

experience / A. A. Chanan-Khan, K. Lee // *Clin. Lymphoma Myeloma*. – 2007. – Suppl. 4. – P. 163–169. – doi: 10.3816/clm.2007.s.018.

Поступила в редакцию 27.04.2023.

DOI 10.52368/2078-0109-2023-59-2-14-18
УДК 619:616.98:579.842.14

РАЗРАБОТКА ОПТИМАЛЬНЫХ ПАРАМЕТРОВ ПОЛУЧЕНИЯ И КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА ИНАКТИВИРОВАННОЙ ЭМУЛЬГИРОВАННОЙ ВАКЦИНЫ ДЛЯ ПРОФИЛАКТИКИ САЛЬМОНЕЛЛЕЗА ПТИЦ

Даровских И.А.

Витебская областная ветеринарная лаборатория, г. Витебск, Республика Беларусь

*В статье приведены данные о разработке оптимальных параметров получения и контроля качества инактивированной эмульгированной вакцины для профилактики сальмонеллеза птиц, выделении и подборе эффективных в иммуногенном отношении вакцинных штаммов сальмонелл. Приведены данные о выделении в условиях птицеводческих хозяйств Республики Беларусь возбудителей для формирования вакцинных штаммов. Важность и актуальность данной работы состоит в том, что проведение подбора вакцинных штаммов с учетом циркулирующих штаммов сальмонелл в каждой отдельно взятой эндемичной зоне необходимо для создания максимально эффективных в иммуногенном отношении вакцин. **Ключевые слова:** сальмонеллез, куры, профилактика, вакцина, штаммы, параметры, эффективность.*

DEVELOPMENT OF OPTIMUM PARAMETERS FOR OBTAINING AND QUALITY CONTROL INACTIVATED EMULSIFIED VACCINE FOR THE PREVENTION OF AVIAN SALMONELLOSIS

Darouskikh I.A.

Vitebsk Regional Veterinary Laboratory, Vitebsk, Republic of Belarus

*The article presents data on the development of optimal parameters for the production and quality control of an inactivated emulsified vaccine for the prevention of salmonellosis in birds, the isolation and selection of immunogenically effective vaccine strains of Salmonella. The data on the isolation of pathogens for the formation of vaccine strains in the conditions of poultry farms of the Republic of Belarus are given. The importance and relevance of this work lies in the fact that the selection of vaccine strains, taking into account the circulating Salmonella strains in each individual endemic zone, is necessary to create the most immunogenically effective vaccines. **Keywords:** salmonellosis, chickens, prevention, vaccine, strains, parameters, efficiency.*

Введение. Для промышленного птицеводства решение проблемы сальмонеллезов имеет особое значение, так как именно эта отрасль производит диетическую, легко усвояемую продукцию. На основании сообщений об обнаружении сальмонеллы в продуктах питания можно сделать вывод, что чаще ее выделяют из продуктов переработки домашней птицы, чем от любых других видов животных. Этот факт свидетельствует о широкой распространенности сальмонеллезной инфекции среди сельскохозяйственной птицы, в частности среди цыплят и индюшат, выращиваемых на мясо. Вспышки сальмонеллеза среди людей в большинстве своем вызваны обсемененным сальмонеллами мясом домашней птицы и яйцами, поэтому контроль сальмонеллезов птиц является важной задачей птицеводства с точки зрения здравоохранения и экономических перспектив. Бактерии рода *Salmonella* являются одной из причин острых и хронических инфекционных болезней домашней птицы [1, 2] .

Отслеживание эпизоотической ситуации, определение этиологической структуры сальмонеллеза является необходимым условием и основанием для конструирования новых специфических препаратов для профилактики болезни. Не менее важной является необходимость углубленного исследования культурально-морфологических, биохимических, патогенных и антигенных свойств серовариантов сальмонелл, выделяемых от птиц [3, 5] .

Так, известен аттенуированный штамм сальмонелл *Salmonella enteritidis* ВГНКИ 204-R. Указанный штамм обладает культуральными и ферментативными свойствами, присущими роду *Salmonella*. Аттенуированный штамм *Salmonella enteritidis* ВГНКИ 204-R используют для приготовления препарата против сальмонеллеза кур. Недостатком является его способность к реверсии патогенности, что может быть причиной вспышки сальмонеллеза в хозяйстве. Известен и патогенный штамм сальмонелл *Salmonella enteritidis* ВГНКИ № 22, но его недостатком является то, что он выделен не в Республике Беларусь, и поэтому менее специфичен, что является причиной более низкой профилактической эффективности вакцины на его основе. Известен аттенуированный штамм сальмонелл *Salmonella typhimurium* ВГНКИ № 14. Указанный штамм обладает культуральными и фер-

ментативными свойствами, присущими роду *Salmonella*. Недостатком аттенуированного штамма является его способность к реверсии патогенности, что может вызвать заболевание сальмонеллезом. За прототип для отечественных вакцин берут и патогенный штамм бактерий *Salmonella typhimurium* № 159. Недостатком указанного штамма является то, что он выделен не в Республике Беларусь и поэтому менее специфичен, что может отразиться на эффективности вакцины на его основе [3, 4, 5, 6].

Таким образом, актуальным остается вопрос о подборе штаммов для изготовления вакцин для профилактики сальмонеллеза птиц.

Цель работы: селекционирование штамма бактерий *Salmonella enteritidis*, специфичного для хозяйств Беларуси.

Материалы и методы исследований. Штаммы сальмонелл выделяли в отделе бактериологии ЛДУ «Витебская областная ветеринарная лаборатория». Материалом служили паренхиматозные органы павшей от сальмонеллеза птицы (цыплята), принадлежавшие ОАО «Витебская бройлерная птицефабрика».

Выделенные штаммы депонировали в качестве штамма-антигена в коллекции микроорганизмов РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского».

Результаты исследований. Проведенные нами исследования по изучению этиологической структуры сальмонеллеза птиц на территории Республики Беларусь показали, что это заболевание наиболее часто вызывается следующими серовариантами сальмонелл: *Salmonella enteritidis* и *Salmonella typhimurium*.

В результате проведенных исследований и мониторинга эпизоотической ситуации по сальмонеллезу, проведения многократных бактериальных исследований был выделен штамм бактерий *Salmonella enteritidis*. Штамм содержит полноценный набор О- и Н-антигенов, что характеризует его специфичность, в частности, для Республики Беларусь. Заявленный штамм обладает более высокой вирулентностью (LD_{50} для белых мышей - 100 живых микробных клеток при внутрибрюшинном заражении) по сравнению с прототипом (LD_{50} для белых мышей внутрибрюшинно $2,4 \times 10^6$ живых микробных клеток), что позволяет сконструировать более иммуногенную вакцину с небольшой антигенной нагрузкой.

Штамм бактерий *Salmonella enteritidis* депонирован в качестве штамма-антигена в коллекции микроорганизмов РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского» и ему присвоен регистрационный номер КМИЭВ-В133.

Штамм бактерий *Salmonella enteritidis* КМИЭВ-В133 – штамм-антиген обладает следующими свойствами.

Таксономическая принадлежность. Предложенный штамм бактерий *Salmonella enteritidis* КМИЭВ-В133 – штамм-антиген отнесен к семейству *Enterobacteriaceae*, роду *Salmonella*, виду *Salmonella enteritidis*.

Морфологические признаки. Подвижные грамотрицательные палочки, спор и капсул не образуют.

Культуральные признаки. На МПБ образует равномерное помутнение через 6-10 часов роста при 37°C, на МПА формирует округлые выпуклые колонии в S – форме диаметром 1-3 мм, беловатого цвета, голубоватые в проходящем свете, на среде Эндо - округлые голубоватые колонии 1-3 мм в диаметре, гладкие блестящие, на Висмут-Сульфит агаре – округлые колонии, через 24-48 часов – выраженный металлический блеск, на ПЖА – диффузный рост.

Биохимические свойства. Ферментирует с образованием кислоты и газа глюкозу, маннит, ксилозу, сорбит, арабинозу, дульцит, не ферментирует лактозу, сахарозу, мальтозу, инозит, не гидролизует мочевины, образует сероводород, не образует индол и ацетилметилкарбинол в реакции Фогес-Проскауэра.

Физико-химические свойства. Чувствителен к липолитическим агентам, теплу и различным дезинфектантам. Длительно сохраняется в лиофилизированном состоянии или при хранении при минус 20°C – минус 60°C (до 19 месяцев).

Антигенные свойства. Агглютинируется монорецепторными сальмонеллезными сыворотками О - 5; Н- g, m.

Патогенность и вирулентность. Штамм вызывает гибель белых мышей массой 14-16 г при внутрибрюшинном введении 300 млн м.т., LD_{50} составляет 100 клеток при внутрибрюшинном заражении.

Также было проведено селекционирование штамма бактерий *Salmonella typhimurium*, выделенного в одном из хозяйств Беларуси и потому являющегося специфичным для территории Республики Беларусь, а также обладающего стабильными иммунобиологическими свойствами, содержит полноценный набор О- и Н-антигенов, что характеризует его специфичность, в частности, для Республики Беларусь и, кроме того, заявленный штамм обладает более высокой вирулентностью (LD_{50} для белых мышей - 50 живых микробных клеток при внутрибрюшинном заражении) по сравнению с прототипом

(LD₅₀ для белых мышей - 5×10^3 живых микробных клеток при внутрибрюшинном заражении), что позволяет сконструировать более иммуногенную вакцину с небольшой антигенной нагрузкой. Штамм бактерий *Salmonella typhimurium* депонирован в качестве штамма-антигена в коллекции микроорганизмов РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского» и ему присвоен регистрационный номер КМИЭВ-В135.

Штамм бактерий *Salmonella typhimurium* КМИЭВ-В135 – штамм-антиген обладает следующими свойствами.

Таксономическая принадлежность. Предложенный штамм бактерий *Salmonella typhimurium* КМИЭВ-В135 – штамм-антиген отнесен к семейству *Enterobacteriaceae*, к роду *Salmonella*, виду *Salmonella typhimurium*.

Морфологические признаки. Подвижные грамотрицательные палочки, спор и капсул не образуют.

Культуральные признаки. На МПБ образует равномерное помутнение через 6-10 часов роста при 37°C, на МПА формирует округлые выпуклые колонии в S – форме диаметром 1-3 мм, беловатого цвета, голубоватые в проходящем свете, на среде Эндо - округлые голубоватые колонии 1-3 мм в диаметре, гладкие блестящие, на Висмут-Сульфит агаре – округлые колонии, через 24-48 часов – выраженный металлический блеск, на ПЖА – диффузный рост.

Биохимические свойства. Ферментирует с образованием кислоты и газа глюкозу, маннит, ксилозу, сорбит, арабинозу, дульцит, не ферментирует лактозу, сахарозу, мальтозу, инозит, не гидролизует мочевины, образует сероводород, не образует индол и ацетилметилкарбинол в реакции Фогес-Проскауэра.

Физико-химические свойства. Чувствителен к липолитическим агентам, теплу и различным дезинфектантам. Длительно сохраняется в лиофилизированном состоянии или при хранении при минус 20°C – минус 60°C (до 19 месяцев).

Антигенные свойства. Агглютинируется монорецепторными сальмонеллезными сыворотками - O 5; H- i (очень быстро), 1.2.5.6 – реакция замедленная, либо отсутствует.

Патогенность. Штамм вызывает гибель белых мышей массой 14-16 г при внутрибрюшинном введении 300 млн м.т., LD₅₀ составляет 50 клеток при внутрибрюшинном заражении

На штаммы *Sal.tnenteritidis* КМИЭВ-В133 и *Sal.tnenteritidis* КМИЭВ-В133 нами получены патенты Республики Беларусь на изобретение.

Таким образом, при конструировании сорбированной и эмульгированной вакцины в качестве продуцента антигенов использовали штамм-антиген *Sal.tnenteritidis* КМИЭВ-В133 и штамм-антиген *Sal.typhimurium* КМИЭВ-В135.

На первом этапе приготовления вакцины получают антигены сальмонелл из штаммов-антигенов *Sal. enteritidis* КМИЭВ-В133 и *Sal. typhimurium* КМИЭВ-В135. Данную работу проводили в цехе производства бактериальных вакцин УП «Витебская биофабрика» по следующей схеме (рисунок).

1. Отбор производственных штаммов сальмонелл (проверка паспортных данных)
2. Получение бактериальной массы путем посева и культивирование отобранных штаммов сальмонелл в биореакторе
3. Отделение бактериальных клеток от питательной среды методом центрифугирования и ресуспензирование бактериальных клеток забуферным физиологическим раствором до необходимой концентрации
4. Инактивация культур сальмонелл Проверка готового антигена на стерильность и полноту инактивации
5. Составление вакцины (получение предэмульсии и эмульсии вакцины)
6. Проверка стерильности и стабильности полученной вакцины

Рисунок – Схема конструирования эмульгированной вакцины

Для проверки биологических свойств сальмонелл, конструирования и испытания полученного антигена нами были использованы питательные среды (МПБ, МПА, среда Китта-Тароцци, бульон Хоттингера и др.).

Ампулы с производственными штамм-антигенами *Sal. enteritidis* КМИЭВ-В133 и *Sal. typhimurium* КМИЭВ-В135 перед использованием комиссионно вскрыли. Для получения расплодки сухие культуры растворили в пробирке с МПБ и культивировали в термальной комнате в течение 16 часов при температуре $37\pm 1^\circ\text{C}$. Для получения расплодки на полужидком МПА, мы культуры первой расплодки трижды подращивали в МПБ при $37\pm 1^\circ\text{C}$ в течение 6 часов. С целью получения изолированных колоний культуры рассеивали на 2 чашки Петри с МПА по Дригальскому. Посевы инкубировали в термальной комнате при $37\pm 1^\circ\text{C}$ в течение 16 часов. После культивирования посевы просматривали и отбирали колонии в «S» форме (округлой формы, гладкие, блестящие, с ровными краями, прозрачные с голубоватым оттенком). Эти колонии пересевали на 0,3% полужидкий МПА во флаконах, культивировали при $37\pm 1^\circ\text{C}$, в течение 20 часов.

С целью проверки всех используемых штаммов сальмонелл на соответствие паспортным данным и чистоту роста бактериальных культур изучали их биологические свойства. Затем получили бактериальную массу путем посева и культивирования отобранных штаммов сальмонелл в биореакторе. Штаммы-антигены *Sal. enteritidis* КМИЭВ-В133 и *Sal. typhimurium* КМИЭВ-В135 на 0,3% полужидком МПА каждые отдельно пересевали в биореакторы на бульон Хоттингера. Культивирование осуществляли в течение 18-24 часов при температуре $36-38^\circ\text{C}$, парциальном давлении 0,012-0,020 мПа, в течение 2-х часов без аэрации и при частичном перемешивании. Через 2 часа осуществляют подачу стерильного воздуха в объеме $0,01 \text{ м}^3/\text{ч}$ и перемешивание со скоростью 150 об/мин. Через каждый час культивирования отбирают пробы микробной суспензии, определяют уровень накопления бактериальной массы (с помощью Денситометра) и устанавливают pH среды. Понижение pH в растущей культуре до 7 и ниже регулируют подщелачиванием путем добавления 10%-ного раствора NaOH до pH 7,6-7,8. Через 2, 4, 6 часов от начала засева среду трижды обогащают раствором глюкозы из расчета 0,3% сухого вещества глюкозы на 1 л среды.

Полученный посевной материал проверяли на чистоту роста макроскопически, просматривая посевы на свету и микроскопированием мазков, окрашенных по Граму.

Отделение бактериальных клеток от питательной среды проводили путем центрифугирования на проточной центрифуге при 8000-10000g в течение 20-30 минут. Затем надосадочную жидкость сливали, а осадок ресуспензировали забуференным физиологическим раствором при pH 7,4-7,6 до концентрации микробных клеток $6,67 \text{ млрд}/\text{м}^3$. Концентрацию бактериальных клеток определяли, используя *Densitometr*.

Полученную суспензию бактериальных клеток инактивировали формалином в концентрации 0,5% при 37°C в течение 120 часов. Полноту инактивации и стерильность проверяли путем посева по $0,2 \text{ см}^3$ бактериальной суспензии в пробирки с МПА, МПБ и МППБ и по 2 см^2 бактериальной суспензии во флаконы с МПБ и МППБ. Посевы культивировали при 37°C в течение 10 суток.

Проводили смешивание инактивированных штаммов бактерий *Salmonella enteritidis* КМИЭВ-В133 и *Salmonella typhimurium* КМИЭВ-В135 штамм-антиген в соотношении 1:1. Затем готовили предэмульсию путем смешивания бактериальной суспензии штаммов и масляного адьюванта – Montanide ISA-70 VG – в количестве 70 частей адьюванта на 30 частей смеси вышеуказанных штаммов-антигенов. Полученную предэмульсию выдерживали при 37°C в течение 12 часов. Для получения однородной стабильной эмульсии предэмульсию подвергли гомогенизации на диспергаторе при скорости гомогенизации (перемешивания) 3000-4000 об/мин и в течение 10 минут. Полученную эмульсию проверяли на стабильность путем центрифугирования при 2000 об/мин в течение 20 минут, а также проверили посев на МПА, МПБ и МППБ на стерильность.

Технологическая схема изготовления вакцины состоит из следующих этапов: реактивация и контроль штаммов *S. enteritidis* и *S. typhimurium*, получение посевного материала, засев в бутыли или матрасные колбы, инактивация антигенов сальмонелл, расфасовка серии вакцины, упаковка и маркировка серии вакцины, контроль и хранение серии вакцины, реализация потребителям.

Отбор, посев, культивирование производственных штаммов сальмонелл *S. typhimurium* и *S. enteritidis* проводили по общепринятым методикам. Инактивацию полученной микробной взвеси проводили формалином (содержание формальдегида не менее 36,6%) до 0,3 % от общего объема (из расчета $0,5 \text{ см}^3$ на 100 см^3 суспензии) и выдерживать в термостате 25 суток при $37\pm 1^\circ\text{C}$.

Проверка иммунной эффективности полиантигена. С этой целью полученные взвеси соответствующих концентраций вводили подкожно в дозе $0,5 \text{ см}^3$ белым мышам массой 14-16 гр (на каждую концентрацию взвеси брали по 6 голов лабораторных животных в опытной группе и по 3 голов в контрольной). Через 10 суток с момента иммунизации всех животных (иммунизированных и контрольных) заражали LD_{50} производственных штаммов сальмонелл *S. typhimurium* и *S. enteritidis*. За всеми зараженными животными вели наблюдение в течение 10 суток, учитывая павших и выживших животных. Для конструирования вакцины использовали те концентрации взвеси, которые показали результат не менее 70% иммунной эффективности.

Проверка полученной вакцины на стерильность и безвредность: использовали 20 цыплят 30-40-дневного возраста, 10 цыплятам подкожно в области средней трети шеи вводили по 1 см³ вакцины из объединенной пробы, 10 цыплят не вакцинировали и оставляли в качестве контроля. Наблюдение за цыплятами опытной и контрольной группы вели в течение 21 дня, за это время вакцина не вызвала заболевание и гибель цыплят. Наблюдалось незначительное повышение температуры в течение первых 3-х суток с момента введения. Через 21 день после введения вакцины цыплят опытной группы убивали и осматривали место введения вакцины. На месте инъекции не присутствовали уплотнения, имелись незначительные гранулемы. Цыплята контрольной группы оставались здоровыми. Стерильность вакцины проверяли на питательных средах согласно общепринятой методике проверки биологических препаратов.

Таким образом сконструированная вакцина для профилактики сальмонеллеза птиц прошла все необходимые контроли.

Заключение. Проведенная работа по разработке оптимальных параметров получения и контроля качества инактивированной эмульгированной вакцины для профилактики сальмонеллеза птиц позволила получить высокоэффективный в экономическом и профилактическом отношении биологический препарат. Вакцина соответствует всем предъявляемым к ней требованиям. Ее основным достоинством является то, что при разработке и изготовлении были использованы местные (циркулирующие) штаммы сальмонелл, что однозначно повышает ее профилактическую эффективность при использовании в хозяйствах республики и снижает ее себестоимость.

Conclusion. The work carried out on the development of optimal parameters for the production and quality control of an inactivated emulsified vaccine for the prevention of salmonellosis in birds made it possible to obtain a biological preparation that is highly effective in economic and preventive terms. The vaccine meets all the requirements for it. Its main advantage is that local (circulating) strains of Salmonella were used in the development and manufacture, which clearly increases its preventive effectiveness when used in the farms of the republic and reduces its cost.

Список литературы. 1. Пак, С. Г. Сальмонеллез / С.Г. Пак, М.Х. Турьянов, М.А. Пальцев. – М. : Медицина, 2010. 2. Шабанова, В. Пищевые инфекции. Дизентерия, сальмонеллез, лямблиоз, аскаридоз / В. Шабанова. – М. : Слог, 2014. – 160 с. 3. Клинические рекомендации. Сальмонеллез. 2015 год. 3. Слаусгальвис, В. Сальмонеллез: меры борьбы и контроль / В. Слаусгальвис // Животноводство России. – 2010. – № 2. – С. 60–61. 4. Инактивированные вакцины против сальмонеллеза птиц / Д. Смирнов [и др.] // Птицеводство. – 2011. – № 8. – С. 35–38. 5. Staroselsky, A. Проблемы и пути решения сальмонеллезной инфекции в современном птицеводстве / A. Staroselsky // Ветеринария. – 2010. – № 2. – С. 13–15. 6. Пименов, Н. В. Совершенствование средств и методов борьбы с сальмонеллезом птиц / Н. В. Пименов // Ветеринария и кормление. – 2012. – № 4. – С. 32–33.

Referenses. 1. Pak, S. G. Sal'monellez / S.G. Pak, M.H. Tur'yanov, M.A. Pal'cev. – M. : Medicina, 2010. 2. SHabanova, V. Pishchevye infekcii. Dizenteriya, sal'monellez, lyamblioz, askaridoz / V. SHabanova. – M. : Slog, 2014. – 160 s. 3. Klinicheskie rekomendacii. Sal'monellyoz. 2015 god. 3. Slausgal'vis, V. Sal'monellez: mery bor'by i kontrol' / V. Slausgal'vis // ZHivotnovodstvo Rossii. – 2010. – № 2. – S. 60–61. 4. Inaktivirovannye vakciny protiv sal'monelleza ptic / D. Smirnov [i dr.] // Pticevodstvo. – 2011. – № 8. – S. 35–38. 5. Staroselsky, A. Problemy i puti resheniya sal'monelleznoj infekcii v sovremennom pticevodstve / A. Staroselsky // Veterinariya. – 2010. – № 2. – S. 13–15. 6. Pimenov, N. V. Sovershenstvovanie sredstv i metodov bor'by s sal'monellezom ptic / N. V. Pimenov // Veterinariya i kormlenie. – 2012. – № 4. – S. 32–33.

Поступила в редакцию 02.05.2023.

DOI 10.52368/2078-0109-2023-59-2-18-22

УДК 619:616.98:579.842.14

ЭКОНОМИЧЕСКАЯ И ПРОФИЛАКТИЧЕСКАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ ИНАКТИВИРОВАННОЙ ЭМУЛЬГИРОВАННОЙ ВАКЦИНЫ ДЛЯ ПРОФИЛАКТИКИ САЛЬМОНЕЛЛЕЗА ПТИЦЫ

Даровских И.А.

Витебская областная ветеринарная лаборатория, г. Витебск, Республика Беларусь

В статье приведены данные об изучении профилактической и экономической эффективности препарата биологического «Вакцина инактивированная эмульгированная для профилактики сальмонеллеза птиц» производства РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского». По результатам производственных испытаний разработанный и рекомендуемый биопрепарат показал высокий терапевтический и профилактический эффект и может быть рекомендован для применения в широкой ветеринарной практике в условиях птицеводческих хозяйств Республики Беларусь. **Ключевые слова:** сальмонеллез, куры, профилактика, вакцина, эффективность, сохранность.