щеплення птиці проводили дворазово в дозі 0,5 см<sup>3</sup> з інтервалом 21 доба, підшкірно, в ділянку середньої третини шиї. Досліджені експериментальні зразки № 2 та № 3 за антигенною активністю не поступаються комерційній вакцині, рівень антитіл коливається від 1:64 до 1:512. Імуногенна активність цих зразків становить 80-100 % у порівнянні з комерційною вакциною (група птиці № 4), імуногенна активність якої знаходиться на тому ж рівні. Реплікація збудника гемофільозу курей з патматеріалу курчат щеплених комерційною вакциною (група № 4) та експериментальними вакцинами № 2 (група № 2, ад'ювант — ГОА+сапонін) і №3 (група № 3, ад'ювант — «Montanid ISA 70») та інфікованих контрольними штаммами збуднику не відмічена. Ріст культур *A. paragallinarum* на збагачених поживних середовищах виявлено у дослідних групах № 1 (експериментальний зразок вакцини № 1 з використанням ад'юванту ГОА) та № 5 (контроль)

**Ключові слова:** *Avibacterium paragallinarum*, свійська птиця

Гемофільоз курей (інфекційний риніт) є гострим захворюванням дихальних шляхів, що викликається *Avibacterium paragallinarum* (*Av. paragallinarum*), раніше відомим як *Haemophilus paragallinarum* [1, 2]. Клінічний синдром, викликаний даним збудником, відомий ще з 1930-х років [3]. *Av. paragallinarum* розповсюджений по всьому світі, але завдає найбільшу економічну шкоду птахівництву в країнах, що розвиваються [2]. У молодняку захворювання проявляється пригніченням, відставанням у рості, сонливістю (синдром «сплячої птиці»), у дорослих курей спостерігаються синусити, кон'юнктивіти, серозний та/або серозно-фібринозний риніт. За прогресування хвороба супроводжується синдромом «опухлої голови».

Окрім курей *Av. paragallinarum* було виділено від інших видів птахів, таких як цесарки [4], гуси [5] та качки [6]. Також *Av. gallinarum* був виділений від людей з гострим гастроентеритом та ендокардитом, але патогенність його до кінця так і не була доведена [7-9].

Збудник гемофільозу курей внаслідок патогенної дії на організм птиці викликає ускладнення в асоціації з іншими бактеріальними збудниками [10-12] такими, як *Mycoplasma gallisepticum*, *Mycoplasma synoviae*, *Gallibacterium anatis* [13], *Escherichia coli* [14] і

*Ornithobacterium rhinotracheale* [11], та вірусами (інфекційний бронхіт, вірус інфекційного ларинготрахеїту, вірус віспи і аденовіруси) [10, 15].

*Av. paragallinarum* вперше був класифікований L. A. Page за допомогою аглютинації на три серовари (А, В та С) [16]. У свою чергу, К. Куте створив альтернативну схему, засновану на тесті гальмування гемаглютинації [17]. Ця модифікована схема також типує серогрупи А, В і С, при цьому додатково розпізнаються дев'ять сероварів (А1–А4, В–1 та С1–С4). Тим не менш, ці схеми потребують постійного перегляду та оновлення, оскільки багато штамів серогрупи В були віднесені до інших (А та С) [18].

Є багато повідомлень щодо використання проти даного збудника з лікувальною та профілактичною метою протимікробних препаратів, але вони лише тимчасово зменшують клінічний прояв захворювання і не можуть повністю усунути його у птиці, а при зниженні резистентності організму (погіршення умов утримання та годівлі тощо) збудник інфекції легко рецидивує [7, 19-23]. Окрім цього, недотримання рекомендованих схем застосування антибактеріальних препаратів може призвести як до розвитку стійкості збудника до антибіотиків, так і вплинути на основні біологічні особливості та появу нових генетичних варіантів бактерій з новими властивостями, часто більш вірулентних, ніж попередні [22, 24, 25].

У якості альтернативи антибіотикам та для зменшення прояву клінічних ознак є використання дезінфікуючих засобів як з питною водою так і аерозольно під час обробки пташнику у присутності птиці [26, 27], але циркуляція *Av. paragallinarum* все одно зберігається у стаді та поступово набирає своїх обертів.

Поширення збудника інфекційного риніту птиці у країнах, де птахівництво є економічно значущим напрямком, сприяло розробці засобів специфічної профілактики цього захворювання. Під час конструювання профілактичного біопрепарату виникає ряд труднощів, пов'язаних головним чином із виділенням з біологічного матеріалу від птиці бактеріальних культур зазначених серотипів. Більше того, *Av. paragallinarum* ізолюють лише на стадії гострої інфекції. Слід також відмітити, що *Av. paragallinarum* повільно зростаюча та вибаглива бактерія, і більшості штамів для росту *in vitro* необхідний фактор V-нікотинамідаденіндинуклеотид. Крім того, у процесі виділення та культивування *Av. paragallinarum* заростає іншими бактеріями *Pasteurellaceae* [7, 19, 28-30].

Також, за літературними даними [31, 32], на виділення *Av. paragallinarum* може впливати безконтрольне використання у птахівництві з лікувальною або профілактичною метою антибіотиків, як зазначено вище, та згодовування птиці комбікормів у склад яких також входять ці препарати.

Значне поширення збудника інфекційного риніту птиці у розвинутих країнах, де птахівництво є економічно значущим напрямком, сприяло розробці засобів специфічної профілактики цього захворювання. Та навіть за широкого використання в світовому птахівництві інактивованих вакцин, які містили всі три серотипи, за останні десять років спостерігається збільшення поширення захворювання – з 14 % до 25 % [31]. Збільшення відсотку може бути цілком пов'язано як з персистенцією збудника на птахофермах із різновіковою птицею, так і частковим імунітетом, що забезпечується не відповідним вмістом сероварів у комерційних вакцинах проти широко поширених у регіоні сероварів *Av. Paragallinarum*, а також роллю свійської птиці як джерела збудника [10]. Тому існуючі заходи боротьби поки не здатні захистити птахогосподарства від даного збудника [2].

**Мета роботи** – встановлення ефективності (антигенна та імуногенна активність, реізоляція збудника від щепленої птиці, встановлення реактогенності) розроблених експериментальних серій інактивованої емульсованої вакцини проти гемофільозу курей в лабораторних умовах на дослідній птиці.

**Матеріали та методи.** У даній науковій публікації наведено результати власних досліджень, аналізу даних відділу хвороб птиці Національного наукового центру «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини» (ННЦ «ІЕКВМ») та Державного науково-контрольного інституту біотехнології і штамів мікроорганізмів (ДНКІБШМ).

З метою встановлення антигенної активності трьох експериментальних зразків вакцини проти гемофільозу курей проведено лабораторні випробування на дослідній птиці (курчата-бройлери кросу «КОББ-500» 8 тижневого віку) (табл. 1).

Таблиця 1 — Експериментальні зразки інактивованої вакцини проти гемофільозу курей

Номер експериментального зразка інактивованої вакцини	Використаний штам збудника та його серотип	Співвідношення штамів (А:В:С)	Ад'ювант	Номер дослідної групи птиці
№ 1	штам SS 6/20 (серотип А), штам SS 7/20 (серотип В), штам SS 8/20 (серотип С)	1:1:1	гідроокис алюмінію (ГОА)	№1
№ 2	штам SS 6/20 (серотип А), штам SS 7/20 (серотип В), штам SS 8/20 (серотип С)	1:1:1	ГОА+ сапонін	№2
№ 3	штам SS 6/20 (серотип А), штам SS 7/20 (серотип В), штам SS 8/20 (серотип С)	1:1:1	Montanid ISA 70	№3

У якості порівняльного контролю використовували комерційну вакцину, зареєстровану на території України (група птиці № 4). 5 група птиці була контрольною. Кожна дослідна та контрольна група птиці складалась із п'ятнадцяти голів.

Щеплення птиці експериментальними зразками вакцини проводили дворазово в дозі 0,5 см<sup>3</sup> з інтервалом 21 доба, підшкірно, у ділянку середньої третини шиї.

Оцінку напруженості імунітету в птиці після застосування експериментальних зразків вакцини проводили в реакції аглютинації (РА) макрометодом у полістиролових планшетах за методикою, описаною L. Page (1962) [32].

З цією метою використано сироватки крові щепленої птиці, відібрані через 21 добу після першого введення вакцини та через 21 добу після ревакцинації. У якості антигену для РА використовували антигени штамів (SS 6/20, серотип А; SS 7/20, серотип В; SS 8/20, серотип С), які входять до складу вакцини.

Постановка реакції: у круглодонних лунках планшета готували двократні розведення сироваток в об'ємі 0,4 см<sup>3</sup> на фосфатно-сольовому буфері, починаючи з 1:2 до 1:1024. Потім в кожну лунку вносили по 0,4 см<sup>3</sup> антигену. Вміст лунок перемішували струшуванням планшета і ставили на контакт у термостат за 37 °С на 2 год, після чого залишали за кімнатної температури (20-25 °С) на 12 год.

Реакцію оцінювали за «чотирьоххрестової» системи. За титр брали найбільше розведення сироватки, яке дає чітко виражену аглютинацію антигену («+++» або «++++»). Одночасно проводили тестування на відсутність спонтанної аглютинації антигену (негативний контроль).

Імуногенні властивості експериментальних зразків № 1-3 (групи птиці № 1-3) та комерційної вакцини (група № 4) визначали методом контрольного інфікування вакцинованої птиці гомологічними ізолятами. Для цього дослідні (вакциновані) та контрольну (не вакциновану) птицю (група № 5) було інфіковано інтраназально 20-год добовою бульйонною культурою ізолятів у дозі 0,5 см<sup>3</sup>, з вмістом не менше 10<sup>8</sup> КУО збудника. Крім того, проводили щоденний огляд кожної особини щодо можливих клінічних ознак та можливої місцевої реакції (реактогенність) у місці введення вакцини (гіперемія шкіри, абсцеси).

**Результати досліджень.** Під час розробки технології виготовлення вакцини було опрацьовано та проаналізовано як закордонну, так і вітчизняну науково-специфічну літературу. У якості антигенної складової були використанні епізоотично актуальні штами трьох серотипів (серотип А – штам «SS 6/20», серотип В – штам «SS 7/20», серотип С – штам «SS 6/20»). У якості інактиванта використано формалін (кінцева концентрація 0,5 %) та підібраний режим інактивації (48 год та температури 37 °С). Для отримання стабільного препарату було використано гідроксид алюмінію в суміші з емульгаторами сапонін та без, а також готовий ад'ювант — «Montanid ISA 70» фірми «SEPPIC» (Франція).

У результаті розробленої технології було виготовлено три експериментальні зразки інактивованої вакцини (№ 1: штам SS 6/20, серотип А; штам SS 7/20, серотип В; штам SS 8/20, серотип С; ад'ювант – гідроокис алюмінію (ГОА); № 2: штам SS 6/20, серотип А; штам SS 7/20, серотип В; штам SS 8/20, серотип С; ад'ювант – ГОА+сапонін; № 3: штам SS 6/20, серотип А;

## Розділ 5. Біотехнологія

штам SS 7/20, серотип В; штам SS 8/20, серотип С; ад'ювант – «Montanid ISA 70»), які відповідали внутрішньолабораторним вимогам за якістю та були нешкідливими для лабораторних мишей.

З метою визначення антигенної активності експериментальних зразків інактивованої вакцини проти гемофільозу курей на дослідному поголів'ї птиці проведено дворазовий відбір зразків крові для РА – на 21 добу після першого щеплення та через 21 добу після другої ін'єкції. Результати наведено у таблиці 2.

**Таблиця 2** — Результати визначення антигенної активності експериментальних зразків та комерційної вакцини проти гемофільозу птиці (по 5 голів на серотип)

Номер дослідної групи птиці	Титри АТ через 21 день після I вакцинації (log <sub>2</sub> )			Титри АТ через 21 день після II вакцинації (log <sub>2</sub> )		
	ізолят SS 6/20	ізолят SS 7/20	ізолят SS 8/20	ізолят SS 6/20	ізолят SS 7/20	ізолят SS 8/20
№ 1 (зразок № 1)	3	4	3	4	5	4
	1	4	3	4	5	4
	3	4	3	3	4	4
	2	2	1	2	5	3
	2	3	1	3	3	2
У середньому	2,2±2,05 CV=34%	3,4±3,29 CV=23,5%	2,2±1,93 CV=44,5%	3,2±3,10 CV=23,4%	4,4±4,32 CV=18,2%	3,4±3,29 CV=23,5%
№ 2 (зразок № 2)	6	7	7	8	9	8
	6	6	6	8	7	7
	5	7	5	7	8	6
	6	7	7	8	8	8
	4	5	7	6	7	8
У середньому	5,4±5,33 CV=14,8%	6,4±6,35 CV=12,5%	6,4±6,35 CV=12,5%	7,4±7,35 CV=10,8%	7,8±7,76 CV=9,5%	7,4±7,35 CV=10,8%
№ 3 (зразок № 3)	5	6	7	8	9	8
	6	4	7	8	6	8
	5	4	6	7	7	8
	4	5	6	6	8	7
	3	6	7	6	9	7
У середньому	4,6±4,48 CV=22,2%	5,0±4,92 CV=17,9%	6,6±6,58 CV=7,4%	7,0±6,94 CV=12,8%	7,8±7,71 CV=14,9%	7,6±7,58 CV=6,4%
№ 4 (комерційна вакцина)	6	7	7	8	8	9
	6	3	7	8	7	8
	5	4	6	8	7	7
	3	7	4	6	8	7
	4	7	7	7	8	8
У середньому	4,8±4,64 CV=24,3%	5,6±5,28 CV=31,1%	6,2±6,07 CV=18,8%	7,4±7,35 CV=10,8%	7,6±7,58 CV=6,4%	7,8±7,76 CV=9,5%
№ 5 (контроль)	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0

Так, з результатів таблиці 2 видно, що на 21 день після щеплення найвища антигенна активність була відмічена у групі щепленої птиці № 2: середній титр антитіл до антигену серотип А (штам SS 6/20) – 5,4±5,33, до серотипу серотип В (штам SS 7/20) – 6,4±6,35 log<sub>2</sub>, до серотипу С (штам SS 8/20) – 6,4±6,35 log<sub>2</sub>. Титри коливались від 1:16 до 1:128. Через 21 добу після ревакцинації високий показник антигенної активності був відмічений у групі № 2 та № 3. Так, середній титр антитіл у сироватках крові дослідної групи птиці № 2 до антигену серотипу А

(штам SS 6/20) становив  $7,4 \pm 7,35 \log_2$ , до серотипу В (штам SS 7/20) –  $7,8 \pm 7,76 \log_2$ , до серотипу С (штам SS 8/20) –  $7,4 \pm 7,35 \log_2$ . У птиці з дослідної групи №3 ці показники були наступні –  $7,0 \pm 6,94 \log_2$ ,  $7,8 \pm 7,71 \log_2$ ,  $7,6 \pm 7,58 \log_2$  відповідно до антигенів А, В та С. Коливання титрів антитіл у обох групах були аналогічними – від 1:64 до 1:512.

Слід відмітити, що досліджені експериментальні зразки № 2 та № 3 за антигенною активністю не поступались комерційній вакцині, а рівень антитіл у птиці, щепленої дослідними зразками, знаходився майже на тому ж рівні, що і у птиці групи 4.

Імуногенні властивості експериментальних зразків № 1, 2, 3 та комерційної вакцини визначали контрольним зараженням вакцинованої птиці гомологічними ізолятами (таблиця 3).

**Таблиця 3 —** Визначення імуногенних властивостей експериментальних зразків та комерційної вакцини проти гемофільозу птиці (по 5 голів на серотип)

Номер дослідної групи птиці	Птиця з клінічними ознаками хвороби, % (гол)			Загибель птиці, % (гол)		
	ізолят SS 6/20	ізолят SS 7/20	ізолят SS 8/20	ізолят SS 6/20	ізолят SS 7/20	ізолят SS 8/20
1 (зразок № 1)	40 (2)	20 (1)	40 (2)	20 (1)	0	20 (1)
2 (зразок № 2)	20 (1)	0	20 (1)	0	0	0
3 (зразок № 3)	20 (1)	0	20 (1)	0	0	0
4 (комерційна вакцина)	20 (1)	0	20 (1)	0	0	0
5 (контроль)	100 (5)	60 (30)	100 (5)	80 (4)	60 (3)	100 (5)

Імуногенна активність експериментальних зразків № 2 і 3 становила 80-100 % у порівнянні з комерційною вакциною, імуногенна активність якої знаходиться на тому ж рівні.

У таблиці 4 представлені дані щодо залежності між титром антитіл після щеплення та відсотком захисту птиці за визначення імуногенності експериментальних серій вакцини та комерційного препарату.

**Таблиця 4 —** Залежність між титром антитіл та відсотком захисту птиці

Номер дослідної групи птиці	Титр антитіл через 21 добу після II вакцинації ( $\log_2$ )			% захисту		
	ізолят SS 6/20	ізолят SS 7/20	ізолят SS 8/20	ізолят SS 6/20	ізолят SS 7/20	ізолят SS 8/20
1 (зразок № 1)	$3,2 \pm 3,10$	$4,4 \pm 4,32$	$3,4 \pm 3,29$	60	80	60
2 (зразок № 2)	$7,4 \pm 7,35$	$7,8 \pm 7,76$	$7,4 \pm 7,35$	80	100	80
3 (зразок № 3)	$7,0 \pm 6,94$	$7,8 \pm 7,71$	$7,6 \pm 7,58$	80	100	80
4 (комерційна вакцина)	$7,4 \pm 7,35$	$7,6 \pm 7,58$	$7,8 \pm 7,76$	80	100	80

На сьому добу після введення контрольних штамів птицю дослідних груп було евтаназовано та відібрано слизові оболонки підочних синусів для бактеріологічних досліджень. Результати наведено у таблиці 5.

**Таблиця 5 —** Реізоляція *Av. paragallinarum* після контрольного інфікування щепленої птиці (по 5 голів на серотип)

Номер дослідної групи птиці	Реізоляція збудника, % (гол)		
	ізолят SS 6/20	ізолят SS 7/20	ізолят SS 8/20
1 (зразок № 1)	20 (1 гол.)	0	20 (1 гол.)
2 (зразок № 2)	0	0	0
3 (зразок № 3)	0	0	0
4 (комерційна вакцина)	0	0	0
5 (контроль)	80 (4 гол.)	60 (3 гол.)	100 (5 гол.)

Так, під час проведення бактеріологічних досліджень біологічного матеріалу, відібраного від птиці, ріст культур *Av. paragallinarum* на збагачених поживних середовищах виявлено у

дослідних групах № 1 (експериментальний зразок вакцини № 1 з використанням ад'юванту ГОА) та № 5 (контроль).

Як видно з таблиці 6, рівень антитіл до *A. paragallinarum* (серотип А, В, С) у сироватках крові дослідних груп птиці № 2, 3 та № 4 (1:256-512) сприяв 80-100 % захисту птиці від контрольних штамів збудника.

**Таблиця 6** — Залежність між титром антитіл до *Av. paragallinarum* та відсотком захисту птиці

Номер дослідної групи птиці	Титр антитіл через 21 добу після II вакцинації			% захисту		
	ізолят SS 6/20	ізолят SS 7/20	ізолят SS 8/20	ізолят SS 6/20	ізолят SS 7/20	ізолят SS 8/20
1 (зразок № 1)	1:16	1:32	1:16	60	80	60
2 (зразок № 2)	1:256	1: 512	1: 256	80	100	80
3 (зразок № 3)	1:256	1: 512	1: 256	80	100	80
4 (комерційна вакцина)	1:256	1: 256	1: 512	80	100	80

**Обговорення.** Дані наукові результати є першим опублікованим дослідженням лабораторних випробувань вітчизняної інактивованої трьохвалентної вакцини проти гемофільозу курей.

Перед ветеринарними фахівцями постійно виникає дилема щодо використання на поголів'ї птиці профілактичних вакцин, у склад яких входять «місцеві» або «міжнародні» штами. Великі глобальні виробники вакцин, як правило, конструюють свої препарати на стандартних, визнаних у всьому світі штаммах. Ці «міжнародні» вакцини реалізуються всюди на тій підставі, що місцеві відмінності збудників є недостатніми для виправдання додавання або видалення штамів. Тому, низка дослідницьких груп, зокрема Bragg et al. [34] у Південній Африці і Terzolo et al. [35] в Аргентині, Guo, M. et al. та Xu Y. et al. [2, 36], а також у Китаї вказують на відсутність перехресного захисту серед вакцинних сероварів, що ймовірно, є причиною появи варіантних штамів та підвищеної вірулентності місцевих культур *Av. paragallinarum*.

Тому, нашою метою було проведення ряду дослідів на птиці з визначення антигенної та імуногенної активності трьох зразків інактивованої трьохвалентної вакцини проти гемофільозу курей з використанням епізоотично актуальних ізолятів *Av. paragallinarum* (штам «SS 6/20», серотип А; штам «SS 7/20», серотип В; штам «SS 6/20», серотип С).

Ефективність (антигенна активність, імуногенність) та нешкідливість (реактогенність) запропонованої вакцини також залежала від використаного нами інактиванта – формаліну (кінцева концентрація 0,5 %) та режиму інактивації (48 год за температури 37 °С), за використання якого нейтралізується інфекційна активність та зберігаються властивості щодо антигенної активності бактеріальної сировини, а також відсутність негативних наслідків (реактогенність) за введення в організм птиці залишків хімічної речовини. Формалін має довгу історію безпечного використання у виробництві біопрепаратів, у тому числі і вакцин проти гемофільозу курей [37, 38].

Використання ад'ювантів підвищує імунну реакцію на введення вакцини, іноді шляхом більш тривалого утримання біопрепарату в місці ін'єкції або стимулювання місцевих імунних клітин.

Тому, нами з метою підвищення антигенної та імуногенної активності у складі вакцин використано ряд ад'ювантів: зразок № 1 – гідроокис алюмінію (ГОА), зразок № 2 – ГОА+сапонін, зразок № 3 – «Montanid ISA 70».

«Montanid ISA 70» фірми «SEPPIC» (Франція) має перевагу в зменшенні кількості технологічних операцій та тривалості процесу виробництва порівняно з класичним ад'ювантом, та дозволяє отримати більш стабільну емульсію [39].

Використання у складі вакцини проти гемофільозу курей гідроксиду алюмінію є давно відома ад'ювантна система [40-43], яка згідно літературних даних [44], довела свою ефективність при введенні або підшкірно (в задню частину шиї), або внутрішньом'язово (у грудний м'яз), але не ефективна при інтраназальному введенні.

Ще з кінця 80-х років минулого століття серед науковців загальна думка полягала в тому, що щеплення птиці з ревакцинацією є більш ефективним, ніж однократне [44-46]. Це твердження залишається незмінним і на даний час [2].

Розроблений нами метод використання експериментальних серій вакцини № 2 та № 3 – доза (0,5 см<sup>3</sup>), шлях введення (підшкірно, в ділянку середньої третини шиї) та кратність (дворазово в дозі з інтервалом 21 доба) довів свою ефективність. Так, зазначені експериментальні серії вакцини за антигенною активністю не поступались навіть комерційній вакцині, а рівень антитіл у птиці становив від 1:64 до 1:512.

Згідно літературних даних [2], чим вище рівень поствакцинальних антитіл, тим птиця залишається більш стійкою до збудника, навіть за контрольного інфікування. Цей факт було також підтверджено і у наших дослідах із імуногенності. Так, імуногенна активність експериментальних зразків № 2 (ад'ювант – ГОА+сапонін) і № 3 (ад'ювант – «Montanid ISA 70») становила 80-100 %, та не поступалась комерційній вакцині (група птиці № 4), де вказаний показник також був на тому ж рівні. Також, у зазначених дослідних груп птиці не відмічали клінічних симптомів захворювання та типових патологічних змін при розтині.

Слід відмітити, що реплікація збудника гемофільозу курей з патматеріалу курчат, щеплених комерційною вакциною (група № 4), та експериментальними серіями вакцини № 2 (група № 2, ад'ювант – ГОА+сапонін) і № 3 (група № 3, ад'ювант – «Montanid ISA 70») з наступним інфікуванням контрольними штамми, також не відмічена.

Ріст культур *Av. paragallinarum* на збагачених поживних середовищах виявлено лише в контрольній групі № 5 (від 3 до 5 гол. до кожного контрольного штаму) та дослідній групі № 1 (експериментальний зразок вакцини № 1 з використанням ад'юванту ГОА) – по одній особині до контрольних штамів «SS 6/20» та «SS 8/20».

Проте, необхідно зазначити, що експериментальний зразок № 3 (ад'ювант – «Montanid ISA 70») за підшкірного введення в місці ін'єкції викликав запальні реакції (гіперемія шкіри), які не зникали впродовж 2-3 тижнів, у той час як використання поєднання ГОА із сапоніном (зразок № 2) не викликало подібних ускладнень.

У науковій літературі аспекту побічних реакцій при використанні профілактичних вакцин проти гемофільозу курей приділялось багато уваги. Було висловлено припущення, що побічні реакції пов'язані з використанням у складі інактивованих вакцин ад'ювантів, або ліпополісахаридів, які присутні у клітинах *Av. paragallinarum*, або комплексу – ад'ювант/ліпополісахарид [47]. Так, Konno Y. et al. [48] довів летальність ліпополісахариду *Av. paragallinarum* на 10-добових курячих ембріонах (KE), що розвиваються, та позитивну реакцію на піроген (ендотоксини грамнегативних бактерій). Iritani Y. et al. [47] також показали, що грубо очищений екстракт полісахариду містить компонент, який є токсичним і викликає гідроперикардит після внутрішньовенної ін'єкції курчатам. Тому, за використання біологічних препаратів, які містять у своєму складі бактерії та ад'юванти, особливо мінеральну олію, слід враховувати потенційну негативну реакцію в місці ін'єкції [49].

**Висновки та перспективи подальших досліджень.** Аналіз розповсюдження інфекційного риніту в світі, незважаючи на помітний прогрес в діагностиці та вакцинопрофілактиці інфекційних хвороб, показав, що проблема боротьби з бактеріальними інфекціями, зокрема з інфекційним ринітом, не вирішена, та потребує постійного контролю та вдосконалення існуючих засобів специфічної профілактики, шляхом підбору відповідних епізоотично актуальних штамів.

У подальшому планується провести виробничі випробування розробленої інактивованої вакцини проти гемофільозу курей.

### Список літератури

1. Blackall P. J. et al. 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. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2005. Vol. 55, Pt. 1. P. 353–362. DOI: <https://doi.org/10.1099/ijs.0.63357-0>.
2. Guo M. et al. The protective efficacy of an inactivated vaccine against *Avibacterium paragallinarum* field isolates. *Veterinary Sciences*. 2022. Vol. 9, No 9. P. 458. DOI: <https://doi.org/10.3390/vetsci9090458>.
3. Blackall P. J., Soriano-Vargas E. Chapter 20. Infectious coryza and related bacterial infections // *Diseases of Poultry* / Ed. D. E. Swayne. 13<sup>th</sup> ed. Ames: John Wiley & Sons, 2013. P. 859–873. DOI: <https://doi.org/10.1002/9781119421481.ch20>.

4. Mohan K, Dziva F, Chitauru D. *Pasteurella gallinarum*: Zimbabwean experience of a versatile pathogen. *The Onderstepoort Journal of Veterinary Research*. 2000. Vol. 67. P. 301–305.
5. Mushin R, Bock R, Abrams M. Studies on *Pasteurella gallinarum*. *Avian Pathology*. 1977. Vol. 6. P. 415–423. DOI: <https://doi.org/10.1080/03079457708418250>.
6. Muhairwa A. P. et al. Occurrence of *Pasteurella multocida* and related species in village free ranging chickens and their animal contacts in Tanzania. *Veterinary Microbiology*. 2001. Vol. 78. P. 139–153. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(00\)00296-0](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(00)00296-0).
7. Blackall P. J, Soriano-Vargas E. Infectious coryza and related bacterial infections // Diseases of Poultry / Ed. D. E. Swayne. 14<sup>th</sup> ed. Hoboken: Wiley-Blackwell, 2020. P. 890–906. DOI: <https://doi.org/10.1002/9781119371199.ch20>.
8. Frederiksen W, Tønning B. Possible misidentification of *Haemophilus aphrophilus* as *Pasteurella gallinarum*. *Clin Infect Dis*. 2001. Vol. 32. P. 987–989. DOI: <https://doi.org/10.1086/319358>.
9. Ahmed K. et al. *Pasteurella gallinarum* neonatal meningitis. *Clin Microbiol Infect*. 2002. Vol. 8. P. 55–57. DOI: <https://doi.org/10.1046/j.1469-0691.2002.00354.x>.
10. Gallardo R. A. et al. Infectious Coryza: Persistence, Genotyping, and Vaccine Testing. *Avian Diseases*. 2020. Vol. 64. P. 157–165. DOI: <https://doi.org/10.1637/0005-2086-64.2.157>.
11. Morales-Erasto, F. et al. Coinfection of *Avibacterium paragallinarum* and *Ornithobacterium rhinotracheale* in Chickens from Peru. *Avian Diseases*. 2015. Vol. 60, No1. P. 75–78. DOI: <https://doi.org/10.1637/11265-082015-ResNote.1>.
12. Crispo M, et al. Otitis and meningoencephalitis associated with infectious coryza (*Avibacterium paragallinarum*) in commercial broiler chickens. *J Vet Diagn Invest*. 2018. Vol. 30, No 5. P. 784–788. DOI: <https://doi.org/10.1177/1040638718792964>.
13. Paudel S, Hess M, Hess C. Coinfection of *Avibacterium paragallinarum* and *Gallibacterium anatis* in Specific-Pathogen-Free Chickens Complicates Clinical Signs of Infectious Coryza, Which Can Be Prevented by Vaccination. *Avian Dis*. 2017. Vol. 61, No 1. P. 55–63. DOI: <https://doi.org/10.1637/11481-081016-reg>.
14. Crispo M. et al. Characterization of an Outbreak of Infectious Coryza (*Avibacterium paragallinarum*) in Commercial Chickens in Central California. *Avian Dis*. 2019. Vol. 63. P. 486–494. DOI: <https://doi.org/10.1637/19-00081.1>.
15. Mei C. et al. Concurrent infection of *Avibacterium paragallinarum* and fowl adenovirus in layer chickens. *Poult Sci*. 2020. Vol. 99, No 12. P. 6525–6532. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.psj.2020.09.033>.
16. Blackall P. J., Eaves L. E., Rogers D. G. Proposal of a New Serovar and Altered Nomenclature for *Haemophilus paragallinarum* in the Kume Hemagglutinin Scheme. *J. Clin. Microbiol*. 1990. Vol. 28. P. 1185–1187. DOI: <https://doi.org/10.1128/jcm.28.6.1185-1187.1990>.
17. Kume K. et al. Serological classification of *Haemophilus paragallinarum* with a hemagglutinin system. *J. Clin. Microbiol*. 1983. Vol. 17. P. 958–964. DOI: <https://doi.org/10.1128/jcm.17.6.958-964.1983>.
18. Caballero-Garcia M. et al. Pathogenicity of *Avibacterium paragallinarum* Strains from Peru and the Selection of Candidate Strains for an Inactivated Vaccine. *Vaccines*. 2022. Vol. 10, No 7. P. 1043. DOI: <https://doi.org/10.3390/vaccines10071043>.
19. Wahyuni A. E. T. H. et al. Isolation, identification, and serotyping of *Avibacterium paragallinarum* from quails in Indonesia with typical infectious coryza disease symptoms. *Vet. World*. 2018. Vol. 11. P. 519–524. DOI: <https://doi.org/10.14202/vetworld.2018.519-524>.
20. Blackall P. J. Antimicrobial Drug Resistance and the Occurrence of Plasmids in *Haemophilus paragallinarum*. *Avian Dis*. 1988. Vol. 32. P. 742–247. DOI: <https://doi.org/10.2307/1590993>.
21. Hsu Y., Shieh H., Chen W. Antimicrobial Susceptibility, Plasmid Profiles and Haemocin Activities of *Avibacterium paragallinarum* Strains. *Vet. Microbiol*. 2007. Vol. 124. P. 209–218. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2007.04.024>.
22. Luna-Galaz G. A., et al. Antimicrobial sensitivity of *Avibacterium paragallinarum* isolates from four Latin American countries. *Avian Diseases*. 2016. Vol. 60, No 3. P. 673–676. DOI: <https://doi.org/10.1637/11398-022616-resnote.1>.
23. Nhung N. T., Chansiripornchai N., Carrique-Mas J. J. Antimicrobial resistance in bacterial poultry pathogens: A review. *Frontiers in Veterinary Science*. 2017. Vol. 4. P. 126. DOI: <https://doi.org/10.3389/fvets.2017.00126>.
24. Chukiatsiri K. et al. Serovar identification, antimicrobial sensitivity, and virulence of *Avibacterium paragallinarum* isolated from chickens in Thailand. *Avian Dis*. 2012. Vol. 56, No 2. P. 359–364. DOI: <https://doi.org/10.1637/9881-080811-reg.1>
25. Nielsen S. S. et al. 2021. Scientific Opinion on the assessment of animal diseases caused by bacteria resistant to antimicrobials: Poultry. *EFSA Journal*. 2021. Vol. 19, No 12. P. e07114. DOI: <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2021.7114>.
26. Huberman Y. D., Bueno D. J., Terzolo H. R. Evaluation of the protection conferred by a disinfectant against clinical disease caused by *Avibacterium paragallinarum* serovars A, B, and C from Argentina. *Avian Diseases*. 2005. Vol. 49, No 4. P. 588–591. DOI: <https://doi.org/10.1637/7374-050405r.1>.
27. Bragg R. R. Limitation of the spread and impact of infectious coryza through the use of a continuous disinfection programme. *Onderstepoort J Vet Res*. 2004. Vol. 71, No 1. P. 1–8. DOI: <https://doi.org/10.4102/ojvr.v71i1.280>.
28. Patil V. V., Mishra D., Mane D. V. 16S ribosomal RNA sequencing and molecular serotyping of *Avibacterium paragallinarum* isolated from Indian field conditions. *Vet World*. 2017. Vol. 10, No 8. P. 1004–1007. DOI: <https://doi.org/10.14202/vetworld.2017.1004-1007>.
29. Ahmadi B., Nasri M. Prevalence of poultry bacterial diseases in different altitudes of Ilam province. *Veterinary Research and Biological Products*. 2018. Vol. 31, No 1. P. 87–92.
30. Nouri A. et al. Isolation, identification and antimicrobial susceptibility of *Avibacterium paragallinarum* from backyard chicken in retail markets of Karaj and Tehran cities, Iran. *Archives of Razi Institute*. 2020. Vol. 76. P. 1047–1053. DOI: <https://doi.org/10.22092/ari.2020.343173.1502>.



31. Han M. S. et al. The current epidemiological status of infectious coryza and efficacy of PoulShot Coryza in specific pathogen-free chickens. *J Vet Sci.* 2016. Vol. 30, No 17. P. 323–330. DOI: <https://doi.org/10.4142/jvs.2016.17.3.323>.
32. Beiranvand S. et al. Novel NAD-independent *Avibacterium paragallinarum*: Isolation, characterization and molecular identification in Iran. *Vet Med Sci.* 2022. Vol. 8, No 3. P. 1157–1165. DOI: <https://doi.org/10.1002/vms3.754>.
33. Page L. A. Haemophilus infections in chickens. I. Characteristics of 12 Haemophilus isolates recovered from diseased chickens. *Am. J. Vet. Res.* 1962. Vol. 23. P. 85–95.
34. Bragg R. R., Coetzee L., Verschoor J. A. Changes in the incidences of the different serovars of Haemophilus paragallinarum in South Africa: a possible explanation for vaccination failures. *Onderstepoort J. Vet. Res.* 1996. Vol. 63. P. 217–226.
35. 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. Vol. 26. P. 365–376. DOI: <https://doi.org/10.1080/03079459708419219>.
36. Xu Y. et al. Characterization of emergent *Avibacterium paragallinarum* strains and the protection conferred by infectious coryza vaccines against them in China. *Poult Sci.* 2019. Vol. 98, No 12. P. 6463–6471. DOI: <https://doi.org/10.3382/ps/pez531>.
37. Rimler R. B. et al. A growth medium for the production of a bacterin for immunization against infectious coryza. *Avian Diseases.* 1975. Vol. 19. P. 318–322.
38. Coetzee L., Strydom, G. S., Rogers E. J. The value of oil-adjuvant vaccines in the control of Haemophilus paragallinarum infection (infectious coryza) in egg producing birds in South Africa. *Developments in Biological Standardisation.* 1982. Vol. 51. P. 169–180.
39. Чергинець А. І., Салій О. О., Любецький О. В. Дослідження впливу ад'ювантів на фізичні властивості інактивованої вакцини проти хвороби Ньюкасла. Технологічні та біофармацевтичні аспекти створення лікарських препаратів різної направленості дії : матеріали V Міжнародної науково-практичної інтернет-конференції, м. Харків, 26 листопада 2020 року. Харків : Вид-во НФаУ, 2020. С. 496–497.
40. Matsumoto M., Yamamoto R. A broth bacterin against infectious coryza: immunogenicity of various preparations. *Avian Diseases.* 1971. Vol. 15. P. 109–117.
41. Kume K., Sawata A., Nakase Y. Relationship between protective activity and antigen structure of Haemophilus paragallinarum serotypes 1 and 2. *American Journal of Veterinary Research.* 1980. Vol. 41. P. 97–100.
42. Reid G. G., Blackall P. J. Comparison of adjuvants for an inactivated infectious coryza vaccine. *Avian Diseases.* 1987. Vol. 31. P. 59–63.
43. Davis R. B. et al. Efficacy studies on Haemophilus gallinarum bacterin preparations. *American Journal of Veterinary Research.* 1976. Vol. 37. P. 219–222.
44. Blackall P. J., Reid G. G. Further Efficacy Studies on Inactivated, Aluminum-Hydroxide-Adsorbed Vaccines against Infectious Coryza. *Avian Diseases.* 1987. Vol. 31. P. 527–532. DOI: <https://doi.org/10.2307/1590735>.
45. Matsumoto M., Yamamoto R. Protective quality of an aluminum hydroxide adsorbed broth bacterin against infectious coryza. *American Journal of Veterinary Research.* 1975. Vol. 36. P. 579–582.
46. Kume K., Sawata A., Nakase Y. Haemophilus infections in chickens. 3. Immunogenicity of serotypes 1 and 2 strains of Haemophilus paragallinarum. *Japanese Journal of Veterinary Science.* 1980. Vol. 42. P. 673–680. DOI: <https://doi.org/10.1292/jvms1939.42.673>.
47. Iritani Y., Iwaki S., Yamaguchi, T. Biological activity of crude polysaccharide extracted from two different immunotype strains of Hemophilus gallinarum in chickens. *Avian Diseases.* 1981. Vol. 25. P. 29–37.
48. Konno Y., Nakase Y. Purification of endotoxin of Haemophilus gallinarum and their biological activity. *Japanese Journal of Bacteriology.* 1977. Vol. 32. P. 212.
49. Droual R. et al. Investigation of problems associated with intramuscular breast injection of oil-adjuvanted killed vaccines in chickens. *Avian Diseases.* 1990. Vol. 34. P. 473–478.

## STUDY OF ANTIGENIC AND IMMUNOGENIC ACTIVITY OF EXPERIMENTAL SERIES OF INACTIVATED EMULSIFIED VACCINE AGAINST CHICKEN HEMOPHILOSIS IN LABORATORY CONDITIONS

**Kolesnikov A. O., Stegnyy B. T.**

*National Scientific Center "Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine", Kharkiv, Ukraine*

Worldwide, *Avibacterium paragallinarum* is the etiological agent of infectious rhinitis in poultry. Most vaccines are based on international reference strains without taking into account the current epizootic situation of hemophilosis in the respective territories. Using a mixture of inactivated *Av. paragallinarum* antigens (SS 6/20, A; SS 7/20, B; SS 8/20, C) of three serotypes (1:1:1) and (sample No 1 – AG + «aluminum hydroxide»; No 2 – AG + «aluminum hydroxide + saponin»; No 3 – AG + «Montanide ISA 70») obtained experimental samples of the domestic inactivated vaccine against chicken rhinitis. The antigenic and immunogenic activity of the inactivated trivalent vaccine on chickens was established. A commercial vaccine registered on the territory of Ukraine was used as a comparison. Vaccination of birds was carried out twice in a dose of 0.5 cm<sup>3</sup> with an interval of 21 days, subcutaneously, in the area of the middle third of the neck. The investigated experimental samples No 2 and No 3 are not inferior to the commercial vaccine in terms of antigenic activity; antibody levels range from 1:64 to 1:512. The immunogenic activity of these samples is 80–100% compared to the commercial vaccine (poultry group 4), the immunogenic activity of which is at the same level. Replication of the causative agent of *Haemophilus* infection in chickens from the paternal material

of chickens vaccinated with a commercial vaccine (group 4) and experimental vaccines №2 (group 2, adjuvant – «aluminum hydroxide + saponin») and №3 (group 3, adjuvant – «Montanid ISA 70») and infected with control strains of the pathogen was not noted

**Keywords:** *Avibacterium paragallinarum*, poultry

УДК 619:616.98:578.82/.83[IPNV]:597.552.51

DOI 10.36016/VM-2023-109-16

## ДОСЛІДЖЕННЯ РЕПРОДУКЦІЇ ВІРУСУ ІНФЕКЦІЙНОГО ПАНКРЕАТИЧНОГО НЕКРОЗУ (IPNV) В УМОВАХ *IN VITRO*

Рудь Ю. П.<sup>1,2</sup>, Залоїло О. В.<sup>1</sup>, Грициняк І. І.<sup>1</sup>, Буцацький Л. П.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Інститут рибного господарства Національної академії аграрних наук України, Київ, Україна, e-mail: [rudziknew@ukr.net](mailto:rudziknew@ukr.net)

<sup>2</sup> Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна

Метою роботи було вивчити репродукцію нових емерджентних ізолятів вірусу інфекційного панкреатичного некрозу (IPNV) в умовах *in vitro* для визначення вірулентних властивостей. В роботі досліджували нові ізоляти IPNV, виділені у форелевих господарствах України упродовж 2021-2022 років. При роботі з вірусом використовували культуру клітин RTG-2, на якій визначали інфекційний титр вірусу та прояв ознак ЦПД. Інфекційний титр виділених ізолятів в культурі клітин RTG-2 коливався в межах від  $1,1 \times 10^3$  до  $1,0 \times 10^7$  TCID<sub>50</sub>/мл. Виділені ізоляти IPNV спричиняли низький ( $\leq 25\%$ ), помірний ( $\leq 50\%$ ) та високий ( $\geq 70\%$ ) рівні смертності у малька лососевих. На основі біологічних властивостей та показників інфекційного титру досліджувані ізоляти VN11, VN18 та VN29 були визначені як низьковірулентні, а ізоляти VN20, VN30, VN32 і VN39 віднесено до високовірулентних. Серед високовірулентних ізолятів, VN32 мав найвищий титр  $1,0 \times 10^7$  TCID<sub>50</sub>/мл та спричиняв смертність у райдужної форелі, середня вага якої становила 100 г. Виділений від палії ізолят вірусу IPNV мав інфекційний титр  $1,58 \times 10^6$  TCID<sub>50</sub>/мл, а смертність малька коливалась в межах 15-25%. Кількість виявлених ізолятів та їх культуральні властивості свідчать про біорізноманіття ізолятів і штамів вірусу інфекційного панкреатичного некрозу в Україні. Скільки нововиявлених ізолятів вірусу належать до того чи іншого штаму треба ще визначити. Для цього буде проведено дослідження нуклеотидної послідовності гена, що кодує капсидний білок VP2, на основі якого також буде можливість визначити вірулентність за змінами в амінокислотах

**Ключові слова:** культура клітин, інфекційний титр, Salmonidae

Вірус інфекційного панкреатичного некрозу (*Infectious pancreatic necrosis virus* або IPNV) спричиняє висококонтагіозне інфекційне захворювання у лососевих (Salmonidae). Вірус належить до роду *Aquabirnavirus*, родина Birnaviridae. Віріони IPNV мають ікосаедричний капсид діаметром близько 65 нм, в середині якого розміщено два сегменти дволанцюгової РНК (А і В) розміром 3100 і 2784 пари нуклеотидів (п.н.) відповідно [1].

В Україні захворювання інфекційний панкреатичний некроз зустрічається у палії (*Salvelinus fontinalis*), струмкової форелі (*Salmo trutta*) та райдужної форелі (*Oncorhynchus mykiss*) [2-4]. Через значний економічний вплив вірусу на галузь аквакультури, великі зусилля в усьому світі приділяють контролю захворювання за допомогою різних підходів: рання діагностика та оцінка біологічних ризиків, контроль торгівлі об'єктами аквакультури, скринінг природних популяцій та вивчення генотипів вірусу і розробка вакцин [1].

Забезпечення біологічної безпеки та біологічного захисту рибництва в Україні є пріоритетним напрямом досліджень Інституту рибного господарства НААН. Тому в умовах актуальної проблеми щодо емерджентних захворювань в аквакультурі, ми обрали за мету наших досліджень вивчити репродукцію нових ізолятів IPNV в умовах *in vitro* для визначення вірулентних властивостей ізолятів, виділених у форелевих господарствах України упродовж 2021-2022 років.