

## ТИФ И ПУЛЛОРОЗ ПТИЦ

---

### РЕЗЮМЕ

*Пуллороз кур – бактериальная инфекция, вызываемая Salmonella enterica, подвид enteric, серовар Gallinarum, биовар Pullorum (Salmonella Pullorum)<sup>1</sup>. В настоящее время данный серовар в некоторых частях мира обозначают как Gallinarum, а других частях мира как Pullorum; в данной главе указанный серовар будет обозначаться как Gallinarum или Pullorum, в зависимости от описываемого биовара, поскольку это более показательно с точки зрения клинической и эпизоотологической перспективы.*

*В острой форме, пуллороз представляет собой почти исключительно септицемическую болезнь молодых цыплят. Однако данный организм может также ассоциироваться с болезнью у индюшат, а у взрослых птиц может наблюдаться субклиническое носительство, или он может приводить к снижению яйценоскости и выводимости плюс ряд атипичных признаков, наблюдаемых у птиц старшего возраста. Овариальная передача – основной путь, которым может распространяться данный организм. Пернатая дичь и стада домашней птицы на личных подворьях могут служить резервуарами инфекции, а дикие птицы могут выступать в качестве векторов для данного организма и, как таковые, играют важную роль в эпизоотологии болезни.*

*Возбудителем тифа птиц у кур и индеек является S. Gallinarum биовар Gallinarum, и данная болезнь чаще всего наблюдается в более поздний период выращивания или у взрослого поголовья. Болезнь часто характеризуется быстрым распространением при высоком уровне заболеваемости и при смертности в острой и подострой фазе болезни. В передаче болезни и персистенции в птичниках определенную роль могут играть красные клещи.*

*Клинические признаки у цыплят и других птенцов могут включать: анорексию, диарею, обезвоживание, слабость и гибель. У взрослых птиц пуллороз протекает в менее тяжелой форме, но снижает яйценоскость, приводит к плохой выводимости, и иногда может наблюдаться повышенный уровень смертности. Тиф птиц – более острое септицемическое состояние, которое в основном поражает взрослых птиц, и может иметь особенно тяжелую форму в стадах коммерческих несушек.*

**Идентификация агента:** *Не следует отбирать образцы у птиц и из яиц, которые недавно были обработаны антимикробными препаратами. Для диагностического тестирования следует использовать мазки или асептически собранные образцы инфицированных тканей или содержимого кишечника и клоаки. Можно отбирать образцы других материалов, включая яйца, эмбрионы, фекалии и остаточные вещества из инкубатора, особенно пушок, пыль и разбитую яичную скорлупу, и выстилку коробок для цыплят. Образцы тканей, таких как скопления лимфоидной ткани в расширенной части стенки слепой кишки и селезенка от инфицированных птиц, являются более предпочтительными, чем образцы фекалий и образцы из окружающей среды. Образцы*

---

<sup>1</sup> См. примечание в Главе 2.9.8. Сальмонеллез, где указаны принципы, на основании которых строится номенклатура Salmonella.

ткани следует инокулировать в неселективные и селективные обогатительные бульоны и на селективную агаровую среду, такую как агар с бриллиантовым зеленым, в кратчайшие сроки после их сбора. В случае задержки образцы следует хранить при 4°C. Типичные колонии можно идентифицировать с помощью серологических и биохимических тестов. Для идентификации и дифференциации *S. Gallinarum* и *S. Pullorum* можно также использовать молекулярные подходы. Итоговое серологическое подтверждение вызывающих подозрение изолятов обычно можно произвести только в референтной лаборатории по типированию сальмонеллы.

**Серологические тесты:** Данные тесты являются убедительными для выявления присутствия инфекции и определения степени превалентности инфекции в стаде. В полевых условиях для тестирования используется экспресс реакция агглютинации на плашке с использованием цельной крови. Данный тест не дает достоверных результатов у индеек и уток, поскольку многие неинфицированные птицы могут демонстрировать положительные реакции. В лаборатории используется реакция сывороточной агглютинации либо в виде экспресс теста на плашке, либо теста в пробирке. Данные тесты могут применяться в виде реакции макроагглютинации или микроагглютинации, хотя при использовании последних вероятность получения ложно положительных результатов на сыворотках индеек выше. В отношении любых животных с положительными реакциями следует подтвердить, что они являются результатом инфицирования, посредством культивирования, осуществляемого при проведении патологоанатомического исследования. Были описаны иммуноферментные анализы (ИФА), но коммерческий тест отсутствует.

При использовании вакцин для контроля инфекций, вызванных *S. Enteridis* и *S. Gallinarum*, у кур могут возникнуть проблемы в интерпретации результатов серологических тестов.

**Требования к вакцинам:** В некоторых странах имеются живые и инактивированные вакцины против тифа птиц. Наиболее широко используемая вакцина представляет собой коммерческую живую вакцину, полученную из стабильного шероховатого штамма *S. Gallinarum*, известного как 9R.

## А. ВВЕДЕНИЕ

Тиф птиц и пуллороз птиц, вызываемые *Salmonella enterica*, подвид *enteric*, серовары *Gallinarum*, биовары *Gallinarum* и *Pullorum*, соответственно, широко распространены по всему миру, но во многих развитых странах Западной Европы, в Соединенных Штатах Америки (США), Канаде, Австралии и Японии данные болезни среди коммерческой домашней птицы были искоренены. В Соединенных Штатах и Соединенном Королевстве указанный серовар обозначают как *Pullorum* (Hitchner, 2004), даже при том, что указанные штаммы в настоящее время считаются тем же сероваром, который возник из *S. Enteridis* в результате событий делеции генов (Thomson *et al.*, 2008); в данной главе будут использоваться термины серовар *Gallinarum* или *Pullorum*, поскольку это более эффективно разграничивает эти два биовара, которые вызывают явно различные клинические синдромы и, поэтому, они эпизоотологически различны. В некоторых европейских странах в последние годы наблюдалось повторное появление *S. Gallinarum* (Ivanics *et al.*, 2008). *Salmonella Pullorum* сохраняется в качестве постоянного резервуара у диких птиц и пернатой дичи.

Сальмонеллез, вызываемый *Salmonella bongori* или подвидами *Salmonella enterica*, описан в Главе 2.9.8. Сальмонеллез.

Клинические признаки тифа птиц типичны для септицемического состояния у домашней птицы и включают повышенный уровень смертности и плохое качество цыплят,

выведенных из инфицированных яиц. У птиц старшего возраста наблюдается анемия, угнетение, затрудненное дыхание и диарея, в результате которой фекалии прилипают к отверстию клоаки. Самый высокий уровень смертности от пуллороза наблюдается у птиц в возрасте 2-3 недель. У более взрослых птиц может наблюдаться легкая форма болезни, или болезнь может быть бессимптомной. В стадах племенных птиц или несушек восприимчивость к болезни повышается в начале периода яйцекладки (Wigley *et al.*, 2005), но единственными признаками инфицирования *S. Pullorum* могут быть сниженная яйценоскость и выводимость. Транс-овариальная инфекция, приводящая к заражению яйца и вылупившихся цыплят или других птенцов, является одним из наиболее важных путей передачи для обеих болезней.

Патологоанатомические признаки пуллороза у только что вылупившихся цыплят следующие: перитонит с генерализованной гиперемией тканей и воспаленный нерассосавшийся желточный мешок. Застарелые инфекции обычно приводят к тифлиту с образованием некротических цилиндров в слепой кишке и небольших некротических очагов в печени, легких и других внутренних органах. Небольшие поражения в печени и селезенке инфицированных *Pullorum* птиц могут внешне выглядеть, как белые пятна, чего не наблюдается при инфицировании *Gallinarum*; однако, данное поражение не является патогномичным. Данные виды *Salmonella* очень плохо образуют колонии, и их выживание в желудочно-кишечном тракте часто показательно для более поздних стадий клинической болезни. У взрослых птиц может наблюдаться деформация и сморщивание яичников с фолликулами, прикрепленными с помощью волокнистых ножек. Вариантные штаммы *S. Pullorum* обычно не вызывают клинической болезни или могут индуцировать слабые неспецифические признаки, но могут привести к сероконверсии.

При тифе птиц, а также при наличии генерализованных признаков септицемии, печень обычно увеличена, темная и хрупкая с явным медно-бронзовым отливом, который может появляться только под воздействием воздуха. Костный мозг также часто темно-коричневого цвета. Несмотря на то, что клинические признаки и результаты патологоанатомического исследования при пуллорозе и тифе птиц могут позволять с большой долей вероятности предполагать наличие данных состояний, они не являются достаточно патогномичными для дифференциации их от других причин септицемии. Поэтому, необходимо подтвердить наличие болезни посредством процедуры выделения организмов. Для определения присутствия болезни в стаде можно использовать серологические тесты.

## **1. Зоонозный риск и требования к уровню биобезопасности**

*Salmonella Gallinarum* и *S. Pullorum* адаптированы к видам птиц-хозяев (Eswarappa *et al.*, 2009) и, как считается, представляют минимальный зоонозный риск (Shivaprasad, 2000), хотя геном непрерывно эволюционирует, что теоретически в будущем может привести к расширению круга хозяев (Lui *et al.*, 2002). Работы с нетифоидными сероварами *Salmonella* обычно производят в лабораториях с уровнем защиты (CL) 2.

## **В. ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ**

### **1. Идентификация агента**

#### **1.1. Методы бактериологического культивирования**

В острых фазах болезни можно произвести выделение возбудителя обеих болезней из почти всех органов, тканей и фекалий. У более взрослых птиц, которые становятся носителями, *S. Pullorum* наиболее часто выделяют из яичников и яйцевода; выделение из других органов и тканей, включая кишечный тракт,

происходит крайне редко. В острой фазе тифа птиц, организм-возбудитель также широко распространен в организме, но у птиц-носителей чаще всего организм выявляют в печени, селезенке и половых путях, а в лимфоидных фолликулах слепой кишки – редко.

*Salmonella Pullorum* и *S. Gallinarum* принадлежат к серогруппе D по схеме Кауфмана-Уайта, вместе с *S. Enteritidis*, которая является близко родственной (Grimont & Weill, 2007). Организмы являются грамотрицательными неспорогенными палочками 1,0-2,5 мкм длиной и 0,3-1,5 мкм шириной. Считается, что в обычных условиях они сохраняют неподвижность, но у некоторых штаммов *S. Pullorum* при росте на специальных средах наблюдалось индуцирование флагеллярных белков и подвижность (Holt & Chaubal, 1997).

Для оптимального выделения организмов, не следует подвергать лечению антимикробными препаратами птиц, у которых будет производиться отбор образцов, в течение примерно 2-3 недель до отбора образцов.

Образцы можно отбирать у живых птиц, предпочтительно после того, как установлено, что они являются в высокой степени сероположительными. Можно также производить отбор свежих или только что охлажденных тушек, яичного материала, свежих фекалий или любых контаминированных материалов из птичника, инкубаторов или транспортных контейнеров, но обнаружить присутствие организма в образцах фекалий и образцах, отобранных из окружающей среды, часто не удастся из-за изменчивости в степени выделения птицами организма в окружающую среду и недостаточной чувствительности бактериологических методов обнаружения. Можно производить отбор мазков из клоаки больных живых птиц, но предпочтительнее в качестве образцов использовать ткани, собранные при патологоанатомическом исследовании. Предпочтительнее отбирать образцы явно аномальных тканей, но можно также произвести асептический отбор образцов из селезенки, печени, желчного пузыря, почек, легких, сердца, яичников, семенников, кишечного тракта или из мест поражений суставов. Предпочтительными тканями для рутинного исследования являются печень, илео-цекальное соединение и яичники/яйцевод. Поверхность прижигается горячим шпателем, образец отбирают посредством погружения стерильной ватной палочки или стерильной петли в ткань сквозь термо-стерилизованную поверхность. Для демонстрации наличия инфекции у птиц с серологическими реакциями, но внешне здоровых, в некоторых случаях, возможно, понадобится культивирование больших количеств гомогенизированных тканей, а также прямой отбор мазков. Ткани, собранные у нескольких птиц, можно объединять в пулы тканей.

При сборе образцов помета на полу, фекального материала или образцов из птичника, следует помнить, что если *S. Pullorum* и *S. Gallinarum* присутствует в малых количествах, как это бывает у субклинически инфицированных птиц-носителей, то выделить организм из образцов фекалий и образцов, отобранных из окружающей среды, намного труднее, чем другие виды сальмонеллы, и, поэтому, всегда предпочтительнее культивировать образцы от больных или недавно погибших птиц. Красные клещи, которые водятся у домашней птицы, инфицированной *S. Gallinarum*, часто содержат организм после того, как они питаются, и можно проводить их культивирование. Такие образцы следует культивировать посредством прямого внесения в селективный обогатительный бульон, такой как цистеин-селенитовый или F селенитовый бульон, с последующим высеванием на плашку на селективные среды, такие как агар с бриллиантовым зеленым (Parmar & Davies, 2007; Proux *et al.*, 2002).

И *S. Pullorum*, и *S. Gallinarum* хорошо растут в чистой культуре на неселективных средах, но описано применение селективных и обогащенных сред, которые содержат вещества для ингибирования роста чужеродных организмов. *Salmonella Pullorum* на селективных средах может расти медленно и продуцировать очень маленькие колонии, поэтому рекомендуется проводить инкубацию чашек в течение 48 часов. Эффективность выделения *Salmonella* варьирует в зависимости от обстоятельств, и, поэтому опыт использования среды, является важным, но не поддающимся количественному определению фактором. Некоторые сложные среды могут оказывать ингибирующее действие на данные организмы, поэтому для процедуры выделения из тканей рекомендуется использовать как селективные, так и нелеселективные среды. Можно использовать как твердые среды, так и бульоны. Поскольку токсические свойства селективных сред могут варьировать, предпочтительнее проводить мониторинг данных свойств посредством сравнения степени роста контрольных культур на обоих типах среды. Ингибирующие среды должны демонстрировать, как минимум, 75% рост колоний от роста таковых колоний на соответствующей неингибирующей среде (Ellis *et al.*, 1976; Mallinsen & Snoeyenbos, 1989).

Все указанные ниже среды являются примерами наиболее широко используемых сред, но имеется много других сред, которые, как установлено, являются в равной степени удовлетворительными.

Не-ингибирующие среды включают питательный агар и кровяной агар, на которых колонии выглядят гладкими, прозрачными, слегка выпуклыми и примерно 1-2 мм в диаметре. *Salmonella Gallinarum* на большинстве сред растет быстрее, чем *Salmonella Pullorum*, и продуцирует более крупные колонии с явным запахом, напоминающим запах спермы. Бульоны представляют собой забуференную пептонную воду и питательный и мясопептонный бульоны или универсальный бульон предварительного обогащения.

### 1.1.1. Селективные среды:

#### *i) Агар МакКонки*

Данный агар является ингибирующим для некишечных организмов; он дифференцирует ферменты лактозы (розовые колонии) от нелактозных ферментов (бесцветные колонии). NaCl не включают в целях ограничения распространения колоний *Proteus*. Колонии *Salmonella* - гладкие и бесцветные. *Salmonella Pullorum* продуцирует колонии меньшего размера, чем другие сальмонеллы. Агар МакКонки – является предпочтительным для метода прямого посева на чашки из тканей.

#### *ii) Ксилозо-лизиновый дезоксихолатный агар*

Данный агар оказывает ингибирующее действие на некишечные организмы. *Salmonella Pullorum* растет разреженно в виде маленьких красных полупрозрачных колоний. Колонии *S. Gallinarum* – небольшие полусферические и могут иметь центральную темную точку ввиду продуцирования H<sub>2</sub>S, но данная реакция может быть замедленной или вариабельной.

#### *iii) Агар с бриллиантовым зеленым (BGA)*

Данный агар оказывает ингибирующее действие на бактерии группы кишечной палочки и большинство штаммов *Proteus*; полезен для дифференциации

колоний кишечных организмов. Сальмонеллы образуют небольшие, выпуклые, бледно-красные полупрозрачные колонии от 1 до 3 мм в диаметре, сходные с *Citrobacter*. *Proteus* образуют точечные колонии, *Pseudomonas aeruginosa* появляются в виде малых красных колоний, а лактозные ферменты – зеленые. *Salmonella Pullorum* продуцирует колонии меньшего размера и более бледные, чем другие сальмонеллы. Агар с бриллиантовым зеленым является предпочтительным для использования после обогащения.

*iv) Агар с бриллиантовым зеленым и сульфациридином*

Агар оказывает ингибирующее действие на бактерии группы кишечной палочки и штаммы *Proteus*. Сульфациридин добавляют для стабилизации селективности в присутствии материалов яйца. *Salmonella Pullorum* продуцирует маленькие колонии.

На более новых хромогенных агарах, таких как Рамбах агар, *Salmonella Pullorum* и *Salmonella Gallinarum* растут плохо и не продуцируют типичных колоний.

### **1.1.2. Жидкие обогатительные и селективные среды**

*i) Цистеин-селенитовый и F селенитовый бульоны*

Данные бульоны обладают ингибирующим действием на бактерии группы кишечной палочки, но не на *Proteus*, улучшенные посредством добавления бриллиантового зеленого. Их использование ограничивает тот факт, что они утрачивают свою активность через 24 часа. Селенитовый бульон с цистеином является более стабильным и имеет менее ингибирующее действие, чем селенитовый F бульон, поэтому обычно является более предпочтительным (например, для мониторинга на уровне инкубатория выстилки корзин инкубатора или мекония), кроме использования для образцов свежих фекалий от взрослых птиц, в которых может присутствовать высоко конкурентная флора. Хотя бульоны на основе селенита считаются предпочтительными для выделения *S. Pullorum* и *S. Gallinarum* из фекалий посредством прямого обогащения (Wray & Wray, 2000), если в определенных лабораториях имеются трудности, связанные с проблемами токсичности или сроком годности, можно использовать и другие обогащенные бульоны, упомянутые ниже. Однако большинство из этих других бульонов созданы для использования после этапа неселективного обогащения, и в неселективной фекальной культуре конкурентные организмы без труда опережают в росте *Salmonella Pullorum* и *S. Gallinarum*, что приводит к получению ложнонегативных результатов теста. Поэтому, для образцов фекалий, кишечника и из окружающей среды рекомендуется использовать прямое селективное обогащение. Неселективное обогащение может давать лучшие результаты для тканей, полученных посредством асептического посмертного отбора, при котором не должно быть конкурирующих организмов (Mallinson & Snoeyenbos, 1989).

*ii) Тетратионатный бульон/бульон с бриллиантовым зеленым*

Данный бульон обладает ингибирующим действием для бактерий группы кишечной палочки и *Proteus*, и может также ингибировать некоторые штаммы *Salmonella Pullorum/Gallinarum*.

*iii) Соево-пептонный бульон Рамнопорта-Вассилиадиса (RVS)*

Данный бульон предназначается для селективного обогащения после предварительного обогащения следует использовать 1 часть инокулята на 100 частей среды. Во время предварительного обогащения фекалий и содержимого кишечника другие организмы, не относящиеся к сальмонеллам, которые не адаптированы к хозяевам, скорее всего, опережают в росте *Salmonella Pullorum* и *Gallinarum*, поэтому, можно также попробовать произвести прямое обогащение с помощью соево-пептонного бульона Раппопорта-Вассилиадиса.

## **1.2. Выделение сальмонелл**

Методы выделения *S. Pullorum* и *S. Gallinarum* варьируют в зависимости от источника образцов. Несмотря на то, что процедура выделения указанных сальмонелл из клоакальных мазков и фекалий может быть безрезультативной, исследование тканей, отобранных в ходе патологоанатомического исследования, обычно бывает более успешным. Применяются следующие методы:

### **1.2.1. Мазки из клоаки и свежие фекалии от живых птиц**

Подходят тампоны, погруженные в питательную среду, для молодых цыплят используют маленькие тампоны. Содержимое мазка с тампона высевают штрихом на селективные среды и помещают в обогатительный бульон. Чашки и бульон инкубируют при 37°C. При применении некоторых бульонов можно использовать более высокие температуры, например, 41,5°C для бульона Раппопорта-Вассилиадиса (RVS). Приготовление субкультур производят на селективных средах через 24 и 48 часов.

### **1.2.2. Содержимое желчного пузыря**

Мазки содержимого желчного пузыря высевают штрихом на неселективные и селективные агары и помещают в ингибирующие и неингибирующие бульоны с последующей инкубацией при 37°C и субкультивированием на селективном агаре через 24 и 48 часов.

### **1.2.3. Органы и ткани**

Производят асептический отбор мазков или сегментов тканей из отдельных тканей или мест поражений и культивируют их на неселективных и селективных средах и в сходных неселективных и селективных бульонах. Затем их инкубируют при 37°C и производят субкультивирование на селективном агаре через 24 и 48 часов. Для повышения общей скорости выделения можно использовать параллельную инкубацию при более высоких температурах, например, при 40°C.

### **1.2.4. Птицы-носители**

Для выявления птиц-носителей могут понадобиться большие количества материала. Яичники и яйцевод являются предпочтительными тканями для *S. Pullorum*, а печень, желчный пузырь и лимфоидные фолликулы слепой кишки, а также яичники и яйцевод следует тестировать на наличие *S. Gallinarum*. На практике, обычно лучше всего объединить в пул образцы разнообразных тканей, включая селезенку, но ткани кишечника не следует объединять с другими образцами. Ткани гомогенизируют в малом объеме бульона и высевают непосредственно на чашку. К 100 мл неселективного обогатительного бульона (например, забуференной пептонной воды) и селективного обогатительного

бульона (например, цистеин-селенитового бульона или бульона с бриллиантовым зеленым) добавляют приблизительно 10 мл гомогената и инкубируют при 37°C. Через 24 часа эти бульоны субкультивируют на неселективном и селективном агаре.

#### **1.2.5. Желудочно-кишечный тракт, включая лимфоидные фолликулы слепой кишки и содержимое кишечника**

После размалывания или гомогенизации в малом количестве бульона, 10 мл гомогената инкубируют в 100 мл селективного обогатительного бульона при 37°C. В целом, процедура выделения проходит более успешно при использовании цистеин-селенитового бульона.

#### **1.2.6. Яичная скорлупа**

Разбитую яичную скорлупу помещают в десятикратный объем обогатительного бульона (например, цистеин-селенитовый бульон). Бульон инкубируют при 37°C и через 24 и 48 часов проводят субкультивирование на селективном агаре.

#### **1.2.7. Содержимое яйца**

Асептически отобранное содержимое свежих яиц гомогенизируют и смешивают с 200 мл забуференной пептонной воды или питательного бульона, инкубируют при 37°C и через 24 и 48 часов проводят субкультивирование на неселективном и селективном агаре. Инкубированные яйца, неоплодотворенные или содержащие маленькие эмбрионы, можно исследовать таким же образом.

#### **1.2.8. Эмбрионы**

Можно произвести посев штрихом гомогенизированных внутренних органов и мазков из желточных мешков хорошо развитых эмбрионов на неселективный и селективный агар, материал одного мазка помещают в 10 мл как неселективного, так и обогатительного бульона (например, цистеин-селенитовый бульон или бульон с бриллиантовым зеленым). Инкубацию проводят при 37°C и через 24 и 48 часов производят получение субкультур на неселективном и селективном агарах.

#### **1.2.9. Образцы, отобранные из окружающей среды**

Они включают пух из инкубатора, остаточные вещества и образцы мацерированных остатков яйца/птенца, выстилку ящиков для птенцов, образцы фекалий с пола или подстилки; 25 г смешивают с 225 мл обогатительного бульона (например, цистеин-селенитовый бульон, бульон с бриллиантовым зеленым), инкубируют при 37°C и через 24 и 48 часов производят субкультивирование на селективном агаре.

Можно также использовать тесты на основе полимеразной цепной реакции (ПЦР), но они еще не полностью валидированы на международном уровне (Cha *et al.*, 2008; Oliviera *et al.*, 2003).

### **1.3. Подтверждающие процедуры**

Типичные колонии *S. Gallinarum* через 24-48 часов инкубации на неселективных средах – круглые, полупрозрачные, блестящие, выпуклые, гладкие, 1-2 мм в



диаметре. Колонии *Salmonella Pullorum* немного меньше по размерам и полупрозрачные. На селективных средах их внешний вид варьирует в зависимости от среды, но вызывающие подозрение колонии можно исследовать серологически посредством тестирования на наличие 'O'9 соматических антигенов, обследования на подвижность и биохимического тестирования.

После инкубации в течение 20-24 часов следует тщательно исследовать плашки на наличие типичных колоний *S. Pullorum* и *S. Gallinarum*. Если после инкубации чашек в течение 24 часов рост небольшой, плашки следует инкубировать повторно в течение дополнительных 24 часов и повторно исследовать. Для биохимического и серологического подтверждения следует для последующего исследования с каждой плашки выбрать пять типичных или вызывающих подозрение колоний. Если типичных и вызывающих подозрение колоний меньше пяти, для дальнейшего исследования отбираются все колонии. Выбранные колонии высевают штрихом на поверхность питательного агара, таким образом, чтобы колонии могли расти отдельно друг от друга. Для биохимического подтверждения следует использовать только чистые культуры, отобранные из неселективных сред. Нижеследующие среды засевают штрихом с помощью петли для инокуляции: тройной сахарный железный агар (TSI), лизиновый железный агар (или среда для декарбоксилирования l-лизина); мочевиновый агар по Кристенсену; триптонная/триптофанная среда для реакции на индол; глюкоза с перевернутой пробиркой Durham для исследования на продуцирование кислоты или газа; среда для декарбоксилирования с образованием дульцита, мальтозы, орнитина и полутвердый агар для исследования на подвижность. Наблюдаются реакции, указанные в таблице 1.

Имеются в продаже наборы для идентификации, например, система индекса аналитического профиля (API) для энтеробактерий. Однако применять данную API систему следует с осторожностью, поскольку *S. Pullorum* можно ошибочно идентифицировать как *Hafnia spp.* В научно-исследовательских лабораториях были разработаны молекулярные тесты с использованием методов риботипирования и ПЦР (Kang *et al.*, 2011), которые можно использовать для подтверждения и дифференциации *S. Gallinarum* и *S. Pullorum*.

Для серологического подтверждения на уровне серогруппы используют колонии из неселективных сред (питательный или кровяной агар). Первый этап – удаление самоагглютинирующих штаммов. Для этого, материал, отобранный из единичной колонии чистой культуры, переносят на стеклянное предметное стекло и смешивают с каплей стерильного солевого раствора. Предметное стекло осторожно покачивают или каплю перемешивают с помощью петли в течение 30-60 секунд и обследуют на наличие агглютинации на темном фоне, предпочтительно с помощью увеличительного стекла или препаровальной лупы. Если наблюдается скопление бактерий с образованием более или менее обособленных групп, штамм считается самоагглютинирующим и не подлежит исследованию в дальнейших тестах. Если бактериальный образец признается не самоагглютинирующим, его тестируют с использованием поливалентной 'O' (A-G) антисыворотки. В этих целях материал из единичной колонии диспергируют в капле поливалентной 'O' антисыворотки на стеклянном предметном стекле до получения однородной и мутной суспензии. После осторожного покачивания в течение 30-60 секунд реакцию исследуют на темном фоне на наличие агглютинации. Альтернативно, тест на агглютинацию на предметном стекле можно провести под препаровальной лупой, используя меньшие объемы суспензии. В данном случае порцию колонии, подлежащей тестированию, добавляют в солевой раствор, объемом в петлю для посева, на предметном стекле для микроскопа для продуцирования задержки света с целью проверки на самоагглютинацию («шероховатые штаммы»). Если агглютинация не происходит,

добавляют одну или две петли антисыворотки, каплю перемешивают с помощью петли и обследуют на наличие агглютинации. *Salmonella Pullorum* и *S. Gallinarum* должны агглютинировать с поливалентной 'O' антисывороткой, но не агглютинировать с поливалентной антижгутиковой (поли H фаза 1 и фаза 2) антисывороткой. Если реакция положительная, единичную колонию тестируют далее таким же образом, используя группно-специфичные сыворотки для серотипов *S. Pullorum* и *S. Gallinarum* ('O' 9 антисыворотка). После серогруппирования изоляты могут быть посланы в референтную лабораторию для серотипирования.

**Таблица 1. Биохимическое исследование *Salmonella Pullorum* и *S. Gallinarum***

	<i>Salmonella Pullorum</i>	<i>Salmonella Gallinarum</i>
TSI* глюкоза (образование кислоты)	+	+
TSI глюкоза (образование газа)	v	-
TSI лактоза	-	—
TSI сахароза	-	-
TSI сульфид водорода	v	v
Газ из глюкозы (среда с пробиркой Durham)	+	—
Гидролиз мочевины	-	-
Декарбоксилирование лизина	+	+
Декарбоксилирование орнитина	+	-
Ферментация мальтозы	- или позже +	+
Дульцит	-	+
Подвижность	-	-

\* TSI - трехсахарный агар с железом; + = в 90% или более наблюдается положительная реакция в течение 1 или 2 дней; - = нет реакции в 90% или более; v = переменные реакции.

Подтверждение наличия *S. Gallinarum* и её дифференциацию можно также произвести с помощью специфической ПЦР (Shan *et al.*, 2005).

#### **1.4. Процедура тестирования для культивирования висцеральных, фекальных, кишечных образцов и образцов из окружающей среды на наличие *S. Pullorum* и *S. Gallinarum***

- i) По возможности следует начинать лабораторные процедуры в тот же день, когда произведен отбор образцов.
- ii) Максимально возможно гомогенизировать материал путем смешивания вручную, осторожного размягчения и обработки на гомогенизаторе Stomacher с небольшим объемом стерильного солевого раствора, если материал сухой.
- iii) Перемешать смесь небольшой палочкой для взятия мазка из прямой кишки или петель и густо высеять штрихом на одну четвертую чашки с агаром, содержащем бриллиантовый зеленый. (Мазки с неконтаминированных тканей, отобранные асептически, можно также высевать штрихом на кровяной агар.)
- iv) Из данного осажденного слоя материала на чашке произвести посев штрихом на оставшейся части чашки для получения отдельных колоний.
- v) Добавить 5-25 г гомогенизированного образца в свежее приготовленный селенитовый бульон с цистеином (см. примечание по жидким обогатительным и селективным средам выше) для получения соотношения образец/бульон – 1/10. Встряхнуть или перемешать для распределения образца в бульоне.

- vi) Инкубировать чашки с агаром, содержащим бриллиантовый зеленый, и селенитовый бульон с цистеином при 37°C в течение 24 часов.
- vii) Исследовать чашку после 24-часового культивирования. Провести тесты на агглютинацию на примерно пяти вызывающих подозрение колониях с использованием поливалентных 'O' (A-G) антисывороток и поливалентных H (фаза 1 и фаза 2) антисывороток. Если агглютинация нечеткая, провести субкультивирование вызывающих подозрение колоний на питательном агаре или кровяном агаре и повторить тесты после 24-часовой инкубации этих сред.
- viii) Если поли 'O' дает положительные результаты, то следует провести проверку с использованием 'O'9 антисыворотки. Если 'O'9 дает положительные результаты, а поли 'H' – отрицательные, то это указывает на возможное присутствие *S. Pullorum* или *S. Gallinarum*.
- ix) Если на чашке с агаром, содержащем бриллиантовый зеленый, положительные колонии отсутствуют, отобрать петлей 10 мкл инкубированного селенитового бульона с цистеином и высеять штрихом на агар с бриллиантовым зеленым, как указано в этапе iv) выше.
- x) Инкубировать чашки с агаром, содержащем бриллиантовый зеленый, при 37°C в течение 24 часов и повторно инкубировать предыдущие (отрицательные) чашки с агаром, содержащем бриллиантовый зеленый, и селенитовые бульоны с цистеином в течение еще 24 часов.
- xi) Повторно произвести обследование чашек, как указано в этапе vii) выше.
- xii) Если чашки по-прежнему остаются отрицательными, произвести повторный посев с селенитового бульона с цистеином и инкубировать чашку с агаром, содержащим бриллиантовый зеленый, которая была инокулирована на этапе ix), в течение еще 24 часов и обследовать, как указано в этапе vii) выше.
- xiii) Подтвердить присутствие *S. Pullorum* и *S. Gallinarum* с помощью биохимических тестов, как указано в таблице 1. Изоляты можно отослать в справочную лабораторию по сальмонеллам для подтверждения серотипа и для фаготипирования *S. Pullorum*.

## 1.5. Молекулярная эпизоотология

Для расследования вспышек, вызванных *S. Pullorum* или *S. Gallinarum*, можно использовать стандартные молекулярные методы фингерпринтинга для *Salmonella*, такие как профильный анализ плазмид, гель-электрофорез в пульсирующем поле, ПЦР-анализ полиморфизма длины рестрикционных фрагментов (RFLP) или риботипирование. В одном исследовании было доказано, что особенно полезно использовать метод случайной амплификации полиморфной ДНК (RAPD) (Habtamu-Taddele *et al.*, 2011). Часто для максимальной дифференциации ввиду высокого уровня клональности необходимо использовать комбинации таких методов и комбинации различных рестриктаз. Наиболее эффективные методы могут также варьировать в зависимости от страны из-за природы циркулирующих клонов в данном регионе. По отношению к *S. Gallinarum* было также применено высокопроизводительное секвенирование, но пока оно не является экономически оправданным для расследования вспышек (Richardson *et al.*, 2011).

## 2. Серологические тесты

Серологические тесты лучше всего использовать в качестве тестов для стада, поскольку результаты для отдельных птиц будут варьировать в зависимости от стадии инфекции. Поэтому, для определения инфекции в стаде необходимо отобрать достаточное количество отдельных образцов. Количество образцов будет зависеть от ожидаемой превалентности и желаемого доверительного уровня (см. Главу 1.1.2 *Отбор и отправка диагностических образцов* и Главу 1.1.3. *Транспортировка образцов животного происхождения*). Если тест используется для выявления отдельных инфицированных птиц в целях их отбраковки, его следует повторять, как минимум, дважды и предпочтительно до тех пор, пока все стадо не покажет, как минимум, в двух тестах отрицательные результаты.

Наиболее легкими в применении являются следующие тесты: экспресс реакция агглютинации на плашке с цельной кровью, реакция сывороточной агглютинации (RST), реакция агглютинации в пробирке и реакция микроагглютинации (Министерство сельского хозяйства США (USDA), 1996). Наличие других инвазивных сальмонелл, таких как *S. Enteritidis* или *S. Typhimurium*, или применение вакцинации может привести к получению ложноположительных результатов в серологических тестах на наличие *S. Pullorum*.

И *S. Pullorum*, и *S. Gallinarum* имеют 'O' антигены 9 и 12 и могут также иметь O антиген 1 (Brooks *et al.*, 2008). Однако в случае с *S. Pullorum* имеет место вариация в соотношении 12<sub>1</sub>, 12<sub>2</sub> и 12<sub>3</sub>; стандартный штамм содержит больше 12<sub>3</sub>, чем 12<sub>2</sub>, тогда как у вариантных форм все наоборот. Также существуют и промежуточные формы. (У *S. Gallinarum* такой вариации форм нет.) Поскольку такая вариация существует, в иммунодиагностических тестах необходимо использовать поливалентный антиген. Такой же антиген используется для обнаружения как *S. Pullorum*, так и *S. Gallinarum*, но результативность обнаружения последнего сравнительно хуже (Proux *et al.*, 2002).

### 2.1. Экспресс-реакция агглютинации на плашке с цельной кровью

Экспресс реакцию агглютинации на плашке с цельной кровью можно использовать в полевых условиях для обнаружения как *S. Pullorum*, так и *S. Gallinarum*, и сразу же можно идентифицировать птиц, у которых наблюдается положительная реакция. Однако данный тест не является достоверным у индеек, поскольку среди результатов данного теста значительную часть составляют ложноположительные результаты. Можно провести скрининг сывороток с помощью экспресс реакции агглютинации на предметном стекле, а подтверждение положительных реакций произвести с помощью более специфичной реакции агглютинации в пробирке. Кур можно тестировать в любом возрасте, хотя некоторые авторы указывают минимальный возраст, который составляет 4 месяца (USDA, 1996; Wray & Wray, 2000), а положительные результаты у цыплят в возрасте моложе 4 недель могут быть следствием присутствия материнских антител.

#### 2.1.1. Подготовка окрашенного антигена для экспресс-реакции агглютинации на плашке с цельной кровью

Инкубировать один штамм *S. Pullorum* стандартной формы (антигенная структура 9, 12<sub>1</sub>, 12<sub>3</sub>) и одну вариантную форму (антигенная структура 9, 12<sub>1</sub>, 12<sub>2</sub>) при 37°C и произвести сбор урожая культуры отдельно до конечного смешивания для получения полного антигена.

Произвести посев штаммов на отдельные скошенные агары, инкубировать при 37<sup>0</sup>С в течение 24 часов, эмульгировать выращенную культуру с использованием стерильного нормального солевого раствора и распределить инокулят на чашке с агаровой средой для получения легко отбираемых дискретных колоний. Для этого чашки инкубируют в течение 48 часов, отмечают ряд колоний и каждую тестируют на наличие агглютинации на предметном стекле с 1/500 акрифлавина в солевом растворе. Колонии в гладкой фазе не продуцируют агглютинации. Отобрать типичные колонии, которые не продуцируют агглютинации, произвести их посев на скошенные агары и инкубировать в течение 24 часов. Эмульгировать культуру в солевом растворе и равномерно распределить 2 мл на поверхности среды (200 мл) в колбе Ру или сходной колбе. Инкубировать колбы в течение 60 часов.

Для сбора бактериальной культуры залить поверхность каждой колбы достаточным количеством стерильного забуференного формолсолевого раствора, рН 6,5 (8,5 г/литр хлорида натрия, 10 мл/ литр нейтрального формалина, 4 мл/литр 0,5М фосфата натрия, доведенного до объема в 1 литр дистиллированной водой, при рН доведенном до 6,5 с помощью 1М ортофосфорной кислоты или 1М гидроокиси натрия) для получения плотных клеточных суспензий (примерно 10 мл на одну колбу). Добавить 12-15 стерильных стеклянных гранул диаметром 3-5 мм и покачать колбы, пока выросшая культура не станет равномерной суспензией; оставить постоять в вертикальном положении в течение не менее 15 минут. Проверить морфологию и чистоту суспензий посредством приготовления и исследования грам-окрашенных мазков. Объединить суспензии из каждой колбы, содержащей одни и те же штаммы. К каждому 100 мл суспензии добавить 200 мл абсолютного спирта. Встряхнуть смесь и оставить постоять в течение 36 часов или до окончания процесса преципитации. Проверить на способность к агглютинации стандарта и преципитата варианта посредством первого центрифугирования образца для отделения спирта, который удаляется, произвести разведение с помощью нормального солевого раствора и протестировать с помощью известной положительной и отрицательной сыворотки. При получении удовлетворительных результатов удалить прозрачный надосадочный спирт (для процесса преципитации может быть полезным центрифугирование при 2000 г в течение 10 минут) и добавить достаточное количество забуференного фосфатом солевого раствора (ЗФР), содержащего 10% (в объемном отношении) глицерина для стандартизации плотности до 75 x No.1 Wellcome непрозрачную пробирку (или 50x пробирку No.1,0 по шкале Мак-Фарланда). К конечной смеси добавить равные объемы стандартного и вариантного штаммов и добавить 1% (в объемном отношении) 3% (вес/объем) спиртового раствора кристаллического фиолетового и оставить постоять в течение 48 часов при комнатной температуре. Хранить в плотно закрытом контейнере при 0-4<sup>0</sup>С в течение не более 6 месяцев. В целях оценки безопасности перед стандартизацией следует провести тестирование неотмытого антигена на нежизнеспособность посредством культивирования на кровяном агаре. Каждый флакон антигена необходимо протестировать после спиртовой преципитации и перед стандартизацией против стандартных титрованных антисывороток к *S. Pullorum* и *S. Gallinarum* и против отрицательной сыворотки. По возможности следует также провести тестирование с использованием известной положительной и негативной сыворотки и крови от положительных и негативных кур.

В продаже имеются окрашенные антигенные продукты для реакции агглютинации на плашке с цельной кровью, и хотя они немного отличаются по

степени своей чувствительности (Gast, 1997), вероятность того, что стада домашней птицы, инфицированные различными вариантами *S. Pullorum*, будут пропущены, мала.

### 2.1.2. Процедура теста

- i) Использовать чистую белую кафельную плитку, расчерченную на квадраты примерно 3 x 3 см. При использовании кафельной плитки с квадратами 3 x 4 можно одновременно протестировать до 12 образцов крови.
- ii) Поместить 1 каплю (около 0,02 мл) окрашенного кристаллическим фиолетовым антигена в центр каждого квадрата.
- iii) Получить образец свежей цельной крови. Удобнее всего это сделать посредством прокола вены крыла с помощью иглы с трехгранным острием.
- iv) Поместить каплю эквивалентного размера свежей цельной крови рядом с каплей антигена.
- v) Перемешать капли антигена и крови тонкой стеклянной палочкой, которую следует протереть начисто перед тем, как перемешивать следующий образец.
- vi) Осторожным покачивающим движением перемешивать капли в течение 2 минут. На одной и той же кафельной плитке можно одновременно провести несколько тестов, но в течение данного периода времени следует не допускать высыхания капель. В очень теплых условиях, возможно, понадобится использовать более крупные капли, чтобы не допускать их высыхания.
- vii) Хорошо видимая агрегация антигена в течение 2 минут указывает на наличие положительной реакции.
- viii) Отсутствие агрегации антигена в течение 2 минут показательно для отрицательной реакции.
- ix) В каждую процедуру тестирования включают известные положительные и отрицательные контрольные сыворотки, используя их таким же образом, что и кровь.
- x) По завершении серии тестов кафельную плитку промывают и высушивают, после этого она готова для дальнейшего использования.

При отсутствии птиц с положительными реакциями интерпретацию любых сомнительных реакций можно производить только с учетом предыдущей истории тестирования данного стада на *Salmonella*. При наличии птиц с положительными реакциями любых птиц с сомнительными реакциями следует считать положительными. Кроме того, недавно инфицированные птиц могут не демонстрировать типичной положительной реакции до тех пор, пока их не протестируют повторно через 3-4 недели.

### 2.2. Экспресс-реакция сывороточной агглютинации

Экспресс-реакция сывороточной агглютинации (RST) проводится таким же образом, кроме того, что вместо цельной крови используется сыворотка крови. Для тестирования с целью отправки на экспорт оптимальным подходом является первоначальный скрининг сывороток крови с помощью экспресс-реакции сывороточной агглютинации с последующим подтверждением положительных реакций посредством реакции агглютинации в пробирке. В идеале, образцы сыворотки крови, тестируемые любым методом, следует исследовать в течение 72 часов после их отбора, поскольку в более старых образцах возрастает вероятность неспецифических реакций. Если не удастся избежать задержки, свежие образцы можно заморозить для тестирования в более поздние сроки.

### 2.3. Реакция агглютинации в пробирке

Используется свежая сыворотка крови от кур, индеек или других птиц в первоначальном разведении 1/25, полученном посредством смешивания 0,04 мл сыворотки крови с 1,0 мл антигена<sup>2</sup>. В каждый тест включают положительные и отрицательные контрольные сыворотки крови. Приготовление антигена производят из неокрашенных культур *S. Pullorum* или *S. Gallinarum*, разведенных до концентрации №1 по шкале Мак-Фарланда (как описано выше). Смесь перед считыванием результатов инкубируют при 37°C или 50°C в течение 18-24 часов. Положительная реакция представляет собой гранулярный белый осадок с прозрачной надосадочной жидкостью; отрицательная реакция – однородную мутность. Образцы, которые дают положительные реакции при разведении 1/25, тестируют повторно при более высоком уровне разведения, а титр в 1/50 обычно считается положительным, хотя данный показатель в литературе варьирует. Во многих случаях используется единичное разведение в 1/50, но при этом некоторые инфекции стада можно и не обнаружить, если произведен отбор лишь малого количества образцов.

### 2.4. Реакция микроагглютинации

Данный тест напоминает реакцию агглютинации в пробирке, но для него требуется намного меньшие объемы реагентов. Данный тест проводится на микропланшетах для тестирования. Сыворотки крови сначала разводят, добавляя 10 мкл сыворотки крови к 90 мкл нормального солевого раствора, а затем добавляют 100 мкл предварительно стандартизированного окрашенного антигена для микротестирования до получения конечного разведения в 1/20. Конечную точку титрования (титр) можно определить посредством титрования сыворотки крови в двойных разведениях и добавления равного объема стандартизированного окрашенного антигена. Планшеты герметично запечатывают и инкубируют при 37°C в течение 18 -24 или 48 часов. Положительная реакция представляет собой явную диффузную преципитацию, тогда как отрицательная реакция представляет собой преципитат в виде пуговицы. Титры в 1/40 обычно считаются положительными, но при использовании данного теста для исследования сывороток крови индеек возрастает вероятность получения ложноположительных результатов.

Другие серологические тесты включают микроантиглобулин (Coombs), иммунодиффузию, гемагглютинацию и иммуноферментный анализ (ИФА).

Описаны ИФА-методы для выявления антител к *S. Pullorum* или *S. Gallinarum* (Oliviera *et al.*, 2004). Непрямой ИФА с использованием липополисахаридного антигена является наиболее чувствительным специфичным серологическим тестом на уровне стада для

---

<sup>2</sup> Для приготовления небольших объемов соматических антигенов см. Главу 2.9.9.

*Salmonella*, включая *S. Pullorum* или *S. Gallinarum*. Он довольно легок в осуществлении при проведении тестирования на сыворотке крови или желтке яйца и может быть использован для количественного определения титров антител (Barrow, 1992; 1994; Wray & Wray, 2000). В настоящее время коммерческие ИФА-наборы для *S. Pullorum* и *S. Gallinarum* отсутствуют.

## С. ТРЕБОВАНИЯ К ВАКЦИНАМ

### 1. Общая информация

#### а) Обоснование и предполагаемое использование продукта

Несмотря на то, что были созданы как живые, так и инактивированные вакцины для применения против *S. Gallinarum* (Paiva *et al.*, 2009), наиболее широко используемой вакциной является вакцина на основе шероховатого 9R штамма (Harbourne *et al.*, 1963). Обычно она используется только для кур. Важным аспектом является количество жизнеспособных организмов в одной дозе; эти организмы могут выживать в вакцинированных птицах в течение многих месяцев и могут передаваться через яйцо (и, возможно, от птицы к птице). Вакцинация может снизить потери в стаде, но не будет предотвращать инфицирование полевыми штаммами. Кроме того, вакцинация с помощью 9R может иногда провоцировать высокую смертность у инфицированных птиц (Silva *et al.*, 1981), и может стимулировать выработку транзиторных антител. Обычно птицу вакцинируют в возрасте 8 недель, а затем повторно в возрасте 16 недель. Следует избегать применения антимикробных препаратов до и после вакцинации.

Имеющиеся в настоящее время вакцины играют, однако, лишь незначительную роль в контроле тифа птиц, поскольку они предоставляют кратковременную защиту от клинической формы болезни и ограниченную или переменную защиту от инфекции. Для контроля клинической формы болезни можно использовать также аутогенные вакцины или вакцины местного производства, но следует соблюдать осторожность, чтобы избежать нестабильности штамма, которая может привести к возврату к вирулентности (Okamoto *et al.*, 2010). Лучшие методы контроля включают наличие системы биозащиты, гигиену, применение надлежащей практики содержания птицы, мониторинг и удаление инфицированных стад. Имеющиеся в продаже 9R вакцины использовались в некоторых странах для снижения распространения *S. Enteritidis* в стадах несушек, но в некоторых странах, где тифа птиц нет, они могут быть запрещены или отсутствовать в продаже (Lee *et al.*, 2005). Даже в странах, где тиф птиц имеется, применение вакцин может затруднять контроль, поскольку вакцина не предотвращает инфицирование, а лишь снижает степень проявления клинической болезни и позволяет продолжить получение продукта от инфицированных стад. Поэтому, предпочтительнее стремиться искоренить данный организм, а не смиряться с постоянным присутствием болезни, но это часто не является экономически оправданным в крупных хозяйствах, где содержится птица нескольких возрастов, поскольку для гарантирования постоянной свободы от инфекции необходимо искоренить красных клещей (Wales *et al.*, 2010).

Руководство по производству ветеринарных вакцин представлено в Главе 1.1.8 *Принципы производства ветеринарных вакцин*. Методические рекомендации, представленные в данной главе и в Главе 1.1.8., намеренно являются общими по своей природе и могут быть дополнены национальными или региональными требованиями. Большинство вакцин производится с использованием высоко технологичных процессов коммерческого производства и регламентируются национальными органами власти, осуществляющими лицензирование ветеринарных препаратов. Меньшее количество вакцин для вынужденной вакцинации стада или аутогенных вакцин производится



частными лабораториями, но каждое такое производство должно быть особым образом лицензировано. Рекомендуется использовать валидированную коммерческую вакцину, если имеется альтернатива, ввиду необходимости поддержания качества на должном уровне и во избежание риска, ассоциированного с возвратом к вирулентности. Необходимо, чтобы живые вакцины можно было бактериологически дифференцировать от полевых штаммов, в противном случае это может поставить под сомнение успешность программ надзора и контроля. Наблюдения, произведенные в некоторых странах, позволяют предположить, что не всегда можно четко дифференцировать вакцинные и полевые штаммы *S. Gallinarum*. Неизбежно будет присутствовать некоторая интерференция при серологическом мониторинге на наличие *S. Gallinarum* и потенциальная интерференция при серологическом мониторинге на наличие *S. Enteritidis*, если не будет применяться поэтапный подход, при котором используется чувствительный ИФА на основе липополисахаридов для тестирования на наличие антител к антигенам O9, а затем дальнейшее тестирование положительных сывороток с помощью ИФА со жгутиковыми антигенами, который в случае инфекции *S. Gallinarum* будет давать отрицательную реакцию (Wray & Wray, 2000). Последние работы по молекулярным механизмам инфекции должны привести к созданию усовершенствованных вакцин в будущем (Barrow & Freitas Neto, 2011).

## **2. Основные принципы производства и минимальные требования для традиционных вакцин**

### **2.1. Характеристика посевного материала**

#### **2.1.1. Биологические характеристики**

Для убитых или живых вакцин, бактериальный штамм должен представлять собой организм, по возможности наиболее близкородственный циркулирующим в настоящее время полевым штаммам. Его следует тщательно выбирать из случаев ярко выраженной клинической формы болезни, следует также производить его оценку на вирулентность и продуцирование антигена. Лучше всего таким образом оценивать набор потенциальных штаммов перед тестированием окончательно выбранного. Итоговый вакцинный штамм следует определять на основании учетно-регистрационной документации по истории стада и охарактеризовать с помощью стабильных фенотипических и генетических маркеров. Живые вакцинные штаммы должны быть маркированы стабильными характеристиками, позволяющими дифференцировать их от диких штаммов. Можно использовать такие маркеры, как резистентность к antimicrobial препаратам, например, к рифампицину, или ауксотропизм. Степень аттенуации вирулентности должна быть стабильной и предпочтительно достигнута посредством двух независимых определенных мутаций. Стабильность живых вакцинных штаммов можно подтверждать посредством регулярных проверок с использованием чувствительного молекулярного фингерпринтинга или методами микрочипов.

Живая вакцина против тифа птиц представляет собой суспензию соответствующим образом аттенуированных живых организмов шероховатого штамма *S. Gallinarum*, например, 9R. Организмы, присутствующие в вакцине, дают биохимические реакции, характерные для *S. Gallinarum*. Колонии 24-часовой культуры, приготовленной из вакцины на планшетах с питательным агаром, - шероховатые, при исследовании их с помощью теста с акрифлавином на предметном стекле. Культура не должна содержать соматических антигенов, характерных для гладких форм *S. Gallinarum*.

## 2.1.2. Критерии качества (стерильность, чистота, отсутствие чужеродных возбудителей)

### i) Стерильность и чистота

Необходимо провести проверку вакцинного штамма следующим образом:

- a) Окрашивание мазка бактериальной суспензии на предметном стекле с помощью красителя Грама.
- b) Однородность культуры на неселективных средах.
- c) Метаболические требования, как определяется биохимическими тестами.
- d) Обнаружение маркеров или фаготипа.
- e) Агглютинация со специфической антисывороткой.
- f) Вакцинная культура и любые адъюванты, консерванты или другие материалы должны быть микробиологически стерильными и нетоксичными в используемых концентрациях.

### ii) Безопасность

Определение ЛД<sub>50</sub> (50% летальная доза) или ИД<sub>50</sub> (50% инфекционная доза) можно производить на цыплятах или, предпочтительнее, проверку на наличие признаков более слабых нежелательных реакций следует проводить на целевых видах животных. Целевым видам животных следует вводить десятикратную полевою дозу живой вакцины или двойную дозу убитых вакцин в рекомендуемом возрасте или рекомендуемым путем. Животных обследуют на отсутствие нежелательных реакций. Для живых вакцин необходимо продемонстрировать их стабильность и невозврат к вирулентности после серийных пассажей на восприимчивых видах животных. Также необходимо учитывать повторную вакцинацию. Для живых вакцин необходимо продемонстрировать, что они не персистируют в течение длительного времени в вакцинированных животных или не передаются с молоком или яйцами, которые могут употребляться в пищу, и то, что метод введения не представляет опасности для операторов. Для исследования вакцины против *S. Gallinarum*, используют, как минимум, шесть здоровых восприимчивых (предпочтительно свободных от специфических патогенных факторов (СПФ)) цыплят, в возрасте 8-16 недель, каждого инъецируют подкожно десятью дозами вакцины и наблюдают за ними в течение не менее 7 дней; местные или системные реакции должны отсутствовать.

### iii) Эффективность

Для демонстрации эффективности вакцин следует использовать лабораторные эксперименты и полевые опыты. Лабораторные эксперименты включают тесты посредством вакцинации с последующим контрольным заражением на целевых видах животных в рекомендованном возрасте с использованием рекомендуемой дозы. Данные об эффективности могут быть также использованы в качестве основы для проведения теста на иммуногенность партии. Проводить полевые опыты

для тестирования степени эффективности нелегко из-за трудностей со стандартизированием контрольного заражения и обеспечением наличия соответствующих контролей. Для вакцины на основе штамма 9R *S. Gallinarum* или сходных вакцин, используют, как минимум, пятнадцать здоровых цыплят в возрасте 8-16 недель, гибридной породы Браун – несушки из стада свободного от инфекции *S. Pullorum*, каждого из которых инъецируют подкожно количеством вакцины, соответствующим одной полевой дозе, т.е.  $5 \times 10^7$  жизнеспособных организмов. Спустя 21-28 дней вакцинированных цыплят и равное количество сходных невакцинированных цыплят выдерживают без корма в течение приблизительно 18 часов. Затем цыплят контрольно заражают посредством перорального введения 1 мл бульонной суспензии, содержащей  $5 \times 10^7$  организмов вирулентного штамма *S. Gallinarum*, смешанной с 300 мг порошка, содержащего мел (40%), светлый каолин (43%) и трисиликат магния (17%). За всеми цыплятами осуществляют наблюдение в течение 14-21 дней. Вакцина считается прошедшей тест, если в конце указанного периода количество выживших вакцинированных цыплят, у которых при патологоанатомическом исследовании отсутствуют макроскопические поражения, ассоциированные с тифом птиц, на восемь или более птиц выше, чем количество таким же образом определенных контрольных цыплят.

#### iv) Факторы окружающей среды

Живые вакцинные штаммы следует протестировать на их способность персистировать в окружающей среде и инфицировать нецелевые виды, такие как грызуны и дикие птицы, которые могут подвергаться воздействию. Длительное выживание некоторых живых вакцин в фекалиях и помете может представлять собой неприемлемую опасность для окружающей среды, при удалении данного материала из птичников. Живые вакцины не следует использовать в коммерческих стадах несушек во время периода яйцекладки.

## 2.2. Метод производства

### 2.2.1. Процедура

Посевную культуру размножают и поддерживают, используя подходящие среды, многие из которых уже были описаны (в руководствах), как используемые для размножения *Salmonella*. Используемые среды не должны содержать сыворотку крови или ткани животных. Культивирование можно производить на твердой среде, в матрасах Ру или в жидкой среде, в ходе данного процесса можно использовать оборудование для ситуационной широкомасштабной ферментации. Лимитирование содержания железа или инкубация при низких температурах на минимальных средах могут усиливать продуцирование липополисахаридного (LPS) антигена вакцинным штаммом. В отношении *S. Gallinarum* (9R), вакцину можно получать посредством инокулирования подходящей среды, такой как пептонный бульон, свежей культурой *S. Gallinarum* (9R) и инкубации при 37°C в течение 24 часов при встряхивании. Сбор организмов производится посредством осаждения или центрифугирования.

Альтернативно, организмы можно выращивать и производить их сбор с твердой среды, такой как питательный агар. В любом случае суспензию разводят ЗФР

раствором, рН 7.0, и её можно лиофилизировать. Доза, используемая для одной птицы, составляет от  $5 \times 10^6$  до  $5 \times 10^7$  организмов.

Вакцину необходимо производить в подходящих чистых помещениях, доступ в которые имеет только имеющий разрешение персонал. Необходимо соблюдать осторожность во избежание перекрестной контаминации между зонами, где производится работа с живыми организмами, и другими зонами. Необходимо не допускать контаминации со стороны операторов и/или окружающей среды, а приготовление вакцины должно производиться в зоне, отделенной от места, где производятся работы по диагностическому культивированию. Операторы не должны работать с вакциной, когда они больны, и не должны находиться в иммуносупрессивном состоянии или подвергаться лекарственной терапии. Персонал должен носить защитную одежду при работе в производственных зонах и в виварии.

Посевные культуры получают из первичной посевной серии микроорганизмов, а количество пассажей зависит от валидации данного процесса. Вакцина может быть приготовлена посредством инокуляции подходящей среды, такой как питательный бульон, свежей культурой и инкубации на шейкере при  $37^{\circ}\text{C}$  в течение 24 часов с или без аэрации. Сбор урожая организмов производится посредством осаждения или центрифугирования. Альтернативно, организмы можно выращивать на и собирать с твердой среды, такой как питательный агар. Если это живые вакцины, суспензию разводят в ЗФР, рН 7.0, и её можно лиофилизировать.

Период инаktivации убитых вакцин должен быть, как минимум, на 33% больше, чем период времени, применяемый для снижения количества жизнеспособных микроорганизмов до не поддающегося обнаружению уровня. Процесс инаktivации должен применяться ко всему объему урожая вакцинных клеток.

Консерванты, эксципиент для лиофилизации, стабилизатор для многодозовых контейнеров или другие вещества, добавляемые к или объединяемые с вакцинным препаратом, не должны оказывать вредного воздействия на иммуногенность продукта.

### **2.2.2. Требования к субстратам и средам**

Следует гарантировать, что все используемые химические вещества и ростовые среды подходят для указанной цели и прошли проверку с применением подходящих контролей.

### **2.2.3. Контроль в процессе производства**

Следует обратить внимание на следующие аспекты:

- i) Визуальный контроль суспензии, гомогенность при применении красителя Грама, культивирование на неселективной среде.
- ii) Агглютинация на предметном стекле при использовании специфической антисыворотки.
- iii) Титрование бактерий посредством нефелометрии и/или определения количества микроорганизмов посредством посева на чашках Петри.

- iv) Тестирование на эффективность инактивации (убитая вакцина) посредством посева на неселективные среды или использования среды, которая дает оптимальный шанс на выделение, например производственная среда с нейтрализацией инактивирующего компонента.
- v) Титрование жизнеспособных бактерий (живая вакцина) до и после лиофилизации.

#### **2.2.4. Тесты на партии конечного продукта**

##### **i) Стерильность/чистота**

Тесты биологических материалов на стерильность и отсутствие контаминации можно найти в Главе 1.1.9.

##### **ii) Безопасность**

Для определения отсутствия нежелательного воздействия на вакцинированных животных можно использовать лабораторный тест, в отношении которого предварительно продемонстрирована соответствующая корреляция по безопасности у целевых видов. Каждую партию следует протестировать на целевых видах в рекомендуемом возрасте при использовании рекомендованного пути введения с применением, как минимум, двукратной полевой дозы для убитых вакцин и десятикратной дозы для живых вакцин. За вакцинированными животными осуществляют наблюдение на наличие каких-либо нежелательных побочных воздействий на их поведение и состояние здоровья, также можно произвести оценку тканевых реакций в месте введения.

##### **iii) Иммуногенность партии**

Тестирование на иммуногенность производится посредством исследования с помощью вакцинации с последующим контрольным заражением на курах и/или других видах, включая (если это практически целесообразно) любые другие целевые виды, и посредством определения иммунологической ответной реакции у целевых видов.

### **2.3. Требования для получения разрешения**

#### **2.3.1. Требования к безопасности**

Определенные убитые вакцины могут иногда вызывать реакции у вакцинированных животных ввиду их липополисахаридного содержания и использованного адъюванта и также, как и живые вакцины, должны с осторожностью применяться у животных, которые не совсем здоровы в момент вакцинации. Однако часто необходимо вакцинировать стада ввиду угрозы появления клинической формы тифа птиц. Вакцины могут также вызвать распухание в месте инъектирования, особенно если в их составе используется масляно-эмульсионный адъювант.

##### **i) Безопасность целевых и нецелевых животных**

Оценка убитых вакцин производится с помощью тестирования с применением двойной дозы, а оценка живых вакцин производится с

помощью тестирования с использованием десятикратной дозы, в идеале на целевых животных. В отношении живых вакцин должно быть подтверждено, что они безвредны для релевантных нецелевых видов, которые могут подвергаться воздействию вакцины, экскретируемой вакцинированными животными. Поскольку как *S. Gallinarum*, так и *S. Pullorum* являются хозяин-специфичными, нецелевые виды вызывают меньшее беспокойство.

#### ii) Возврат к вирулентности для аттенуированных/живых вакцин

В отношении живых вакцин следует продемонстрировать в ходе тестов на репликацию у целевых видов, что они не возвращаются к вирулентным штаммам во время соответствующего большого количества репликаций. Следует продемонстрировать, что мутации, особенно недифференцированные мутации, являются стабильными, а проверки на стабильность можно производить методами молекулярного фингерпринтинга или секвенирования. Хотя риск небольшой, но нецелесообразно использовать живые вакцины в стране, где был искоренен организм, используемый в вакцине. Следует соблюдать особые меры предосторожности для гарантирования того, что аттенуированные вакцины достаточным образом аттенуированы и не контаминированы посевными организмами.

#### iii) Учет факторов окружающей среды

Живые вакцины должны лишены способности реплицироваться в окружающей среде или персистировать в течение длительного периода.

### 2.3.2. Требования к эффективности

#### i) В животноводстве

Продолжительность иммунитета, скорее всего, будет значительно варьировать в зависимости от используемых вакцинных продуктов, схем вакцинации и конкретных вакцинируемых животных. Вакцина должна предоставлять защиту в течение периода яйценоскости, что можно определить посредством проведения тестов на иммуногенность (эффективность) на разных этапах во время периода яйцекладки. Возможно, в период яйцекладки понадобится бустерная вакцинация, но её не следует проводить в период яйцекладки в стадах птиц, яйца которых предназначены для потребления человеком.

Иммунитет к *Salmonella* является серовароспецифичным или серогруппоспецифичным. В результате консультаций с коллегами было выдвинуто предположение, что большинство убитых вакцин будут предоставлять некоторый уровень защиты в течение 6 месяцев, тогда как некоторые живые вакцины, введенные посредством инъектирования, могут индуцировать более сильный иммунитет, который может сохраняться в течение одного года или дольше. Следует, однако, помнить, о том что сильное повторное заражение, например, ассоциированное с фермами с постоянным присутствием домашней птицы или с инфицированными дикими птицами или популяциями клещей, может преодолеть индуцированный вакциной иммунитет и что коммерческие живые вакцины могут быть аттенуированы в целях снижения степени выживания в окружающей среде

таким образом, который снижает иммунный ответ. Также могут быть проблемы с гарантированием эффективного перорального введения в отношении живых вакцин, которые вводятся перорально или правильностью инъекирования при введении живых и убитых инъекируемых вакцин. Вакцины против *Salmonella* предназначены для ограничения степени проявления клинической формы болезни у домашней птицы и также для снижения риска заноса инфекции в стада. По возможности, тест на иммуногенность должен быть ассоциирован с эффективностью указанной вакцины у целевых видов и для признания партий соответствующим должны применяться подходящие критерии. Можно произвести оценку убитых и инъекируемых вакцин по продуцируемому гуморальному иммунному ответу, хотя следует помнить, что сывороточные антитела являются лишь частью механизма защиты хозяина от *Salmonella*. Альтернативно, иммуногенность вакцины можно оценить по её воздействию на контрольно зараженных вакцинированных животных при количественном и статистическом сравнении с невакцинированными контролями.

#### ii) Для контроля и искоренения

Вакцины против *Salmonella* не способны искоренить инфекцию в стадах, но могут повысить порог заражения, снизить уровень выделения организма в среду и снизить степень вертикальной передачи у домашней птицы, которая приводит к контаминации инкубационного или столового яйца. Поэтому, вакцинация способствует контролю и искоренению, которые производятся другими методами, такими как выбраковка, производство по схеме «занято-пусто», создание системы биозащиты и соблюдение гигиены на ферме.

#### iii) Стабильность

Информация о стабильности убитых вакцин отсутствует. На стабильность оказывают влияние условия хранения и присутствие контаминирующих микроорганизмов, размножающихся в продукте. В убитые бактериальные вакцины часто в качестве консервантов включают химические вещества, имеющие антимикробную активность, такие как тиомерсал, фенол или кристаллический фиолетовый. Оценка стабильности производится в ходе тестов на иммуногенность, повторяемых через надлежащие промежутки времени. Стабильность живых вакцин можно оценивать посредством подсчета количества живых организмов, повторяемого через определенные промежутки времени, и генотипирующих тестов для идентификации генетических изменений во время процесса ферментации.

### **3. Вакцины, созданные с помощью биотехнологий**

#### **3.1. Имеющиеся вакцины и их преимущества**

В продаже таких вакцин нет.

#### **3.2. Специальные требования к вакцинам, полученным с помощью биотехнологий, если таковые имеются**

Не применяются.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Barrow P.A. (1992). ELISAs and the serological analysis of *Salmonella* in poultry: a review. *Epidemiol. Infect.*, **109**, 361–369.
- Barrow P.A. (1994). Serological diagnosis of *Salmonella* serotype *enteritidis* infections in poultry by ELISA and other tests. *Int. J. Food Microbiol.*, **21**, 55–68.
- Barrow P.A. & Freitas Neto O.C. (2011). Pullorum disease and fowl typhoid – new thoughts on old diseases: a review. *Avian Pathol.*, **40** (1), 1–13.
- Brooks B.W., Perry M.B., Lutze-Wallace C.L. & Maclean L.L. (2008). Structural characterization and serological specificities of lipopolysaccharides from *Salmonella enterica* serovar *gallinarum* biovar *pullorum* standard, intermediate and variant antigenic type strains. *Vet. Microbiol.*, **126**, (4), 334–344.
- Cha S., Jang D., Kim S., Park J. & Jang H. (2008). Rapid detection and discrimination of the three *Salmonella* serotypes, *S. Pullorum*, *S. Gallinarum* and *S. Enteritidis* by PCR-RFLP of ITS and *fliC* genes. *Korean J. Poult. Sci.*, **35**, (1), 9–13.
- Ellis E.M., Williams J.E., Mallinson E.T., Snoeyenbos G.H. & Martin W.J. (1976). Culture Methods for the Detection of Animal Salmonellosis and Arizonosis. Iowa State University Press, Ames, Iowa, USA.
- Eswarappa S.M., Janice J., Balasundaram S.V., Dixit N.M. and Dipshikha C. (2009). Host-specificity of *Salmonella enterica* serovar *gallinarum*: Insights from comparative genomics. *Infect Genet. Evol.*, **9**, (4), 468–473.
- Gast R.K. (1997). Detecting infections of chickens with recent *Salmonella Pullorum* isolates using standard serological methods. *Poult. Sci.*, **76**, 17–23.
- Grimont P.A.D. & Weill F.-X. (2007). Antigenic formulae of the *Salmonella* serovars. WHO Collaborating Centre for reference and research on *Salmonella*. Institut Pasteur, Paris, France.
- Habtamu-Taddele M., Rathore R., Dhama K. & Agarwal R.K. (2011). Epidemiological characterization of *Salmonella gallinarum* Isolates of poultry origin in India, employing two PCR based typing methods of RAPD-PCR and PCR-RFLP. *Asian J. Anim. Vet. Adv.*, **6**, 1037–1051.
- Harbourne J.F., Williams B.M., Parker W.H. & Fincham I.H. (1963). The prevention of fowl typhoid in the field using a freeze-dried 9R vaccine. *Vet. Rec.*, **75**, 858–861.
- Hitchner S.B. (2004). History of biological control of poultry diseases in the U.S.A. *Avian Dis.*, **48**, 1–8.
- Holt P.S. & Chaubal L.H. (1997). Detection of motility and putative synthesis of flagellar proteins in *Salmonella pullorum* cultures. *J. Clin. Microbiol.*, **35**, 1016–1020.
- Ivanics E., Kaszanyitzky E., Glavits R., Szeredi L., Szakall S., Imre A., Kardos G. & Nagy B. (2008). Acute epidemic disease in laying hen flocks, caused by *Salmonella gallinarum*. *Magyar Allatorvosok Lapja*, **130**, (10), 611–617.
- Kang M.S., Kwon Y.K., Jung B.Y., Kim A., Lee K.M., An B.K., Song E.A., Kwon J.H. & Chung G.S. (2011). Differential identification of *Salmonella enterica subsp enterica* serovar



*Gallinarum* biovars *Gallinarum* and *Pullorum* based on polymorphic regions of *glgC* and *speC* genes. *Vet. Microbiol.*, **147**, (1–2), 181–185.

Lee Y.J., Mo I.P. & Kang M.S. (2005). Safety and efficacy of *Salmonella gallinarum* 9R vaccine in young laying chickens. *Avian Pathol.*, **34**, 362–366.

Liu G.-R., Rahn, A., Liu W.-Q., Sanderson K.E., Johnston R.N. & Liu S.-L. (2002). The evolving genome of *Salmonella enterica* serovar *Pullorum*. *J. Bacteriol.*, **184**, 2626–2633.

Mallinson E.T. & Snoeyenbos G.H. (1989). Salmonellosis. In: Isolation and Identification of Avian Pathogens, Third Edition, Purchase H.G. et al., eds. American Association of Avian Pathologists, Kendall Hunt Publishing, Iowa, USA, 3–11.

Okamoto A.S., Menconi A., Goncalves G.A.M., Rocha T.S., Andreatti R.F., Savano E.N. & Sesti L. (2010). Reversion to virulence evaluation of a 9r vaccine strain of *Salmonella enterica* serovar *Gallinarum* in commercial brown layers. *Brazilian J. Poult. Sci.*, **12**, (1), 47–52.

Oliveira G.H. DE, Berchieri Junior A., Montassier H.J. & Fernandes A.C. (2004). Assessment of serological response of chickens to *Salmonella Gallinarum* and *Salmonella Pullorum* by Elisa. *Rev. Bras. Cienc. Avic.*, **6**, 111–115.

Oliveira S.D., Rodenbusch C.R., Ce M.C., Rocha S.L.S. & Canal, C.W. (2003). Evaluation of selective and nonselective enrichment PCR procedures for *Salmonella* detection. *Let. Appl. Microbiol.*, **36**, 217–221.

Paiva J.B.D., Penha Filho R.A.C., Arguello Y.M.S., Silva M.D.D., Gardin Y., RESENDE F., Berchieri Junior A. & Sesti L. (2009) Efficacy of several *Salmonella* vaccination programs against experimental challenge with *Salmonella gallinarum* in commercial brown layer and broiler breeder hens. *Brazilian J. Poult. Sci.*, **11**, (1), 65–72.

Parmar D. & Davies R.H. (2007). Fowl typhoid in a small backyard laying flock. *Vet. Rec.*, **160**, 348.

Proux K., Humbert F., Jouy E., Houdayer C., Lalande F., Oger A. & Salvat G. (2002). Improvements required for the detection of *Salmonella Pullorum* and *Gallinarum*. *Can. J. Vet. Res.*, **66**, 151–157.

Richardson E.J., Limaye B., Inamdar H., Datta A., Manjari K.S., Pullinger G.D., Thomson N.R., Joshi R.R., Watson M., Stevens M.P. (2011). Genome sequences of *Salmonella enterica* serovar *typhimurium*, Choleraesuis, Dublin, and *Gallinarum* Strains of well-defined virulence in food-producing animals. *J. Bacteriol.*, **193** (12), 3162–3163.

Shah D.H., Park J.-H., Cho M.-R., Kim M.-C. & Chae J.-S. (2005). Allele-specific PCR method based on *rfbS* sequence for distinguishing *Salmonella Gallinarum* from *Salmonella pullorum*: serotype-specific *rfbS* sequence polymorphism. *J. Microbiol. Methods*, **60**, 169–177.

Shivaprasad H.L. (2000). Fowl typhoid and pullorum disease. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.* **19**, 405–424.

Silva E.N., Snoeyenbos G.H., Weinack O.M. & Smyser C.F. (1981). Studies on the use of 9R strain *Salmonella Gallinarum* as a vaccine in chickens. *Avian Dis.*, **25**, 38–52.

Thomson N.R., Clayton D.J., Windhorst D., Vernikos G., Davidson S., Churcher C., Quail M.A., Stevens M., Jones M.A., Watson M., Barron A., Layton A., Pickard D., Kingsley R.A., Bignell

A., Clark L., Harris B., Ormond D., Abdellah Z., Brooks K., Cherevach I., Chillingworth T., Woodward J., Norberczak H., Lord A., Arrowsmith C., Jagels K., Moule S., Mungall K., Sanders M., Whitehead S., Chabalgoity J.A., Maskell D., Humphrey T., Roberts M., Barrow P.A., Dougan G. & Parkhill J. (2008) Comparative genome analysis of *Salmonella enteritidis* pt4 and *Salmonella gallinarum* 287/91 provides insights into evolutionary and host adaptation pathways. *Genome Res.*, **18**, (10), 1624–1637.

United States Department of Agriculture (1996). Auxiliary Provisions on National Poultry Improvement Plan. Code of Federal Regulations, Title 9, Part 147, 717–727.

Wales A.D., Carrique-Mas J.J., Rankin M., Bell B., Thind B.B. & Davies R.H. (2010) Review of the carriage of zoonotic bacteria by arthropods, with special reference to *Salmonella* in mites, flies and litter beetles. *Zoonoses Public Health*, **57**, (5), 299–314.

Wigley P., Hulme S.D., Powers C., Beal R.K., Berchieri A., Smith A. & Barrow P. (2005). Infection of the reproductive tract and eggs with *Salmonella enterica* serovar *Pullorum* in the chicken is associated with suppression of cellular immunity at sexual maturity. *Infect. Immun.*, **73**, (5), 2986–2990.

Wray C. & Wray A. (EDS) (2000). *Salmonella* in Domestic Animals. CAB International, Wallingford, Oxon, UK, 407–427.

\*

\* \*