



ГОСУДАРСТВЕННОЕ ПАТЕНТНОЕ
ВЕДОМСТВО

(12) **Описание изобретения** К МАЛОМУ ПАТЕНТУ

1

(21) 2301814

(22) 03.04.2023

(46) Бюл. №199, 2023

(71) Институт проблем биологический безопасности и биотехнологии таджикской Академии сельскохозяйственных наук (ТД).

(72) Саттори И. (ТД); Махмудов К.Б. (ТД); Рахимов А.А. (ТД).

(73) Институт проблем биологический безопасности и биотехнологии таджикской Академии сельскохозяйственных наук (ТД).

(54) **ШТАММ БАКТЕРИЙ SALMONELLA DUBLIN SD 5 TJ ИСПОЛЬЗУЕМЫЙ ДЛЯ ИЗГОТОВЛЕНИЯ ВАКЦИНЫ ПРОТИВ САЛЬМОНЕЛЛЕЗА ТЕЛЯТ**

(56) 1. Патент РФ 1197186, кл. А 61 К 39/112, С 12 N 1/00, 1994.

2. Патент РФ 2154495, кл. А 61 К 39/112, С 12 N 1/20, 2000.

3. Патент РФ 2218176, кл. А 61 К 39/112, С 12 N 1/..., 2003

2

(57) Изобретение относится к области ветеринарной микробиологии и биотехнологии, представляет собой штамм *Salmonella dublin* для приготовления инактивированной моновакцины против сальмонеллеза, ассоциированной вакцины против сальмонеллеза и пастереллеза телят, а также диагностикумов.

Штамм бактерий *Salmonella dublin* SD 5 TJ, обладающий низкой патогенностью и высокой иммуногенностью. Отобранный штамм по тинкториальным, морфологическим, культуральным, биохимическим, патогенным и серологическим свойствам отнесен к семейству Enterobacteriaceae и к роду *Salmonella*. Бактериальный антиген агглютинируется монорецепторными 0 - сыворотками: 1,9,12 и Н - сывороткой первой фазы - гр. При внутрибрюшинном заражении белых мышей ЛД₅₀ составляет 5 x 10⁶ микробных клеток. Изготовленная из указанного штамма инактивированная вакцина является стерильной, безвредной и обеспечивает у телят, после двукратной подкожной иммунизации, формирование напряженного иммунитета, создающего 97,2% защиту.

Изобретение относится к области ветеринарной микробиологии и биотехнологии, представляет собой штамм *Salmonella dublin* для приготовления инактивированной моновакцины против сальмонеллеза, ассоциированной вакцины против сальмонеллеза и пастереллеза телят, а также диагностикумов.

Известен аттенуированный штамм *Salmonella dublin* ВГНКИ 9-16/2 [1], обладающий стабильной низкой остаточной вирулентностью, высокой иммуногенностью и используемый для приготовления моно- и бивалентной вакцины против сальмонеллеза телят. Особенностью штамма является наличие в его геноме наличие двух мутаций (в гене *Su-Str* и стрептомициновом локусе) независимо одна от другой снижающих вирулентность и обеспечивающих стабильность низкой остаточной вирулентности. Штамм ВГНКИ 9-16/2 обладает морфологическими, культуральными и ферментативными свойствами присущими роду *Salmonella* и агглютинировался с монорецепторными О сыворотками: 1, 9, 12 и Н – сыворотками первой фазы – гр.

Известен штамм *Salmonella dublin* 1449, используемый в качестве антигена серовара *Salmonella dublin* в инактивированной эмульсин – вакцине против сальмонеллеза телят [2]. По морфологическим, культуральным и ферментативным свойствам и относится к роду *Salmonella*. Штамм агглютинируется с О – сыворотками: 1, 9, 12; Н – г, р. Патогенность штамма (ЛД₅₀) для белых мышей составляла 5×10^3 микробных клеток при внутрибрюшинном введении.

Анализ выше указанных изобретений показывает на то, что указанные серогруппы сальмонелл менее распространены в условиях Республики Таджикистан и эффективность изготовленных, из этих штаммов, вакцин при профилактике сальмонеллезной инфекции будет ниже.

Наиболее близким к заявляемому является штамм *Salmonella dublin* 19, который по биологическим свойствам штамм отнесен к семейству *Enterobacteriaceae*, к роду *Salmonella* и выделен научно-исследовательской лабораторией биотехнологии МГАВМИБ из фекалий телят [3]. Указанный штамм агглютинируется с сальмонеллезной монорецепторной сывороткой 09 и Н – сывороткой г, р. При внутрибрюшинном введении штамма *Salmonella dublin* белым мышам ЛД₅₀ составляет $3,2 \times 10^6$ микробных клеток. Штамм *Salmonella dublin* 19 используется для изготовления вакцин и диагностических препаратов.

Анализ данного изобретения показывает, что несмотря на то, что вакцина против сальмонеллеза телят изготовлена из слабовирулентного штамм *Salmonella dublin* 19, но он редко циркулирует в животноводческих хозяйствах республики и профилактическая эффективность вакцины будет значительно ниже.

Цель изобретения является изыскание наиболее распространенного местного штамма *Salmonella dublin*, обладающий низкой патогенностью, высокой иммуногенностью для изготовления моновакцины против сальмонеллеза, ассоциированной вакцины

против сальмонеллеза и пастереллеза телят, а также диагностикумов.

Поставленная цель достигается тем, что при исследовании 185 проб патологического материала больных и павших от пневмоэнтеритов телят из различных регионов республики этиологическая роль сальмонелл установлена в 25 (13,5%) случаев (табл.1). При серотипизации изолятов сальмонелл выявлено, что в животноводческих хозяйствах чаще всего циркулирует штамм *Salmonella dublin*, агглютинирующий монорецепторными О-сыворотками: 1,9,12 и Н – сывороткой первой фазы – гр.

Выделенный, из паренхиматозных органов павшей с синдромом пневмоэнтерита телят принадлежащей ООО «Баракат» г.Гиссар, штамм *Salmonella dublin* SD 5 TJ хранится в Национальном центре коллекции патогенных микроорганизмов Института проблем биологической безопасности и биотехнологии Таджикской академии сельскохозяйственных наук под № 05.

Особенностью штамма является то, что он наиболее распространен в животноводческих хозяйствах Республики Таджикистан, стабильно растет на питательных средах, обладает низкой патогенностью для белых мышей и высокой иммуногенностью.

Культурально – морфологические свойства штамма и генетические особенности штамма. Штамм *Salmonella dublin* SD 5 TJ хорошо окрашивается анилиновыми красками и представляет собой мелкие граммотрицательные палочки без спор и капсул. Длина палочек составляет 1,6 - 1,9 мк, ширина – 0,3 – 0,4 мк. Микробные клетки подвижные с петрихально расположенными жгутиками.

Условия культивирования на питательных сред, РН – среды. На мясопептонном бульоне образуют равномерное помутнение спустя 10 - 12 ч роста при температуре 37°C; на мясопептонном агаре через 24 ч при температуре 37°C образуют прозрачные, круглые, гладкие, выпуклые колонии диаметром 1 – 1,8 мм.

Физико – биохимические свойства штамма *Salmonella dublin* SD 5 TJ. Бактерия сбраживает глюкозу, мальтозу, ксилоту, арабинозу и сорбит с образованием кислоты и газа. Образует сероводород, не сбраживает сахарозу, лактозу и раффинозу. Не свертывает молоко, не разжижает желатину и не образует индол.

Биологические свойства на лабораторных животных (патогенность). Патогенен для лабораторных животных. Бактериальный антиген агглютинируется монорецепторными О – сыворотками: 1,9,12 и Н – сывороткой первой фазы – гр.

При внутрибрюшинном заражении белых мышей ЛД₅₀ составляет 5×10^6 микробных клеток. При пероральном введении штамма *Salmonella dublin* в дозе 2×10^9 микробных клеток у телят на 5-6 сутки наблюдается синдром диареи.

Пример 1. С целью изготовления инактивированной вакцины против сальмонеллеза телят, первичную культуру штамма *Salmonella dublin* SD 5 TJ засевали в МПБ и инкубировали в течение 24 ч при температуре 37°C. Спустя 24 ч в маточной культуре

изучали тинкториальные и морфологические свойства бактерии, определяли однородность культуры и ее стерильность. Затем для получения биомассы, в реакторе изготовили питательную среду, содержащей мясопептонный бульон с дрожжевым экстрактом и засеивали маточной культурой из расчета 100 млн м. к. на мл среды и при 37°C инкубировали в течение 36 - 48 ч. После изучения однородности культуры, бактериальную массу инактивировали формалином и определяли полноту инактивации. Затем в биомассу добавили гидроокись алюминия, изучили стерильность и безвредность изготовленной вакцины.

В результате посева вакцины на питательных средах: МПБ, МПА, МППБ и Сабура установлено, что развития посторонней микрофлоры: бактерии и грибов не отмечается.

Безвредность вакцины проверяли на белых мышках и кроликах. С этой целью, препарат белым мышам (10 гол) ввели подкожно, по 0,2 мл и кроликам (6 гол) – по 1 мл, и за подопытными животными вели наблюдение в течение 10 дней. Результаты наблюдения показывают, что привитые животные остаются здоровыми.

Таким образом, проведенные исследования показали, что изготовленная вакцина является стерильной и безвредной для животных.

Пример 2. Иммуногенные свойства инактивированной вакцины против сальмонеллеза изучали путем вакцинации десяти белых мышей (16 -18г) подкожно в дозе 0,5 мл двукратно, 6 кроликов живой массой 2,5 - 3 кг двукратно в дозе 2 мл подкожно с интервалом 14 дней. Контролем служили десять голов не вакцинированных белых мышей и шесть го-

лов кроликов. Через 14 дней после двукратной вакцинации лабораторных животных заражали внутри брюшинно минимальной смертельной дозой суточной бульонной культурой *Salmonella Dublin* SD 5 TJ, заранее подтитрованной для белых мышей в дозе 200 млн м. к., для кроликов в дозе - 1 млрд м. к. Вакцину считали иммуногенной при выживании не менее 8-9 белых мышей из десяти и пятеро кроликов из шести в течение 10 дней после заражения.

Результаты опытов показали, что из числа вакцинированных белых мышей и кроликов после заражения заболели сальмонеллезом по одной головы с каждой опытной группы. Тогда как, все животные контрольных групп, после заражения заболели сальмонеллезом и пали.

Таким образом, разработанная на основе штамма *Salmonella dublin* SD 5 TJ вакцина при двукратной вакцинации обеспечивает формирование напряженного иммунитета, создающего в среднем 87,7% защиту лабораторных животных.

Пример 3. Опыты по изучению иммуногенной активности штамма *Salmonella dublin* SD 5 TJ проводили в неблагополучных по сальмонеллезу телят хозяйствах. С этой целью 35 голов телят 20 - 25 дневного возраста 2-хкратно, подкожно иммунизировали инактивированной вакцинной против сальмонеллеза в дозе 2 мл. За животными наблюдали в течение 6 месяцев после ревакцинации. Отмечали случаи заболевания подопытных животных сальмонеллезом. В результате наблюдения за опытными животными было установлено, что из 35 голов иммунизированных животных сальмонеллезом заболела одна голова (табл. 2).

Таким образом, профилактическая эффективность испытуемого препарата составила 97,2 %.

Формула изобретения

Штамм бактерий *Salmonella dublin* SD 5 TJ используемый для изготовления вакцин против сальмонеллеза телят депонирован в Национальном центре коллекции патогенных микроорга-

низмов Института проблем биологической безопасности и биотехнологии Таджикской академии сельскохозяйственных наук под № 05.

Таблица 1

Результаты серотипизации сальмонелл

Серовар	Таджикистан			Всего
	Северный	Центральный	Южный	
S. enteritidis	2 (1,1)	4 (2,2)	2 (1,1)	8 (5,4)
S. dublin	3 (1,6)	6 (3,2)	4 (2,2)	13 (12)
S. typhimurium	1 (0,5)	2 (1,1)	1 (0,5)	4 (2,1)
Итого	6 (3,2)	12 (6,5)	7 (3,8)	25 (13,5)

Примечание. В скобках указано процентное значение.

Таблица 2

Профилактическая эффективность
инактивированной вакцины против сальмонеллеза телят

Показатель	Группа животных	
	Опытная	контроль
Количество телят, гол.	35	35
Заболело сальмонеллезом, гол.	1 (2,8)	6 (17,1)
Пало, гол.	0	3 (8,6)
Профилактическая эффективность, %	97,2	82,9