

ГЕМАГГЛЮТИНИРУЮЩИЕ И АНТИГЕННЫЕ СВОЙСТВА ИЗОЛЯТОВ *AVIBACTERIUM PARAGALLINARUM*, ВЫДЕЛЕННЫХ НА ТЕРРИТОРИИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ И РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

А. В. Потехин¹, В. А. Евграфова², Д. Б. Андрейчук³

¹Заведующий лабораторией, кандидат ветеринарных наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия, e-mail: potehin@arriah.ru

²Ведущий ветеринарный врач, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия, e-mail: evgrafova@arriah.ru

³Заведующий лабораторией, кандидат биологических наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия, e-mail: andreychuk@arriah.ru

РЕЗЮМЕ

Представлены результаты изучения антигенных свойств референтного штамма *Avibacterium paragallinarum* и 10 изолятов, выделенных на территории Российской Федерации и Республики Беларусь. У референтного штамма и 9 изолятов обнаружен гемагглютинин типа L – термолabileного, трипсинчувствительного, активного в отношении свежих и обработанных глутаровым альдегидом эритроцитов. 1 изолят характеризовался наличием гемагглютинина типа HL – термолabileного, трипсинрезистентного, активного только в отношении эритроцитов, обработанных глутаровым альдегидом. Антиген референтного штамма оказался инагглютинабельным в гомологичной антисыворотке, а также неспособным агглютинировать эритроциты из-за наличия гиалуроновой кислоты в составе капсульной субстанции. Серологическая и гемагглютинирующая инертность исчезла после обработки клеток гиалуронидазой. В реакции агглютинации выявлено, что 7 из 10 исследуемых изолятов принадлежали к одной серологической группе,

при этом коэффициент двустороннего антигенного родства составил $\geq 78,4\%$. В реакции торможения гемагглютинации степень антигенного родства между исследуемыми изолятами составила $\geq 92,6\%$, что указывает на их принадлежность не только к 1 серогруппе, но и к 1 серотипу. Между группой исследуемых изолятов и референтным штаммом серогруппы А серологического соответствия в реакции агглютинации ($\leq 23,6\%$) и в реакции торможения гемагглютинации ($\leq 12,2\%$) не выявлено. Методом полимеразной цепной реакции установлено, что все изоляты, выделенные в Российской Федерации и Республике Беларусь в период с 2014 по 2016 г., принадлежат к серогруппе В.

Ключевые слова: инфекционный ринит (гемофилез) кур, изоляты, агглютинины, гемагглютинины, антигенное родство, *Avibacterium paragallinarum*.

UDC 619:616.98:579.843.94(470)(476)

HEMAGGLUTINATION AND ANTIGENIC PROPERTIES OF *AVIBACTERIUM PARAGALLINARUM* ISOLATES RECOVERED IN THE RUSSIAN FEDERATION AND REPUBLIC OF BELARUS

A. V. Potehin¹, V. A. Yevgrafova², D. B. Andreychuk³

¹ Head of Laboratory, Candidate of Science (Veterinary Medicine), FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia, e-mail: potehin@arriah.ru

² Leading Veterinarian, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia, e-mail: evgrafova@arriah.ru

³ Head of Laboratory, Candidate of Science (Biology), FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia, e-mail: andreychuk@arriah.ru

SUMMARY

The paper demonstrates examination results of antigenic properties of *Avibacterium paragallinarum* reference strain and ten isolates thereof recovered in the Russian Federation and Republic of Belarus. Nine isolates and the reference strain demonstrated type L hemagglutinin (thermolabile, trypsin-sensitive, active against fresh and glutaraldehyde-treated RBC). One isolate was marked by type HI hemagglutinin (thermolabile, trypsin-resistant, active only against glutaraldehyde-treated RBC). The reference strain antigen proved to be inagglutinable by homologous antiserum, and unable to agglutinate RBCs due to hyaluronic acid in the capsular substance. Serological and hemagglutination non-reactivity was removed through the cell treatment with hyaluronidase. The agglutination test demonstrated that seven out of ten tested isolates belonged to the same

serological group; herewith, the proportion of the bilateral antigenic relatedness amounted to $\geq 78.4\%$. HI results demonstrated $\geq 92.6\%$ antigenic relatedness of the tested isolates being indicative of the fact that they belonged not only to the same serological group but also to the same serotype. No serological relatedness was identified between the tested isolates and reference strain of serogroup A both using agglutination test ($\leq 23.6\%$) and HI ($\leq 12.2\%$). Polymerase chain reaction demonstrated that all the isolates recovered in the Russian Federation and Republic of Belarus in 2014-2016 belonged to serogroup B.

Key words: chicken infectious coryza (Haemophilus infection), isolates, agglutinins, hemagglutinins, antigenic relatedness, *Avibacterium paragallinarum*.

ВВЕДЕНИЕ

В современном птицеводстве при интенсивных методах выращивания, высокой плотности посадки, быстрой смене технологических процессов, частой вакцинации куры подвергаются воздействию различных неблагоприятных факторов. Появляется высокая нагрузка на иммунный статус птицы. На фоне этого повышается вероятность появления многих заболеваний, одним из которых является инфекционный ринит кур.

Инфекционный ринит (гемофилез) – это острое инфекционное заболевание кур, вызываемое бактериями *Avibacterium paragallinarum*, ранее известными как *Haemophilus paragallinarum* [4, 15]. Заболевание характеризуется катаральным воспалением слизистых оболочек носовой полости, конъюнктивы и воздухоносных пазух, а также подкожным отеком головы и в редких случаях – пневмонией. Инфекционный ринит зарегистрирован во всех странах мира и наносит ощутимый экономический ущерб птицеводству. Экономический ущерб от заболевания складывается в основном из потери яйценоскости кур до 40% в течение 2–3 нед, особенно на пике яйценоскости, снижения прироста бройлеров, задержки роста цыплят. Может наблюдаться падеж молодняка до 10%. Обычно смертность при инфекционном рините незначительная, гибель птицы в основном происходит при ассоциированном течении болезни с инфекционным бронхитом, ларинготрахеитом или респираторным микоплазмозом [10, 12].

Антигенная структура *A. paragallinarum* сложна и разнообразна. К. Хинц впервые детально изучил антигенные свойства возбудителя по гемагглютинирующей активности. Способность агглютинировать эритроциты кур была установлена у инкапсулированных клеток серотипа А. Позднее, используя специальные методы обработки бактерий, обнаружили гемагглютинирующие свойства и у культур серотипа С. Гемагглютинины, по данным электронной микроскопии, локализируются на мембране клеточной стенки, они гетерогенны по серологическим и физико-химическим свойствам. Различают следующие типы гемагглютининов: HS – термостабильный, трипсинрезистентный; HL – термолабильный, трипсинрезистентный; L – термолабильный, трипсинчувствительный, устойчивый к действию гиалуронидазы, активный в отношении свежих и обработанных глутаровым альдегидом куриных эритроцитов. Гемагглютинины типов HS и HL активны в отношении только свежих куриных эритроцитов, но не обработанных глутаровым альдегидом. Антигенная структура возбудителя тесно связана с типом образуемых на агаре колоний: бактерии из флюоресцирующих колоний содержат типоспецифический антиген типа L, гемагглютинин и обладают протективными свойствами, а нефлюоресцирующие колонии состоят из клеток, не имеющих перечисленных свойств.

В настоящее время для типирования возбудителя инфекционного ринита кур используют серологические и молекулярно-генетические методы.

Первая схема типирования *A. paragallinarum* была разработана Л. Пейджем с использованием реакции агглютинации на стекле. В данной схеме различали 3 серотипа – А, В и С. Долгое время существовало предположение, что серотип В не является отдельным серотипом, а представляет собой промежуточное звено между серотипами А и С, которые потеряли типоспецифический антиген [5, 19]. Последующие

исследования окончательно показали, что серотип В является самостоятельным и не имеет ничего общего с серотипами А и С [13]. По результатам исследования большого количества изолятов инфекционного ринита кур было установлено, что в Германии циркулируют преимущественно серотипы А и В, в Испании – А, В и С, в Австралии, Южной Африке и Индонезии – А и С, а в Малайзии – А. Недостатком данной схемы является то, что около трети всех изолятов не типифицируются, возможно, из-за отсутствия агглютиногена.

Вторая схема типирования, разработанная К. Кумэ на основе реакции торможения гемагглютинации, предусматривала наличие 7 серотипов (HA-1-HA-7), распределенных по 3 серогруппам (I, II, III) [10]. Преимуществом данной схемы является то, что большинство изолятов, не типифицируемых в реакции агглютинации, были типированы в реакции торможения гемагглютинации. Однако данная схема не нашла широкого практического применения в связи техническими сложностями постановки теста.

Для удобства классификации *A. paragallinarum* по антигенным свойствам П. Блэкл совместил результаты исследований Л. Пейджа и К. Кумэ и предложил новую схему, включающую 3 серогруппы по агглютинирующей и 9 серотипов по гемагглютинирующей. В настоящее время по модифицированной схеме к серогруппе А относятся 4 серотипа (А-1, А-2, А-3 и А-4), к серогруппе В – 1 серотип (В-1), к серогруппе С – 4 серотипа (С-1, С-2, С-3 и С-4) [6]. Как показывают результаты исследований, серотиповой профиль возбудителя в разных странах мира разнообразен и имеет значительные различия. Так, в Австралии наибольшее распространение имеют серотипы А-4, С-2, С-4, в Африке – А-1, А-2, С-2, С-3, в Бразилии – А-3, в Германии – А-1, А-2, В-1, С-2, в Израиле – С-3, в Мексике – А-1, А-2, В-1, С-2, в США – А-1, В-1, С-2, в Японии – А-1, С-1 [9].

Третий метод типирования возбудителя основан на использовании моноклональных антител в иммуноферментном анализе [11]. Несмотря на ряд сообщений о достаточной специфичности и приемлемом уровне чувствительности, данный метод не нашел широкого применения в связи с наличием высокого потенциала изменчивости у *A. paragallinarum* и необходимостью создания широкой панели моноклональных антител.

Четвертая схема типирования основана на выявлении термостабильных антигенов в реакции диффузионной преципитации в агаровом геле. Недостатком этого метода является то, что у 6 серовариантов, выявленных по этой схеме, не удалось обнаружить корреляцию с основными иммунотипами возбудителя, поэтому и эта схема не нашла широкого применения [5].

Существует также сывороточный бактерицидный тест, с помощью которого возможно проведение дифференциации серологических групп А и С [18].

В последнее время широкое распространение стали получать методы молекулярной диагностики инфекционного ринита кур на основе полимеразной цепной реакции (ПЦР), обладающие рядом преимуществ по сравнению с традиционными серологическими методами. ПЦР характеризуется высокой быстротой постановки теста и специфичностью, которая позволяет исключить ложноположительные результаты; делает возможным отбор проб от погибшей птицы; не требует особых времени доставки и условий хранения материала для исследования. Разрабатываются

тест-системы на основе ПЦР в реальном времени, позволяющие с высокой чувствительностью выявлять геном возбудителя инфекционного ринита [14]. Сакамото и соавт. использовали мультиплексную ПЦР для эффективной дифференциации *A. paragallinarum* на крупные генетические группы, которые совпадали с серогруппами [1].

Многочисленные сообщения о недавних вспышках инфекционного ринита в разных странах мира актуализируют проблему данного заболевания в респираторной патологии птиц. Несмотря на успехи в изучении свойств возбудителя и на разработки средств вакцинопрофилактики, ситуация в мировом масштабе остается достаточно сложной, ареал распространения болезни расширяется, что приводит к массовым экономическим потерям [8]. Многие аспекты, касающиеся изучения антигенных свойств изолятов возбудителя инфекционного ринита кур, циркулирующих на территории Российской Федерации и Республики Беларусь, отсутствуют, что существенно осложняет выбор штаммов для разработки отечественных средств специфической профилактики.

Целью данной работы было изучение гемагглютинирующей активности и серогрупповой принадлежности изолятов *A. paragallinarum*, выделенных в Российской Федерации и Республике Беларусь в 2014–2016 гг.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Штаммы и изоляты. В работе использовали референтный штамм № 29545 серотипа А-1 из Американской коллекции типовых культур и 10 изолятов *A. paragallinarum*, выделенных от кур с респираторной патологией из птицеводческих хозяйств Российской Федерации и Республики Беларусь. Изоляты хранили в лиофилизированном виде при температуре 2–4 °С или в замороженном виде при температуре –50 °С.

Культивирование штамма и изолятов. Для культивирования штамма и изолятов использовали агар и бульон колумбийские (Becton, Dickinson and Co., США) с добавлением 20 мкг/мл НАД (AppliChem, Гер-

мания) и 5% сыворотки крови лошади. Культивирование бактерий на агаровой среде проводили в течение 24 ч при температуре 37 °С в условиях повышенного содержания углекислого газа. Культивирование штамма и изолятов в жидкой питательной среде проводили в орбитальном шейкере-инкубаторе при 150 об/мин в течение 18 ч при температуре 37 °С в условиях обычной атмосферы.

Получение антигенов. Инактивацию бактерий проводили формалином в конечной концентрации 0,3% по объему при температуре 37 °С в течение 48 ч. Затем клетки осаждали центрифугированием при 3000 g в течение 20 мин при 4 °С, а осадок ресуспендировали в фосфатном буферном растворе с рН 7,2 до концентрации 100 ед. (10¹⁰ м. к./см³) по оптическому стандарту мутности. В качестве консерванта в антиген добавляли тиомерсал в конечной концентрации 100 мкг/см³. Полученные антигены хранили при температуре 4 °С.

Бактериальные антигены изолятов *A. paragallinarum* подвергали воздействию гиалуронидазы и трипсина. К 1,0 см³ антигена добавляли 100 ед. гиалуронидазы и инкубировали в термостате при 37 °С в течение 2 ч. В другую часть суспензии антигена добавляли 10%-й раствор кристаллического трипсина в конечной концентрации 0,25% и инкубировали при 37 °С в течение 30 мин. По окончании экспозиции антигены центрифугировали при 3000 g в течение 20 мин. Надосадочную жидкость удаляли, а антигены ресуспендировали в исходных объемах фосфатного буферного раствора. В качестве консерванта в антигены добавляли тиомерсал в конечной концентрации 100 мкг/мл.

Приготовление гипериммунных сывороток крови кроликов для типирования изолятов *A. paragallinarum*. Кроличьи антисыворотки готовили по методу А. М. Thornton и Р. J. Blackall [20]. Для иммунизации использовали кроликов массой 2,0–2,5 кг. Первую инъекцию антигена делали в смеси с масляным адьювантом Фрейнда (Sigma) подкожно в объеме 1,0 см³. Через 10 сут проводили 6 последовательных внутривенных инъекций антигена без адьюванта (0,5; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0

Таблица 1
Происхождение изолятов инфекционного ринита кур

№ изолята	Локализация возбудителя при выделении	Возраст птицы, сутки	Направление продуктивности птицы	Регион
1	Подглазничные синусы	53	Яичное	Костромская область
2	Конъюнктивальный мешок	68	Яичное	Московская область
3	Подглазничные синусы	190	Яичное	Оренбургская область
4	Подглазничные синусы	38	Мясное	Московская область
5	Подглазничные синусы	211	Яичное	Республика Беларусь
6	Легкие	170	Яичное	Владимирская область
7	Подглазничные синусы	76	Яичное	Республика Татарстан
8	Подглазничные синусы	164	Яичное	Ярославская область
9	Подглазничные синусы	114	Яичное	Республика Мордовия
10	Подглазничные синусы	80	Яичное	Ульяновская область



Рис. 1. Отечность подкожной клетчатки вокруг глаз и истечение из носовых ходов при инфекционном рините

и 4,0 см³) с интервалом 3 сут. Концентрация антигена составляла 10⁹ м. к./см³. Через 7 сут после последней инъекции у кроликов брали кровь и получали сыворотки, которые хранили в замороженном виде при -20 °С.

Постановка реакции агглютинации. Реакцию агглютинации (РА) ставили в полистироловых планшетах, делая двукратные разведения сыворотки от 1:50 до 1:3200 по традиционной методике [10].

Постановка реакции гемагглютинации (РГА). В круглодонных лунках планшета готовили двукратные разведения антигена в объеме 0,4 см³ на фосфатном буферном растворе, содержащем 0,1% бычьего сывороточного альбумина и 0,001% желатина, начиная с 1:2

до 1:2048. Затем в каждую лунку вносили по 0,4 см³ 1%-й суспензии эритроцитов. Содержимое лунок перемешивали встряхиванием планшета и оставляли при комнатной температуре на 1 ч (до оседания эритроцитов в контроле).

Реакцию оценивали по четырехкрестовой системе. За титр антигена принимали наибольшее разведение антигена, дающее четко выраженную агглютинацию эритроцитов (+++ или ++++). Одновременно проводили тестирование на отсутствие спонтанной агглютинации эритроцитов (отрицательный контроль). Статистическую достоверность различия гемагглютинирующей активности изолятов определяли с вероятностью 95% ($p > 0,05$).

Постановка реакции торможения гемагглютинации микрометодом. Реакцию торможения гемагглютинации (РТГА) микрометодом ставили по традиционной методике [10]. Постановка реакции включала следующие этапы: приготовление взвеси эритроцитов кур с обработкой глутаровым альдегидом, определение гемагглютинирующего титра антигена в РГА и рабочей дозы антигена, постановка реакции.

Для удаления неспецифических ингибиторов гемагглютинации перед постановкой РТГА исследуемые сыворотки инактивировали прогреванием при 56 °С в течение 30 мин. В фосфатном буферном растворе с рН 7,2, содержащем 0,1% бычьего сывороточного альбумина и 0,001% желатина, готовили двукратные разведения сывороток от 1:40 до 1:2560 в объеме 25 мкл. К каждому разведению сыворотки добавляли по 25 мкл рабочей дозы антигена (8 ГАЕ). Смесь встряхивали и выдерживали в течение 1 ч при температуре (20 ± 2) °С, после чего в каждую лунку добавляли по 50 мкл 1%-й суспензии куриных эритроцитов. Смесь повторно встряхивали и оставляли при температуре (20 ± 2) °С в течение 1 ч

Таблица 2
Гемагглютинирующая активность нативных и обработанных ферментами антигенов *A. paragallinarum*

Изолят, штамм	Номер	Нативный антиген		Антиген, обработанный гиалуронидазой		Антиген, обработанный трипсином	
		Свежие эритроциты	Эритроциты, обработанные глутаровым альдегидом	Свежие эритроциты	Эритроциты, обработанные глутаровым альдегидом	Свежие эритроциты	Эритроциты, обработанные глутаровым альдегидом
Изолят	1	1:64	1:512	1:64	1:512	1:64	<1:2
	2	1:64	1:128	1:128	1:256	1:64	<1:2
	3	1:64	1:128	1:64	1:128	1:64	<1:2
	4	1:256	1:512	1:256	1:512	1:256	<1:2
	5	1:256	1:1024	1:256	1:1024	1:256	<1:2
	6	<1:2	1:32	<1:2	1:32	<1:2	1:32
	7	1:128	1:512	1:128	1:512	1:128	<1:2
	8	1:64	1:256	1:64	1:256	1:64	<1:2
	9	1:32	1:256	1:32	1:256	1:32	<1:2
	10	1:16	1:64	1:16	1:64	1:16	<1:2
Штамм	29545	1:4	1:8	1:256	1:512	1:4	<1:2

Таблица 3
Антигенное родство штамма и изолятов *A. paragallinarum* в реакции агглютинации
n = 3

Антиген	Двустороннее родство, R% (среднее значение)											
	Сыворотка, специфичная к антигену											29545
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
Изолят	1	100	96,8	82,4	86,4	92,6	88,4	86,8	98,6	94,2	100	4,2
	2	94,2	100	82,4	100	82,8	94,2	100	88,4	96,8	78,8	23,6
	3	86,8	82,4	100	96,4	90,2	84,6	94,2	90,3	92,4	92,8	12,6
	4	82,4	98,4	92,6	100	86,4	100	98,4	92,8	100	86,2	2,8
	5	92,6	86,4	83,6	78,4	100	87,4	90,2	91,8	94,7	100	4,8
	6	80,7	84,8	62,4	100	96,6	100	87,4	84,3	84,6	94,6	11,8
	7	100	90,2	93,5	10,64	94,2	86,4	100	56,2	94,8	88,2	4,2
	8	86,4	82,8	94,2	100	92,8	78,8	96,0	100	82,8	96,8	11,8
	9	92,4	100	78,8	82,8	86,8	80,4	100	90,4	100	98,4	8,6
	10	100	94,8	80,4	43,6	100	86,2	96,4	84,2	100	100	10,2
Штамм	29545	3,0	17,6	8,2	4,3	2,1	8,7	6,4	11,8	7,4	8,7	100

(до оседания эритроцитов в контроле), после чего проводили учет результатов реакции. При наличии специфических антител в сыворотке, наступала задержка агглютинации эритроцитов. За титр сыворотки принимали предельное разведение, вызывающее полную задержку геммагглютинации.

Определение двустороннего антигенного родства. Степень двустороннего антигенного родства штамма и изолятов *A. paragallinarum* в РА и РТГА рассчитывали по формуле J. Archetti, F. L. Horsfall [3] и выражали в процентах:

$$r_1 = \frac{\text{титр } S_{\text{станд}} / \text{Аг}_{\text{испыт}}}{\text{титр } S_{\text{станд}} / \text{Аг}_{\text{станд}}}; r_2 = \frac{\text{титр } S_{\text{станд}} / \text{Аг}_{\text{испыт}}}{\text{титр } S_{\text{станд}} / \text{Аг}_{\text{станд}}}; R\% = 100 \sqrt{r_1 r_2},$$

где титр $S_{\text{станд}} / \text{Аг}_{\text{испыт}}$ – титр сыворотки крови кролика, полученный на референтный штамм/изолят с антигеном из испытуемого штамма/изолята;

титр $S_{\text{станд}} / \text{Аг}_{\text{станд}}$ – титр сыворотки крови кролика, полученный на референтный штамм/изолят с антигеном из референтного штамма/изолята;

титр $S_{\text{испыт}} / \text{Аг}_{\text{станд}}$ – титр сыворотки крови кролика, полученный на испытуемый штамм/изолят с антигеном из референтного штамма/изолята;

титр $S_{\text{испыт}} / \text{Аг}_{\text{испыт}}$ – титр сыворотки крови кролика, полученный на испытуемый штамм/изолят с антигеном из испытуемого штамма/изолята;

r_1 и r_2 – коэффициенты одностороннего антигенного родства;

R% – коэффициент двустороннего антигенного родства штамма/изолятов.

Типирование изолятов методом ПЦР. Метод ПЦР включал 3 этапа: выделение ДНК из клеток возбудителя, амплификацию специфического фрагмента генома *A. paragallinarum*, детекцию и анализ продуктов

ПЦР с помощью электрофореза. В работе использовали 4 праймера, предложенные R. Sakamoto и соавт. [16]. Это прямой праймер, общий для амплификации генома *A. paragallinarum* 3 серогрупп, и 3 обратных праймера, специфичные каждый к геному возбудителя определенной серогруппы. Положительными считали результаты при выявлении фрагментов кДНК (ампликонов) на уровне 800, 1000–1100 и 1500–1600 п. н. При этом фрагменты кДНК величиной 800 п. н. свидетельствовали о наличии генома *A. paragallinarum* серогруппы А, 1000–1100 п. н. – серогруппы В, 1500–1600 п. н. – серогруппы С. Отрицательными считали результаты, если не выявлялись указанные фрагменты кДНК или они не соответствовали приведенным величинам.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Исследуемые изоляты *A. paragallinarum* были выделены в период с 2014 по 2016 г. из патологического материала от птиц в возрасте от 38 до 211 сут из хозяйств Владимирской, Московской, Костромской, Ярославской, Оренбургской и Ульяновской областей, а также Республики Мордовия и Республики Татарстан. Кроме того, 1 изолят был выделен от птиц из Республики Беларусь. Краткая характеристика происхождения изолятов представлена в таблице 1.

Клинические признаки заболевания у кур обычно проявлялись в виде водянистого истечения из носовых отверстий. Иногда у птиц наблюдали опухшие подглазничные синусы и конъюнктивальные мешки (рис. 1). У некоторых кур, вследствие закупорки носовых ходов, отмечали ротовое дыхание с хрипами.

Большинство изолятов возбудителя были выделены от птиц яичного направления продуктивности. Основным местом локализации возбудителя явились

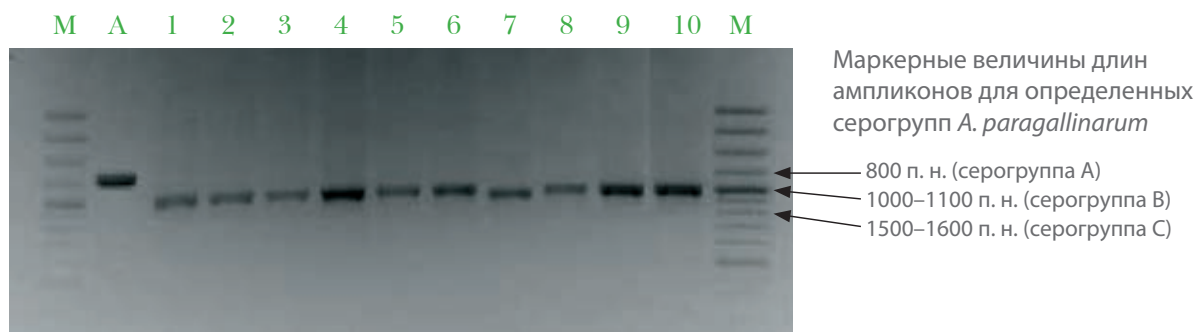


Рис. 2. Электрофореграмма продуктов мультиплекс-ПЦР при исследовании образцов выделенных изолятов и штамма *A. paragallinarum*

М – маркер длин фрагментов ДНК;
 А – ампликон образца штамма № 29545;
 1 – ампликон образца изолята № 1;
 2 – ампликон образца изолята № 2;
 3 – ампликон образца изолята № 3;
 4 – ампликон образца изолята № 4;
 5 – ампликон образца изолята № 5;
 6 – ампликон образца изолята № 6;
 7 – ампликон образца изолята № 7;
 8 – ампликон образца изолята № 8;
 9 – ампликон образца изолята № 9;
 10 – ампликон образца изолята № 10.

подглазничные синусы. О наиболее частом выделении возбудителя инфекционного ринита кур из содержимого подглазничных синусов свидетельствуют результаты исследований ряда авторов [2, 7, 21].

В предыдущей работе опубликованы результаты изучения вирулентных свойств изолятов *A. paragallinarum* для кур [2]. 9 из 10 изолятов оказались патогенными для птиц. При заражении кур различными изолятами *A. paragallinarum* отмечали одинаковую продолжительность периодов течения заболевания. У больных птиц отмечали сходные клинические признаки, проявляющиеся ринитом, синуситом и конъюнктивитом. Несмотря на однотипную динамику развития заболевания у зараженных птиц, вирулентность изолятов оказалась различной. Изолят № 6 оказался апатогенным для кур, а при заражении изолятом № 8 заболеваемость птиц составила 100%. Спустя 21 сут после экспериментального заражения, возбудителя удалось реизолировать из содержимого подглазничных синусов большинства птиц, независимо от наличия и тяжести проявления клинических признаков в период заболевания. Полученные данные свидетельствовали о сохранении *A. paragallinarum* на слизистых оболочках верхних дыхательных путей, что, вероятно, обусловлено наличием адгезинов (гемагглютининов).

Референтный штамм и изоляты возбудителя инфекционного ринита кур по гемагглютинирующей активности представляли собой неоднородную группу. На начальном этапе исследований исключили принадлежность изолятов к серогруппе С, так как для агглютинации эритроцитов не требовалась дополнительная обработка антигенов ультразвуком. 9 из 10 изолятов *A. paragallinarum* обладали гемагглютинирующей активностью в отношении свежих эритроцитов кур (табл. 2).

При использовании эритроцитов, обработанных глутаровым альдегидом, титр гемагглютинации был выше в 2–4 раза, чем при использовании свежих эритроцитов ($p < 0,05$). После обработки антигенов различных изолятов гиалуронидазой их гемагглютинирующая активность не изменилась ($p > 0,05$), что свидетельствует об отсутствии гиалуроновой кислоты в составе капсульной субстанции. После обработки антигенов трипсином гемагглютинирующая активность исчезла, кроме изолята № 6.

Нативный антиген референтного штамма № 29545 серогруппы А обладал слабой гемагглютинирующей активностью в отношении как свежих, так и обработанных глутаровым альдегидом эритроцитов. После обработки антигена гиалуронидазой титр гемагглютинирующей активности стал выше в 64 раза ($p > 0,05$). О наличии гиалуроновой кислоты в составе капсулы у некоторых штаммов и изолятов серогруппы А сообщают и другие исследователи [17]. По данным ряда авторов, штаммы, имеющие в составе капсулы гиалуроновую кислоту, обладают высокой вирулетностью.

Результаты, представленные в таблице 3, свидетельствуют об отсутствии антигенного родства референтного штамма и исследуемых изолятов. Изучаемые изоляты представляли собой гомологичную группу, за исключением изолятов № 6, 7 и 10. Однако при этом не отмечено обратной связи между степенью родства антигена № 6 с сывороткой № 3 и сыворотки № 6 с антигеном № 3.

Нативный антиген референтного штамма *A. paragallinarum* № 29545 оказался инагглютинабельным в гомологичной антисыворотке. Серологическая инертность антигена исчезла после его обработки гиалуронидазой.

Полученные результаты исследований свидетельствуют, что исследуемые изоляты *A. paragallinarum* не принадлежат к серогруппе А.

Данные таблицы 4 показывают, что все исследуемые изоляты представляли собой однородную группу по гемагглютинину. Минимальное значение двустороннего родства составило 78,4%. Полученные данные позволяют предположить, что все исследуемые изоляты принадлежат не только к 1 серогруппе, но и к 1 серотипу.

Гомогенность серогруппы выделенных изолятов подтвердили с помощью типизирующей ПЦР в формате мультиплекс (рис. 2).

ПЦР установлено в результате анализа продуктов, что ампликоны образцов всех исследуемых изолятов имели величину 1000–1100 п. н., что соответствует величине ПЦР-ампликона *A. paragallinarum* серогруппы В.

Таблица 4

Антигенное родство штамма и изолятов *A. paragallinarum* в реакции торможения гемагглютинации

n = 3

Антиген (номер изолята, штамма)	Двустороннее родство, R% (среднее значение)										
	Сыворотка, специфичная к антигену										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	29545
1	100	100	96,8	86,8	92,4	86,4	88,8	92,4	96,7	96,2	6,4
2	92,6	100	94,6	92,6	98,2	94,6	86,6	100	90,2	82,4	7,2
3	98,6	96,4	100	100	84,2	94,8	90,4	98,4	86,2	84,8	10,4
4	100	94,8	95,2	100	94,2	88,4	96,8	100	94,6	98,8	3,6
5	87,6	93,2	87,4	97,8	100	98,2	84,6	90,2	97,2	100	4,8
6	90,2	100	79,6	96,2	86,2	100	88,2	92,6	100	96,4	8,2
7	94,6	96,6	91,3	100	96,8	100	100	98,2	99,3	86,8	2,2
8	88,2	100	96,4	96,3	98,4	92,8	96,8	100	100	88,2	4,8
9	86,6	90,8	87,8	78,4	92,6	94,8	94,2	96,2	100	100	6,2
10	96,6	92,4	92,8	86,4	88,4	86,2	98,0	100	98,4	100	4,2
29545	6,3	4,8	8,6	12,2	6,3	5,2	10,3	4,2	6,8	8,2	100

Таким образом, все выделенные изоляты принадлежали к генетически обособленной серогруппе В, что подтверждают результаты, полученные с помощью серотипирования.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

У 9 изолятов *A. paragallinarum* обнаружен гемагглютинин типа L – термолabileного, трипсинчувствительного, активного в отношении свежих и обработанных глутаровым альдегидом эритроцитов. 1 изолят характеризовался наличием гемагглютинина типа HL – термолabileного, трипсинрезистентного, активного только в отношении эритроцитов, обработанных глутаровым альдегидом. Антиген референтного штамма *A. paragallinarum* № 29545 оказался инагглютинабельным в гомологичной антисыворотке, а также неспособным агглютинировать свежие и обработанные глутаровым альдегидом эритроциты кур. Серологическая и гемагглютинирующая инертность антигена исчезла после его обработки гиалуронидазой. В реакции агглютинации выявлено, что 7 из 10 исследуемых изолятов принадлежали к 1 серологической группе, при этом коэффициент двустороннего антигенного родства составил $\geq 78,4\%$. В реакции торможения гемагглютинации степень антигенного родства между исследуемыми изолятами составила $\geq 92,6\%$, что указывает на их принадлежность не только к 1 серогруппе, но и к 1 серотипу. Между группой исследуемых изолятов и референтным штаммом серогруппы А серологического соответствия в реакции агглютинации ($\leq 23,6\%$) и в реакции торможения гемагглютинации ($\leq 12,2\%$) не выявлено. Методом ПЦР установлено, что все изоляты, выделенные в Российской Федерации и Республике

Беларусь в период с 2014 по 2016 г., принадлежали к генетически обособленной серогруппе В.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Андрейчук Д. Б., Чвала Ил. А., Потехин А. В. Методические рекомендации по выявлению генома и типированию микроорганизма *Avibacterium paragallinarum* с помощью ПЦР в формате мультиплекс. – Владимир: ФГБУ «ВНИИЗЖ», 2016. – 12 с.
2. Евграфова В. А., Потехин А. В. Вирулентность изолятов возбудителя инфекционного ринита кур // Ветеринария сегодня. – 2017. – № 4 (23). – С. 28–32.
3. Archetti I., Horsfall F. L. Persistent antigenic variation of influenza A virus after incomplete neutralization in ovo with heterologous immune serum // J. Exp. Med. – 1950. – Vol. 92 (5) – P. 441–462; DOI: 10.1084/jem.92.5.441.
4. Blackall P. J. The avian haemophilus // Clin. Microbiol. Rev. – 1989. – Vol. 2 (3). – P. 270–277; DOI: 10.1128/CMR.2.3.270.
5. Blackall P. J. Infectious coryza: overview of the disease and new diagnostic options // Clin. Microbiol. Rev. – 1999. – Vol. 12 (4). – P. 627–632; DOI: 10.1128/CMR.12.4.627.
6. Blackall P. J., Eaves L. E., Rogers D. G. Proposal of a new serovar and altered nomenclature for *Haemophilus paragallinarum* in the Kume hemagglutinin scheme // J. Clin. Microbiol. – 1990. – Vol. 28 (6). – P. 1185–1187; PMID: PMC267902.
7. Blackall P. J., Matsumoto M. Infectious coryza // Diseases of Poultry / ed. Y. M. Saif [et al.]. – 11th ed. – Ames, Iowa, 2003. – P. 691–703.
8. Bragg R. R. Effects of differences in virulence of different serovars of *Haemophilus paragallinarum* on perceived vaccine efficacy // Onderstepoort J. Vet. Res. – 2005. – Vol. 72 (1). – P. 1–6; PMID: 15991700.
9. Characterization of isolates of *Haemophilus paragallinarum* from Indonesia / S. Poernomo, Sutarma, M. Rafiee, P. J. Blackall // Australian Vet. J. – 2000. – Vol. 78 (11). – P. 759–762; DOI: 10.1111/j.1751-0813.2000.tb10447.x.
10. Eaves L. E., Rogers D. G., Blackall P. J. Comparison of hemagglutinin and agglutinin schemes for the serological classification of *Haemophilus paragallinarum* and proposal of a new hemagglutinin serovar // J. Clin. Microbiol. – 1989. – Vol. 27 (7). – P. 1510–1513; PMID: PMC267605.
11. Evaluation of a panel of monoclonal antibodies in the subtyping of *Haemophilus paragallinarum* / P. J. Blackall, Y. Z. Zheng, T. Yamaguchi [et al.] // Avian Dis. – 1991. – Vol. 35 (4). – P. 955–959; PMID: 1786026.

12. Further studies on the use of a polymerase chain reaction test for the diagnosis of infectious coryza / X. Chen, C. Song, Y. Gong, P. J. Blackall // *Avian Pathol.* – 1998. – Vol. 27 (6) – P. 618–624; DOI: 10.1080/03079459808419393.

13. Pathogenicity and serovar-specific hemagglutinating antigens of *Haemophilus paragallinarum* serovar B strains / T. Yamaguchi, P. J. Blackall, S. Takigami [et al.] // *Avian Dis.* – 1990. – Vol. 34 (4). – P. 964–968; PMID: 2149263.

14. Rapid and sensitive detection of *Avibacterium paragallinarum* in the presence of other bacteria using a 5' Taq nuclease assay: a new tool for diagnosing infections coryza / B. G. Corney, I. S. Diallo, L. Wright [et al.] // *Avian Pathol.* – 2008. – Vol. 37 (6). – P. 599–604; DOI: 10.1080/03079450802449139.

15. Reclassification of *Pasteurella gallinarum*, [*Haemophilus*] *paragallinarum*, *Pasteurella avium* and *Pasteurella volantium* as *Avibacterium gallinarum* gen. nov., comb. nov., *Avibacterium paragallinarum* comb. nov., *Avibacterium avium* comb. nov. and *Avibacterium volantium* comb. nov. / P. J. Blackall, H. Christensen, T. Beckenham [et al.] // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* – 2005. – Vol. 55 (Pt). – P. 353–362; DOI: 10.1099/ijs.0.63357-0.

16. Sakamoto R., Kino Y., Sakaguchi M. Development of a multiplex PCR and PCR-RFLP method for serotyping of *Avibacterium paragallinarum* // *J. Vet. Med. Sci.* – 2012. – Vol. 74 (2). – P. 271–273; DOI: 10.1292/jvms.11-0319.

17. Sawata A., Kume K. Relationships between virulence and morphological or serological properties of variants dissociated from serotype 1 *Haemophilus paragallinarum* strains // *J. Clin. Microbiol.* – 1983. – Vol. 18 (1). – P. 49–55; PMID: PMC270743.

18. Sawata A., Kume K., Nakai T. Serologic typing of *Haemophilus paragallinarum* based on serum bactericidal reactions // *Jpn. J. Vet. Sci.* – 1984. – Vol. 46 (6). – P. 909–912; PMID: 6521153.

19. Sawata A., Kume K., Nakase Y. Biologic and serologic relationships between Page's and Sawata's serotypes of *Haemophilus paragallinarum* // *Am. J. Vet. Res.* – 1980. – Vol. 41 (11). – P. 1901–1904; PMID: 7212424.

20. Thornton A. M., Blackall P. J. Serological classification of Australian isolates of *Haemophilus paragallinarum* // *Aust. Vet. J.* – 1984. – Vol. 61 (8). – P. 251–253; DOI: 10.1111/j.1751-0813.1984.tb15533.x.

21. Virulence of the nine serovar reference strains of *Haemophilus paragallinarum* / V. E. Soriano, G. M. Longinos, R. P. Fernández [et al.] // *Avian Dis.* – 2004. – Vol. 48 (4). – P. 886–889; DOI: 10.1637/7188-033104R1.

REFERENCES

1. Andreychuk D. B., Chvala I. L. A., Potehin A. V. Methodical guidelines for *Avibacterium paragallinarum* genome detection and typing using multiplex-PCR [Metodicheskie rekomendacii po vyyavleniyu genoma i tipirovaniyu mikroorganizma *Avibacterium paragallinarum* s pomoshch'yu PCR v formate mul'tipleks]. Vladimir: FGBI "ARRIAH", 2016 (in Russian).

2. Yevgrafova V. A., Potehin A. V. Virulence of chicken infectious coryza agent isolates [Virulentnost' izolyatov vzbuditelya infekcionnogo rinita kur]. *Veterinary Science Today*. 2017; 4 (23): 28–32 (in Russian).

3. Archetti I., Horsfall F. L. Persistent antigenic variation of influenza A virus after incomplete neutralization in ovo with heterologous immune serum. *J. Exp. Med.* 1950; 92 (5): 441–462; DOI: 10.1084/jem.92.5.441.

4. Blackall P. J. The avian haemophili. *Clin. Microbiol. Rev.* 1989; 2 (3): 270–277; DOI: 10.1128/CMR.2.3.270.

5. Blackall P. J. Infectious coryza: overview of the disease and new diagnostic options. *Clin. Microbiol. Rev.* 1999; 12 (4): 627–632; DOI: 10.1128/CMR.12.4.627.

6. Blackall P. J., Eaves L. E., Rogers D. G. Proposal of a new serovar and altered nomenclature for *Haemophilus paragallinarum* in the Kume hemagglutinin scheme. *J. Clin. Microbiol.* 1990; 28 (6): 1185–1187; PMID: PMC2679302.

7. Blackall P. J., Matsumoto M. Infectious coryza. *Diseases of Poultry*. ed. Y. M. Saif [et al.]. 11th ed. Ames, Iowa, 2003: 691–703.

8. Bragg R. R. Effects of differences in virulence of different serovars of *Haemophilus paragallinarum* on perceived vaccine efficacy. *Onderstepoort J. Vet. Res.* 2005; 72 (1): 1–6; PMID: 15991700.

9. Characterization of isolates of *Haemophilus paragallinarum* from Indonesia. S. Poernomo, Sutarma, M. Rafiee, P. J. Blackall. *Australian Vet. J.* 2000; 78 (11): 759–762; DOI: 10.1111/j.1751-0813.2000.tb10447.x.

10. Eaves L. E., Rogers D. G., Blackall P. J. Comparison of hemagglutinin and agglutinin schemes for the serological classification of *Haemophilus paragallinarum* and proposal of a new hemagglutinin serovar. *J. Clin. Microbiol.* 1989; 27 (7): 1510–1513; PMID: PMC267605.

11. Evaluation of a panel of monoclonal antibodies in the subtyping of *Haemophilus paragallinarum*. P. J. Blackall, Y. Z. Zheng, T. Yamaguchi [et al.]. *Avian Dis.* 1991; 35 (4): 955–959; PMID: 1786026.

12. Further studies on the use of a polymerase chain reaction test for the diagnosis of infectious coryza. X. Chen, C. Song, Y. Gong, P. J. Blackall. *Avian Pathol.* 1998; 27 (6): 618–624; DOI: 10.1080/03079459808419393.

13. Pathogenicity and serovar-specific hemagglutinating antigens of *Haemophilus paragallinarum* serovar B strains. T. Yamaguchi, P. J. Blackall, S. Takigami [et al.]. *Avian Dis.* 1990; 34 (4): 964–968; PMID: 2149263.

14. Rapid and sensitive detection of *Avibacterium paragallinarum* in the presence of other bacteria using a 5' Taq nuclease assay: a new tool for diagnosing infections coryza. B. G. Corney, I. S. Diallo, L. Wright [et al.]. *Avian Pathol.* 2008; 37 (6): 599–604; DOI: 10.1080/03079450802449139.

15. Reclassification of *Pasteurella gallinarum*, [*Haemophilus*] *paragallinarum*, *Pasteurella avium* and *Pasteurella volantium* as *Avibacterium gallinarum* gen. nov., comb. nov., *Avibacterium paragallinarum* comb. nov., *Avibacterium avium* comb. nov. and *Avibacterium volantium* comb. nov. P. J. Blackall, H. Christensen, T. Beckenham [et al.]. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2005; 55 (Pt): 353–362; DOI: 10.1099/ijs.0.63357-0.

16. Sakamoto R., Kino Y., Sakaguchi M. Development of a multiplex PCR and PCR-RFLP method for serotyping of *Avibacterium paragallinarum*. *J. Vet. Med. Sci.* 2012; 74 (2): 271–273; DOI: 10.1292/jvms.11-0319.

17. Sawata A., Kume K. Relationships between virulence and morphological or serological properties of variants dissociated from serotype 1 *Haemophilus paragallinarum* strains. *J. Clin. Microbiol.* 1983; 18 (1): 49–55; PMID: PMC270743.

18. Sawata A., Kume K., Nakai T. Serologic typing of *Haemophilus paragallinarum* based on serum bactericidal reactions. *Jpn. J. Vet. Sci.* 1984; 46 (6): 909–912; PMID: 6521153.

19. Sawata A., Kume K., Nakase Y. Biologic and serologic relationships between Page's and Sawata's serotypes of *Haemophilus paragallinarum*. *Am. J. Vet. Res.* 1980; 41 (11): 1901–1904; PMID: 7212424.

20. Thornton A. M., Blackall P. J. Serological classification of Australian isolates of *Haemophilus paragallinarum*. *Aust. Vet. J.* 1984; 61 (8): 251–253; DOI: 10.1111/j.1751-0813.1984.tb15533.x.

21. Virulence of the nine serovar reference strains of *Haemophilus paragallinarum*. V. E. Soriano, G. M. Longinos, R. P. Fernández [et al.]. *Avian Dis.* 2004; 48 (4): 886–889; DOI: 10.1637/7188-033104R1.

Поступила 09.02.18

Принята в печать 29.11.18