

УДК 619:615.371:616.98:579.842.14:636.5

ВИВЧЕННЯ ІМУНОГЕННИХ ТА ПРОТЕКТИВНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ СЕРІЙ ІНАКТИВОВАНИХ ВАКЦИН ПРОТИ САЛЬМОНЕЛЬОЗУ ПТИЦІ

Обуховська О.В., Стегній Б.Т., Завгородній А.І., Петренчук Е.П., Глебова К.В., Крюкова Н.В., Вовк С.І.

Національний науковий центр «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини», м. Харків

Плис В.М., Біла Н.В., Колбасіна Т.В.

Дніпропетровська дослідна станція ННЦ «ІЕКВМ», м. Дніпропетровськ

Важливе місце серед бактеріальних хвороб птиці посідають сальмонельози [2, 8, 13, 15, 17]. Особливості біології сальмонел – наявність широкого спектру факторів патогенності, унікальні ферментативні властивості та здатність переживати в зовнішньому середовищі впродовж тривалих строків – забезпечують умови для широкого розповсюдження цих збудників серед сприйнятливих тварин (сальмонели є убіквітарними патогенами). Окремі серовари сальмонел, зокрема *Salmonella Enteritidis*, спричиняють не тільки сальмонельози птиці, але й сальмонельозні токсикоінфекції людини [3, 6, 14]. Основним джерелом патогенних сальмонел в таких ситуаціях являються продукти птахівництва (яйце та м'ясо птиці) [3, 5, 6, 14].

Однією з найвагоміших умов забезпечення стабільного благополуччя щодо цих інфекцій є застосування ефективних засобів специфічної профілактики (вакцин) [1, 4, 7, 10, 11]. На сьогоднішній день сучасних вакцин проти сальмонельозів птиці не існує, однак у світі застосовують певний перелік інактивованих та атенуованих вакцин проти сальмонельозів птиці, спричинених цим сероваром сальмонел [9, 12, 16].

Метою нашої роботи було вивчення імуногенних та протективних властивостей експериментальних серій інактивованих вакцин проти сальмонельозу птиці, виготовлених на основі розроблених нами технологій.

Матеріали та методи. Експериментальні серії вакцин були виготовлені з виробничого штаму *Salmonella Enteritidis* M. Перша експериментальна серія була виготовлена на основі інактивованого сальмонельозного бактерину, друга – із суміші сальмонельозних анатоксинів та фімбріальних адгезинів (1:1) за оригінальними методиками, розробленими співробітниками ННЦ «ІЕКВМ».

До обох експериментальних серій вакцин було додано ад'ювант Мантанід ISA 70 в кількості 70 %; 30 % складали сальмонельозні антигени, бакмасу стандартизували таким чином, щоб кожна доза вакцини (0,3 см³) утримувала 1·10⁸ КУО.

Виготовлені препарати піддавали контролю на відсутність контамінації бактеріальною та грибною мікрофлорою відповідно до ДСТУ 4483, відсутність контамінації мікоплазмами – відповідно до ДСТУ 4613, повноту інактивації – за загальноприйнятими методиками.

З метою вивчення імуногенних та протективних властивостей експериментальних серій інактивованих вакцин було проведено в досліді на курчатах. Всього було сформовано 3 групи (по 40 гол.) курчат за принципом аналогів.

1 група (дослідна). Птиця була імунізована вакциною на основі сальмонельозного бактерину (ВСБ) дворазово в віці 30 та 37 днів (внутрішньому язеву в грудні м'язи, об'єм вакцини 0,3 см³).

2 група (дослідна). Птиця була імунізована вакциною на основі суміші анатоксинів та фімбріальних адгезинів (БАА) дворазово в віці 30 та 37 днів (внутрішньому язеву в грудні м'язи, об'єм вакцини 0,3 см³).

3 група (контрольна). Птиця залишалась інтактною.

З метою визначення наявності та титру антитіл до *Salmonella Enteritidis*, а також динаміки формування імунітету у птиці всіх груп відбирали проби сироваток крові до імунізації, а також в наступні строки – через 7 днів після першої вакцинації та через 14, 28, 42, 56, 70, 84, 112 та 126 днів після другої вакцинації.

Сироватку крові птиці перевіряли в ПРА із «Антигеном для діагностики сальмонельозів тварин групи Д в реакції аглютинації» (ТУУ 24.4-00497087-105:2010).

Через 14 днів після останнього введення вакцинних препаратів курчата всіх груп були інфіковані внутрішньому язеву добовою культурою *Salmonella enteritidis* M в кількості 2·10⁹ КУО. За птицею вели спостереження впродовж 10 днів, враховуючи наявність та інтенсивність прояву клінічних ознак. Після чого кури всіх груп були примусово вбиті шляхом тотального знекровлення, від птиці були відібрані внутрішні органи для проведення бактеріологічних досліджень.

Результати досліджень. Результати вивчення експериментальних серій інактивованих вакцин проти сальмонельозу птиці показали, що застосовані нами технології виготовлення дозволяють отримати стерильні та повністю інактивовані препарати.

У досліді на білих мишах встановлено, що обидві серії препаратів є нешкідливими. Введення вакцин не викликало місцевих реакцій, жодна з тварин не загинула впродовж періоду спостереження, показники життєдіяльності були в межах фізіологічних норм. Таким чином, виготовлені серії вакцин були визнані нешкідливими і застосовані в подальших дослідіах на птиці.

Експериментальними серіями вакцин були імунізовані дві дослідні групи курчат дворазово внутрішньому язеву в об'ємі 3 см³. Після другої імунізації за курчатами вели спостереження впродовж 126 днів. Місцевої реакції на введення вакцин не спостерігали, загальний стан птиці також був задовільним.

Наявність та рівень титрів антитіл проти *Salmonella Enteritidis* перевіряли в розгорнутій ПРА із «Антигеном для діагностики сальмонельозів тварин групи Д в реакції аглютинації».

Встановлено, що обидва вакцинних препарати стимулюють наробку специфічних антитіл, починаючи з 14-ої доби після другого введення (табл.).

Таблиця – Середні показники рівнів протисальмонельозних антитіл у курчат дослідних груп (Log 2).

Строки спостереження	Групи птиці			
	ВСБ	БАА	Контроль	
До імунізації	0,00	0,00	0,00	
Термін з моменту другої імунізації, днів	14	8,25±0,05	7,60±0,05	0,00
	28	8,30±0,06	7,85±0,05	0,00
	42	8,30±0,06	7,85±0,05	0,00
	56	8,30±0,06	7,85±0,05	0,00
	70	8,25±0,07	7,70±0,08	0,00
	84	8,15±0,04	7,70±0,08	0,00
	112	8,15±0,04	7,65±0,03	0,00
	126	8,10±0,06	7,65±0,03	0,00

Розділ 4. Розробка та виробництво ветеринарних імунологічних препаратів. Контролювання якості, випробування, стандартизація, сертифікація, маркетинг і провайдинг ветеринарних імунобіологічних препаратів

Як видно з даних таблиці 1, імунізація птиці двома вакцинними препаратами стимулює наробку специфічних антитіл на високому рівні 7,85-8,3 Log₂. Однак, імунна відповідь на введення ВСБ більш інтенсивна.

На рисунку можна побачити динаміку напруженості імунної відповіді у птиці.

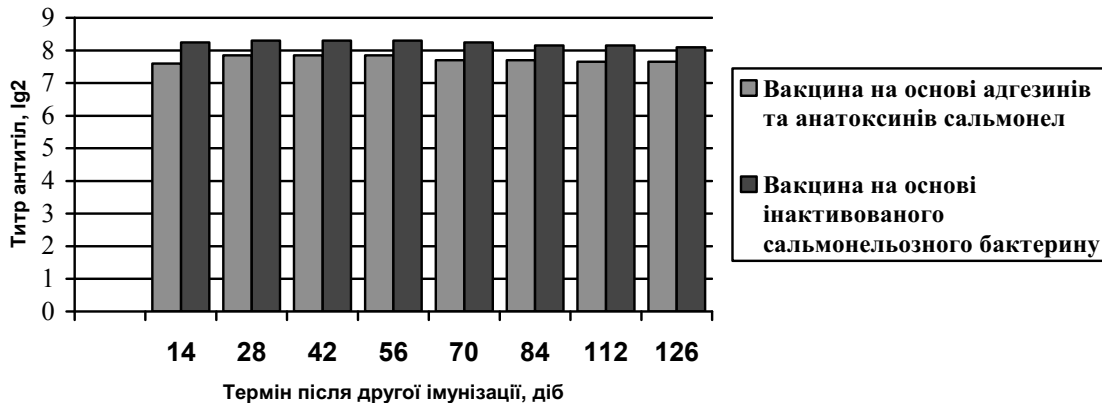


Рис. Динаміка зміни рівня антитіл у курчат, імунізованих експериментальними серіями вакцин проти сальмонельозу птиці

На рисунку показано, що введення ВСБ стимулює наробку специфічних антитіл на рівні 8,25 Log₂ на 14 добу після другого введення, на 28 добу інтенсивність імунної відповіді підвищується до 8,25 Log₂ і стабільно утримується на цьому рівні до 56 доби. Після цього ми спостерігаємо поступове, але незначне зниження приблизно на 0,05 Log₂ впродовж 14 діб, однак, і наприкінці досліду у птиці зберігається високий показник напруженості імунної відповіді (8,1 Log₂).

За умов застосування ВАА ми спостерігали менш інтенсивну імунну відповідь – на 14 добу після другого введення 7,6 Log₂, на 28 – 7,85 Log₂. Найвищі титри утримувались до 56 доби, а на 126 – знижувались до 7,65 Log₂, що практично на 1,5 Log₂ нижче ніж у групі ВСБ.

Протективні властивості обох вакцинних препаратів були вивчені в досліді по прямому зараженню птиці. На 14 добу після другого введення вакцин по 20 голів з усіх груп птиці були заражені культурою *Salmonella Enteritidis*. За птицею спостерігали впродовж 10 діб. На 3-тю добу птиця контрольної групи захворіла із типовими клінічними ознаками гострої сальмонельозної інфекції. Спостерігали пригнічення, відмову від корму, виснажуючу діарею, лихоманку. 13 голів птиці з цієї групи загинули на 5 добу, жива птиця була примусово забита на 10-ту добу спостереження. З крові серця, жовчі, паренхіми селезінки, вмісту сліпих відрізках кишечника та трубчастій кістці від усіх курей контрольної групи було ізольовано культуру *Salmonella Enteritidis*.

У птиці обох дослідних груп ніяких клінічних ознак не спостерігали. На 10-ту добу спостереження птиця дослідних груп була забита, внутрішні органи піддані бактеріологічним дослідженням. З жовчного міхура однієї голови з групи ВСБ та двох голів з групи ВАА була ізольована культура *Salmonella Enteritidis*. З проб біологічного матеріалу від інших особин обох дослідних груп сальмонели ізольовані не були.

Висновки. 1. Застосована нами технологія отримання інактивованих вакцинних препаратів проти сальмонельозу птиці дозволяє отримати стерильні, нешкідливі та нереагеногенні препарати.

2. Встановлено, що інактивована вакцина на основі бактерину *Salmonella Enteritidis* за умов 2-разового внутрішньом'язевого введення забезпечує напрацювання специфічних антитіл на рівні $8,30 \pm 0,06 \log_2$, тоді як вакцина на основі суміші анатоксинів та фімбріальних адгезинів *Salmonella Enteritidis* за умов аналогічної схеми застосування ініціює утворення специфічних антитіл на нижчому рівні ($7,85 \pm 0,05 \log_2$).

3. Застосування вакцини на основі бактерину по запропонованій нами схемі забезпечує захист 95 % імунізованих особин від зараження штамом-пробійником, при застосуванні вакцини на основі суміші анатоксинів та фімбріальних адгезинів цей показник дещо нижчий (90 %).

4. Обидві застосовані нами технології виготовлення інактивованих вакцин проти сальмонельозу птиці дозволяють отримати препарати із вираженими імуногенними та проективними властивостями і можуть бути покладені в основу технологічних циклів щодо виготовлення вітчизняних препаратів для профілактики цих інфекцій.

Список літератури

1. Венгеренко, Л.А. Ветеринарно-санитарное обеспечение эпизоотического благополучия в птицеводствах Российской Федерации [текст] // Л.А. Венгеренко // Ветеринария – 2009. – №8. – С. 3-6.
2. Мониторинг возбудителей бактериальных инфекций [текст] / В. Гусев [с соавт.] // Птицеводство. – 2003. – №2. – С.8-9.
3. Кафтырёва, Л.А. Сальмонеллёзы у людей, связанные с продуктами промышленного птицеводства [текст] / Л.А. Кафтырёва, А.В. Забровская // 1-й Международный ветеринарный конгресс по птицеводству 18-22 апреля 2005 г. – М., 2005. – С.188-190.
4. Крохин, Н.Л. Сальмонеллёз птиц основы профилактики [текст] / Н.Л. Крохин, С.В. Панкратов // IV Межд. вет. конгр. по птицев., 8-11 апреля 2008 г. – М., 2008. – С. 122-125.
5. Куликовский, А.В. Эмерджентные пищевые зоонозы [текст] / А.В. Куликовский // М., Крафт, 2004. – 174 с.
6. Куликовский, А.В. Профилактика пищевых токсикоинфекций человека и концепция ХАССП [текст] / А.В. Куликовский // Ветеринария. – 2011. – № 1. – С. 19-24.
7. Ленев, С.В. Вакцинопрофилактика сальмонеллёза кур [текст] / С.В. Ленев, Н.А. Дрогалина, С.А. Бугаев // III Межд. Ветер. конгр. по птицев. 10-13 апреля 2007 г., Москва. – М., 2007. – С. 153-156.
8. Результаты эпизоотологического мониторингу щодо мікоплазма галлісептік-інфекції та бактеріальних хвороб на території України [текст] / О.В. Обуховська [та ін.] // Ветеринарна медицина: міжвід. темат. наук. зб.- X., 2010. – Вып.94. – С. 182-185.
9. Рождественская, Т.Н. Специфическая профилактика инфекции *Salmonella enteritidis* у птицы [текст] / Т.Н. Рождественская // Российский вет. журн. С.-х. животные. – 2009. – №1. – С. 46-48.
10. Современные методы контроля сальмонеллеза [текст] / В. Афонюшкин [с соавт.] // Птицеводство. – 2008. – № 9. – С. 43-44.
11. Старосельский, А. Проблемы и пути решения сальмонеллезной инфекции в современном птицеводстве [текст] / А. Старосельский // Ветеринария. – 2010. – №2. – С. 13-15.
12. Barrow, P.A. Immunological control of *Salmonella* in poultry [text] / P.A. Barrow In: Blankenship L.C., ed. Colonisation control of human bacterial enteropathogens in poultry.-Acad. Press., San Diego, USA. – 1991. – P.199-217.
13. Capita, R. Occurrence of *Salmonella* in retail chicken carcasses and their products in Spain [text] / R. Capita, M. Alvarez-Astorga,

C. Alonso-Calleja // Intern. J. Food Microbiol. – 2003. – Vol.81. – P. 161-173. **14.** Kimura, A.C. Chicken consumption is a newly identified risk factor for sporadic Salmonella enteric serotype Enteritidis infections in the United States: a case-control study in FoodNet sites [text]/ A.C. Kimura // Clin. Infect. Dis. – 2004. – Vol.38. – P.244-252. **15.** Messens, W. Eggshell penetration by Salmonella: a review [text]/ W. Messens, K. Grijspeerdt, L. Herman // World Poult. Sci. J. – 2005. – Vol.61, N1. – P.71-85. **16.** Results of a Salmonella Enteritidis vaccination field trial in broiler-breeder flocks in the Netherlands [text]/ A. Feberwee [et al.] // Avian Dis. – 2000. – Vol.44. – P.249-255. **17.** Routes for Salmonella contamination of poultry meat: epidemiological study from hatchery to slaughterhouse [text]/ M. Hendrickx [et al.] // Epidemiol. and Infect. – 2002. – Vol.129. – P.253-265.

THE STUDY OF IMMUNOGENIC AND PROTECTIVE CHARACTERISTIC OF EXPERIMENTAL SERIES OF INACTIVATED VACCINES AGAINST AVIAN SALMONELLOSIS

Obukhovskaya O.V., Stegnyy B.T., Zavgorodniy A.I., Petrenchuk E.P., Glebova K.V., Krukova N.V., Vovk S.I.

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

Plys V.N., Belaya N.V., Kolbasina T.V.

Dnipropetrovsk Research Station of the NSC "IECVM", Dnipropetrovsk

In experiments on birds there were studied immunogenic and protective properties of two series of inactivated vaccines against Avian Salmonellosis (serovar Salmonella Enteritidis). There has been found that the inactivated vaccine based on the Salmonella bacterin at 2-fold intramuscular injection stimulates the formation of specific antibodies at the level of $8,30 \pm 0,06 \log_2$ and protects 95% of immunized individuals from infection of Salmonella. We also show that a vaccine based on a mixture of fimbrial adhesins and toxoids of Salmonella Enteritidis at the application of a similar immunization initiated the formation of specific antibodies to the low level ($7,85 \pm 0,05 \log_2$), protective properties of the vaccine is 90%.

УДК 619:616.98:579.843.96:636.6

ОТРИМАННЯ ГІПЕРІМУННОЇ СІРОВАТКИ КРОВІ ДЛЯ ВИГОТОВЛЕННЯ АНТИГЕНУ АНТИТІЛЬНОГО ЕРИТРОЦИТАРНОГО ЩОДО ДІАГНОСТИКИ ПАСТЕРЕЛЬОЗУ (ХОЛЕРИ) ПТИЦІ В РЕАКЦІЇ НЕПРЯМОЇ ГЕМАГЛЮТИНАЦІЇ

Плис В.М.

Дніпропетровська дослідна станція Національного наукового центру «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини»

Стегній Б.Т.

Національний науковий центр «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини», м. Харків

Пастерельоз (холера) птиці – інфекційна хвороба, яка вражає всі види сільськогосподарської птиці, диких перелітних та синантропних птахів і характеризується септицемією, геморагічним діатезом і високою смертністю. Збудником пастерельозу є *Pasteurella multocida* – нерухома, коротка, овальної форми, біполярна, грам негативна бактерія. Хвороба може перебігати в блискавичній, гострій, підгострій та хронічній формах [2, 3, 5].

Попередній діагноз на пастерельоз (холеру) ставиться комплексно, враховуючи анамнестичні та епізоотологічні дані, клінічні ознаки, патологоанатомічні зміни та результати бактеріологічних досліджень, а заключний – через 48 годин [2, 3, 4, 5].

Тому найбільш актуальною є робота по розробці експрес-методу діагностики пастерельозу (холери) птиці [1, 3, 6].

Метою нашої роботи було отримати гіперімунну сироватку крові птиці для виготовлення антигену антитільного еритроцитарного щодо прижиттєвої діагностики пастерельозу (холери) птиці в реакції непрямой гемаглютинації та визначити її специфічність та антигенну активність.

Матеріали і методи. Дослідження проводились в секторі імуноепізоотологічного моніторингу бактеріальних інфекцій птиці лабораторії епізоотології бактеріальних хвороб птиці та лабораторії епізоотології вірусних хвороб птиці Дніпропетровської дослідної станції Національного наукового центру «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини».

У дослідях щодо отримання гіперімунної сироватки крові від птиці використовували задепонований виробничий штам пастерел № 1931. Рівень специфічних антитіл у сироватці крові птиці визначали в реакції непрямой гемаглютинації (РНГА) з виготовленим антигеном антитільним еритроцитарним, розробленим спільно з Національним науковим центром «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини» та Дніпропетровською дослідною станцією Національного наукового центру «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини».

Нами проведено дослід, у якому порівняли схеми отримання гіперімунної сироватки крові з застосуванням повного і неповного ад'юванту Фрейнда. Для проведення досліді було завезено 60 голів гусей річного віку, породи «Італійська» з господарства-постачальника, благополучного щодо пастерельозу (холери) та інших інфекційних хвороб птиці.

Птиця утримувалася в спеціалізованих віваріях, які відповідають ветеринарно-санітарним вимогам, годівля здійснювалася за раціонами відповідно до виду, віку, породи та періоду продуктивності.

Птахопоголів'я розділили на дві групи за принципом пар аналогів контрольна (n=10) і дослідна (n=50).

Птиці дослідної групи вводили внутрішньом'язево по 0,5 см³ інактивованої бактеріальної маси культури *Pasteurella multocida*, змішаної у співвідношенні 1:1 з повним ад'ювантом Фрейнда. Через 28 діб повторно вводили внутрішньом'язево по 0,5 см³ інактивованої бактеріальної маси культури *Pasteurella multocida*, у такому ж співвідношенні, але використовували неповний ад'ювант Фрейнда.

Птиці контрольної групи внутрішньом'язево вводили по 0,5 см³ стерильного фізіологічного розчину. На сьому добу після повторного введення інактивованої бактеріальної маси культури *Pasteurella multocida* у птиці відбирали кров для досліджень приросту титрів специфічних антитіл до *Pasteurella multocida* в реакції непрямой гемаглютинації з антигеном антитільним еритроцитарним.

До імунізації і після (через 35 діб) відбирали проби крові від дослідної птиці, для отримання сироватки крові, яку досліджували в реакції непрямой гемаглютинації з пастерельозним антигеном антитільним еритроцитарним з метою визначення рівня титрів специфічних антитіл до пастерельозу (холери) птиці.

Результати досліджень. Визначення специфічності та антигенної активності щодо стандартного антигену в РНГА представлені в таблиці 1.

Представлені в таблиці 1 результати досліджень свідчать про те, що при застосуванні ад'юванту Фрейнда отримані гіперімунні сироватки крові мали високий рівень титрів специфічних антитіл до *Pasteurella multocida* та складали 1:256 тобто зросли на 4,1 \log_2