




УДК:619:616.98:579.852.11.

Original Article

ИНДИКАЦИЯ, ИДЕНТИФИКАЦИЯ И ИНАКТИВАЦИЯ SALMONELLA ABORTUS-OVIS

Мусаева А.К. , Егорова Н.Н. , Еришов М.Ө. , Глепов А.А. , Касенов М.М. *Казахский научно-исследовательский ветеринарный институт, проспект Райымбека 223, Алматы, 050016, Казахстан*

* Correspondence: assiyakylashevna@mail.ru

АННОТАЦИЯ

В статье приводятся результаты идентификации эпизоотической культуры *Salmonella abortus-ovis* (A) 58, выделенной из паренхиматозных органов абортированного плода овцематки, инв.№ KZH 210397333, доставленного из с. Сенокосное Осакаровского района Карагандинской области. Для выделения чистой культуры сальмонелл из патологического материала от абортплода овцематки использовали метод ступенчатого отбора колоний по Дригальскому. Идентификацию выделенной культуры проводили на основании изучения культурально-морфологических, биохимических, антигенных свойств культуры *Salmonella abortus-ovis* (A) 58 в соответствии с Определителем бактерий Берджи. Культура агглютинировалась с поливалентной сальмонеллезной сывороткой А,В,С,Д,Е (+++), с монорецепторными сыворотками О –IV (++++), О –XII (++++), Н- с (1 фаза) - (++++), Н- 1,6 (2 фаза) (++++). По результатам типирования в РА культура, выделенная от абортированного плода овцематки, отнесена к роду *Salmonella*, виду *abortus-ovis*, серологической группе В. В статье представлены результаты экспериментов по оптимизации процесса культивирования сальмонелл. Для культивирования эпизоотического штамма *S. abortus-ovis* (A) 58 использовали посевные матричные культуры сальмонелл второй генерации в экспоненциальной фазе роста. Предварительно отбирали значимые физико-химические параметры - давление растворенного кислорода (O_2) и концентрацию глюкозы ($C_6H_{12}O_6$) с последующим осуществлением управляемого по этим параметрам процесса периодического культивирования. Изучена динамика роста сальмонелл в процессе культивирования, определены оптимальные параметры культивирования сальмонелл от 7 до 12 часов, характеризующиеся короткой лаг-фазой. За указанный период культивирования происходило максимальное накопление бактериальной массы. Периодическое культивирование сальмонелл обеспечивало физиологически активное состояние культуры, увеличение максимальной скорости роста, сокращение лаг-фазы и минимального времени генерации. Изучение характера роста сальмонелл в процессе культивирования на МПБ показало, что экспериментальный режим периодического освежения штамма сальмонелл интенсифицирует процесс, особенно в экспоненциальной фазе, за счет увеличения скорости роста бактерий. Отработан режим инактивации сальмонелл с последующим высевом на жидкие и плотные питательные среды для определения полноты инактивации. Установлено, что эффективным инактивантом является димерэтиленмин (ДЭИ): 10%-ный раствор бакмассу сальмонелл в 3%-ном объеме к объему бакмассы инактивирует за 22-24ч; в 3,5%-ном объеме – за 22-24ч. Эффективным инактивантом является формальдегид: 10% раствор формалина бакмассу сальмонелл в 3,5%-ном объеме инактивирует за 22-24ч. В статье приведены условия реактивации, культивирования, способ и температура хранения штамма *S. abortus—ovis* (A) 58. В статье представлена электроннограмма штамма *S. abortus—ovis* (A) 58.

Инактивирование бактериальной массы проведена для изготовления вакцины против сальмонеллезного аборта овец.

Ключевые слова: инфекция, сальмонелла, аборт, индикация, идентификация, инактивация

ВВЕДЕНИЕ

Овцеводство является одной из ведущих отраслей сельского хозяйства республики. Сальмонеллез овец встречается во всех странах мира, независимо от климатических и географических условий и наносит огромный экономический ущерб овцеводству. В Казахстане разводятся породы шерстного и мясо-шерстного направления [1-5]. Сальмонеллезный аборт овец распространенная инфекционная болезнь, характеризуется массовыми абортами во второй половине беременности и рождением мертвых плодов. Сальмонеллезный аборт овец принимает массовое распространение и часто сопровождается гибелью овцематок от послеродового сепсиса. У новорожденных ягнят болезнь протекает в виде бактериемии и энтерита, а в более позднем возрасте развиваются пневмония и артриты. Аборты чаще регистрируются в зимне-весенний период во второй половине суягности. Стационарное неблагополучие хозяйств тесно связано со скрытым носительством (выделение и распространение) сальмонелл и

неблагоприятными для животных условиями содержания. Серьезным препятствием для увеличения поголовья овец и повышения продуктивности является низкая оплодотворяемость и высокий процент бесплодия маточного поголовья, возникающего на почве заболевания животных инфекционными заболеваниями с синдромом поражения репродуктивных органов [6-10].

Источником возбудителя являются больные или переболевшие животные – сальмонеллоносители. Продолжительность инкубационного периода болезни от момента заражения до аборта зависит от количества и вирулентности возбудителя от того, в какой период суягности овца заразилась. Массовые аборты в отарах начинаются за месяц до окотов, с наступлением которых вскоре заканчиваются. За 12-24 часа до аборта овца проявляет беспокойство, затем ложится; появляется отечность наружных половых органов и кровянисто-слизистое истечение из влагалища. Температура у овец повышается до 40-41 °С. После аборта овцы не встают, падеж наступает в первые

1-3 дня, иногда через несколько часов. У абортировавших овец послед задерживается, истечения становятся кровянисто-гниеными. На почве эндометрита развиваются осложнения пара-и пиометриты, заканчивающиеся падежом овцематок на 1-10 день. Вспышки сальмонеллезного аборта овец сопровождаются не только абортами у овец, также заболеванием и падежом ягнят, заразившихся ярок и даже взрослых баранов. Случаи аборт и падежа овец на последнем месяце суягности вызывают подозрение на сальмонеллезный аборт овец [11-14].

Выделения больных животных загрязняют корма, воду и т. д., которые впоследствии становятся основными факторами передачи сальмонелл. Ягнята заболевают в первые дни жизни. Выздоровевшие ягнята развиваются плохо. Профилактика сальмонеллезного аборта овец основывается на вакцинации овцематок. В настоящее время эпизоотическая ситуация усугубляется тем, что отсутствует вакцина против сальмонеллезного аборта овец. Важное место среди мер борьбы с сальмонеллезом занимает вакцинопрофилактика. Для профилактики сальмонеллеза известно использование инактивированных сорбированных и эмульгированных вакцин, которые не лишены недостатков. Опыт промышленного производства инактивированных вакцин против сальмонеллезом насчитывает несколько десятилетий, однако, до сих пор существует проблема подбора средств для инактивации сальмонелл и режимов инактивации, позволяющих максимально полно сохранять нативную структуру бактерий, продолжает оставаться актуальной [15-20].

Разработка приемлемых методов инактивации выделенной вирулентной эпизоотической культуры *Salmonella abortus-ovis* для изготовления эффективного профилактического средства против сальмонеллезного аборта овец является актуальной задачей.

Цель исследований

Выделить эпизоотический вирулентный штамм сальмонелл, идентификация, инактивации выделенной вирулентной культуры *Salmonella abortus-ovis* с максимально сохраненной антигенной активностью для изготовления вакцины против сальмонеллезного аборта овец.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Индикацию и идентификацию выделенной из паренхиматозных органов абортировавшего плода овцематки инв.№ KZH 210397333, доставленного из с. Сеносное Осакаровского района Карагандинской области.

Бактериологические исследования биоматериала на наличие сальмонелл проводят путем посева биоматериала на жидкие и плотные питательные среды (МПБ, МПА, МППБ, Сабуро). Лабораторную диагностику сальмонеллезного аборта овец проводят в соответствии с «Методическими указаниями по лабораторной диагностике сальмонеллезом животных». Отбор проб от животных для диагностических исследований проводили согласно Правилам отбора проб, перемещаемых (перевозимых) объектов и биологического материала, утвержденным приказом Министра сельского хозяйства Республики Казахстан от 30 апреля 2015 года № 7-1/393 и Методическими рекомендациями по отбору проб для диагностических исследова-

ний на инфекционные заболевания сельскохозяйственных животных и птиц [21-23].

Для выделения чистой культуры сальмонелл из патологического материала от абортплода овцематки используют метод ступенчатого отбора колоний по методу Дригальского. Чистая культура необходима для изучения типичности роста, культурально-морфологических, биохимических, антигенных свойств эпизоотической вирулентной культуры. В целях получения однородного популяционного свойства сальмонелл, обладающих сравнительно короткой лаг-фазой, сопровождающейся накоплением более высокой бактериальной массой, проводят исследования по селекции отдельных колоний сальмонелл с активными ростовыми свойствами.

В результате бактериологических исследований проверяют культуральные, тинкториальные, морфологические, биохимические свойства и агглютинабельность штамма *Salmonella abortus-ovis* с поливалентной (ABCDE) и монорецепторными сыворотками O-IV, O-XII, H-c (1 фаза), 1,6 (2 фаза) (Петсал, г. Санкт-Петербург). Для дальнейшей идентификации посева изучаемой культуры делали на дифференциально-диагностические среды (среда Эндо, висмут сульфитный агар). Штамм обладает высокой патогенностью и вирулентностью для белых мышей, овец и ягнят. Идентификацию выделенной культуры сальмонелл проводят путем изучения культуральных, тинкториальных, морфологических, биохимических и антигенных свойств в соответствии с Определителем бактерий Берджи [20].

Провели индикацию и идентификацию эпизоотической культуры *Salmonella abortus-ovis* (A), выделенной абортировавшего плода. Методом ступенчатого отбора колоний отбирали перспективный эпизоотический штамм сальмонелл. Штамм сальмонелл *Salmonella abortus-ovis* (A) с наибольшей целевой активностью отобран для производства вакцины и накопления бактериальной массы (бакмасса). Изученный вирулентный штамм *Salmonella abortus-ovis*, отобранный путем селекции клонов с последующим ступенчатым отбором колоний, был паспортизирован и присвоен номер депозитора - 58. Затем проводили инактивацию бакмассы. Инактивация – процесс утраты инфекционной, репродуктивной и метаболической активности микроорганизмов при действии физических или химических факторов.

Накопление бактериальной массы проводили на плотной питательной среде МПА. Накоплена бакмасса путем культивирования отобранного эпизоотического вирулентного штамма *Salmonella abortus-ovis* (A) - культуры *Salmonella abortus-ovis* от абортплода; Культура *Salmonella abortus-ovis* (A) 58, выделенный из органов от абортировавшего плода, с наибольшей целевой активностью была отобрана для изучения инактивации антигена.

Проделаны работы по накоплению бакмассы; разработки режима инактивации с разными концентрациями двух видов инактиваторов: испытаны 10%-ный раствор формалина и 10%-ный раствор димерэтиленимина. В опытах для инактивации эпизоотической вирулентной культуры *Salmonella abortus-ovis* (A) 58 применяли 5, 10%-ный раствор димерэтиленимина (ДЭИ) в сравнении с 5, 10%-ным раствором формальдегида. Отработаны разные

концентрации инактивантов для добавления в бакмассу по объему в оптимальном и максимальном разведениях; отработано время экспозиции каждой концентрации инактивантов с бакмассой; проведена проверка полноты инактивации бакмассы и оптимального времени экспозиции с бакмассой; разработан режим депонирования бакмассы на адьювант: отработан метод осаждения инактивированной бакмассы на гидроксид алюминия (гидроксид алюминия, гидроксал, ГОА).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Бактериологическими исследованиями из патматериала абортплода из с/о Сенокосное Осакаровского района Карагандинской области выделен эпизоотическая вирулентная культура *Salmonella abortus-ovis* (A). Для выделения чистой культуры сальмонелл из патологического материала от абортплода овцематки использовали метод ступенчатого отбора колоний. Чистая культура необходима для изучения типичности роста, культурально-морфологических, биохимических, антигенных и патогенных свойств.

Для бактериологического исследования посева из пробы патологического материала абортплода делали на МПБ, МПА и дифференциально-диагностические среды. Для высева брали пробы из паренхиматозных органов с учетом наибольшей локализации сальмонелл: небольшие кусочки печени, селезенки, сердца, из толстого отдела кишечника. Путем ступенчатого отбора колоний (нескольких пассажей на МПА) получен штамм *Salmonella abortus-ovis* (A), обладающий высокой вирулентностью.

Изучение характера роста сальмонелл в процессе культивирования на МПБ или бульоне Хоттингера показало, что экспериментальный режим периодического освещения штаммов сальмонелл интенсифицирует процесс, особенно в экспоненциальной фазе, за счет увеличения скорости роста бактерий (рисунок 1).

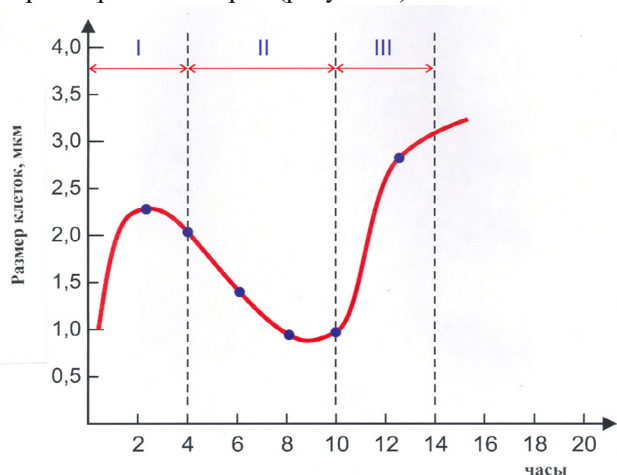


Рисунок 1-Динамика роста сальмонелл в процессе культивирования

На рисунке 1 показаны основные фазы культивирования эпизоотического штамма

сальмонелл: I – лаг-фаза; II – экспоненциальная фаза; III – стационарная фаза.

После засева матричной культуры вакцинного штамма

сальмонелл первой генерации в питательную среду приспособительные реакции в лаг-фазе приводят к укрупнению клеток сальмонелл. После 5 часов культивирования сальмонелл крупных клеток становилось меньше или они совсем отсутствовали, преобладали палочки средней величины (до 0,8-2,0 мкм), реже встречались мелкие, типичные для сальмонеллезных штаммов.

В 7-ти часовой культуре присутствовали в основном мелкие однородные палочки, и иногда в небольшом количестве палочки средней величины (до 1,0-2,0 мкм). Типичную для сальмонелл морфологию культура приобретает через 8 ч культивирования (0,8-3,0 мкм) и не изменялась в течение последующих 2 ч при обеспечении оптимальных условий.

На 12 часовой стадии культивирования в значительном количестве выявлялись гетероморфные клетки с округлые, утолщенные клетки, что свидетельствовало о деформации клеточной стенки в связи с истощением питательной среды.

Проведены эксперименты по оптимизации процесса культивирования. Для культивирования эпизоотического штамма необходимо использовать посевные матричные культуры сальмонелл второй генерации в экспоненциальной фазе роста. Предварительно отбирали значимые физико-химические параметры - давление растворенного кислорода (O_2) и концентрацию глюкозы ($C_6H_{12}O_6$) с последующим осуществлением управляемого по этим параметрам процесса периодического культивирования.

Управляемое периодическое культивирование сальмонелл обеспечивало физиологически активное состояние культур, увеличение максимальной скорости роста, сокращение лаг-фазы и минимального времени генерации по сравнению с неуправляемым культивированием (контроль), интенсификацию процесса за счет уменьшения продолжительности выращивания сальмонелл в 2,5 раза (с 24 до 8-10 часов). При этом наблюдалось более интенсивное накопление микробных клеток (20 млрд КОЕ/см³) по сравнению с контролем (8 млрд КОЕ/см³).

После засева матричной культуры сальмонелл второй генерации рН питательной среды снижается незначительно с 7,4 до 7,2 к концу 10 -12 часов культивирования.

Рост культуры *Salmonella abortus-ovis* (A) 58 на дифференциально-диагностических средах Эндо и висмут-сульфитном агаре представлены на рисунке 2,3.

Как видно на рисунке 2 в процессе роста эпизоотической культуры *Salmonella abortus-ovis* (A) на среде Эндо не разлагается углевод лактоза, поэтому рост сальмонелл на среде не сопровождается изменением цвета среды, остается светло-розовым, на которой располагаются выпуклые колонии сальмонелл.

Как видно на рисунке 3 при росте эпизоотической культуры *Salmonella abortus-ovis* (A) на среде происходит разложение уксуснокислого свинца и появление черных колоний за счет образования сернистого железа.

В ходе изучения биохимических свойств выделенных эпизоотической культуры *Salmonella abortus-ovis* (A) определено, что культура на среде Гисса обладает свойствами, типичными для бактерий рода *Salmonella*. Культура по биохимическим свойствам идентична с контролем



Рисунок 2- Рост культуры *Salmonella abortus-ovis* (A) на среде Эндо.



Рисунок 3- Рост культуры *Salmonella abortus-ovis* (A) на висмут-сульфитном агаре.

ным вирулентным штаммом *Salmonella abortus-ovis* 372: не ферментирует лактозу, сахарозу; ферментирует с образованием кислоты и газа глюкозу, мальтозу, дульцит, арабинозу, ксилозу, фруктозу, рамнозу, сорбит.

В результате изучения физиологических особенностей обмена веществ у сальмонелл, генетических, биохимических, физиологических, антигенных свойств эпизоотиче-

ской культуры *Salmonella abortus-ovis* №1 разработан и утвержден паспорт штамма и карта хранения. В паспорте штамма *Salmonella abortus-ovis* (A) присвоен коллекционный № 57. Разработан и утвержден паспорт штамма *Salmonella abortus-ovis* (A) и карта хранения. В паспорте штамма *Salmonella abortus-ovis* (A) присвоен коллекционный № 58 (Таблица 1).

Таблица 1 - Биологические свойства эпизоотической культуры сальмонелл *Salmonella abortus-ovis* (A) в сравнении с изученной культурой *Salmonella abortus-ovis* №1 и контрольным вирулентным штаммом *Salmonella abortus-ovis* 372

Наименование тестов	<i>Salmonella abortus-ovis</i> (A)	<i>Salmonella abortus-ovis</i> №1	Контрольный штамм <i>Salmonella abortus-ovis</i> 372
Физиологические особенности обмена веществ у сальмонелл			
Каталаза	+	+	+
Оксидаза	-	-	-
Уреаза	+	+	+
Образование сероводорода	+	+	+
Индолообразование	-	-	-
Желатин	не разжижает	не разжижает	не разжижает
Цитрат натрия	разлагает	разлагает	разлагает
Реакция с метилрот	+	+	+
Реакция Фогеса-Проскауера	-	-	-
Маркерные признаки штамма			
Генетические (особые) мутации	При длительном хранении культуры в S форме возможна диссоциация в R-форму вследствие генетической изменчивости	При длительном хранении культуры в S форме возможна диссоциация в R-форму вследствие генетической изменчивости	При длительном хранении культуры в S форме возможна диссоциация в R-форму вследствие генетической изменчивости
Биохимические свойства (особенности)	Не ферментирует лактозу, сахарозу, образует сероводород, не образует индола	Не ферментирует лактозу, сахарозу, образует сероводород, не образует индола	Не ферментирует лактозу, сахарозу, образует сероводород, не образует индола

Физиологические свойства	прототроф		прототроф
Антигенные свойства	Титр антител в сыворотке в РА 1:800. Агглютинируется поливалентной и монорецепторными сальмонеллезными сыворотками О- 12,4; Н-с (1-я фаза), 1,6 (2-я фаза)	Титр антител в сыворотке в РА 1:800. Агглютинируется поливалентной и монорецепторными сальмонеллезными сыворотками О- 12,4; Н-с (1-я фаза), 1,6 (2-я фаза)	Титр антител в сыворотке в РА 1:800 - 1:1600. Агглютинируется поливалентной и монорецепторными сальмонеллезными сыворотками О -12,4; Н-с (1-я фаза), 1,6 (2-я фаза)
Патогенные свойства	Патогенен для белых мышей, для суягных овцематок и новорожденных ягнят. Вызывает гибель белых мышей в дозе 150 м.к. при внутрибрюшинном введении. Обладает abortогенными свойствами.	Патогенен для белых мышей, для суягных овцематок и новорожденных ягнят. Вызывает гибель белых мышей в дозе 150 м.к. при внутрибрюшинном введении. Обладает abortогенными свойствами.	Патогенен для белых мышей, для суягных овцематок и новорожденных ягнят. Вызывает гибель белых мышей в дозе 150 м.к. при внутрибрюшинном введении. Обладает abortогенными свойствами.

Согласно данным таблицы 1, по физиологическим особенностям обмена веществ, биохимическим, антигенным и патогенным свойствам выделенная эпизоотическая вирулентная культура *Salmonella abortus-ovis* (А) идентична контрольному вирулентному штамму *Salmonella abortus-ovis* 372 и изученному паспортизированному штамму *Salmonella abortus-ovis* №1.

Изучена антигенная структура сальмонелл. Определение антигенной структуры сальмонелл с поливалентной и монорецепторными О – и Н – агглютинирующими сальмонеллезными сыворотками. Антигенные свойства эпизоотических штаммов сальмонелл, изолированных от овцематок, изучена с помощью поливалентной и монорецепторных О- и Н- сальмонеллезных сывороток производства Санкт-Петербургского научно-исследовательского института вакцин и сывороток и предприятия по производству бактериальных препаратов (ПЕТСАЛ). Суточные агаровые культуры сальмонелл трех культур агглютинировались с поливалентной сывороткой сальмонеллезной сывороткой А,В,С,Д,Е О – XII на (+++), с монорецепторными сыворотками О –IV (+++), Н-с (1 фаза) – (+++), 1,6 (2 фаза) –(+++). По результатам реакции агглютинации (РА), культура, выделенная от овцематки (А), была идентична с контрольным вирулентным штаммом *Salmonella abortus-ovis* 372. При изучении агглютинабельных свойств штамма О - агглютинация сальмонелл характеризовалась как мелкозернистая, Н – агглютинация характеризовалась образованием хлопьевидного крупного рыхлого агглютината.

По результатам изучения культурально-морфологических, биохимических свойств, антигенной структуры эпизоотическая культура сальмонелл *Salmonella abortus-ovis* (А)58, выделенная от abortированного плода овцематки, отнесена роду к *Salmonella*, виду *S.abortus-ovis*, серологической группе В.

Известно, что фенотипические признаки бактерий могут варьировать в зависимости от условий хранения, куль-

тивирования и от аллельного состояния ответственных за экспрессию генов [1]. Жизненные процессы микроорганизмов, зависимость их от условий внешней среды, характера питания вызывают необходимость совершенствования условий и методов хранения культур. При выращивании на питательных средах, общепринятых для определенного вида микроорганизмов, М – форма с возрастом культуры переходит в S – форму, а колонии S – формы - в форму R. Бактерии из R – колоний с большим трудом и не во всех случаях удается превратить в колонии формы S (т. е. произвести реверсию), но бактерии из вторичных S – колоний во многом отличаются от бактерий первичной формы S.

Проводили электронную микроскопию сальмонеллезной культуры. Готовили специальные препараты для электронной микроскопии. Стерильную чашку Петри заливали парафином. Затем приготовленную из суточной агаровой культуры *Salmonella abortus-ovis* бактериальную взвесь (концентрация 500 млн. микробных клеток/см³ по оптическому стандарту ГИСК им. Тарасевича) наносили пастеровской пипеткой на парафин в чашке Петри. При нанесении на парафин капля взвеси принимала округлую форму и не растекалась (всего 2 -3 капли). Затем специальную золотистую сеточку подложкой вниз (расчерченные квадратики) помещали в каплю суспензии сальмонелл на 1 минуту. Метод называется метод флотации. При этом сеточка плавала на поверхности капли микробной суспензии. Подложка находилась сверху на золотистой круглой сеточке. Бактерии, таким образом, фиксировались на сеточке. Через 1 минуту сеточку снимали и переворачивали подложкой вверх и бактериальную взвесь оставляли на 24 часа для высушивания. Через сутки каплю микробной суспензии высыхала. Высохшую каплю контрастировали следующим образом. Через сутки сеточку вынимали, на парафин в чашке капали каплю контрастера – 2% раствор фосфорно - вольфрамовой кислоты (ФВК). 2% раствор фосфорно - вольфрамовой кислоты капали пастеровской пипеткой на парафин, сеточку топили в капле

подложкой вверх. Контрастировали 1,5 -2 минуты. Затем сеточку пинцетом аккуратно вынимали, удаляли лишнюю жидкость прикосновением фильтровальной бумаги. Сеточку промывали от контрастера (ФНК) дистиллированной водой из шприца (очень осторожно). Затем сеточку вновь ставили на спичку в контейнер подложкой вверх. Сеточку с бактериальной взвесью сушили в контейнере 7 суток. После высушивания препарат был готов для просмотра под электронным микроскопом.

Приготовление контейнера. Контейнер для фиксации сеточки готовили из стерильной чашки Петри. К дну чашки приклеивали лейкопластырь или широкий скотч, затем на лейкопластырь помещали предметное стекло, на которое наклеивали лейкопластырь липкой поверхностью вверх. Между липкими лентами помещали либо спички, либо капилляры пастеровских пипеток. Сеточку боком (золотистый кружок) прислоняли к спичке боком каплей снаружи (вверх).

Электронный снимок *Salmonella abortus-ovis* представлен на рисунке 2.

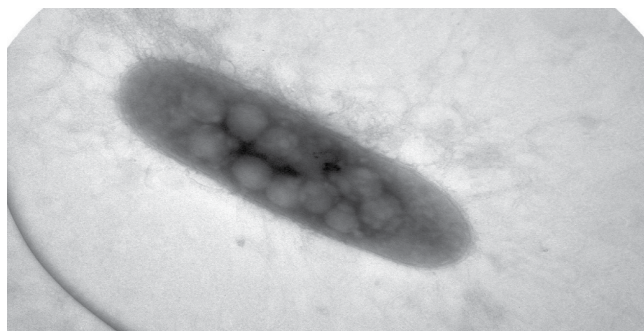


Рисунок 2 – Электронограмма *Salmonella abortus—ovis*

На рисунке 2 представлена бактериальная клетка из одного клона (популяция из одной клетки без предварительной конъюгации). Стационарная фаза. На цель-

ной клетке сальмонелл видны обрывки перитрихально расположенных жгутиков. По всей поверхности клетки располагаются ворсинки. Также видна трехслойная клеточная мембрана (наружный слой клеточной стенки). В центральной части клетки расположен нуклеоид. Зона нуклеоида заполнена фибриллярным компонентом. Вблизи нуклеоида локализованы клеточные включения округлой формы. Включения имеют мелкозернистое строение и ограничены от цитоплазмы мембраной. По всей цитоплазме расположены мелкие внутриклеточные включения. Увеличение x 60 000.

Определена патогенность эпизоотических изолятов в опыте на белых мышах. Патогенность сальмонелл определяли в опыте на белых мышах массой 18 – 20 граммов. Использовали по 3 белой мыши на каждую культуру, которым вводили 0,2 см³ подкожно в область спины суточную бульонную культуру. Гибель мышей от заражения *Salmonella abortus-ovis* наблюдалось, начиная с 3 суток после заражения от сальмонелл от абортплода – на 3-4 сутки, от овцематки №1 – на 5-6 сутки отмечалась гибель заражённых мышей. Результаты опыта на белых мышах представлены в таблице 2.

Из таблицы 2 видно, что тестируемые культуры *Salmonella abortus-ovis* обладали патогенностью для белых мышей массой 18-20 граммов, вызывая гибель мышей при подкожном введении 0,2 см³ суточной бульонной культуры. От *Salmonella abortus-ovis* (A) 3 опытных мышей пали на 3-4 сут, от *Salmonella abortus-ovis* №1 - 3 опытных мышей пали на 5-6 сутки после заражения. По результатам изучения патогенности 2 эпизоотических культур для разработки технологии изготовления вакцины – для накопления бакмассы отобрана культура *Salmonella abortus-ovis* (A).

Штамм *Salmonella abortus-ovis* (A) 58, выделенный из абортплода, выбран как перспективный штамм для изготовления инактивированной вакцины. После изучения фи-

Таблица 1-Сравнительная эффективность инактивации сальмонелл разными инактивантами

Инактивант	Концентрация (%)	Экспозиция (ч)	Инактиванты в рабочем разведении по объему(%)							
			1,0	2,0	3,0	3,5	4,0	4,5	5,0	
Формалин	5	16-18								
		22-24					+	+	+	
		28-30					+	+	+	
		32-36				+	+	+	+	
Формалин	10	16-18					+	+	+	
		22-24				+	+	+	+	
		28-30			+	+	+	+	+	
		32-36			+	+	+	+	+	
Бетапропиолактон	5	16-18								
		22-24					+	+	+	
		28-30					+	+	+	
		32-36				+	+	+	+	
Бетапропиолактон	10	16-18					+	+	+	
		22-24					+	+	+	
		28-30				+	+	+	+	
		32-36			+	+	+	+	+	

ДЭИ	5	16-18							
		22-24					+	+	+
		28-30					+	+	+
		32-36				+			
ДЭИ	10	16-18					+	+	+
		22-24			+	+	+	+	+
		28-30			+	+	+	+	+
		32-36			+	+	+	+	+
Примечание:	+ Происходит инактивации сальмонелл при данной экспозиции								

Таблица 2 – Результаты постановки биопробы на белых мышах

№	Наименование штамма	Количество животных	Заражающая доза	Результат. Время гибели б.мышей
1	S. abortus-ovis Овцематка №1 (биоматериал)	3 гол. 18-20 г	0,2 см ³ подкожно в область спины	Пали – 3 гол. За 5-6 сут
2	S. abortus-ovis Овцематка (абортплод)	3 гол. 18-20 г	0,2 см ³ подкожно в область спины	Пали – 3 гол. За 3-4 сут

зико-химических и биологических свойств выделенной вирулентной культуры *Salmonella abortus-ovis* (A) 58, ее идентификации в соответствии с Определителем бактерий (Берджи, 2005), приступили к разработке режима инактивации антигена с последующим высевом инактивированного антигена сальмонелл на питательные среды для изучения полноты инактивации. Особое значение имеет правильный подбор инактиванта. В опытах для инактивации эпизоотической вирулентной культуры *Salmonella abortus-ovis* (A)58 применяли 5, 10%-ный раствор формальдегида; 5, 10%-ным раствор бетапропиолактона; 5, 10%-ным раствор димерэтиленимина (ДЭИ).

Режим инактивации и время экспозиции инактивантов с бакмассой приведены в таблице 1.

Из таблицы 1 видно, что 5% раствор формалина в объеме 3,5% (к объему бакмассы) инактивирует бакмассу сальмонелл за 32-36ч; 10% раствор формалина инактивирует бакмассу сальмонелл в 3%-ном объеме (к объему бакмассы) за 28-30ч; в 3,5%-ном объеме – за 22-24 ч; 5% раствор бетапропиолактона в объеме 3,5% (к объему бакмассы) инактивирует бакмассу сальмонелл за 32-36ч; 10%-ный раствор бетапропиолактона инактивирует бакмассу сальмонелл в 3%-ном объеме к объему бакмассы за 32-36ч; в 3,5%-ном объеме – за 28-30; 5% раствор димерэтиленимина (ДЭИ) в объеме 3,5% (к объему бакмассы) инактивирует бакмассу сальмонелл за 32-36; 10%-ный раствор димерэтиленимина (ДЭИ) инактивирует бакмассу сальмонелл в 3%-ном объеме к объему бакмассы за 22-24ч; в 3,5%-ном объеме – за 22-24ч;

Таким образом, по времени экспозиции при инактивации бакмассы сальмонелл самым эффективным инактивантом является димерэтиленимин (ДЭИ): 10%-ный раствор бакмассу сальмонелл в 3%-ном объеме к объему бакмассы инактивирует за 22-24ч; в 3,5%-ном объеме – за 22-24ч, а также эффективным инактивантом является формальдегид, 10% раствор формалина бакмассу сальмонелл в 3,5%-ном объеме инактивирует за 22-24ч.

Инактивированную бакмассу проверяли на полноту инактивации путем посева на жидкие и плотные питательные среды: МПБ, МПА, МППБ, Сабуро. Полноту инактивации проверяли путем посева инактивированной бакмассы с каждой концентрацией инактивантов на МПБ и МППБ в пробирках и МПА, Сабуро в ч.Петри. Высевы на МПБ и МПА культивировали в термостате при 37°C 18-20 ч, на МППБ - в термостате при 37°C 40-48 ч, на Сабуро – 12-21 день. Роста микроорганизмов на питательных средах не наблюдалось. В результате исследований полноты инактивации лучшие результаты показали инактивация 10% раствором формальдегида в разведении 3,5% к объему бакмассы, и инактивация 10% ДЭИ в разведении 3% к объему бакмассы сальмонелл. Инактивация ДЭИ отличается тем, что 10% ДЭИ при добавлении 3% по объему при сравнении сроков инактивации 100 мл бакмассы сальмонелл время инактивации укорочено до 22-24ч. Это положение примечательно тем, что в инактивированной бакмассе нет необходимости нейтрализовать содержание ДЭИ. При добавлении для инактивации 10 %-ного формалина к бакмассе 3,5% по объему, после инактивации проводится нейтрализация формалина 25%-ным раствором тиосульфата натрия.

Инактивирование бактериальной массы проведена для изготовления вакцины против сальмонеллезного аборта овец. Вакцинация овцематок позволит защитить их от массовых абортов сальмонеллезной этиологии, предотвратить гибель овцематок от сальмонеллезного сепсиса и сохранить поголовье нарождающихся ягнят. Вакцинация овец против сальмонеллезного аборта позволит улучшить эпизоотическую, эпидемиологическую ситуацию и экологические показатели по сальмонеллезам.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена в рамках НТП ИРН BR218004/0223 «Совершенствование мер обеспечения биологической безопасности в Казахстане: противодействие опасным

и особо опасным инфекциям» на 2023-2025 годы, ИРН BR218004/0223.

ЛИТЕРАТУРА

1. Шиманов В.Г. Гинекологические заболевания как одна из причин яловости овец. Ж. Каракулеводство и звероводство.—1954.-№2.- С.50-52.
2. Шахов А.Г. Экологические проблемы патологии сельскохозяйственных животных. – Воронеж.-1997.-. С.17-20.
3. Терентьев Ф.А., Марков А.А. и др. Инфекционные и инвазионные болезни овец и коз. – М.-1951.- С.218-219.
4. Конопаткин А.А., Бакулов И.А., Нуйкин Я.В и др. Эпизоотология и инфекционные болезни сельскохозяйственных животных. – М.: Колос, 1984. –С. 436-437.
5. Джамбулатов З.М. Сальмонеллез овец в южных регионах России: Автореферат дисс. докт. Вет. наук. Махачкала, 2004.- С.93-105.
6. Микайлов М.М., Мусиев Д.Г., Джамбулатов З.М. Методические рекомендации по диагностике, лечению и профилактике сальмонеллеза мелкого рогатого скота. – Махачкала.-2011 С.-19.
7. Аликаев В.А., Дульнев В.И. и др. Профилактика и лечение болезней молодняка сельскохозяйственных животных. М.-1968.- С. 325-330.
8. Латышев С.Н. Особенности эпизоотического процесса при сальмонеллезе и колибактериозе ягнят: диагностика, профилактика и терапия: Автореферат дисс. канд. Вет. наук. Ставрополь.-2009.- С. - 22.
9. Кадымов Р.А. и др. Инфекционные болезни овец. М.: Агропромиздат, 1987. - С.151-153.
10. Гнездилова Л.А. Эпизоотологическая характеристика, диагностика и профилактика смешанных инфекций овец с синдромом поражения репродуктивных органов. Автореферат дисс. докт. Вет. наук.- Москва.-2005. – С. 21-30.
11. Бессарабов, Е.С., Сидорчук А.А. и др. Инфекционные болезни животных. -- М.: Колос.- 2007. -671 С.
12. Кантери В.М. Теоретические основы технологий микробиологических производств. - М.: Агропромиздат.-1991.- С. 272.
13. Матвиенко Б.А., Кенжибаев М.А. Вопросы иммунологии при ассоциированной вакцинации против паратифа овец, бруцеллеза и листериоза.—Вестник с/х науки Казахстана.- 1967.- №7.- С. 41-43.
14. Самуйленко А.Я., Рубан Е.А. Основы биотехнологии производства биологических препаратов (Теоретические основы, оборудование, технологические линии). М.- 2000.- 782 с.
15. Ярцев М.Я. Разработка технологии вакцин против пастереллеза животных и птиц. Ж.Ветеринария-1996- N.2.- с. 17-19.
16. Ярцев М.Я., Раевский А.А., Анисимова И.В. Патент РФ № 2129016 (1999)
17. Рождественская Т.Н., Каримова Л., Панкратов С.В., Рузина А.В., Томина Е.В. Современные подходы к

изготовлению инактивированных вакцин.- Ж. Аграрная наука.-2022;1(7-8): 68-73.

18. Рубан Е.А. и др. под ред. А.Я. Самуйленко. Промышленная технология производства противобактериальных препаратов. – М.: ИКЦ «Академкнига», 2006.-267 с.
19. Сусский Е.В. и др. Система посевных материалов-фактор стабильности серийного производства биопрепаратов/Ж. Ветеринарная патология, 2013. - №3.-С.43-49.
20. Школьников Е.Э., Анисимова Л.В., Павленко И.В. и др. Вакцина поливалентная против сальмонеллеза продуктивных животных. Патент РФ RU2764118C1, 2021 г- 3 с.
21. Определитель Bergey's Manual of Systematic Bacteriology /Department of Microbiology and Molecular Genetics: Michigan State University: USA, 2005, Volum 2. Part B. p. 764 – 799.
22. Антонов Б.И. Методические указания по бактериологической диагностике сальмонеллезов животных. В кн. Лабораторные исследования в ветеринарии.- М.: Агропромиздат.-1986.-С.177-192.
23. Приказ Министра сельского хозяйства Республики Казахстан от 30 апреля 2015 года № 7-1/393 об утверждении Правил отбора проб, перемещаемых (перевозимых) объектов и биологического материала, утвержденные.

REFERENCES

1. SHimanov V.G. Ginekologicheskie zabolovaniya kak odna iz prichin yalovosti ovec. ZH. Karakulevodstvo i zverovodstvo.—1954.-№2.- S.50-52.
2. SHahov A.G. Ekologicheskije problemy patologii sel'skohozyajstvennyh zhivotnyh. – Voronezh.-1997.-. S.17-20.
3. Terent'ev F.A., Markov A.A. i dr. Infekcionnye i invazionnye bolezni ovec i koz. – M.-1951.- S.218-219.
4. Konopatkin A.A., Bakulov I.A., Nujkin YA.V i dr. Epizootologiya i infekcionnye bolezni sel'skohozyajstvennyh zhivotnyh. – M.: Kolos, 1984. –S. 436-437.
5. Dzhambulov Z.M. Sal'monellez ovec v yuzhnyh regionah Rossii: Avtoreferat diss. dokt. Vet. nauk. Mahachkala, 2004.- S.93-105.
6. Mikailov M.M., Musiev D.G., Dzhambulov Z.M. Metodicheskie rekomendacii po diagnostike, lecheniyu i profilaktike sal'monelleza melkogo rogatogo skota. – Mahachkala.-2011 S.-19.
7. Alikaev V.A., Dul'nev V.I. i dr. Profilaktika i lechenie boleznej molodnyaka sel'skohozyajstvennyh zhivotnyh. M.-1968.- S. 325-330.
8. Latsyshev S.N. Osobennosti epizooticheskogo processa pri sal'monelleze i kolibakterioze yagnyat: diagnostika, profilaktika i terapiya: Avtoreferat diss. kand. Vet. nauk. Stavropol'.-2009.- S. - 22.
9. Kadymov R.A. i dr. Infekcionnye bolezni ovec. M.: Agropromizdat, 1987. - S.151-153.
10. Gnezdilova L.A. Epizootologicheskaya harakteristika, diagnostika i profilaktika smeshannyh infekcij ovec s

sindromom porazheniya reproduktivnyh organov. Avtoreferat diss. dokt. Vet. nauk.- Moskva.-2005. – S. 21-30.

11. Bessarabov, E.S., Sidorchuk A.A. i dr. Infekcionnye bolezni zhivotnyh. -- M.: Kolos.- 2007. -671 S.

12. Kanteri V.M. Teoreticheskie osnovy tekhnologii mikrobiologicheskikh proizvodstv. - M.: Agropromizdat.-1991.- S. 272.

13. Matvienko B.A., Kenzhibayev M.A. Voprosy immunologii pri associirovannoj vakcinacii protiv paratifa ovec, brucelleza i listerioza.—Vestnik s/h nauki Kazahstana.- 1967.- №7.- S. 41-43.

14. Samujlenko A.YA., Ruban E.A. Osnovy biotekhnologii proizvodstva biologicheskikh preparatov (Teoreticheskie osnovy, oborudovanie, tekhnologicheskije linii). M.-2000.- 782 s.

15. YArcev M.YA. Razrabotka tekhnologii vakcin protiv pasterelleza zhivotnyh i ptic. ZH.Veterinariya-1996- N.2.- s. 17-19.

16. Yarcev M.YA., Raevskij A.A., Anisimova I.V. Patent RF № 2129016 (1999)

17. Rozhdestvenskaya T.N., Karimova L., Pankratov S.V., Ruzina A.V., Tomina E.V. Sovremennye podhody k izgotovleniyu inaktivirovannyh vakcin.- ZH. Agrarnaya nauka.-2022;1(7-8): 68-73.

18. Ruban E.A. i dr. pod red. A.YA. Samujlenko. Promyshlennaya tekhnologiya proizvodstva protivobakterijnyh preparatov. – M.: IKC «Akademkniga», 2006.-267 s.

19. Susskij E.V. i dr. Sistema posevnyh materialov-faktor stabil'nosti serijnogo proizvodstva biopreparatov/ZH. Veterinarnaya patologiya, 2013. - №3.-S.43-49.

20. SHkol'nikov E.E., Anisimova L.V., Pavlenko I.V. i dr. Vakcina polivalentnaya protiv sal'monelleza produktivnyh zhivotnyh. Patent RF RU2764118S1, 2021 g- 3 s.

21. Opredelitel' Bergey's Manual of Systematic Bacteriology /Department of Microbiology and Molecular Genetics: Michigan State University: USA, 2005, Volum 2. Part V. p. 764 – 799.

22. Antonov B.I. Metodicheskie ukazaniya po bakteriologicheskoi diagnostike sal'monellezov zhivotnyh. V kn. Laboratornye issledovaniya v veterinarii.- M.: Agropromizdat.-1986.-S.177-192.

23. Prikaz Ministra sel'skogo hozyajstva Respubliki Kazahstan ot 30 aprelya 2015 goda № 7-1/393 ob utverzhdenii Pravil otbora prob, peremeshchaemyh (perevozimyh) ob»ektov i biologicheskogo materiala, utverzhdennye.

INDICATION, IDENTIFICATION AND INACTIVATION SALMONELLA ABORTUS-OVIS

Mussayeva A.K., Egorova N.N., Erishov M.O., Tlepov A.A., Kasenov .M.M.

Kazakh Scientific-Research Veterinary Institute, Rayymbek Ave. 223, Almaty, 050016, Kazakhstan

* Correspondence: assiyakyblashevna@mail.ru

ABSTRACT

The article presents the results of identification of epizootic culture of *Salmonella abortus-ovis* (A) 58 isolated from parenchymatous organs of aborted sheep fetus, inv.№ KZH 210397333, delivered from Senokosnoye village of Osakarovsky district of Karaganda region. For isolation of pure culture of *Salmonella* from pathological material from aborted sheep fetus, we used the method of staged selection of colonies according to Drigalsky Identification of the isolated culture was based on the study of culture-morphological, biochemical, antigenic properties of *Salmonella abortus-ovis* (A) 58 in accordance with the Bacterial Identifier Bergey. The culture was agglutinated with polyvalent salmonellosis serum A,B,C,D,E (+++), with monoreceptor sera O-IV (+++), H- c (phase 1) - (+++), H- 1,6 (phase 2) (+++). According to the results of typing in RA, the culture isolated from the aborted fetus of a sheep sow was assigned to the genus *Salmonella*, species *abortus-ovis*, serologic group B. The article presents the results of experiments to optimize the process of *Salmonella* cultivation. Seed matrix cultures of second-generation *Salmonellae* in the exponential growth phase were used to cultivate the epizootic strain *S. abortus-ovis* (A) 58. Significant physicochemical parameters - dissolved oxygen (O_2) pressure and glucose ($C_6H_{12}O_6$) concentration - were pre-selected, followed by the realization of a periodic cultivation process controlled by these parameters. The dynamics of *Salmonella* growth in the process of cultivation was studied, optimal parameters of *Salmonella* cultivation from 7 to 12 hours characterized by a short lag phase were determined. The maximum accumulation of bacterial mass occurred during this period of cultivation. Periodic cultivation of *Salmonellae* provided physiologically active state of culture, increase of maximum growth rate, short lag phase and minimum generation time. The study of *Salmonella* growth character in the process of cultivation on MPB has shown that the experimental mode of periodic refreshing of *Salmonella* strain intensifies the process, especially in the exponential phase, due to an increase in the rate of bacterial growth. The mode of *Salmonella* inactivation with subsequent seeding on liquid and dense nutrient media to determine the completeness of inactivation was worked out. Dimerethylenimine (DEI) was found to be an effective inactivant: 10% solution of *Salmonella* bacmass in 3% volume to volume of bacmass inactivates in 22-24h; in 3.5% volume - in 22-24h. Formaldehyde is an effective inactivant: 10% formalin solution inactivates *Salmonella* bacmass in 3.5% volume in 22-24h. The article presents the conditions of reactivation, cultivation, method and storage temperature of *S. abortus-ovis* strain (A) 58. The electronogram of *S. abortus-ovis* (A) 58 strain is presented in the article.

Inactivation of the bacterial mass was carried out for the manufacture of a vaccine against salmonella abortion of sheep.

Keywords: infection, salmonella, abortions, indication, identification, inactivation

SALMONELLA ABORTUS-OVIS-ТЫҢ ИНДИКАЦИЯ, ИДЕНТИФИКАЦИЯ ЖӘНЕ ИНАКТИВАЦИЯСЫ

Мусаева А.К., Егорова Н.Н., Еришов М.Ө., Тлепов А.А., Касенов М.М.

Қазақ ғылыми-зерттеу ветеринария институты, Райымбек даңғылы 223, Алматы, 050016, Қазақстан

* Correspondence: assiyakyblashevna@mail.ru

ТҮЙІН

Мақалада Қарағанды облысы Осакаров ауданы Сенокосное селосынан әкелінген аналық қойдың сальмонеллезді abortталған түсігінің паренхималық органдарынан бөлініп алынған *Salmonella abortus-ovis* (A) 58 эпизоотиялық өсіндісін идентификациялау нәтижелері берілген. Қой аналығынан abortталған түсіктің патологиялық материалынан таза сальмонелла өсіндісін оқшаулау үшін колонияларды Дригальскийге сәйкес кезең-кезеңмен іріктеу әдісін қолданылды. Бөлініп алынған өсінді *Salmonella abortus-ovis* (A) 58 идентификациялау культуральды-морфологиялық, биохимиялық, антигендік қасиеттерін зерттеу негізінде жүргізілді. Культура А,В,С,Д,Е О-ХІІ (+ + +) поливалентті сальмонелла сарысуымен (+ + +) агглютинация реакциясына түседі, О-ІV (+ + + +), монорецепторлық сарысулармен, Н - с (1 фаза) - (+++), Н - 1,6 (2 фаза) (+++). АР реакциясы нәтижелері бойынша аналық малдың abortталған түсігінен оқшауланған өсінді *Salmonella* тұқымдастығына, *abortus-ovis* түріне, В серологиялық тобына жатқызылды. Мақалада сальмонеллаларды өсіру процесін оңтайландыру бойынша эксперименттердің нәтижелері келтірілген. Эпизоотиялық штаммды өсіру үшін *S. abortus-ovis* (A) 58 экспоненциалды өсу фазасында екінші генерацияда сальмонеллаларының матрицалық өсінділері пайдаланылды. Маңызды физикалық-химиялық параметрлері алдын ала таңдалды - еріген оттегінің қысымы (O_2) және глюкоза концентрациясы ($C_6H_{12}O_6$), содан кейін осы параметрлер бойынша басқарылатын мерзімді өсіру процесі жүзеге асырылады. Өсіру процесінде сальмонеллалардың өсу динамикасы зерттелді, қысқа лагфазамен сипатталатын 7-ден 12 сағатқа дейін сальмонеллаларды өсірудің оңтайлы параметрлері анықталды. Көрсетілген өсіру кезеңінде бактериялық массаның максималды жинақталуы болды. Сальмонеллаларды мезгіл-мезгіл өсіру өсін-

дінің физиологиялық белсенді күйін, өсу қарқынының жоғарылауын, лагфазаның қысқаруын және генерацияның минималды уақытын қамтамасыз етті. МПБ-да өсіру процесінде сальмонеллалардың өсу үлгісін зерттеу сальмонелла штаммының мезгіл-мезгіл сергітетін эксперименттік режимі бактериялардың өсу қарқынын арттыру арқылы процесі, әсіресе экспоненциалды фазада күшейтетінін көрсетті. Сальмонеллаларды инактивациялау режимі пысықталды, содан кейін инактивацияның толықтығы сұйық және тығыз қоректік ортаға себу арқылы анықталды. Тиімді инактивант димерэтиленмин (ДЭИ) болып табылатыны анықталды: бакмасса көлеміне 3% көлемде сальмонелла бакмассасының 10% ерітіндісі 22-24 сағат ішінде инактивациялайды; 3,5% көлемде-22-24 сағат ішінде тиімді инактивант формальдегид болып табылады: формалин бакмасса сальмонеллаларының 10% ерітіндісі 3,5% -мақалада *S. abortus—ovis* (A) 58 штаммының қайта белсендендіру, өсіру шарттары, сақтау әдісі мен температурасы келтірілген. Мақалада *Salmonella abortus-ovis* штаммының электрондық суреті берілген.

Бактериялық массаны инактивтендіру қойлардың сальмонеллезді аборттына қарсы вакцина жасау үшін жүргізілді.

Кілтті сөздер: инфекция, сальмонелла, аборттар, индикация, идентификация, инактивация