УДК: 619:616.98:579.843.94:615.371:636.52/.58(477)
DOI: 10.31073/vet_biotech43-07

КОЛЕСНІКОВ А.*, e-mail: artemon909@gmail.com,
СТЕГНІЙ Б., д-р вет. наук, e-mail: boris.stegniy@gmail.com
ННЦ «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини»

РОЗРОБКА ТЕХНОЛОГІЧНОГО РЕГЛАМЕНТУ ВИГОТОВЛЕННЯ ВІТЧИЗНЯНОЇ ІНАКТИВОВАНОЇ ВАКЦИНИ ПРОТИ ГЕМОФІЛЬОЗУ КУРЕЙ З ВИКОРИСТАННЯМ ЕПІЗООТИЧНО АКТУАЛЬНИХ ШТАМІВ, ВИДІЛЕНИХ НА ТЕРИТОРІЇ УКРАЇНИ

На території України зареєстровано дев'ять вакцин проти гемофільозу курей закордонного виробництва, у складі яких використовуються міжнародні еталонні штами і включають щонайменше по одному штаму з кожної серогрупи А, В і С. Згідно з літературними даними, використання не епізоотично актуальних штамів у складі вакцин проти інфекційних захворювань може бути причиною появи варіантних штамів. Тому, для виготовлення вітчизняної вакцини проти гемофільозу курей, нами було використано епізоотично актуальні штами Av. paragallinarum (SS 6/20, серотип А; SS 7/20, серотип В; SS 8/20, серотип С), виділені на території України. Рідке поживне середовище з додаванням НАД (20 мкг/м^3) та 7% дефібринованої крові коня дозволило накопичити бакмасу використаних штамів з концентрацією не менше, ніж 1,0×10^9 КУО/см^3. Формальдегід в концентрації 0,5% забезпечив повну інактивацію інфекційних властивостей збудника. Як ад'юванти та емульгатори для експериментальних вакцин були використані «Montanide ISA 70», гідроокис алюмінію (ГОА) та сапонін. Отриманий біопрепарат відповідав дослідженим лабораторним критеріям якості та може бути використаний для подальших міжлабораторних і виробничих випробувань на птиці.

Ключові слова: *збудник, вакцина, технологія, поживне середовище, нешкідливість.*

Вступ. Респіраторним захворюванням належить провідне місце у структурі інфекційних патологій птиці. Етіологічними агентами цих захворювань можуть виступати як віруси (ньюкаслська хвороба, грип птиці, інфекційний бронхіт курей, інфекційний ларинготрахеїт, метапневмовірусна інфекція), так і бактерії (респіраторний мікоплазмоз, бордетеліоз, орнітобактеріоз тощо). Респіраторною хворобою є й інфекційний риніт (гемофільоз курей), викликаний бактеріями виду *Avibacterium paragallinarum*, раніше відомими як *Haemophilus paragallinarum*. Гемофільоз має світове економічне значення і призводить до зниження показників росту бройлерів, а

* Аспірант

також до зниження продуктивності серед курей-несучок до 40%, особливо на піку несучості [1, 2].

За антигенними властивостями збудник класифікований L.A. Page за допомогою реакції гальмування гемаглютинації (РГА) на три серовари (A, B і C) [3, 4]. У свою чергу K. Kume створив альтернативну схему, засновану на тесті РГА [5]. Слід зазначити, що модифікована схема K. Kume розпізнає серогрупи A, B та C, які відповідають сероварам L. A. Page A, B та C, при цьому розпізнаються дев'ять сероварів (A1 – A4, B – 1 і C1 – C4) [6].

Розподіл трьох серогруп за L.A. Page не є однаковим у різних країнах. Так, про всі три серогрупи повідомлялося в Канаді [7], США [8, 9], Аргентині [10, 11], Бразилії [12], Перу [13], Мексиці [9], Гватемалі [14], Еквадорі [15], Великобританії [16], Іспанії [17], Німеччині [18], Швейцарії [19], Нідерландах [20], Болгарії [21], Китаї [22, 23], Індії [24], Індонезії [25, 26], Ізраїлі [27], Іраку [28], Єгипті [29], Південній Африці [30], Австралії [31], Філіппінах [32] і Японії [33]. У Австралії лише серогрупи A та C [34], тоді як у Зімбабве відомі тільки серогрупи B та C [35, 36]. У Малайзії [37] була описана тільки серогрупа A, у Панамі і Тайланді – тільки серогрупа B [27, 38], а на Тайвані – тільки серогрупа C [39].

Крім того, деякі штами серогрупи B було зареєстровано в Аргентині, Еквадорі, Перу, США та Зімбабве як варіанти (Bvar) та можуть представляти собою новий імунотип [13, 40, 41]. Проте не всі держави повідомляють про цей розподіл.

У середини 90-х років XX ст. значне поширення збудника інфекційного риніту птиці серед розвинутих країн, де птахівництво є економічно значущим напрямком, сприяло розробці засобів специфічної профілактики цього захворювання. Більшість комерційних вакцин містили тільки штами *Av. paragallinarum* серотипів A і C, що негативно позначалося на їх протективних властивостях, особливо за активної циркуляції патогенного збудника серотипу B. Тому на сьогодні практично всі препарати містять три серотипи, що розрізняються тільки кількістю штамів збудника у кожному серотипі. Найбільш популярною й ефективною є вакцинація проти інфекційного риніту курей-несучок і племінної птиці безпосередньо перед початком яйценосності. Найчастіше вакцинація збігається із плановим переміщенням птиці із корпусів дорощування ремонтного молодняку в приміщення для утримання промислового стада. Такий тип вакцинації дозволяє уникнути найзначніших втрат, зумовлених розвитком інфекційного риніту в період піку продуктивності. Однак у складніших випадках, коли бактеріоносійство виявляється у курчат раннього віку, рекомендується проводити як мінімум дві вакцинації проти цієї хвороби з інтервалом між

імунізацією не менш як 6 тижнів (у разі крайньої потреби птиця може бути вакцинована у віці 5 тижнів).

Аналіз розповсюдження інфекційного риніту у світі, незважаючи на помітний прогрес в діагностиці та вакцинопрофілактиці інфекційних хвороб птиці, показав, що проблема боротьби з бактеріальними інфекціями, зокрема з інфекційним ринітом, не вирішена [8, 24–26].

Що стосується України, у нашій державі відсутня нормативна документація та вітчизняні препарати щодо діагностики та профілактики гемофільозу курей. Тому будь-яка науково-практична інформація щодо *Av. paragallinarum* є вкрай актуальною.

Мета роботи. Розробити технологію виготовлення інактивованої емульсованої вакцини проти гемофільозу курей з використанням вітчизняних епізоотично актуальних штамів (включаючи відпрацювання схеми інактивації отриманої сировини, підбір режимів змішування компонентів вакцини та визначення відповідності отриманого біологічного препарату).

Матеріали та методи досліджень. У цій 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 отримання високоспецифічного та високоактивного антигену для серологічних досліджень та виготовлення інактивованої емульсин-вакцини проведено ряд дослідів з підбору рідких та твердих поживних середовищ для культивування ізолятів *Av. paragallinarum* (SS 6/20, серотип A; SS 7/20, серотип B; SS 8/20, серотип C), а саме: м’ясопептонний бульйон (МПБ) та агар (МПА); м’ясопептонний бульйон та агар Хоттінгера (МПБХ, МПАХ); триптон-соєвий бульйон (ТСБ) та агар (ТСА); серцево-мозкове середовище з додаванням гемоглобіну, вітамінних добавок та факторів росту; кров’яний агар; шоколадний агар.

Під час інкубації бактерій у рідких поживних середовищах відзначали інтенсивність, характер помутніння середовища, наявність осаду і його структуру під час струшування.

На щільних поживних середовищах визначали форму, колір, блиск, розмір, поверхню, рівність країв, прозорість і консистенцію колоній.

Світлову мікроскопію бактерій проводили при збільшенні × 1000 разів. Мазки фарбували за Грамом.

Біохімічні властивості визначали у культур *Av. paragallinarum*, вирощених на щільному середовищі через 24 години інкубації за 37°C шляхом культивування в поживному середовищі «Основа бульйону з феноловим

червоним М 054, виробництва «*Himedia*». Оксидазну активність визначали за допомогою комерційного набору відповідно до інструкції щодо застосування. Відсутність продукції каталази перевіряли за допомогою 3%-го розчину перекису водню.

Для інактивації культур використовували формалін у кінцевій концентрації 0,5% (у перерахунку на суху речовину) за об'ємом та температури 37 С упродовж 48 год.

Інактивований формаліном антиген, призначений для виготовлення вакцини, зберігався до використання за умов холодильника (плюс 2–8°С), а антиген для серологічних реакцій додатково консервували розчином тіомерсалу та зберігали аналогічно вакцинній сировині.

Отримані інактивовані антигени трьох штамів підлягали контролю на відсутність контамінації сторонньою мікрофлорою відповідно до ДСТУ 4483, відсутності контамінації мікоплазмами – відповідно до ДСТУ 4613. Повноту інактивації та нешкідливість на білих мишах визначали загальноприйнятими в бактеріологічній практиці методами .

Визначення типу емульсії експериментальних серій інактивованої вакцини проводили методом «крапля у воді». Стабільність емульсії перевіряли центрифугуванням за 2000 rpm упродовж 10 хв, частка водної фази у верхній частині пробірки не повинна перевищувати 10% від загального об'єму проби. Кінематичну в'язкість вимірювали за допомогою капілярного скляного віскозиметру ВПЖ-2, згідно з інструкцією.

Результати досліджень та їх обговорення. Як відомо, одним із головних методів захисту птиці від збудників інфекційних захворювань є вакцинопрофілактика. У зв'язку з цим нами було проведено аналіз засобів специфічної профілактики проти гемофільозу курей, які зареєстровані та доступні в Україні.

Так, за даними Державного науково-контрольного інституту біотехнології і штамів мікроорганізмів (ДНКІБШМ) на території України зареєстровано дев'ять вакцин проти гемофільозу курей з п'яти закордонних країн (Німеччина, Ізраїль, Нідерланди, Франція, Іспанія) (табл. 1) [42]. Слід зауважити, що у науковій літературі відсутні дані щодо ефективності використання імпортних вакцин проти гемофільозу курей у птахівничих господарствах на території України, а є лише комерційна рекламна інформація з описом високої якості препаратів.

Таблиця 1

Зареєстровані профілактичні вакцини проти гемофільозу курей на території України (дані ДНКІБШМ на 13.04.2021 з чинними реєстраційними посвідченнями)

Номер р/п та термін його дії	Назва препарату	Власник р/п	Виробник препарату
ВА-00518-02-12 до 06.11.2022	Вольвак® АС Плюс+НХ+ІБ+СЗН КВ (*емульсія)*	Берінгер Інгельхайм Ветмедіка ГмбХ / Німеччина	Берінгер Інгельхайм Ветмедіка С.А. де Ц.В. / Мексика
ВА-00549-02-13 до 05.03.2023	АйСі Квадро, ІС Quadro (*емульсія)*	АБІК Біолоджикал Лабораторіз Лтд. / Ізраїль	АБІК Біолоджикал Лабораторіз Лтд. / Ізраїль
ВА-00618-02-13 до 28.10.2023	Нобіліс® COR4+IB+ND+EDS, Nobilis® COR4+IB+ND+EDS (*емульсія)*	Інтервет Інтернешнл Б.В. / Нідерланди	Інтервет Інтернешнл Б.В. / Нідерланди; Мерк Шарп енд Дом Енімал Хелс, С.Л. СА / Іспанія
ВА-00656-02-13 до 28.10.2023	Нобіліс® Coryza, Nobilis®Coryza (*суспензія)*	Інтервет Інтернешнл Б.В. / Нідерланди	Інтервет Інтернешнл Б.В. / Нідерланди; Мерк Шарп енд Дом Енімал Хелс, С.Л. СА / Іспанія
ВА-00697-02-14 до 09.07.2024	Вольвак® АС Плюс (*емульсія)*	Берінгер Інгельхайм Ветмедіка ГмбХ / Німеччина	Берінгер Інгельхайм Ветмедіка С.А. де Ц.В. / Мексика
ВА-00916-02-18 до 20.12.2023	СЕВАК КОРИЗА 3 ГЕЛЬ, CEVAC CORYZA 3 GEL *(суспензія)*	Сева Санте Анімаль / Франція	Сева-Філаксія Ветеринарі Байолоджикалс Ко Лтд / Угорщина
ВА-00939-02-19 до 09.07.2024	КОРІПРАВАК АН, CORIPRAVAC AH (*суспензія)*	Лабораторіос Хіпра, С. А. / Іспанія	Лабораторіос Хіпра, С. А. / Іспанія
ВА-00944-02-19 до 10.10.2024	Нобіліс® Corvac-4, Nobilis® Corvac-4 – (*суспензія)*	Інтервет Інтернешнл Б.В. / Нідерланди	Мерк Шарп енд Дом Енімал Хелс, С.Л. СА / Іспанія
ВА-00947-02-19 до 10.10.2024	Севак Кориза Комбо 6, Cevac Coryza Combo 6 (*емульсія)*	Сева Санте Анімаль / Франція	Сева-Філаксія Ветеринарі Байолоджикалс Ко Лтд/ Угорщина

У складі як полівалентних (три вірус-бактеріальні вакцини), так і моновалентних біопрепаратів (шість вакцин) використовується інактивований збудник гемофільозу та представлений він у вигляді двох препаративних форм – емульсії та суспензії.

З метою розроблення технологічного регламенту виготовлення вітчизняної інактивованої вакцини проти гемофільозу курей нами було проведено ряд дослідів щодо отримання інактивованих антигенів як для виготовлення вакцини, так і проведення серологічних реакцій після щеплення

дослідної птиці з метою контролювання імунної відповіді організму. Для виконання поставленої задачі ми використали епізоотично-актуальні ізоляти *Av. paragallinarum* (SS 6/20, серотип А; SS 7/20, серотип В; SS 8/20, серотип С), які були виділені на території України. Результати висівів культур на рідкі та тверді поживні середовища наведено у таблиці 2.

Таблиця 2

Результати підбору поживних середовищ для культивування ізолятів збудника гемофільозу *Avibacterium paragallinarum*

вико-риста-ний ізолят	**Назва поживного середовища**											
	М'ясопептонний бульйон (МПБ)	М'ясопептонний агар (МПА)	М'ясопептонний бульйон Хоттінгера (МПБХ)	М'ясопептонний агар Хоттінгера (МПАХ)	Триптон-соєвий бульйон (ТСБ)	Триптон-соєвий агар (ТСА)	Серцево-мозковий бульйон (СМБ)	Серцево-мозковий агар (СМА)	Серцево-мозковий бульйон (СМБ) з додаванням гемоглобіну, вітамінних добавок та факторів росту	Серцево-мозковий агар(СМА) з додаванням гемоглобіну, вітамінних добавок та факторів росту	Кров'яний агар з додаванням гемоглобіну, вітамінних добавок та факторів росту	Шоколадний агар з додаванням гемоглобіну, вітамінних добавок та факторів росту
SS 6/20, серотип А	ріст відсутній	ріст відсутній	ріст відсутній	ріст відсутній	ріст відсутній	ріст відсутній	ріст відсутній	ріст відсутній	інтенсивний ріст	інтенсивний ріст	інтенсивний ріст	інтенсивний ріст
SS 7/20, серотип В	ріст відсутній	ріст відсутній	ріст відсутній	ріст відсутній	ріст відсутній	ріст відсутній	ріст відсутній	ріст відсутній	інтенсивний ріст	інтенсивний ріст	інтенсивний ріст	інтенсивний ріст
SS 8/20, серотип С	ріст відсутній	ріст відсутній	ріст відсутній	ріст відсутній	ріст відсутній	ріст відсутній	ріст відсутній	ріст відсутній	інтенсивний ріст	інтенсивний ріст	інтенсивний ріст	інтенсивний ріст

Як видно з результатів (табл. 2), найбільш придатним для культивування виробничих штамів є рідкі (СМБ) та тверді (СМА, шоколадний та кров'яний агари) поживні середовища з додаванням гемоглобіну, вітамінних добавок і факторів росту.

Враховуючи вищезазначене та з метою отримання антигену для виготовлення вакцини інактивованої проти гемофільозу курей, нами було використано рідке поживне середовище «Brain Heart Infusion» (BHI) (Merck 1.10493, Дармштадт, Німеччина) із додаванням 25 мкг/см^3 нікотинамідаденіндинуклеотиду (НАД) (Sigma, N8129, Сент-Луіс, Міссурі, США) та 7% дефібринованої крові коня. Інкубували висіви впродовж 48 год за температури 37°С в умовах звичайної атмосфери.

Отриману бактеріальну масу перевіряли на активність на агарі Колумбія (Oxoid, CM0331, Basingstoke, Hants, UK) з додаванням гемоглобіну, вітамінних добавок та факторів росту. У результаті було накопичено достатню бакмасу виробничих штамів у концентрації не менше 1,0×10^9 КУО/см^3.

Наступним етапом був підбір інактиванту та регламенту інактивації, які б забезпечували повну інактивацію збудника (пригнічення хімічної чи біологічної активності) та не впливали на його антигенні та імуногенні характеристики. У результаті було встановлено, що оптимальним інактивантом для цього мікроорганізму є формальдегід у кінцевій концентрації 0,5% за температури 37 С упродовж 48 год. Використання формаліну дозволило повністю інактивувати збудник, що було підтверджено висівом на вищезазначені поживні середовища.

З метою отримання вакцинної сировини інактивовані клітини збудника осаджували центрифугуванням за 3000 об. упродовж 30 хв. Надосадову рідину видаляли, осад для виробництва інактивованої вакцини ресуспендували у фосфатно-буферному розчині до концентрації 500 од. (≈ 500 м.к./см^3) за оптичним стандартом каламутності та зберігали до використання за температури 4–6°С. У свою чергу, антиген для серологічних реакцій консервували розчином тіомерсалу 100 мкг/см^3 і в такому вигляді зберігали до використання за 4–6 С.

Отримані інактивовані антигени піддавали внутрішньому контролю на відсутність контамінації сторонньою мікрофлорою, мікоплазмами та повноту інактивації. Установлено, що антигени не контаміновані сторонньою мікрофлорою, мікоплазмами та повністю інактивовані.

Одним з основних компонентів інактивованих вакцинних препаратів є ад'юванти, які забезпечують формування стійкого імунітету в щепленої птиці, що зберігається тривалий час, тому важливим моментом був підбір ад'юванту, співвідношення антигену та ад'юванту, а також технології емульсування. Для

отримання експериментальних серій емульсин-вакцин були використані наступні ад'юванти: «Montanide ISA 70»; гідроокис алюмінію (ГОА); ГОА+сапонін.

Для виготовлення емульсованої інактивованої вакцини з ресуспендованого осаду інактивованих клітин збудників (SS 6/20, серотип А; SS 7/20, серотип В; SS 8/20, серотип С) готували суспензію у рівному співвідношенні 1:1:1 з концентрацією не менше, ніж $1,0\times10^9$ КУО/см^3.

Змішування проводили з використанням лабораторного диспергатора за 500 об/хв близько однієї-двох хвилин для утворення передемульсії, а потім протягом п'яти хвилин за 2500 об/хв для утворення емульсії.

Усього було отримано три експериментальні зразки інактивованої емульсованої вакцини проти гемофільозу птиці:

– зразок № 1 (*Av. paragallinarum SS 6/20*, серотип А; *Av. paragallinarum SS 7/20*, серотип В; *Avibacterium paragallinarum SS 8/20*, серотип С) з концентрацією не менше $1,0\times10^9$ КУО/см^3 кожного штаму; інактивант – 37% розчин формаліну в об'ємі 0,5% до загального об'єму бакмаси; ад'ювант – ГОА;

– зразок №2 (*Av. paragallinarum SS 6/20*, серотип А; *Av. paragallinarum SS 7/20*, серотип В; *Av. paragallinarum SS 8/20*, серотип С) з концентрацією не менше $1,0\times10^9$ КУО/см^3 кожного штаму; інактивант – 37% розчин формаліну в об'ємі 0,5% до загального об'єму бакмаси; ад'ювант – ГОА+сапонін;

– зразок №3 (*Av. paragallinarum SS 6/20*, серотип А; *Av. paragallinarum SS 7/20*, серотип В; *Av. paragallinarum SS 8/20*, серотип С) з концентрацією не менше $1,0\times10^9$ КУО/см^3 кожного штаму; інактивант – 37% розчин формаліну в об'ємі 0,5% до загального об'єму бакмаси; ад'ювант – Montanide ISA 70.

Під час визначення стабільності емульсій (центрифугування в режимі 3000 об./ хв. 20 хв.) отриманих серій препарату встановлено, що всі серії експериментальної вакцини стабільні. Так, частка водної фази у верхній частині пробірки експериментальної серії №1 дорівнювала 8% від загального об'єму проби, серії №2 – 6%, серії №3 – 4%.

За результатами проведеного випробування в'язкість експериментальної вакцини серії №1 склала 120 мм^2/сек, серії №2 – 130 мм^2/сек, серії №3 – 70 мм^2/сек. За прийнятими нормами в'язкість препарату не повинна перевищувати 200 мм^2/сек, що свідчить про відповідність досліджених зразків нормативним вимогам.

Нешкідливість експериментальних зразків вакцини було доведено у дослідах на білих мишах. Сформовано чотири групи: три дослідних та контрольна (по 8 гол. кожна). Тваринам дослідних груп вводили препарат підшкірно, у дозі 0,3 см^3, двічі, з терміном ревакцинації 14 діб. Тваринам контрольної групи препарат введено не було. На 14-ту добу після ревакцинації

тварин дослідних груп було евтаназовано та відібрано внутрішні органи (трахея, легені, печінка, селезінка). Під час проведення бактеріологічних досліджень біологічного матеріалу, відібраного від дослідних мишей, росту культур *Av. paragallinarum* на збагачених поживних середовищах не виявлено.

Ці наукові результати є першим опублікованим дослідженням щодо розробки технологічного регламенту виготовлення вітчизняної трьохвалентної вакцини проти місцевих українських штамів збудників гемофільозу курей.

У склад комерційних вакцин входять міжнародні еталонні штами або, останнім часом, місцеві/регіональні штами розробника біопрепарату і включають щонайменше по одному штаму з кожної серогрупи A, B і C [35, 43–45].

У цьому дослідженні до складу експериментальної вакцини також входили епізоотично актуальні штами трьох серогруп (серотип A – SS 6/20; серотип B – SS 7/20; серотип C – SS 8/20), які були виділені в Україні від клінічно хворої сільськогосподарської птиці. Перед розробкою технології ми вже мали дані щодо патогенності вказаних ізолятів і здатності викликати клінічні ознаки, та загибель експериментально інфікованої птиці. Так, вірулентність ізолятів *Av. paragallinarum* різнилась. Висока середня сума балів відмічена з використанням ізолятів SS 8/20 (серотип C) – від 0,8 до 0,9 (вірулентний) та SS 6/20 (серотип A) – від 0,5 до 0,7 (вірулентний). У свою чергу, у ізолята SS 7/20 (серотип B) цей показник був найнижчим – від 0,2 до 0,3 (низьковірулентний). Щодо реізоляції, то ізолят SS 8/20 (серотип C) продемонстрував високі показники (80–100%), ізоляти SS 6/20 та SS 7/20 (80% та 40–60%) дещо поступаються ізоляту SS 8/20, за відтворюваністю вони також були нижче, ніж у SS 8/20, але однаковими між собою (60–80%) [46].

На сьогодні в доступних літературних джерелах немає прямих порівнянь сучасних вакцин, під час виробництва яких антиген накопичували у різних поживних середовищах, тому ефективність засобів не може бути безпосередньо порівняна. Так, накопичення культури *Av. paragallinarum* у жовтковому мішку курячих ембріонів застосовували ще на початку 1960-х років для виробництва перших вакцин проти гемофільозу курей [4]. Але, такі вакцини не давали належного захисту від клінічних ознак гемофільозу птиці, вони лише попереджали розвиток вторинних уражень повітроносних мішків і зменшували зниження несучості, пов’язане зі спалахами хвороби. Проте, вакцини, антиген яких отриманий за культивування в поживному бульйоні, забезпечували кращий захист від збудника [47, 48]. Також проводились дослідження з використанням інших рідких середовищ, включаючи настої з курячого м’яса різних типів [49, 50] та модифікований відвар Casman [51, 52].

Спираючись на дані літературних джерел [43, 53, 54], у нашій роботі були використанні як рідкі, так і тверді поживні середовища з додаванням і без крові

тварин і НАДФ, в умовах нормальної атмосфери. У результаті проведених досліджень встановлено, що найбільш придатними для культивування виробничих штамів є рідкі (СМБ) та тверді (СМА, шоколадний та кров'яний агари) поживні середовища з додаванням гемоглобіну, вітамінних добавок і факторів росту. У наших дослідженнях використання рідкого поживного середовища «Brain Heart Infusion» (BHI) (Merck 1.10493, Дармштадт, Німеччина) із додаваннм 25 мкг/см^3 нікотинамідаденіндинуклеоти́ду (НАД) (Sigma, N8129, Сент-Луіс, Міссурі, США) та 7% дефібринованої крові коней дало можливість накопичувати бакмасу виробничих штамів у концентрації не менше 1,0×10^9 КУО/см^3.

Інактивацію отриманої бактеріальної маси *Av. paragallinarum* проводили нейтральним формаліном. Використання цього класичного інактиванта (кінцева концентрація 0,5%) та дотримання режиму інактивації (48 год за температури 37°С) дозволило отримати якісну сировину для виготовлення біопрепарату, що було доведено додатковими дослідженнями отриманої інактивованої бактеріальної маси (повнота інактивації, нешкідливість для білих мишей, відсутність росту гемофіл) та завершеними науковими розробками [55, 56].

Для підвищення антигенних та імуногенних властивостей під час виробництва інактивованих вакцин використовуються різні ад'юванти. У складі вакцини досліджували ад'ювант, виготовлений з використанням гідроксиду алюмінію в суміші з емульгаторами сапонін та без, а також готовий ад'ювант для виробництва вакцин – «Montanid ISA 70» фірми «SEPPIC» (Франція). Слід зауважити, що застосування стандартизованого готового ад'юванту має перевагу в зменшенні кількості технологічних операцій, тривалості процесу виробництва порівняно з класичним ад'ювантом, та дозволяє отримати стабільну емульсію без змін показників в'язкості та стабільності емульсії [57].

У результаті проведених досліджень було отримано три експериментальні вакцини з використанням суміші антигенів (*Av. paragallinarum*, серотип А; *Av. paragallinarum*, серотип В; *Av. paragallinarum*, серотип С – 1:1:1) та ад'ювантів (зразок № 1 – АГ + «ГОА»; № 2 –АГ + «ГОА+сапонін»; №3 – АГ + «Montanide ISA 70»).

Зразки вакцини відповідали вимогам нормативних документів, які висуваються для інактивованих та емульсованих вакцин і не були контаміновані бактеріальною та грибковою мікрофлорою. Відповідали вимогам щодо стабільності (зразок №1 – 8% від загального об'єму проби, №2 – 6%, №3 – 4%), в'язкості (зразка №1 склала 120 мм^2/сек, №2 – 130 мм^2/сек, №3 – 70 мм^2 /сек) та нешкідливості на білих мишах упродовж 14 діб.

Висновки та перспективи подальших досліджень. Фахівцями ННЦ «ІЕКВМ» та «ДНКІБШМ» проводиться розробка технологічного

регламенту виготовлення інактивованої емульсованої вакцини проти гемофільозу курей. У результаті науковцями отримано експериментальні серії інактивованої вакцини проти гемофільозу курей з використанням епізоотично-актуальні штамів *Av. paragallinarum* (SS 6/20, серотип A; SS 7/20, серотип B; SS 8/20, серотип C), які були виділені на території України. Експериментальні серії біопрепарату відповідали вимогам нормативних документів, що висуваються для інактивованих та емульсованих вакцин за стерильністю, стабільністю, в'язкістю та нешкідливістю для лабораторних тварин. З метою завершення дослідів з розробки технологічного регламенту виготовлення вакцини планується проведення серії дослідів з визначення антигенної та імуногенної активності на птиці.

DEVELOPMENT OF THE TECHNOLOGICAL REGULATIONS TO PRODUCE AN INACTIVATED VACCINE AGAINST CHICKEN HEMOPHILIA USING UKRAINIAN EPIZOOTIC-RELEVANT STRAINS / Kolesnikov A., Stegnii B.

Introduction. *Both viruses and bacteria, including Avibacterium paragallinarum, formerly known as Haemophilus paragallinarum, can act as etiological agents of respiratory infections in birds. On the territory of Ukraine, nine foreign-made vaccines against hemophiliasis of chickens are registered, which use strains of the pathogen that are relevant for those countries. Therefore, the development of technological regulations to produce an inactivated vaccine using epizootically relevant strains isolated on the territory of Ukraine is relevant.*

The goal of the work*. To develop a technology for the production of an inactivated emulsified vaccine against hemophilosis of chickens.*

Materials and methods. *The production of bacterial mass was carried out using epizootically relevant isolates of Av. paragallinarum (SS 6/20, A; SS 7/20, B; SS 8/20, C) in "Brain Heart Infusion" with the addition of V-growth factor (nicotinamide adenine dinucleotide – NAD) and blood serum. Inactivation was carried out using formalin. The following adjuvants were used: "Montanide ISA 70"; aluminum hydroxide (GOA); GOA + saponin. The type of emulsion was determined by the "water drop test" method, stability – by centrifugation (3000 rpm 20 min), and kinematic viscosity using a capillary glass viscometer. The vaccines safety was tested on white mice, 8 heads per group (three experimental and control).*

Results of research and discussion. *Nutrient medium with the addition of NAD (20 μg/m^3) and blood serum (7%) for 18 hours at 37°C under normal atmospheric conditions provided the accumulation of bacterial mass with a concentration of at least 1.0×10^9 CFU cm^3. The optimal inactivant was formaldehyde at a concentration of 0.5% (t 37°C, 48 hours). Three experimental vaccines were obtained using a mixture of antigens (AG) (1:1:1) and adjuvants: sample №1 – AG + "GOA"; №2 – AG + "GOA + saponin"; №3 – AG + "Montanide ISA 70". The vaccines were stable – from 4% to 8% (requirement: no more than 10%). Viscosity was from 70 mm^2/s to 130 mm^2/s (requirement: no more than 200 mm^2/s). When inoculating the biological material from experimental mice on a nutrient medium, the growth of cultures of Av. paragallinarum was not detected.*

Conclusions and prospects for further research. *The development of technological regulations for the production of inactivated emulsified vaccine against hemophilia in chickens is under development. As a result, experimental series of inactivated vaccine against chicken hemophilia using epizootic-relevant Av. paragallinarum strains (SS 6/20, serotype A; SS 7/20, serotype B; SS 8/20, serotype C) were obtained, isolated in Ukraine. The last one complies with the regulatory documents proposed for inactivated vaccines (sterility, stability, viscosity and safety to mice). It is planned to conduct studies on the determination of antigenic and immunogenic activity in poultry. In order to complete the development of technological regulations for vaccine production, it is planned to conduct a series of experiments on the determination of antigenic and immunogenic activity on poultry.*

Keywords: *pathegen, vaccine, technology, nutrient environment, safety.*

REFERENCES

1. Korniienko, L., Nalyvaiko, L., Nedosiekov, V., et al. (2012). *Infektsiini khvoroby ptytsi [Infectious diseases of poultry]*. Kherson: Hrin D.S. [in Ukrainian].

2. Plys, V. (2015). Osoblyvosti klinichnoho proiavu ta perebihu hemofilozu u kurei [Peculiarities of the clinical manifestation and course of hemophilosis in chickens]. *Visnyk Sumskoho natsionalnoho ahrarnoho universytetu – Bulletin of the Sumy National Agrarian University*, 1, 118-120 [in Ukrainian].

3. Page, L.A. (1962). Haemophilus infections in chickens. 1. Characteristics of 12 Haemophilus isolates recovered from diseased chickens. *Am. J. Vet. Res.*, 23, 85-95.

4. Page, L.A., Rosenwald, A.S., & Price, F.C. (1963). Haemophilus infections in chickens. IV. Results of laboratory and fieldtrials of formalinized bacterins for the prevention of disease caused by Haemophilus gallinarum. *Avian diseases*, 7(3), 239-256.

5. Kume, K., Sawata, A., Nakai, T., & Matsumoto, M. (1983). Serological classification of Haemophilus paragallinarum with a hemagglutinin system. *Journal of clinical microbiology*, 17(6), 958–964. https://doi.org/10.1128/jcm.17.6.958-964.1983.

6. Blackall, P.J., Eaves, L.E., & Rogers, D.G. (1990). Proposal of a new serovar and altered nomenclature for Haemophilus paragallinarum in the Kume hemagglutinin scheme. *Journal of clinical microbiology*, 28(6), 1185-1187. https://doi.org/10.1128/jcm.28.6.1185-1187.1990.

7. Kerr, E., & Hammarlund, M.A. (1982). Coryza – plain or complicated. Proceedings of *31st Western Poultry Disease Conference & 16th Poultry Health Symposium.* (February 24 – March 3). California (Davis): University of California.

8. Crispo, M., Sentíes-Cué, C.G., Cooper, G.L., Mountainspring, G., Corsiglia, C., Bickford, A. A., & Stoute, S.T. (2018). Otitis and meningoencephalitis associated with infectious coryza (Avibacterium paragallinarum) in commercial broiler chickens. *Journal of veterinary diagnostic investigation*, 30(5), 784-788. https://doi.org/10.1177/1040638718792964.

9. Soriano, V.E., Blackall, P.J., Dabo, S.M., Téllez, G., García-Delgado, G.A., & Fernández, R.P. (2001). Serotyping of Haemophilus paragallinarum isolates from Mexico by the Kume hemagglutinin scheme. *Avian diseases*, 45(3), 680-683.

10. Linzitto, O.R., Abeiro, H.D., Benítez, R., & Menéndez, N.A. (1988). Estudios bacteriológicos y clínicos de coriza infecciosa. *Rev Med Vet*, 69, 98-101.

11. Terzolo, H.R., Paolicchi, F.A., Sandoval, V.E., Blackall, P.J., Yamaguchi, T., & Iritani, Y. (1993). Characterization of isolates of Haemophilus paragallinarum from Argentina. *Avian diseases*, 37(2), 310-314.

12. Blackall, P.J., Silva, E.N., Yamaguchi, T., & Iritani, Y. (1994). Characterization of isolates of avian haemophili from Brazil. *Avian diseases,* 38(2), 269-274.

13. Mendoza-Espinoza, A., Terzolo, H.R., Delgado, R.I., Zavaleta, A.I., Koga, Y., & Huberman, Y.D. (2009). Serotyping of Avibacterium paragallinarum isolates from Peru. *Avian diseases,* 53(3), 462-465. https://doi.org/10.1637/8581-010809-ResNote.1.

14. Matzer, N. (1974). Summary of studies of infectious coryza in Guatemala. Proceedings from *the 23rd Western Poultry Disease Conference & 8th Poultry Health Symposium* (March 19-21). (pp. 48-49). California (Davis): University of California.

15. Cabrera, A., Morales-Erasto, V., Salgado-Miranda, C., Blackall, P. J., & Soriano-Vargas, E. (2011). Hemagglutinin serotyping of Avibacterium paragallinarum isolates from Ecuador. *Tropical animal health and production,* 43(3), 549-551. https://doi.org/10.1007/s11250-010-9746-4.

16. Welchman, D.deB., King, S.A., Wragg, P., Wood, A.M., Irvine, R.M., Pepper, W.J., Dijkman, R., & de Wit, J.J. (2010). Infectious coryza in chickens in Great Britain. *The Veterinary record,* 167(23), 912-913. https://doi.org/10.1136/vr.c6841.

17. Pagés Manté, A., & Costa-Quintana, L. (1986). Eficacia de una oleovacuna inactivada polivalente contra el coriza aviar. *Med. Vet,* 3, 27-36.

18. Eaves, L.E., Rogers, D.G., & Blackall, P.J. (1989). Comparison of hemagglutinin and agglutinin schemes for the serological classification of Haemophilus paragallinarum and proposal of a new hemagglutinin serovar. Journal of clinical microbiology, 27(7), 1510-1513. https://doi.org/10.1128/jcm.27.7.1510-1513.1989.

19. Baumann, P. (1982). Présence et incidence de Haemophilus Paragallinarum dans le cheptel de volaille suisse [Presence and incidence of Haemophilus paragallinarum in Swiss poultry stocks]. *Schweizer Archiv fur Tierheilkunde – Swiss Archives of Veterinary Medicine,* 124(4), 189-201.

20. De Blieck, L. (1932). A Hæmoglobinophilic Bacterium as the Cause of Contagious Catarrh of the Fowl. (Coryza infectiosa gallinarum.). *The Veterinary Journal,* 88(1), 9-13.

21. Giurov, B. (1984). Klinichni sluchai na zarazna khrema i svoĭstva za izoliranite shtamove Haemophilus [Clinical cases of infectious coryza and the properties of isolated Haemophilus strains]. *Veterinarno-meditsinski nauki – Veterinary Medical Sciences,* 21(7-8), 22-30 [in Russian].

22. Sun, H., Xie, S., Li, X., Xu, F., Li, Y., Boucher, C. E., & Chen, X. (2018). Selection of Avibacterium paragallinarum Page serovar B strains for an infectious coryza vaccine. *Veterinary immunology and immunopathology,* 199, 77-80. https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2018.04.001.

23. Guo, M., Chen, X., Zhang, H., Liu, D., Wu, Y., & Zhang, X. (2022). Isolation, Serovar Identification, and Antimicrobial Susceptibility of Avibacteriumparagallinarum from Chickens in China from 2019 to 2020. *Veterinary sciences,* 9(1), 27. https://doi.org/10.3390/vetsci9010027.

24. Patil, V.V., Mishra, D., & Mane, D.V. (2017). Virulence pattern of Avibacterium paragallinarum isolates studied from Indian field condition. *Int. J. Livest. Res,* 7(2), 201-207.

25. Wahyuni, A.E.T.H., Tabbu, C.R., Artanto, S., Setiawan, D.C.B., & Rajaguguk, S.I. (2018). Isolation, identification, and serotyping of Avibacterium paragallinarum from quails in Indonesia with typical infectious coryza disease symptoms. *Veterinary world,* 11(4), 519-524. https://doi.org/10.14202/vetworld.2018.519-524.

26. Patil, V.V., Mishra, D., & Mane, D.V. (2017). 16S ribosomal RNA sequencing and molecular serotyping of Avibacterium paragallinarum isolated from Indian field conditions. *Veterinary world,* 10(8), 1004-1007. https://doi.org/10.14202/vetworld.2017.1004-1007.

27. Corney, B.G., Diallo, I.S., Wright, L., Hewitson, G., De Jong, A., Tolosa, X., Burrell, P., Duffy, P., Rodwell, B., Boyle, D.B., & Blackall, P.J. (2008). Rapid and sensitive detection of Avibacterium paragallinarum in the presence of other bacteria using a 5' Taq nuclease assay: a new tool for diagnosing infectious coryza. Avian pathology. *Journal of the W.V.P.A,* 37(6), 599-604. https://doi.org/10.1080/03079450802449139.

28. Rashid, R.A., & Pociecha, J.Z. (1984). Epidemiological study of an outbreak of infectious coryza on a poultry farm in Iraq. *Avian diseases,* 28(1), 235–237.

29. Aly, M. (2000). Characteristics and pathogenicity of Haemophilus paragallinarum isolates from upper Egypt. *Assiut Veterinary Medical Journal,* 43(85), 319-338.

30. Bragg, R.R., Coetzee, L., & Verschoor, J.A. (1996). Changes in the incidences of the different serovars of Haemophilus paragallinarum in South Africa: a possible explanation for vaccination failures. *The Onderstepoort journal of veterinary research,* 63(3), 217-226.

31. Arzey, G.G. (1987). The effects of infectious coryza on the egg production of a layer flock. *Australian veterinary journal,* 64(4), 124-126. https://doi.org/10.1111/j.1751-0813.1987.tb09653.x.

32. Nagaoka, K., De Mayo, A., Takagi, M., & Ohta, S. (1994). Characterization of Haemophilus paragallinarum isolated in the Philippines. *The Journal of veterinary medical science,* 56(5), 1017-1019. https://doi.org/10.1292/jvms.56.1017.

33. Yamaguchi, T., Kato, K., Takigami, S., Iritani, Y., & Hayashi, Y. (1990). Serological classification of Japanese isolates of Haemophilus paragallinarum using two serovar-specific monoclonal antibodies. *Avian diseases,* 34(2), 364-368.

34. Blackall, P.J., & Eaves, L.E. (1988). Serological classification of Australian and South African isolates of Haemophilus paragallinarum. *Australian veterinary journal,* 65(11), 362-363. https://doi.org/10.1111/j.1751-0813.1988.tb14271.x.

35. Jacobs, A.A., van den Berg, K., & Malo, A. (2003). Efficacy of a new tetravalent coryza vaccine against emerging variant type B strains. *Avian Pathol.,* 32(3), 265-269. https://doi.org/10.1080/0307945031000097859.

36. Bragg, R.R. (2002). Isolation of serovar C-3 Haemophilus paragallinarum from Zimbabwe: A further indication of the need for the production of vaccines against infectious coryza containing local isolates of H. paragallinarum. *The Onderstepoort journal of veterinary research,* 69(2), 129-132.

37. Zain, Z.B., & Iritani, Y. (1992). Serotyping of Haemophilus paragallinarum isolated in Malaysia. *The Journal of veterinary medical science,* 54(2), 363-365. https://doi.org/10.1292/jvms.54.363.

38. Calderón, E.N., Thomas, K., Morales-Erasto, V., Salgado-Miranda, C., & Soriano-Vargas, E. (2010). Identification of Avibacterium paragallinarum serovar B-1 from severe infectious coryza outbreaks in Panama. *Avian diseases,* 54(3), 1095-1097. https://doi.org/10.1637/9123-110409-Case.1.

39. Lin, J.A., Shyu, C.L., Yamaguchi, T., & Takagi, M. (1996). Characterization and pathogenicity of Haemophilus paragallinarum serotype C in local chickens of Taiwan. *The Journal of veterinary medical science,* 58(10), 1007-1009. https://doi.org/10.1292/jvms.58.10_1007.

40. Sandoval, V.E., Terzolo, H.R., & Blackall, P.J. (1994). Complicated infectious coryza outbreaks in Argentina. *Avian diseases,* 38(3), 672-678.

41. Blackall, P.J. (1999). Infectious coryza: overview of the disease and new diagnostic options. *Clinical microbiology reviews,* 12(4), 627-632. https://doi.org/10.1128/CMR.12.4.627.

42. *Perelik veterynarnykh imunobiolohichnykh preparativ, shcho zareiestrovani v Ukraini stanom na 13.04.2021 r. [List of veterinary immunobiological drugs registered in Ukraine as of April 13, 2021]*. Derzhavnyi naukovo-kontrolnyi instytut biotekhnolohii i shtamiv mikroorhanizmiv State scientific and control institute of biotechnology and strains of microorganisms https://drive.google.com/file/d/1fyug2ZrW1AzBTbiUd3yQwCmGakpcoifv/view).

43. Caballero-Garcia, M., Mendoza-Espinoza, A., Ascanio, S., Chero, P., Rojas, R., & Huberman, Y.D. (2022). Pathogenicity of Avibacterium paragallinarum Strains from Peru and the Selection of Candidate Strains for an Inactivated Vaccine. *Vaccines,* 10(7), 1043. https://doi.org/10.3390/vaccines10071043.

44. Blackall, P.J., & Soriano-Vargas, E. (2020). Infectious coryza and related bacterial infections. *Diseases of poultry,* 890-906.

45. Wahyuni, A.E.T.H., Ramandani, D., Prakasita, V.C., & Widyarini, S. (2019). Efficacy of tetravalent coryza vaccine against the challenge of Avibacterium paragallinarum serovars A and B isolates from Indonesia in chickens. *Veterinary world,* 12(7), 972-977. https://doi.org/10.14202/vetworld.2019.972-977.

46. Kolesnykov, A., Stegniy, B. (2022). Study of the pathogenic properties of Avibacterium paragallinarum cultures isolated in 2019–2020. *Journal for Veterinary Medicine, Biotechnology and Biosafety,* Vol. 8, Is. 3-4. P. 3-7. DOI: https://doi.org/10.36016/JVMBBS-2022-8-3-4-1.

47. Matsumoto, M., & Yamamoto, R. (1975). Protective quality of an aluminum hydroxide-absorbed broth bacterin against infectious coryza. *American journal of veterinary research,* 36(4 Pt 2), 579-582.

48. Davis, R.B., Rimler, R.B., & Shotts, E.B., Jr (1976). Efficacy studies on Haemophilus gallinarum bacterin preparations. *American journal of veterinary research,* 37(2), 219-222.

49. Matsumoto, M., & Yamamoto, R. (1971). A broth bacterin against infectious coryza: immunogenicity of various preparations. *Avian diseases,* 15(1), 109-117.

50. Kume, K., Sawata, A., & Nakase, Y. (1980). Immunologic relationship between Page's and Sawata's serotype strains of Haemophilus paragallinarum. *American journal of veterinary research,* 41(5), 757-760.

51. Rimler, R.B., Shotts, E.B., Jr, & Davis, R.B. (1975). A growth medium for the production of a bacterin for immunization against infectious coryza. *Avian diseases,* 19(2), 318-322.

52. Reid, G.G., & Blackall, P.J. (1987). Comparison of adjuvants for an inactivated infectious coryza vaccine. *Avian diseases,* 31(1), 59–63.

53. Guo, M., Liu, D., Xu, H., Zhang, H., Jin, Y., Tan, H., Wu, Y., & Zhang, X. (2022). The Protective Efficacy of an Inactivated Vaccine against Avibacterium paragallinarum Field Isolates. *Veterinary sciences,* 9(9), 458. https://doi.org/10.3390/vetsci9090458.

54. Sakamoto, R., Baba, S., Ushijima, T., Kino, Y., Honda, T., Mizokami, H., & Sakaguchi, M. (2013). Development of a recombinant vaccine against infectious coryza in chickens. *Research in veterinary science,* 94(3), 504-509. https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2012.10.027.

55. Stehnii, B.T., et al. (2017). Imunohenni vlastyvosti eksperymentalnoi serii vaktsyny proty salmoneloziv ptytsi [Immunogenic properties of experimental series of vaccines against poultry salmonellosis]. *Veterynarna medytsyna – Veterinary medicine,* 103, 326-329 [in Ukrainian].

56. Stehnii, B.T., et al. (2018). Rozrobka tekhnolohii vyhotovlennia vitchyznianoi vaktsyny proty infektsiinoi ahalaktii ovets i kiz [Development of technology for the production of native vaccine against infectious agalactia of sheep and goats]. *Veterynarna biotekhnolohiia – Veterinary biotechnology,* 32 (1), 272-277 [in Ukrainian].

57. Chehrynets, A., Salii, O., Liubetskyi, O. (2020). Doslidzhennia vplyvu adiuvantiv na fizychni vlastyvosti inaktyvovanoi vaktsyny proty khvoroby Niukasla [Studies of the influence of adjuvants on the physical properties of an inactivated vaccine against Newcastle disease]. Proceedings from the Technological and biopharmaceutical aspects of the creation of medicinal preparations of different directions of action: *V Mizhnarodnoi naukovo-praktychnoi internet-konferentsii (26 lystopada 2020 roku) – International Scientific and Practical Internet Conference.* (pp. 496-497). Kharkiv [in Ukrainian].