С.Сейфуллин атындағы Қазақ агротехникалық университетінің 60 жылдығына арналған **«Сейфуллин оқулары– 13: дәстүрлерді сақтай отырып, болашақты құру»** атты Республикалық ғылыми-теориялық конференциясының **материалдары** = **Материалы** Республиканской научно-теоретической конференции **«Сейфуллинские чтения – 13: сохраняя традиции, создавая будущее»**, посвященная 60-летию Казахского агротехнического университета имени С.Сейфуллина. - **2017. - Т.I, Ч.2. -** С.25-28

БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ВАКЦИННОГО ШТАММА SALMONELLATYPHIMURIUM

Макбуз А.Ж., *д.в.н., профессор*
Кошкимбаев С.С.*, ассистент*
Жолдасбекова А.Е.*, докторант Ph.D*
Казахский национальный аграрный университет, г.,Алматы

Введение. Птицеводству Казахстана и раньше, и сегодня большой урон наносят кишечные инфекции, в частности сальмонеллез, что выражается потерей молодняка впервые 25 дней жизни, потерей продукции (яйцо, мясо), так как обсемененная сальмонеллами продукция, попавшая в торговую сеть, часто вызывает вспышки инфекции среди людей.

Сальмонеллез самый распространенный в мире зооантропонозов и, по данным ВОЗа (1999) с каждым годом приобретают вид угрозу во всем мире. Ущерб, наносимый этой болезнью, заключается не только в падеже сельскохозяйственной птицы, но и в том, что переболевшие птицы на протяжение длительного времени являются сальмонеллоносителями и становятся постоянными источниками контаминации окружающей среды. Широко распространенными носительсями среди кур (5—22,2%), уток (10—15%), гусей (5—20%). В среднем носители выявлены среди здоровых птиц в пределах от 0,25 до 7,0%, а среди больных, вынужденно убитых от 2,9 до 30% [1,2].

Как было уже отмечено, несмотря на снижение количество сельскохозяйственной птицы в Республике Казахстан проблема сальмонеллёза будет сопровождать эту отрасль, что связано с большой концентрацией птицепоголовья и многочисленными факторами распространения этой инфекции исходящих из недостатков современного производства.

Обычно в хозяйствах мало обращают внимание на падёж птицы с признаками кишечных заболеваний, который наблюдается в первые 7 – 15 дней после инкубации. Такой падёж в основном списывается на недоработки инкубатора, хотя проведённые исследования показывают, что причиной падежа молодняка может быть и сальмонеллёз (тиф – пуллороз). Правильно проведённые профилактические мероприятия помогут предприятиям сократить падёж птицы. Сокращение падежа даже на 1% принесёт более высокую рентабельность. Основная роль должна отводится специфической

профилактике, для чего необходимы современные эффективные, удобные в применении вакцины [3, 4].

Перспективным для профилактики сальмонеллеза овец считают живые вакцины.

В настоящее время согласно международным требованиям и стандартам аттенуированные штаммы, используемые для изготовления вакцин, должны иметь минимум две охарактеризованные мутации, обладать стабильностью биологических свойств, умеренной реактогенностью и остаточной вирулентностью, созданием иммунитета высокой напряженности при однократном введении, эпизоотически безопасными, а также возможностью сочетания с другими вакцинами. Вакцинные штаммы должны быть маркированы, и это позволяет дифференцировать их от эпизоотических прототипов[5,6].

Целью и задачей исследования явилось получение аттенуированного штимма Salmonellatyphimurium и изучение его биологических свойств.

Материалы и методы.В работе использовали аттенуированный штамм Salmonellatyphimurium 42, полученный в лаборатории противобактериозной биотехнологии КазНАУ, под руководством профессора Бияшева К.Б.

Вакцинный штамм S. typhimurium 42 получен генетическим путем из исходного штамма Salmonellatyphimurium66. Штамм Salmonellatyphimurium 42 депонирован в Коллекции микроорганизмов Республиканского государственного предприятия «Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности» Комитета науки Министерства образования и науки Республики Казахстан (РГП КН МО и Н РК). Коллекционный номер М-37-15/D. На штамм Salmonellatyphimurium 42 получено заключение о выдаче патента на изобретение за №27374 от 20.09.2016.

Результаты и обсуждение. В результате проведенных генетических исследований получен трехмаркерный мутант Salmonellatyphimurium 42 (Nea^R, Rif^R и Hst).

Две мутации Nea^R и Rif^R приводят к повреждению рибосомальных белков (S_{12} иS_{13}) и тем самым влияют на правильность считывания генетической информации. В результате происходит снижение вирулентных свойств, т.е.- аттенуация. Таким образом, аттенуация связана с нарушением трансляции генов, кодирующих синтез важных факторов патогенности бактерии или генов, продукты которых имеют важное значение в жизнедеятельности бактерии.

Третья мутация, сообщает высокую чувствительность к поверхностно активным веществам. Указанная мутация, обозначенная как Hst(highsensibility), не влияет на аттенуацию и иммуногенность штамма, однако ограничивает время переживания бактерий в кишечнике хозяина и окружающей среде. Потенциальные вакцинные штаммы, обладающие Hst-мутацией, неспособны к длительному пребыванию во внешней среде, в связи с чем они могут рассматриваться как «экологически чистые» живые вакцинные штаммы, характеризующиеся ограниченной способностью к

формированию инфекционной цепи (т.е., неспособные к эпидемическому или эпизоотическому распространению).

Для препаратов применяемых в области иммунопрофилактики кишечных инфекций важное значение имеет их морфологические, культуральные, антигенные и биохимические свойства, а также сроки элиминации, константность их остаточной вирулентности.

Работа по изучению вакцинного штамма Salmonellatyphimurium 42 показала, что данный штамм обладает типичными для этого вида культурально-биохимическими, антигенными свойствами, слабой и стабильной остаточной вирулентностью.

Культуральные свойства штамма изучались на обычных питательных средах. На МПА наблюдается равномерный хороший рост с голубоватым оттенком, образуются круглые, гладкие, полупрозрачные колонии. На среде Эндо клетки штамма образуют круглые, блестящие бесцветные колонии. Бактерии обладают хорошей подвижностью. При микроскопировании мазков можно видеть беспорядочно расположенные палочки, при посеве на МПБ образуется равномерное помутнение. Диапозон температур роста 37-39^{0}С, оптимум pH – 6,8-7,5. В качестве источника углерода используют арабинозой, глюкозой, дульцитом, мальтозой, фруктозой, арабинозой и сорбитом. Обладает лизин - и орнитиндекарбоксилазной активностью, не обладает уреазной активностью. Образует сероводород и не образует индол.

Антигенная стуктура типичная для S.typhimurium 42: 0-1,4,5,12; H-i,1,2. Чувствителен к бактериофагу Р 22 специфичному в отношении S-форм сальмонелл.

Срок элиминации штамма S.typhimurium 42 изучали на белых мышах живой массой 14-16 г и морских свинках массой 250 – 300 г. Белых мышей иммунизировали подкожно в дозе – 10^5 колониеобразующих клеток (КОЕ) и перорально в дозе – 10^6 КОЕ, а морских свинок подкожно в дозе - 3 х 10^8 КОЕ. После вакцинации животных убивали на 3, 7, 14 и 21 сутки. Посевы из органов производили на МПА и выделенные культуры типировалимонорецепторными типоспецифическими сыворотками. Вакцинный штамм из органов лабораторных животных обильно высевался на 3, 7 сутки как после подкожной, так и после пероральной иммунизации. На 14 сутки у белых мышей в селезенке, печени, паховом лимфатическом узле наблюдалось свыше 10 и единичные колонии исследуемого штамма, у морских свинок в селезенке, печени наблюдалось свыше 10 колоний, в паховом лимфатическом узле свыше 20 колоний. Элиминация вакцинного штамма S. typhimurium 42 наступила на 21 сутки после иммунизации, что подтверждалось стерильностью сделанных посевов.

Остаточную вирулентность штаммаS. typhimurium 42 также проверяли на белых мышах и морских свинках с учетом их выживаемости. Заражение мышей проводили внутрибрюшинно и перорально в дозах – 10^5 ,- 10^6 ,- 10^7 , 10^8 КОЕ. Морским свинкам исследуемый штамм вводили внутрибрюшинно, в дозах от 2 х 10^9 КОЕ до 6 х 10^9 КОЕ.

Исследования показали, что белые мыши при внутрибрюшинном заражении в дозах-10^5,10^6,10^7 КОЕ остались живы в 100 % случаев, в дозе 10^8 КОЕ 85%, а при пероральном введении исследуемого штамма в дозах от 10^5 до 10^8 КОЕ остались живыми от 85,0 до 100 % белых мышей, тогда как контрольные мыши, зараженные вирулентной культурой S. . typhimurium 371 в оттитрованной дозе все погибли. Морские свинки при внутрибрюшинном заражении в дозах от от 2 х 10^9 КОЕ до 4 х 10^9 КОЕ 100 % остались живы, а контрольная группа животных зараженных вирулентной культурой S. . typhimurium371 все погибли.

Как известно, аттенуация вакцинных штаммов должна сопровождаться стабильностью их биологических свойств. Стабильность остаточной вирулентности штамма S. typhimurium 42 изучали, проводя пассаж штамма через организм белых мышей, путём смертельного подкожного и внутрибрюшинного заражения в дозе 2 х 10^8 КОЕ. Мыши погибали на 3 – 5 сутки. Изолированные из органов мышей культуры проверялись по морфологическим, культуральным, тинкториальным и антигенным свойствам, а также по сохранению маркёров аттенуации, после чего проводили следующий пассаж.

Все изолированные из органов мышей после каждого пассажа субкультуры имели примерно одинаковые показатели остаточной вирулентности. После десятикратного пассирования было выявлено сохранение исходного уровня ($LgLD_{50}$ - 8.0 ± 0.3) остаточной вирулентности штамма S. typhimurium 42 при подкожном и внутрибрюшинном заражении белых мышей. Наблюдалась и стабильность генетических маркеров. Стабильность аттенуации и генетических маркеров штамма S. typhimurium 42 определяли путем обработки штамма мутагеном нитрозогуанидином. Изучение указанных свойств у 10 клонов штамма, отобранных после такой обработки, выявило их сохранение на том же уровне, что и у необработанной культуры.

Выводы. Штамм Salmonellatyphimurium 42 отвечает всем требованиям, предъявляемым к вакцинным штаммам: обладает стабильностью биологических свойств, умеренной реактогенностью и остаточной вирулентностью, имеет три генетические маркеры для отличия его от штамма естественного происхождения, эпизоотически безопасен для использования, обеспечивает довольно длительное раздражение организма, на больших тканевых поверхностях, как при пероральном, так и при подкожном введении и в тоже время не вызывает хронического бактерионосительства. Присутствие в штамме Salmonellatyphimurium 42 трех мутаций с известными механизмами действия, служит убедительным генетическим доказательством стабильности и безопасности аттенуированного штаммаS.typhimurium 42. Теоретическая частота обратной мутации одновременно по всем маркерам составляет примерно 10^{-21}, что практически невозможно.

Список литературы

1.Бияшев К. Б. Профилактика сальмонеллёза В Казахстане, Алма-Ата, 1991, 42 с.

2.Mayer M., Gessler K., WeissH, E. Infektketten und infektionszyklen der salmonellen in der broiler und putenproduktion. Tierarztl.Umsch.,1984, №39, 7, S. 538 – 548.

3.K.B. Biyashev, B.K. Biyashev, A.M. Makbuz. Occurrence of Enteroinfecious Pathogens in Agricultural Animals and Poultry.Biology and Medicine.Web of Science. ISSN:0974-8369 BLM, an open access journal. Volume 8.Issue 2.170-16.

4.Чарлз Д. Я., Четфилд Н. С., Фейрветер Ф. Н. Способ получения аттенуированного штамма бактерий Salmonella ивакцина. Патент РФ №2126447 С1. Опубликован 20.02.1999.

5.Шустер Б. Ю., Малахов Ю. А., Киржаев Ф. С., Персов А. С., Зуев В. Г. Вакцина против сальмонеллеза водоплавающей птицы // Мат. ВГНКИ, «Новое в борьбе с болезнями птиц». – М., 1984. - С. 24 -26.

6.Линде К., Беер Й., Рандхаген Б. Патент РФ №2177804 С2. Живая сальмонеллезная вакцина. Опубликован 10.01.2002.