СВОЙСТВА ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ОБРАЗЦОВ ВАКЦИНЫ ПРОТИВ ИНФЕКЦИОННОГО РИНИТА КУР

М.С. ФИРСОВА, А.В. ПОТЕХИН, В.А. ЕВГРАФОВА, О.В. ПРУНТОВА ✉,
В.С. РУСАЛЕЕВ, Р.В. ЯШИН

Инфекционный ринит кур (возбудитель *Avibacterium paragallinarum*) встречается во всех странах мира с развитым птицеводством, в том числе в Российской Федерации, и наносит серьезный экономический ущерб. Основным звеном в системе мер борьбы с инфекционным ринитом кур служит специфическая профилактика. Вакцинация птиц обеспечивает выработку напряженного иммунитета, обусловленного наличием антигематтенирующих антител. В настоящей работе впервые представлены результаты, характеризующие безвредность, антигенные и протективные свойства образцов вакцины, включающей антиген нового отечественного штамма *A. paragallinarum* № 5111 серогруппы В. Цель работы состояла в оценке иммунобиологических свойств у образцов сорбированной и эмульсионной вакцины против инфекционного ринита кур на основе антигена штамма *Avibacterium paragallinarum* № 5111. Для изготовления экспериментальных образцов вакцины использовали цельноклеточный антиген штамма *A. paragallinarum* № 5111 (серотип В-1), инактивированный формальдегидом. Концентрация бактерий в объеме прививной дозы ($0,5 \text{ см}^3$) каждого образца составляла 10^9 микробных клеток по оптическому стандарту мутности. Образец сорбированной вакцины содержал 3,75 мг гидрооксида алюминия в иммунизирующей дозе. Образец эмульсионной вакцины содержал в составе масляный адъювант Montanide ISA 70 VG («SEPPIC», Франция) в количестве 70 % по массе. Иммунобиологические свойства вакцины оценивали в 2019 году на 125 серонегативных к *A. paragallinarum* цыплятах (*Gallus gallus* L.) кросса Хайсекс коричневого в возрасте 1,5–2,0 мес. Безвредность образцов вакцины определяли при инъекциях цыплятам в 2-кратной дозе ($1,0 \text{ см}^3$). Каждый образец вводили подкожно в область средней трети шеи и внутримышечно в область груди (по 5 гол. в каждом варианте). Наблюдение за клиническим состоянием птиц и наружный осмотр осуществляли в течении 42 сут. По завершении эксперимента проводили убой птицы и визуальную оценку состояния тканей в месте инъекции на разрезе. Протективные свойства вакцины определяли на 75 цыплятах (три группы по 25 гол. в каждой). Птицу I группы иммунизировали образцом сорбированной вакцины, II группы — эмульсионным образцом, III группу не вакцинированных цыплят использовали в качестве контроля. Образцы вводили подкожно в среднюю треть шеи в дозе $0,5 \text{ см}^3$, 2-кратно с интервалом 20 сут. Спустя 15 сут после ревакцинации цыплят заражали 1-суточной бульонной культурой штамма *A. paragallinarum* № 5111 с концентрацией 5 ед. по оптическому стандарту мутности. В течение 7 сут после заражения наблюдали за клиническим состоянием цыплят. Во время эксперимента и по завершении опыта проводили патологоанатомическое вскрытие с бактериологическим анализом содержимого носовых пазух. Антигенные свойства вакцины и продолжительность иммунитета определяли на 30 птицах (три группы по 10 гол. в каждой). Цыплят I группы иммунизировали сорбированной вакциной, II группы — эмульсионной вакциной, контролем служила III группа не вакцинированных птиц. Антигенную активность образцов оценивали по содержанию гуморальных антител в реакции торможения гематтенизации. При введении вакцины наблюдали поражения тканей легкой и средней степени тяжести без выраженной воспалительной реакции. В месте подкожного введения образца сорбированной вакцины у некоторых цыплят возникала незначительная отечность и гиперемия подкожной клетчатки, а в месте инъекции эмульсионного образца у всех птиц происходило образование соединительнотканых гранул с наличием остатков вакцины без некротических поражений и выраженной воспалительной реакции окружающих тканей. При сравнении результатов контрольного заражения птиц, иммунизированных разными образцами вакцины, значимых различий не наблюдали ($p > 0,05$), однако отмечали существенную разницу между опытными и контрольной группами ($p < 0,05$). В I группе количество защищенных цыплят составило 92 %, во II группе — 88 %. Средние значения титров антител через 20 сут после первой вакцинации у птиц, привитых образцами сорбированной и эмульсионной вакцины, были ниже пороговых значений ($p > 0,05$). Их существенное увеличение наблюдали спустя 15 сут после повторного введения обоих образцов вакцины, а через 60 сут содержание антител достигало максимальных значений. У птиц из I группы средний титр антител составил $7,5 \pm 0,8 \log_2$, из II группы — $8,9 \pm 0,7 \log_2$ ($p > 0,05$). Через 240 сут после ревакцинации в I группе наблюдали снижение количества антител до $5,5 \pm 0,7 \log_2$, во II группе средний титр составлял $8,7 \pm 0,8 \log_2$ ($p > 0,05$). У птиц из контрольной группы в течение всего срока наблюдения специфические антитела к возбудителю инфекционного ринита не выявляли. Таким образом, опытные образцы сорбированной и эмульсионной вакцины против инфекционного ринита были безвредными для птиц при подкожном введении и обладали высокой антигенной и протективной активностью после 2-кратного применения.

Ключевые слова: инфекционный ринит кур, штамм, *Avibacterium paragallinarum*, антиген, адъювант, образец вакцины.

Бактериальные болезни птиц на промышленных птицефабриках остаются одной из актуальных проблем ветеринарии. Среди респираторных заболеваний в последнее время широкое распространение получил инфекционный ринит кур (гемофилез). Это острое энзоотическое заболевание характеризуется катаральным воспалением слизистых оболочек верхних дыхательных путей и отеками в подкожной клетчатке лицевой части головы. Возбудитель болезни — бактерия *Avibacterium paragallinarum* (1-5).

Инфекционный ринит встречается во всех странах мира с развитым птицеводством, в том числе в Российской Федерации (4-6). Заболевание наносит серьезный экономический ущерб отрасли, который складывается из потери яйценоскости кур до 40 %, снижения темпов роста цыплят, а также затрат на проведение профилактических и оздоровительных мероприятий.

Важный фактор в эпизоотологии заболевания — антигенное многообразие возбудителя. Признаны три серогруппы *A. paragallinarum* — А, В и С, объединяющие девять серотипов — А-1, А-2, А-3, А-4, В-1, С-1, С-2, С-3 и С-4. В различных странах мира доминируют разные серогруппы и серотипы возбудителя (1, 7-9). Естественное переболевание птиц, как правило, сопровождается формированием слабого и непродолжительного иммунитета, по этой причине возможны рецидивы болезни (6, 10).

Основным звеном в системе мер борьбы с инфекционным ринитом кур служит специфическая профилактика. Вакцинация птиц обеспечивает выработку напряженного иммунитета, обусловленного наличием антигемагглютинирующих антител. Выявлена тесная связь между протективной функцией иммунитета и титром специфических антител в реакции торможения гемагглютинации (7, 11, 12). Вакцинация позволяет значительно сократить использование антибактериальных препаратов, что, в свою очередь, способствует предотвращению проблем, связанных с появлением резистентности у микроорганизмов и остаточными количествами антибиотиков в продукции птицеводства (12-13).

До середины 1990-х годов большинство коммерческих вакцин против инфекционного ринита кур производились из штаммов серогрупп А и С, что негативно отражалось на их эффективности, особенно в регионах с активной циркуляцией возбудителя серогруппы В. Однако за последние 20 лет были разработаны и внедрены в лабораторную практику экспресс-методы дифференциации типов *A. paragallinarum*, позволяющие точно определять антигенный профиль возбудителя. Большинство современных вакцин позиционируются как универсальные, поскольку содержат в своем составе набор штаммов *A. paragallinarum* серогрупп А, В и С. При этом между отдельными серотипами внутри серогрупп А и С имеется перекрестная защита. Вместе с тем эффективность препаратов против возбудителя серогруппы В напрямую зависит от антигенного соответствия вакцинного штамма и эпизоотического, циркулирующего в конкретном географическом регионе.

В настоящее время в России зарегистрирована одна отечественная трехвалентная вакцина против инфекционного ринита кур, применение которой ограничено из-за высокой реактогенности. Для профилактики заболевания наиболее широко используются вакцины зарубежного производства, что создает зависимость страны от импортных препаратов.

В результате проведенных в Федеральном центре охраны здоровья

животных (ФГБУ ВНИИЗЖ) диагностических исследований патологического материала были выделены 12 изолятов *A. paragallinarum* от птиц из различных регионов России (2). При серологическом типировании была установлена их принадлежность к серотипу В-1. Необходимо отметить, что в 2014 году два изолята возбудителя были выделены из патологического материала от больных кур при вспышке заболевания на крупных птицефабриках Российской Федерации, применявших коммерческую трехвалентную эмульсионную вакцину против инфекционного ринита кур. Этот факт позволяет усомниться в эффективности вакцины, используемой на территории Российской Федерации. Кроме того, в последние годы в Европе и Азии также участились вспышки, обусловленные *A. paragallinarum* серотипа В-1 на фоне использования коммерческих вакцин против инфекционного ринита кур. Причина слабой перекрестной защиты между штаммами серотипа В-1 до сих пор не установлена. Поскольку исследованные штаммы серотипа В-1 обеспечивают лишь частичную перекрестную защиту, то, вероятно, эффективная вакцина может быть изготовлена только из антигена штамма, выделенного в конкретном географическом регионе, где указанный серотип эндемичен (7, 10, 14). При этом широкое распространение возбудителя инфекционного ринита кур серотипа В-1 на территории России свидетельствует о целесообразности включения штамма в состав отечественной вакцины (1, 15).

Эффективность вакцины в значительной степени определяется не только качеством и количеством антигена в ее составе, способом введения препарата, но также применением соответствующих адъювантов (16-18). При этом выбор неспецифического стимулятора иммунитета в первую очередь должен основываться на гарантии безопасности готового препарата (3, 19, 20).

Эндемичный для Российской Федерации штамм *A. paragallinarum* № 5111 серотипа В-1 в процессе культивирования способен накапливаться в высокой концентрации с сохранением стабильной гемагглютинирующей активности и высокой вирулентности. Изучение свойств экспериментальных образцов вакцины против инфекционного ринита кур, изготовленных на его основе с использованием различных адъювантов, имеет важное научное и практическое значение для ветеринарии.

В настоящей работе впервые представлены результаты, характеризующие безвредность, антигенные и протективные свойства образцов вакцины, включающей антиген нового отечественного штамма *A. paragallinarum* № 5111 серогруппы В.

Цель работы состояла в оценке иммунобиологических свойств образцов сорбированной и эмульсионной вакцины против инфекционного ринита кур на основе антигена штамма *Avibacterium paragallinarum* № 5111.

Методика. Для изготовления экспериментальных образцов вакцины использовали цельноклеточный антиген штамма *A. paragallinarum* № 5111 (серотип В-1), инактивированный формальдегидом. Концентрация бактерий в объеме прививной дозы (0,5 см³) каждого образца составляла 10⁹ микробных клеток по оптическому стандарту мутности. Образец сорбированной вакцины содержал 3,75 мг гидроокиси алюминия в иммунизирующей дозе. Образец эмульсионной вакцины содержал в составе масляный адъювант Montanide ISA 70 VG («SEPPIC», Франция) в количестве 70 % по массе.

Иммунобиологические свойства вакцины оценивали в 2019 году на

125 серонегативных к *A. paragallinarum* цыплятах (*Gallus gallus* L.) кросса Хайсекс коричневый в возрасте 1,5-2,0 мес, которые были доставлены с птицефабрики, благополучной по инфекционным болезням.

Безвредность образцов вакцины определяли при инъекциях цыплятам в 2-кратной дозе (1,0 см³). Каждый образец вводили подкожно в область средней трети шеи с дорсальной стороны и внутримышечно в область груди (по 5 гол. в каждом варианте). Наблюдение за клиническим состоянием птиц и наружный осмотр места введения образцов осуществляли ежедневно в течение 42 сут. По завершении эксперимента проводили убой птицы и визуальную оценку состояния тканей в месте инъекции на разрезе. Степень поражения тканей при внутримышечном введении оценивали по критериям, предложенным Н.Д. Stone (21): слабые поражения (побледнение тканей, окружающих место введения препаратов с отсутствием признаков воспаления и остатков инкапсулированной вакцины), умеренные поражения (гиперемия и отек окружающих тканей размером от 1,0 до 2,0 см в диаметре с наличием остатков инкапсулированной или диффузно распределенной вакцины), сильные поражения (выраженное воспаление тканей с образованием гранулемы диаметром от 3,0 до 4,0 см, содержимое жидкой консистенции вытекает на разрезе или имеет вид творожистой массы).

Протективные свойства образцов вакцины определяли на 75 цыплятах (три группы по 25 гол. в каждой). Птицу I группы иммунизировали образцом сорбированной вакцины, II группы — эмульсионным образцом, III группу невакцинированных цыплят использовали в качестве контроля. Образцы вакцины вводили подкожно в среднюю треть шеи с дорсальной стороны в дозе 0,5 см³, 2-кратно с интервалом 20 сут. Спустя 15 сут после ревакцинации цыплят заражали 1-суточной бульонной культурой штамма *A. paragallinarum* № 5111 с концентрацией 5 ед. по оптическому стандарту мутности. Суспензию микробных клеток вводили интраназально в объеме 0,2 см³. В течение 7 сут после заражения проводили ежедневное наблюдение за клиническим состоянием цыплят. Протективные свойства образцов вакцины определяли по методике, предложенной V.E. Soriano с соавт. (22) для определения вирулентности штаммов *A. paragallinarum*, с тем исключением, что достоверная разница между средним количеством баллов по опытной и контрольной группам свидетельствовала об иммуногенности препарата.

Степень проявления клинических признаков заболевания у зараженной птицы оценивали следующим образом: 0 баллов — отсутствие симптомов, 1 балл — небольшие истечения из носовых ходов и/или слабое опухание области носовых пазух, 2 балла — умеренное истечение из носовых ходов и/или умеренное опухание области носовых пазух, 3 балла — обильные истечения из носовых ходов и/или выраженное опухание области носовых пазух, 4 балла — обильные истечения из носовых ходов и выраженное опухание области носовых пазух, хрипы. При обнаружении симптомов заболевания баллы по отдельным особям суммировали и делили на общее число зараженных цыплят в группе. Во время эксперимента и по завершении опыта проводили патологоанатомическое вскрытие с бактериологическим анализом содержимого носовых пазух от павших и убитых цыплят. Защищенными от заболевания считали птиц, не имеющих клинических признаков, без патологоанатомических изменений на вскрытии и с отрицательным результатом бактериологического исследования.

Антигенные свойства вакцины и продолжительности иммунитета определяли на 30 птицах (три группы по 10 гол. в каждой). Цыплят I группы иммунизировали образцом сорбированной вакцины, птицу II группы —

эмульсионной вакциной, контролем служила III группа невакцинированных птиц. Схему иммунизации и метод введения вакцины использовали такие же, как в эксперименте по определению протективных свойств. Антигенную активность образцов оценивали по содержанию гуморальных антител в реакции торможения гемагглютинации (РТГА) (23, 24). Отбор проб крови проводили из подкрыльцовой вены перед иммунизацией, спустя 20 сут после первого введения препаратов, а также через 15, 40, 100, 160 и 220 сут после ревакцинации. При исследовании сывороток крови в РТГА положительными считали значения титров антител $\geq 4,0 \log_2$, отрицательными — $\leq 2,0 \log_2$.

Полученные данные подвергали статистической обработке с определением средних арифметических значений (M) и стандартных ошибок средних ($\pm SEM$). Достоверность различий между результатами оценивали по t -критерию Стьюдента. Разницу между значениями считали статистически значимой при $p < 0,05$.

Результаты. Первым этапом работы было определение безвредности образцов вакцины. Через 1 сут после внутримышечного введения эмульсионной вакцины у трех цыплят на месте инъекции образовывалась небольшая припухлость, которая самостоятельно исчезала в течение 3-5 сут.

Рис. 1. Состояние тканей у цыплят (*Gallus gallus* L.) кросса Хайсекс коричневый при введении вакцины против инфекционного ринита кур на основе антигена штамма *Avibacterium paragallinarum* № 5111 (серотип В-1) с разными адьювантами: А — отечность и гиперемия тканей в месте подкожной инъекции образца сорбированной вакцины, Б — соединительнотканная гранулема с наличием остатков вакцины в месте подкожной инъекции образца эмульсионной вакцины, В — отсутствие поражений мышечной ткани в месте внутримышечного введения образца сорбированной вакцины, Г — наличие в тканях инкапсулированных остатков эмульсионной вакцины в месте внутримышечного введения образца сорбированной вакцины (лабораторные исследования).

По окончании опыта при вскрытии убитых птиц обнаруживали поражения тканей легкой и средней степени тяжести без выраженной воспалительной реакции. Если в месте подкожного введения сорбированной вакцины у некоторых цыплят наблюдали незначительную отечность и гиперемию подкожной клетчатки, то в месте инъекции эмульсионной вакцины у всех птиц происходило образование соединительнотканного гранулем с наличием остатков вакцины без некротических поражений и выраженной воспалительной реакции окружающих тканей (рис. 1).

При внутримышечной инъекции сорбированной вакцины наблюдали слабую степень поражения тканей, которая характеризовалась отсутствием выраженных признаков воспаления и остатков инкапсулированной вакцины. При аналогичном способе введения образца эмульсионной вакцины отмечали умеренную степень воспаления тканей с образованием гранулемы до 2,0 см в диаметре и остатками вакцины в виде мелких инкапсулированных капель, располагающихся вдоль мышечных волокон. Некрозы и кровоизлияния в окружающих тканях не обнаруживали. Полученные результаты свидетельствовали о безопасности обоих образцов вакцины при подкожном введении.

Следующим этапом работы было определение протективных свойств образцов вакцины при контрольном заражении цыплят 1-суточной бульонной культурой штамма *A. paragallinarum* № 5111. Спустя 1-2 сут после заражения у большинства птиц из контрольной группы и через 3-4 сут у некоторых цыплят из опытных групп отмечали развитие однотипных клинических признаков, проявляющихся ринитом, синуситом и конъюнктивитом. На начальной стадии заболевания у птиц наблюдали прозрачные истечения из носовых ходов и незначительное одно- или двустороннее опухание в области носовых пазух. Впоследствии у больных цыплят контрольной группы выделения из носа мутнели и приобретали вязкую консистенцию. При этом воспалительный экссудат часто закупоривал носовые ходы, в результате чего птица начинала дышать через рот. Дальнейшее развитие заболевания у цыплят контрольной группы сопровождалось выраженным опуханием области носовых пазух и конъюнктивальных мешков. У большинства больных птиц отмечали угнетенное состояние с частичным или полным отказом от корма и воды. При локализации инфекции в глубоких отделах респираторного тракта у некоторых цыплят дыхание сопровождалось хрипами. У иммунизированных птиц симптомы заболевания проявлялись в виде незначительного водянистого истечения из носовых ходов и слабозаметного одно- или двустороннего опухания области носовых пазух. Средняя продолжительность заболевания у вакцинированных цыплят составляла 3-4 сут, тогда как у особей из контрольной группы — 5-7 сут (табл.).

Протективные свойства образцов вакцины против инфекционного ринита кур с разными адьювантами при заражении цыплят (*Gallus gallus* L.) кросса Хайсекс коричневый 1-суточной бульонной культурой штамма *A. paragallinarum* № 5111 (лабораторные исследования)

Вакцина	Число птиц, шт.				Тяжесть заболевания, сумма баллов по группе ($M \pm SEM$)	Эффективность, %
	всего	заболевших	павших	с выделенным возбудителем		
Сорбированная	25	3	0	3	0,12±0,03	92
Эмульсионная	25	4	0	4	0,16±0,04	88
Контроль (без вакцинации)	25	23	7	25	3,00±1,00	

При сравнении результатов контрольного заражения птиц, иммунизированных разными образцами вакцины, значимых различий не наблюдали ($p > 0,05$), однако отмечали существенную разницу между опытными и контрольной группами ($p < 0,05$). В I группе цыплят, иммунизированных образцом сорбированной вакцины, протективная эффективность препарата составила 92 %. При этом сумма баллов, характеризующих тяжесть течения заболевания, была в 25 раз ниже по сравнению с аналогичным показателем у птиц из контрольной группы. Во II группе птиц, иммунизированных образцом эмульсионной вакцины, эффективность препарата составила 88 %. В контрольной группе клинические признаки наблюдали у 23 цыплят, из них 7 цыплят пало.

Патологоанатомические изменения у цыплят наблюдали преимущественно в верхних отделах респираторного тракта. У иммунизированных цыплят, имеющих клинические признаки заболевания при жизни, в носовых пазухах отмечали незначительное количество серозного экссудата. У большинства птиц контрольной группы подкожная клетчатка в области лицевой части головы имела выраженную отечность и студневидную консистенцию. Носовые ходы и пазухи у всех цыплят были заполнены фибринозным или фибринозно-гнойным экссудатом. В конъюнктивальных мешках часто обнаруживали серозно-гнойный экссудат с пленками фибрина. При поражении дистальных участков респираторного тракта, как правило, отмечали фибринозную пневмонию и аэросаккулиты. При бактериологическом исследовании воспалительного экссудата из носовых пазух был выделен возбудитель болезни. Исходный штамм *A. paragallinarum* № 5111 выделили от 3 птиц из I группы, 4 цыплят из II группы и от всех особей в контроле.

Анализ динамики образования специфических антител в сыворотках крови птиц после двукратной иммунизации свидетельствовал о высокой антигенной активности обоих образцов вакцины (рис. 2).

Рис. 2. Титр гуморальных антител в реакции торможения гемагглютинации (РТГА) и продолжительность иммунитета у цыплят (*Gallus gallus* L.) кросса Хайсекс коричневый, иммунизированных образцами вакцины против инфекционного ринита на основе антигена штамма *Avibacterium paragallinarum* № 5111 (серотип В-1) с разными адъювантами: 1 — эмульсионная вакцина, 2 — сорбированная вакцина, 3 — контроль (без вакцинации); 1-я и 2-я вакцинации ($M \pm SEM$, лабораторные исследования).

Через 20 сут после первой вакцинации у птиц, привитых образцами сорбированной и эмульсионной вакцин, средние значения титров антител были ниже пороговых значений ($p > 0,05$). Существенное увеличение титров антител в сыворотках крови цыплят мы наблюдали только через 15 сут после второй иммунизации. Максимальное значение титров антител у птиц из I и II групп было отмечено нами через 60 сут после иммунизации — соответственно $7,5 \pm 0,5$ и $8,9 \pm 0,2 \log_2$ ($p < 0,05$).

Через 240 сут после вакцинации у цыплят, иммунизированных сорбирован-

ным препаратом, наблюдали снижение количества антител до $5,5 \pm 0,6 \log_2$, в то время как у птиц, иммунизированных образцом эмульсионной вакцины,

титр составлял $8,7 \pm 0,8 \log_2$ ($p < 0,05$). В контрольной группе в течение всего срока наблюдения специфические антитела к *A. paragallinarum* не выявляли.

Согласно данным литературы, эмульсионные вакцины обладают большей иммуногенностью, чем сорбированные, но при их применении существует вероятность развития местных воспалительных реакций вплоть до образования абсцессов. Сорбированные вакцины, как правило, имеют меньшую реактогенность для животных, однако при подкожном введении иногда вызывают образование соединительнотканых гранулем (21, 25, 26).

Известно, что эффективность инактивированных вакцин напрямую зависит от количества бактериального антигена в дозе вакцинного препарата. Избыточное количество антигена может вызывать угнетение иммунной системы организма вплоть до развития иммунологической толерантности и обуславливать возникновение нежелательных реакций в месте введения препарата. В свою очередь, при недостаточной дозе антиген не индуцирует иммунологическую перестройку в организме (10, 13). Наши эксперименты показали, что исследуемые образцы вакцины были безопасны для птиц при подкожных инъекциях. По результатам оценки протективных свойств опытные образцы обладали выраженной иммуногенной активностью. Эффективная инактивированная вакцина должна обеспечивать защиту не менее 80 % привитого поголовья. В наших экспериментах протективная активность образца сорбированной вакцины составила 92 %, а эмульсионной — 88 %. Аналогичные результаты были получены зарубежными учеными. Так, P.J. Blackall с соавторами проводили испытания по оценке безопасности и эффективности инактивированных вакцин, содержащих в качестве адьюванта минеральное масло и гель гидрооксида алюминия. Оба вида препарата вводили подкожно в среднюю треть шеи с дорсальной стороны. Спустя 3 нед птиц подвергали экспериментальному заражению. Степень защиты эмульсионного препарата составила 80 %. Вакцина на основе алюминиево-гидрооксидного геля обеспечивала защиту в 94 % случаев (10, 26). Полученные нами результаты также согласуются с данными других авторов, утверждающих, что сорбированные и эмульсионные препараты против инфекционного ринита кур обладают высокой антигенной активностью после 2-кратного применения (27).

Таким образом, испытанные образцы вакцины против инфекционного ринита на основе антигена штамма *Avibacterium paragallinarum* № 5111 (серотип В-1) были безвредны при подкожном введении цыплятам кросса Хайсекс коричневый в 2-кратной дозе. В месте подкожного введения сорбированной вакцины у некоторых цыплят наблюдали незначительную отечность и гиперемию подкожной клетчатки. В месте инъекции эмульсионной вакцины у всех птиц образовывались соединительнотканые гранулемы с наличием остатков вакцины без выраженной воспалительной реакции окружающих тканей. Эффективность сорбированного препарата составила 92 %, эмульсионного образца вакцины — 88 %. Оба типа вакцин индуцировали образование антигемагглютинирующих антител. Максимальные значения титров антител наблюдали через 60 сут после вакцинации. У птиц, привитых сорбированным препаратом и эмульсионной вакциной, средний титр антител был равен соответственно $7,5 \pm 0,8$ и $8,9 \pm 0,7 \log_2$ ($p > 0,05$). Для ранней защиты птиц от инфекционного ринита кур предпочтительнее использовать сорбированную вакцину. В то же время более напряженный и продолжительный иммунитет обеспечивает вакцина с масляным адьювантом.

PROPERTIES OF EXPERIMENTAL SAMPLES OF VACCINE AGAINST AVIAN INFECTIOUS CORYZA

M.S. Firsova, A.V. Potekhin, Val.A. Evgrafova, O.V. Pruntova ✉, V.S. Rusaleev,
R.V. Yashin

Federal Center for Animal Health Control, FGBU VNIIZZh, mkr. Yurievets, Vladimir, 600901, e-mail firsova@arriah.ru, andrey@biokorm.cat, pruntova@arriah.ru (✉ corresponding author), rusaleev@arriah.ru, evgrafova@arriah.ru, yashin@arriah.ru

ORCID:

Firsova M.S. orcid.org/0000-0002-1531-004X

Potekhin A.V. orcid.org/0000-0002-3529-4809

Evgrafova Val.A. orcid.org/0000-0003-3053-6976

The author declares no conflict of interests

Received September 10, 2020

Pruntova O.V. orcid.org/0000-0003-3143-7339

Rusaleev V.S. orcid.org/0000-0002-4972-6326

Yashin R.V. orcid.org/0000-0002-1385-705X

doi: 10.15389/agrobiology.2021.2.315eng

Abstract

Avian infectious coryza is caused by the bacteria *Avibacterium paragallinarum* and occurs throughout the world in countries with a well-developed poultry industry, causing significant economic losses to the poultry industry. The specific prevention is the main link in combating infectious rhinitis of chicken. Vaccination of birds provides expressed immunity due to generation of anti-hemagglutinating antibodies. The presented research study is the first to report on immunobiological properties of two formulations of a developed experimental vaccine against avian infectious coryza which contains the formaldehyde-inactivated antigen of a new *A. paragallinarum* strain No. 5111 (serogroup B). The aim of the work was to evaluate the safety, antigenic and protective properties of the absorbed and emulsion-based formulations of a vaccine against chicken infectious rhinitis based on the *A. paragallinarum* strain No. 5111. A whole-cell antigen of the *A. paragallinarum* strain No. 5111 (serotype B-1) inactivated with formaldehyde was used to produce experimental samples of the vaccine for trials. A dose for immunization (0,5 cm³) contained 10⁹ inactivated microbial cells and 3.75 mg of aluminum hydroxide for the absorbed vaccine formulation or oil adjuvant Montanide ISA 70 VG («SEP-PIC», France, 70 % wgt) for the emulsion-based formulation. The immunobiological properties of the vaccine were tested on 125 Haysex brown chickens (*Gallus gallus* L.) of 1.5-2.0 months of age which were seronegative to *A. paragallinarum*. The safety of the vaccine samples was tested by injecting chickens in a 2-fold dose (1.0 cm³). Each sample was injected subcutaneously in the middle third of the neck and intramuscularly in the chest using 5 chickens per each formulation. The clinical status of the birds was observed daily for 42 days. At the end of the experiment, the chickens were slaughtered and the incision of the injection site was visually examined. Three groups of chickens (25 birds each, 75 chickens in total) were assigned to determine protective properties of the vaccine. The birds of group I were immunized with the absorbed formulation of the vaccine, the chickens of group II were injected with the emulsion-based formulation. The birds were injected subcutaneously into the middle third of the neck at a dose of 0.5 cm³ twice with a 20-day interval. Unvaccinated chickens of group III were used as a control. In 15 days after revaccination, the chickens of groups I, II, and III were infected with a 1-day broth culture of the *A. paragallinarum* strain No. 5111 with a concentration of 5 units according to the optical standard of bacterial suspension turbidity. The clinical status of the chickens was observed during 7 days after infection. The post-mortem examination was performed with a bacteriological analysis of the contents of the nasal sinuses during the experiment and at the end of the experiment. The vaccine antigenicity and the duration of immunity were determined on 30 birds (three groups of 10 birds each). The chickens of group I were immunized with the absorbed vaccine sample, group II — with an emulsion-based sample, and unvaccinated birds of group III served as a control. The vaccine antigenicity was assessed based on humoral antibody level using the hemagglutination inhibition test (HI test). The mild to moderate tissue lesions were observed at the injection site without an obvious inflammatory reaction. For the absorbed formulation, slight subcutaneous swellings and hyperemia were observed in some chickens at the injection site. For the emulsion-based formulation, the formation of connective tissue granules with the vaccine residues without necrotic lesions and an obvious inflammatory reaction of the surrounding tissues occurred at the injection site in all birds. No significant differences in the condition of chicks from vaccinated groups were observed ($p > 0.05$), but there was a significant difference between the birds of the test and control groups ($p < 0.05$). The level of protection of chickens after double immunization with the adsorbed

vaccine and the emulsion-based vaccine was 92 % and 88 %, respectively. Twenty days after the first vaccination with absorbed and emulsion-based formulations, the average antibody titers were below the threshold level ($p > 0.05$). Increased antibody titers in chicken sera were observed only at day 15 post the second immunization. At day 60 post vaccination, the antibody levels in the chicken sera reached their maximum, i.e., $7.5 \pm 0.8 \log_2$ in poultry immunized with the adsorbed vaccine and $8.9 \pm 0.7 \log_2$ in birds immunized with the emulsion-based vaccine ($p > 0.05$). In chickens vaccinated with the vaccine containing aluminum hydroxide gel, a decrease in the antibody titer to $5.5 \pm 0.7 \log_2$ was observed at day 240 while in birds immunized with the emulsion-based vaccine the titer remained at the level of $8.7 \pm 0.8 \log_2$ ($p > 0.05$). No specific antibodies to the causative agent of infectious coryza were detected in chickens of the control group during the entire observation period, including the diseased and convalescence period. Thus, our findings show that the adsorbed and emulsion-based experimental formulations of the developed vaccine against avian infectious coryza are safe and demonstrate high antigenicity and immunogenicity after double administration.

Keywords: infectious coryza in chicken, *Avibacterium paragallinarum* strains, antigen, adjuvant, sample of vaccine.

REFERENCES

1. *Bolezni domashnikh i sel'skokhozyaistvennykh ptits* /Pod redaktsiei B.U. Kelneka, Kh. Dzh. Barnsa, Ch.U. Bierda, L.R. Makdugalda, I.M. Seifa [Bolezni domashnikh i sel'skokhozyaistvennykh ptits. B.U. Kelnek, Kh. Dzh. Barns, Ch.U. Bierd, L.R. Makdugald, I.M. Seif (eds.)]. Moscow, 2011 (in Russ.).
2. Evgrafova V.A. *Biologicheskie svoystva izolyatov vozbuditelya infektsionnogo rinita kur, vydelennykh na territorii Rossiiskoi Federatsii. Kandidatskaya dissertatsiya* [Biological properties of isolates of the causative agent of chicken infectious rhinitis isolated on the territory of the Russian Federation. PhD Thesis]. Vladimir, 2018 (in Russ.).
3. Ali M., Hossain M.S., Akter S., Khan M.A.H.N.A., Hossain M.M. Pathogenesis of infectious coryza in chickens (*Gallus gallus*) by *Avibacterium paragallinarum* isolate of Bangladesh. *The Agriculturists*, 2013, 11(1): 39-46 (doi: 10.3329/agric.v11i1.15240).
4. Conde M.D., Huberman Y.D., Espinoza A.M., Delgado R.I., Terzolo H.R. Vaccination of one-day-old broiler chicks against infectious coryza. *Avian Diseases*, 2011, 6(1): 119-122 (doi: 10.1637/9655-946311-DIGEST.1).
5. Kumar A., Rawat M., Verma R. Studies on absolute requirement of NAD and reduced oxygen tension for growth of field isolates of *Avibacterium paragallinarum* of poultry origin. *Indian Journal of Poultry Science*, 2012, 47(1): 90-92.
6. Tu T., Hsieh M., Tan D., Ou S., Shien J., Yen T., Chang P. Loss of the capsule increases the adherence activity but decreases the virulence of *Avibacterium paragallinarum*. *Avian Diseases*, 2015, 59(1): 87-93 (doi: 10.1637/10937-091414-Reg).
7. Deshmukh S., Banga H.S., Sodhi S., Brar R.S. An update on avian infectious coryza: its re-emerging trends on epidemiology, etiologic characterization, diagnostics, therapeutic and prophylactic advancements. *Journal of Dairy, Veterinary and Animal Research*, 2015, 2(3): 86-92 (doi: 10.15406/jdvar.2015.02.00037).
8. Sun H., Xie S., Li X., Xu F., Li Y., Boucher C.E., Chen X. Selection of *Avibacterium paragallinarum* Page serovar B strains for an infectious coryza vaccine. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 2018, 199: 77-80 (doi: 10.1016/j.vetimm.2018.04.001).
9. Page L.A., Rosenwald A.S., Price F.C. Haemophilus infections in chickens. IV. Results of laboratory and field trials of formalinized bacterins for the prevention of disease caused by *Haemophilus gallinarum*. *Avian Diseases*, 1963, 7(3): 239-256.
10. Blackall P.J., Eaves L.E., Rogers D.G., Firth G. An evaluation of inactivated infectious coryza vaccines containing a double-emulsion adjuvant system. *Avian Diseases*, 1992, 36(3): 632-636 (doi: 10.2307/1591758).
11. Akter S., Saha S., Khan K., Amin M., Haque M. Isolation and identification of *Avibacterium paragallinarum* from layer chickens in Gazipur, Bangladesh. *Microbes and Health*, 2014, 3(1): 9-11 (doi: 10.3329/mh.v3i1.19769).
12. Muhammad T.M., Sreedevi B. Detection of *Avibacterium paragallinarum* by polymerase chain reaction from outbreaks of Infectious coryza of poultry in Andhra Pradesh. *Veterinary World*, 2015, 8(1): 103-108 (doi: 10.14202/vetworld.2015.103-108).
13. Charoenvisal N., Chansiripornchai P., Chansiripornchai N. Efficacy of four commercial infectious coryza vaccines on prevention of *Avibacterium paragallinarum* serovar A, B, and C infection in Thailand. *Pakistan Veterinary Journal*, 2017, 37(3): 287-292.
14. Chukiatsiri K., Sasipreeyajan J., Neramitmansuk W., Chansiripornchai N. Efficacy of autogenous killed vaccine of *Avibacterium paragallinarum*. *Avian Diseases*, 2009, 53(3): 382-386 (doi: 10.1637/8563-121908-Reg.1).
15. Wahyuni A.E.T.H., Ramandani D., Prakasita V.C., Widyarini S. Efficacy of tetravalent coryza

- vaccine against the challenge of *Avibacterium paragallinarum* serovars A and B isolates from Indonesia in chickens. *Veterinary World*, 2019 12(7): 972-977 (doi: 10.14202/vetworld.2019.972-977).
16. Isaenko E.Yu., Babich E.M., Eliseeva I.V., Zhdamarova L.A., Belozerskii V.I., Kolpak S.A. *Annals of Mechnikov Institute*, 2013, 4: 5-21 (in Russ.).
 17. 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 Diseases*, 2017, 61(1): 55-63 (doi: 10.1637/11481-081016-Reg).
 18. Gupta R.K. Aluminum compounds as vaccine adjuvants. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 1998, 32(3): 155-172 (doi: 10.1016/S0169-409X(98)00008-8).
 19. Bomford R. V knige: *Biotehnologiya kletok zhivotnykh. Tom 2* /Pod redaktsiei R.E. Spiera, Dzh.B. Griffithsa; Perevod s angliiskogo V.M. Tarasenko [In: Biotechnology of animal cells. Volume 2. R.E. Spier, Dzh.B. Griffiths (eds.)]. Moscow, 1989, 264-280 (in Russ.).
 20. Blackall P.J., Soriano-Vargas E. Infectious coryza and related bacterial infections. In: *Disease of Poultry* /Swayne D.E. (ed.). John Wiley & Sons, NY, 2013: 859-873 (doi: 10.1002/9781119421481.ch20).
 21. Stone H.D. Newcastle disease oil emulsion vaccines prepared with animal, vegetable, and synthetic oils. *Avian Diseases*, 1997, 41(3): 591-597 (doi: 10.2307/1592149).
 22. 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 Diseases*, 2004, 48(4): 886-889 (doi: 10.1637/7188-033104R1).
 23. Garçon N., Leroux-Roels G., Cheng W.-F., Vaccine adjuvants. *Perspectives in Vaccinology*, 2011, 1(1): 89-113 (doi: 10.1016/j.pervac.2011.05.004).
 24. Page L.A. Haemophilus infections in chickens. I. Characteristics of 12 *Haemophilus* isolates recovered from diseased chickens. *American Journal of Veterinary Research*, 1962, 23: 85-95.
 25. Garçon N., Segal L., Tavares F., Van Mechelen M. The safety evaluation of adjuvants during vaccine development: The AS04 experience. *Vaccine*, 2011, 29(27): 4453-4459 (doi: 10.1016/j.vaccine.2011.04.046).
 26. Gong Y., Zhang P., Wang H., Zhu W., Sun H., He Y., Shao Q., Blackall P.J. Safety and efficacy studies on trivalent inactivated vaccines against infectious coryza. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 2014, 158(1-2): 3-7 (doi: 10.1016/j.vetimm.2013.01.015).
 27. Byarugaba D.K., Minga U.M., Gwakisa P.S., Katunguka-Rwakashya E., Bisgaard M., Olsen J.E. Virulence characterization of *Avibacterium paragallinarum* isolates from Uganda. *Avian Pathology*, 2007, 36(1): 35-42 (doi: 10.1080/03079450601102947).