

**ОШ МАМЛЕКЕТТИК УНИВЕРСИТЕТИНИН ЖАРЧЫСЫ. АЙЫЛ ЧАРБА:
АГРОНОМИЯ, ВЕТЕРИНАРИЯ ЖАНА ЗООТЕХНИЯ**

ВЕСТНИК ОШСКОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО УНИВЕРСИТЕТА. СЕЛЬСКОЕ ХОЗЯЙСТВО:
АГРОНОМИЯ, ВЕТЕРИНАРИЯ И ЗООТЕХНИЯ

JOURNAL OF OSH STATE UNIVERSITY. AGRICULTURE: AGRONOMY, VETERINARY AND
ZOOTECHNICS

e-ISSN: 1694-8696

№2(7)/2024, 111-122

ВЕТЕРИНАРИЯ

УДК: 579.842.14:616.9:636.1

DOI: [10.52754/16948696_2024_2\(7\)_12](https://doi.org/10.52754/16948696_2024_2(7)_12)

**ШТАММ БАКТЕРИЙ SALMONELLA ABORTUS EQUI
ДЛЯ РАЗРАБОТКИ МЕР БОРЬБЫ**

SALMONELLA ABORTUS EQUI БАКТЕРИЯСЫНЫН ШТАММЫ МЕНЕН КҮРӨШҮ
ЧАРАЛАРЫН ИШТЕП ЧЫГУУ

SALMONELLA ABORTUS EQUI BACTERIAL STRAIN FOR DEVELOPMENT OF
CONTROL MEASURES

Петрова Саргылана Гурьевна

Петрова Саргылана Гурьевна

Petrova Sargylana Guryevna

к.в.н., Якутский научно-исследовательский институт сельского хозяйства имени М.Г. Сафронова, г. Якутск
в.и.к., М.Г. Сафронов атындагы Якутск айыл чарба илимий-изилдөө институту, Якутск шаары
*Candidate of Veterinary Sciences, Federal Research Center of the Yakut Scientific Research Institute of Agriculture named
after Safronov M.G., Yakutsk.*

sargy1970p@mail.ru

Неустроев Михаил Петрович

Неустроев Михаил Петрович

Neustroev Mikhail Petrovich

доктор ветеринарных наук, профессор, Якутский научно-исследовательский институт сельского хозяйства
имени М.Г. Сафронова, г. Якутск
ветеринария илимдеринин доктору, профессор, М.Г. Сафронов атындагы Якутск айыл чарба илимий-изилдөө
институту, Якутск шаары

*Doctor of Veterinary Sciences, Professor, Head of the Laboratory of Veterinary Biotechnology, Federal Research Center of
the Yakut Scientific Research Institute of Agriculture named after
Safronov M.G., Yakutsk.*

mneustroev50@mail.ru

ORCID: 0000-0003-0672-4109

преподаватель, Женишбеков Абдымалик Ибраимович

окутуучу, Женишбеков Абдымалик Ибраимович

lecturer, Zhenishbekov Abdymalik Ibraimovich

Ошский государственный университет

Ош мамлекеттик университети

Osh State University

malikjenishbekov67@gmail.com

ШТАММ БАКТЕРИЙ *SALMONELLA ABORTUS EQUI* ДЛЯ РАЗРАБОТКИ МЕР БОРЬБЫ

Аннотация

Выделение чистых культур бактерий *Salmonella abortus equi* из биологических материалов, его идентификация, изучение их свойств необходимо для постановки диагноза, разработки мер борьбы и средств профилактики. Культуральные свойства возбудителя изучали путем посева на жидкие и плотные питательные и дифференциально-диагностические среды (мясопептонный бульон, мясопептонный агар, агар Эндо, среду Олькеницкого). Биохимические свойства выделенных культур определяли по способности ферментировать углеводы на средах Гисса с маннитом, лактозой, мальтозой, сахарозой, глюкозой, дульцитом. Подвижность – путем посева на полужидкий агар. Морфологию культур определяли просмотром мазков, окрашенных по Граму при микроскопировании. Антигенную структуру культур сальмонелл определяли с использованием моноклональных сальмонеллезных сывороток. Штамм бактерий *Salmonella abortus equi* БН-12 по культуральным, биохимическим и антигенным свойствам соответствует характерным признакам возбудителя сальмонеллезного аборта лошадей. Оценка вирулентности штамма бактерий проверяли на беспородных белых мышах (n= 20) массой тела 18-20 г. Вирулентную активность LD50 определяли методом Кербера. Генетическая идентификация проводилась методом определения нуклеотидной последовательности фрагмента гена 16s рРНК в ЦКП «Геномика» ИХБиФМ СО РАН и отделении биотехнологии ФГБУ «ВГНКИ». Методом ПЦР установлена 100 % идентичность анализируемых последовательностей образцов с нуклеотидной последовательностью гена 16s рРНК *Salmonella enterica*. Патогенен для белых мышей. Летальная доза составляет 400 млн микробных клеток в 1 мл. Результаты исследований позволили штамм бактерий *Salmonella abortus equi* БН-12 депонировать во «Всероссийской государственной коллекции штаммов микроорганизмов, используемых в ветеринарии и животноводстве» ФГБУ «ВГНКИ» под номером ВКШМ-Б-01ПД. Из штамма бактерий *Salmonella abortus equi* БН-12 изготовлена инактивированная вакцина против сальмонеллезного аборта лошадей с иммуномодулятором. Иммунобиологический препарат утвержден Россельхознадзором с выдачей регистрационного удостоверения в 2019 г. Иммуногенность составила 80 %. Вакцина аналогов в России не имеет и успешно применяется в субъектах России и Казахстане. Штамм используется при разработке бактериофагов для диагностики и лечения больных сальмонеллезным абортom лошадей.

Ключевые слова: сальмонеллы, штамм, вирулентность, иммуногенность, депонирование.

SALMONELLA ABORTUS EQUI
БАКТЕРИЯСЫНЫН ШТАММЫ МЕНЕН КҮРӨШҮ
ЧАРАЛАРЫН ИШТЕП ЧЫГУУ

SALMONELLA ABORTUS EQUI BACTERIAL
STRAIN FOR DEVELOPMENT OF CONTROL
MEASURES

Аннотация

Биологиялык материалдардан *Salmonella abortus equi* бактерияларынын таза культураларын бөлүп алуу, аны идентификациялоо жана алардын касиеттерин изилдөө диагностикалоо, күрөшүү жана алдын алуу чараларын иштеп чыгуу үчүн зарыл. Козгучтун маданий касиеттери суюк жана катуу азыктандыруучу жана дифференциалдык диагностикалык чөйрөлөргө (эт-пептон сорпосу, эт-пептондук агар, Эндо агар, Олкеницкий чөйрөсү) каптоо жолу менен изилденген. Бөлүнгөн культуралардын биохимиялык касиеттери гисс чөйрөсүндө углеводдорду маннитол, лактоза, мальтоза, сахароза, глюкоза жана дульцит менен ачытуу жөндөмдүүлүгү менен аныкталган. Кыймылдуулугу - жарым суюк агарга каптоо аркылуу. Маданияттардын морфологиясы микроскопиянын астында Грам менен боёлгон мазектерди көрүү аркылуу аныкталган. *Salmonella* культураларынын антигендик түзүмү монорецептор *Salmonella* сывороткасы аркылуу аныкталган. *Salmonella abortus equi* BN-12 бактериялык штаммы маданий, биохимиялык жана антигендик касиеттери боюнча жылкылардагы сальмонелла абортунун козгогучунун мүнөздүү белгилерине туура келет. Бактериялык штаммдын вируленттүүлүгү 18-20 г салмактагы ак чычкандарда (n= 20) бааланды. Генетикалык идентификация 16s рРНК генинин фрагментинин нуклеотиддик ырааттуулугун аныктоо жолу менен Россия Илимдер академиясынын Сибирдеги филиалынын Химиялык биология жана физика институтунун Геномикалык биргелешкен колдонуу борборунда жана Федералдык институттун Биотехнология департаментинде жүргүзүлдү. Мамлекеттик бюджеттик мекеме "ВГНКИ". ПТР ыкмасы *Salmonella enterica* дын 16s рРНК генинин нуклеотиддик ырааттуулугу менен талданган үлгү тизмегинин 100% окшоштугун аныктады. Ак чычкандар үчүн патогендүү. Өлтүрүү дозасы 1 мл 400 миллион микроб клеткасын түзөт. Изилдөөнүн натыйжалары *Salmonella abortus equi* BN-12 бактериялык штаммын ВКШМ- номери менен «ВГНКИ» федералдык мамлекеттик бюджеттик мекемесинин «Ветеринарияда жана мал чарбачылыгында колдонулуучу микроорганизмдердин штамдарынын Бүткүл россиялык мамлекеттик коллекциясына» сактоого мүмкүндүк берди. В-01PD. Иммуномодулятору бар жылкыларда сальмонелла абортунан каршы инактивдештирилген вакцина *Salmonella abortus equi* BN-12 бактериялык штаммынан жасалган. Иммунобиологиялык дары Россельхознадзор тарабынан 2019-жылы каттоо күбөлүгүн берүү менен бекитилген. Иммуногендүүлүк 80% түзгөн. Вакцинанын Россияда аналогу жок жана Россия менен Казакстандын субъектилеринде ийгиликтүү колдонулат. Штамм сальмонелла аборттору бар жылкыларды диагностикалоо жана дарылоо үчүн бактериофагдарды иштеп чыгууда колдонулат..

Ачкыч сөздөр: сальмонелла, штамм, вируленттүүлүк, иммуногендүүлүк, депонирлөө

Abstract

The isolation of pure cultures of the bacteria *Salmonella abortus equi* from biological materials, its identification, and the study of their properties are necessary for making a diagnosis, developing control measures and preventive measures. The cultural properties of the pathogen were studied by plating on liquid and solid nutrient and differential diagnostic media (meat-peptone broth, meat-peptone agar, Endo agar, Olkenitsky's medium). The biochemical properties of the isolated cultures were determined by the ability to ferment carbohydrates on Hiss media with mannitol, lactose, maltose, sucrose, glucose, and dulcitate. Motility - by plating on semi-liquid agar. The morphology of the cultures was determined by viewing Gram-stained smears under microscopy. The antigenic structure of *Salmonella* cultures was determined using monoreceptor *Salmonella* sera. The bacterial strain *Salmonella abortus equi* BN-12 corresponds in cultural, biochemical and antigenic properties to the characteristic features of the causative agent of salmonella abortion in horses.

The virulence of the bacterial strain was assessed on outbred white mice (n=20) weighing 18-20 g. Virulent activity LD50 was determined by the Kerber method.

Genetic identification was carried out by determining the nucleotide sequence of a fragment of the 16s rRNA gene at the Genomics Shared Use Center of the Institute of Chemical Biology and Physics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences and the Department of Biotechnology of the Federal State Budgetary Institution "VGNKI". The PCR method established 100 % identity of the analyzed sample sequences with the nucleotide sequence of the 16S rRNA gene of *Salmonella enterica*. Pathogenic for white mice. The lethal dose is 400 million microbial cells in 1 ml. The research results allowed the bacterial strain *Salmonella abortus equi* BN-12 to be deposited in the "All-Russian State Collection of Strains of Microorganisms Used in Veterinary Medicine and Animal Husbandry" of the Federal State Budgetary Institution "VGNKI" under the number VKShM-B-01PD. An inactivated vaccine against salmonella abortion in horses with an immunomodulator was made from the bacterial strain *Salmonella abortus equi* BN-12. The immunobiological preparation was approved by Rosselkhozнадзор with the issuance of a registration certificate in 2019. The immunogenicity was 80 %. The vaccine has no analogues in Russia and is successfully used in the constituent entities of Russia and Kazakhstan. The strain is used in the development of bacteriophages for the diagnosis and treatment of horses with salmonella abortion.

Keywords: salmonella, strain, virulence, immunogenicity, deposition.

Введение

Сальмонеллезный аборт лошадей – инфекционная болезнь бактериального происхождения, проявляющаяся у кобыл абортами или рождением нежизнеспособного молодняка. У жеребят сопровождается диареей и воспалением суставов. Заболевание наносит существенный экономический ущерб коневодству страны [1]. Сальмонеллезный аборт лошадей широко распространен в коневодческих хозяйствах Республики Саха (Якутия), Новосибирской области, Красноярского и Алтайского краев, Республиках Хакасия и Алтай, Иркутской области. При вспышке этой болезни деловой выход жеребят снижается на 20-40 % из-за инфекционных абортов, в зависимости от эпизоотической ситуации. Основные источники инфекции – абортировавшие кобылы [2,3].

Возбудителем сальмонеллезного аборта лошадей является бактерия– подвижная грамтрицательная полиморфная палочка с закругленными краями. Бактерию можно выделить из паренхиматозных органов абортированных плодов (из крови сердца, печени, селезенки, желудка), плодовых оболочек плода, околоплодных вод, с полости матки абортировавших кобыл, обсемененных навоза, сена, и воды. Возбудитель сальмонеллезного аборта лошадей относится к роду *Salmonella*, виду *Salmonella enterica*, серовар *Salmonella abortus equi*.

Основным средством борьбы с сальмонеллезным абортом лошадей является специфичекая профилактика [4]. При изготовлении вакцины используются штаммы бактерий возбудителя сальмонеллезного аборта лошадей, от биологических свойств которых зависит иммуногенность и эффективность препарата [5, 6]. Возбудитель сальмонеллезного аборта используется при разработке диагностических препаратов и выделении, идентификации бактериофагов.

Цель исследований – изучение биологических свойств возбудителя сальмонеллезного аборта лошадей для разработки диагностических, лечебных и вакцинных препаратов.

Материалы и методы

Использованы бактериологические, биохимические, серологические и молекулярно-генетические методы исследований. Культуральные свойства возбудителя изучали путем посева на жидкие и плотные питательные и дифференциально-диагностические среды (мясо-пептонный бульон, мясо-пептонный агар, агар Эндо, среду Олькеницкого). Биохимические свойства выделенных культур определяли по способности ферментировать углеводы на средах Гисса с маннитом, лактозой, мальтозой, сахарозой, глюкозой, дульцитом. Подвижность – путем посева на полужидкий агар. Посевы инкубировали в термостате при температуре +37^oС в течение 18-20 ч. Морфологию культур определяли просмотром мазков, окрашенных по Граму при микроскопировании. Антигенную структуру культур сальмонелл определяли с использованием монорецепторных сальмонеллезных сывороток.

Оценку вирулентности штамма бактерий проверяли на беспородных белых мышах (n= 20) массой тела 18-20 г. Вирулентную активность LD₅₀ устанавливали методом Кербера.

Генетическая идентификация проводилась методом определения нуклеотидной последовательности фрагмента гена 16s рРНК в ЦКП «Геномика» ИХБиФМ СО РАН и отделении биотехнологии ФГБУ «ВГНКИ».

С полужидкого агара бактерии отбирались с помощью обработанного абсолютным спиртом пинцетом путем единичного касания бактериального слоя носиком с фильтром. Затем носик вставлялся в пипеточный дозатор и ресуспендировали в 200 мкл бидистиллированной воды Mili-Q_W, в заранее подготовленном стрипе. Суспензия клеток подвергалась в течение 15 мин УЗО при помощи УЗ-ванны на максимальной мощности.

ПЦР проводилась с использованием стандартных праймеров 16S рНК 27F (AGAGTTTGATCMTGGCTCAG) и 1492R (GGTTACCTTGTTACGACTT) (~1450 н.п.) на ДНК-амплификаторе Verity (Applied Biosystems). Конечные концентрации компонентов ПЦР были следующие: 1,2 мМ MgCl₂, 0,6 мМ dNTP, 5x Phusion GC Buffer (NEB), 0,014 U/мкл Phusion Hot start II Pol (NEB), 0,2 мкМ 16S_27F, 0,2 мкМ 16S_1492R. Схема ПЦР и условия термоциклирования представлены в таблице 1 и 2.

Реактив	С исходная	С рабочая	V=50µl
MgCl ₂	50 мМ	1,2 мМ	1,2 µl
dNTP mixture	25 мМ	0,6 мМ	0,6 µl
5x Phusion GC Buffer	5x	x	10 µl
Phusion Hot start II Pol	2U/ µl	0,014U/ µl	0,35µ
16S_27F	10 µМ	0,2 µ	1 µ
16S_1492R	10 µМ	0,2 µ	1 µ
cells			1/50V

98°C	98°C	62°C	72°C	72°C	4°C
1:00	0:10	0:15	0:45	5:00	∞
33-35 cycles					

Полученные ампликоны анализировали гель-электрофорезом в 1% агарозе E (Диаэм) после окрашивания EtBr (Sigma-Aldrich). Очистку проводили набором MinElute PCR Purification Kit (Qiagen).

Полученный ПЦР продукт секвенировался по Сэнгеру с использованием тех же праймеров 16S_27F и 16S_1492R и BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) согласно протоколам производителя. Очистку от не включившегося BDT проводили с помощью Sephadex G-50 Fine (GE Healthcare) по протоколу. Капиллярный электрофорез выполнялся на ABI 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA).

Из прямого и обратного нуклеотидных прочтений путем перекрывания 3'-участков формировался контиг с помощью CLC Main Workbench v22.0 (Qiagen). Поиск ближайшего гомолога проводили Blast [5] с использованием базы NCBI Reference Sequence Database для прокариот.

Результаты исследований и их обсуждение

От абортированных плодов были выделены 25 изолятов возбудителя сальмонеллезного аборта кобыл. Из них штамм бактерий *Salmonella abortus equi* БН-12 выделен из паренхиматозных органов абортированного плода кобылы из Хангаласского улуса, который является наиболее неблагополучным и стационарным пунктом по сальмонеллезному аборт.

Штамм хорошо растет на универсальных питательных средах в аэробных и факультативно-аэробных условиях.

Оптимальная температура роста +37° С, при pH – 7,2-7,4. По биохимическим свойствам не разлагает лактозу, сахарозу, рафинозу, ксилозу, салицин, инулин, адонит, инозит. Ферментирует с выделением кислоты и газа глюкозу, маннит, дульцит, рамнозу, галактозу. Штамм не свертывает молоко, желатин не разжижает. Ферментативные свойства культуры не постоянны, могут изменяться под действием различных условий в процессе хранения [7].

На МПА образует сероватые округлые колонии (рис. 1), в МПБ дает равномерное помутнение, на полужидком агаре имеет диффузный рост, на среде Эндо растут в виде круглых бесцветных или слегка розоватых прозрачных или полупрозрачных колоний (рис. 2). Дает положительную реакцию с метилротом и отрицательную реакцию Фогес-Проскауэра. На стекле дает положительную реакцию агглютинизации (РА) с монорецепторными сальмонеллезными сыворотками 04. Патогенен для белых мышей. Летальная доза составляет 400 млн микробных клеток в 1 мл. При микроскопии видны подвижные короткие грамотрицательные палочки (рис. 3).

МПА
среде Эндо
Fig. 1 –
Fig. 2 –
Endo



Рис. 1 – Рост на
Рис. 2 – Рост на
Growth by MPA
Growth on the

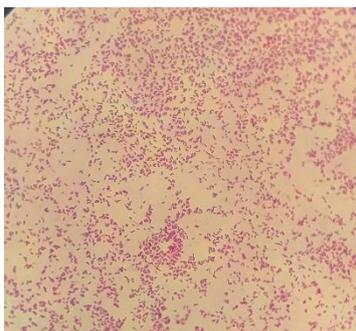


Рис. 3 – Грамотрицательные короткие палочки (окраска по Граму)
Fig. 3 – Gram-negative short sticks (Gram coloring)

Определение нуклеотидной последовательности фрагмента гена 16S рРНК трех бактериальных штаммов проводилось при помощи программы Blast с сравнительным анализом нуклеотидных последовательностей исследуемых образцов с последовательностями микроорганизмов, представленных в базах данных GenBank+EMBL+

DDBJ+PDB. Для каждого образца была проведена ПЦР и получены ампликоны, соответствующие гену 16S рРНК.

Все фрагменты очищены от компонентов ПЦР с помощью сорбции на магнитных частицах Протокол AmPureXP с количеством x0,8. Концентрации очищенных ампликонов в таблице 3.

Таблица 3. Концентрация ампликонов
Table 3. Concentration of amplicons

Sem pl ID	User ID	Date	Time	ng/ul	A260	A280	260/280	260/230	Constant	Cursor Pos.	Cursor abs	340raw	Measurement Type
BN12	Default	22/07/29	18:15	46.72	0.934	0.534	1.75	1.85	50.00	230	0.506	0.043	Measure
A/S	Default	22/07/29	18:15	47.92	0.958	0.490	1.96	2.50	50.00	230	0.383	-0.027	Measure
SAE	Default	22/07/29	18:15	19.10	0.982	0.517	1.90	2.04	50.00	230	0.481	-0.024	Measure

Секвенированы методом Сэнгера по 300 fmol ампликона с обеих сторон, используя те же праймеры, что и для амплификации. Реакции очищены хроматографическими колонками 1ml с Sephadex G-50. Секвенограммы сшивали в программе CLC Main Workbench 8.

В результате были получены следующие контиги последовательностей (рис. 4):

1. Сшитый контиг фрагмента гена 16S рРНК *Salmonella abortus equi* БН-12

GGCGTAGGAGGYAGCTWGCTGCTTCGCTGACGAGWGGCGGACGGGTGAGTAAT
 GTCTGGGAAACTGSCTGATGGAGGGGGATAACTACTGGAAACGGTGGCTAATACCGCA
 TAACGTCGCAAGACCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCTTGCCATCAGATGTGCCAG
 ATGGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATCCCTAGCTGGTC
 TGAGAGGATGACCAGCCACACTGGAAGTACGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGC
 AGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATG
 AAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAGTACTTTCAGCGGGGAGGAAGGTGTTGTGGTTAATA
 ACCGCAGCAATTGACGTTACCCGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCC
 GCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTAAGTGGGCGTAAAGCGCACGCA
 GGCGGTCTGTCAAGTCGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATTCGAA
 ACTGGCAGGCTTGAGTCTTGTAGAGGGGGGTAGAATTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGC
 GTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCTGGACAAAGACTGACGC
 TCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATAACCCTGGTAGTCCACGCCGTA
 AACGATGTCTACTTGGAGGTTGTGCCCTTGAGGCGTGGCTTCCGGAGCTAACGCGTTAA
 GTAGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTAAAACCTCAAATGAATTGACGGGGGC
 CCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGG
 TCTTGACATCCACAGAACTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACTGTGAGACA
 GGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTGAAATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGA
 GCGCAACCCTTATCCTTTGTTGCCAGCGGTTAGGCCGGGAACTCAAAGGAGACTGCCA
 GTGATAAACTGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGACCAGG

GCTACACACGTGCTACAATGGCGCATACAAAGAGAAGCGACCTCGCGAGAGCAAGCG
GACCTCATAAAGTGCGTCGTAAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTYGACTCCATGAAGTC
GGAATCGYTAGTAATYRWGGATCWRAATRCCAACGTTAGAMTACGTTSTMMCAACGTA
RTWCACGTCCTMCCAACGCAMCCAWGTMGTAACAACCTAAYCAAGTMGTWACAASGT
AATCAAGTCGTAACA

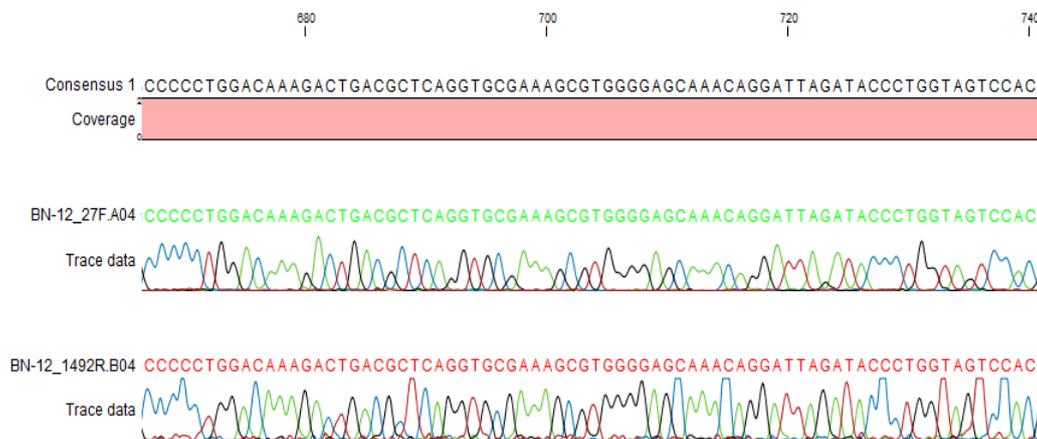


Рис. 4. Секвенограмма
Fig. 4. Sequenogram

2. Сшитый контиг фрагмента гена 16S рРНК Salmonella abortus equi A/S

AGCTTGCTGCTTCGCTGACGAGWGGYGGACGGGTGRGTAATGTCTGGGAAACT
GSCTGATGGAGGGGGATAACTACTGGAAACGGTGGCTAATACCGCATAACGTCGCAAG
ACCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCTTGCCATCAGATGTGCCCAGATGGGATTAGCT
TGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGAC
CAGCCACACTGGAAGTGAACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAA
TATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTC
GGGTTGTAAAGTACTTTCAGCGGGGAGGAAGGTGTTGTGGTTAATAACCGCAGCAATT
GACGTTACCCGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGG
AGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTAAGCGCAGCAGGCGGTCTGTCAA
GTCGGATGTGAAATCCCCGGGCTAACCTGGGAACTGCATTCGAAACTGGCAGGCTTG
AGTCTTGTAGAGGGGGGTAGAATTCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGA
GGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGGACAAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAG
CGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGTCTACT
TGGAGGTTGTGCCCTTGAGGCGTGGCTTCCGGAGCTAACGCGTTAAGTAGACCGCCTG
GGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGG
TGGAGCATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGTCTTGACATCCAC
AGAAGAATCCAGAGATGGATTTGTGCCTTCGGGAACTGTGAGACAGGTGCTGCATGGC
TGTCGTCAGCTCGTGTGTTGTGAAATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTAT

CCTTTGTTGCCAGCGATTAGGTCGGGAACCTCAAAGGAGACTGCCAGTGATAAACTGGA
GGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGACCAGGGCTACACACGTGC
TACAATGGCGCATACAAAGAGAAGCGACCTCGCGAGAGCAAGCGGACCTCATAAAGT
GCGTCGTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTYGACTCCATGAAGTCGGAATCG

3. Сшитый контиг фрагмента гена 16S рPHK *Salmonella abortus equi* Sae

CAGGAAGCAGCTTGCTGCTTCGCTGACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAATGTCT
GGGAAACTGCCTGATGGAGGGGGATAACTACTGGAAACGGTGGCTAATACCGCATAA
CGTCGCAAGACCAAAGAGGGGGACSTTCGGGCCTCTTGCCATCAGATGTGCCAGATG
GGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGA
GAGGATGACCAGCCACACTGGAACCTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGC
AGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAG
AAGGCCTTCGGGTTGTAAAGTACTTTCAGCGGGGAGGAAGGTGTTGTGGTTAATAACC
GCAGCAATTGACGTTACCCGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCG
GTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTAAGTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGC
GGTCTGTCAAGTCGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATTCGAAACT
GGCAGGCTTGAGTCTTGTAGAGGGGGGTAGAATTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTA
GAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGGACAAAGACTGACGCTCA
GGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATAACCCTGGTAGTCCACGCCGTA
CGATGTCTACTTGGAGGTTGTGCCCTTGAGGCGTGGCTTCCGGAGCTAACGCGTTAAGT
AGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCC
GCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGTC
TTGACATCCACAGAACTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACTGTGAGACAGG
TGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTTGTGAAATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGC
GCAACCCTTATCCTTTGTTGCCAGCGGTTAGGCCGGGAACTCAAAGGAGACTGCCAGT
GATAAACTGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGACCAGGGC
TACACACGTGCTACAATGGCGCATACAAAGAGAAGCGACCTCGCGAGAGCAAGCGGA
CCTCATAAAGTGCGTCGTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTYGACTCCATGAAGTCGG
AATCGYTAGTAAT

В результате получены следующие контиги последовательностей, которые представлены в таблице 4.

Таблица 4. Бласт анализ контигов Table 4. Blast analysis of contigues		
№ образцов	Наименование образца	Ближайший гомолог
1	БН-12	<i>Salmonella enterica</i>

2	A/S	<i>Salmonella enterica</i>
3	Sae	<i>Salmonella enterica</i>

Следовательно, установлена 100 % идентичность анализируемых последовательностей образцов с нуклеотидной последовательностью гена 16S рНК *Salmonella enterica*.

Комиссионные испытания штамма бактерий *Salmonella abortus equi* БН-12 в отделении биотехнологии ФГБУ «ВГНКИ» также показали 100% идентичность анализируемой последовательности образца с нуклеотидной последовательности гена 16S рНК *Salmonella enterica* (GenBank CP104638.1). Результаты исследований позволили штамм бактерий *Salmonella abortus equi* БН-12 депонировать во «Всероссийской государственной коллекции штаммов микроорганизмов, используемых в ветеринарии и животноводстве» ФГБУ «ВГНКИ» под номером ВКШМ-Б-01ПД в ампулах в лиофилизированном под вакуумом виде, при температуре хранения +2-80 С (Справка о депонировании № 01ПД от 16.11.2022 г.).

Для определения вирулентности штамма бактерий *Salmonella abortus equi* БН-12 использовали 18-20-часовую культуру. Культуру после пересева на МПА доводили до концентрации 2 млрд микробных тел в 1 мл по оптическому стандарту мутности. Затем готовили разведения на стерильном физиологическом растворе (1 млрд, 500 млн, 400 млн, 300 млн и 200 млн микробных тел в 1 мл). Из каждой пробирки заражали по четыре белой мыши. Разведенную культуру в дозе 0,2 мл вводили подкожно в область спины, одновременно четырем мышам вводили 0,2 мл мясопептонного бульона и физиологического раствора в качестве контроля. Наблюдения вели в течение 15 дней.

Результаты опыта по определению летальной дозы (LD50) штамма бактерий *Salmonella abortus equi* БН-12 приведены в таблице 5. LD50 составила 400 млн микробных тел в 1 мл.

Таблица 5. Результаты определения вирулентности штамма бактерий *Salmonella abortus equi* БН-12
Table 5. The results of determining the virulence of the bacterial strain *Salmonella abortus equi* BN-12

Доза	Экспериментальные данные		
	голов		% заражения
	заболело и погибло	не заболело	
1 млрд м.к.	4	0	100
500 млн м.к.	3	1	75,0
400 млн м.к.	4	0	100
300 млн м.к.	3	1	75,0
200 млн м.к.	0	4	0
Контроль	0	4	0

Из штамма бактерий *Salmonella abortus equi* БН-12 изготовлена инактивированная вакцина против сальмонеллезного аборта лошадей с иммуномодулятором. Иммунобиологический препарат утвержден Россельхознадзором с выдачей регистрационного удостоверения в 2019 г. Для определения иммуногенной активности вакцину вводили 20 ти белым мышам массой тела 18-20 г подкожно в дозе 0,5 мл. Через 14 дней после иммунизации 20 вакцинированных и 20 контрольных мышей аналогичной массы заражали подкожно в области спины подтитрованной летальной дозой (LD50) штамма бактерий *Salmonella abortus equi* БН-12. В течение 10 дней наблюдения за животными из 20

голов иммунизированных мышей заболели и погибли две мыши, а в контрольной группе – 18. Иммуногенность составила 80 %. Вакцина аналогов в России не имеет и успешно применяется в субъектах России и Казахстане.

В настоящее время нами разрабатываются бактериофаги для диагностики и лечения больных сальмонеллезным абортom лошадей. Штамм используется для идентификации бактериофагов, выделенных из объектов окружающей среды и больных лошадей.

Заключение

Выделен и изучены морфологические, культуральные, биохимические, антигенные, молекулярно-генетические свойства штамма бактерий *Salmonella abortus equi* БН-12. Штамм депонирован во «Всероссийской государственной коллекции штаммов микроорганизмов, используемых в ветеринарии и животноводстве» ФГБУ «ВГНКИ» под номером ВКШМ-Б-01ПД, который может быть использован для разработки диагностических и вакцинных препаратов при сальмонеллезном аборте лошадей.

Список источников

1. Гулюкин М.И. Профилактика массовых инфекционных болезней лошадей в табунном коневодстве / Гулюкин М.И., Юров К.П. // Ветеринария и кормление. – 2004. – № 4. – С. 22–24.
2. Неустроев М.П., Петрова С.Г., Ордахов И.А. Сальмонеллезный аборт лошадей (этиология, эпизоотология, меры борьбы и профилактики): - Монография;. – Новосибирск: Изд. ООО «СиБАК», 2019. – С. 9.
3. Borovikov S. Clinical case of Salmonella detected in an aborted mare fetus and its characteristics / Borovikov S., Kuibagarov M., Akibekov O. and Muranets A. // International Journal of Veterinary Science. – 2024 – 13(3) – P. 357-361.
4. Неустроев М.П. Результаты разработки вакцины против сальмонеллезного аборта лошадей / Неустроев М.П., Петрова С.Г. // Российская сельскохозяйственная наука. – 2020. – № 4. – С. 69-72.
5. Султанов А.А. Диагностика и профилактика сальмонеллезного аборта кобыл / Султанов А.А. [и др.] // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. – 2015. – № 12 (часть 10) – С. 1883-1887.
6. Неустроев М.П. Результаты лабораторного контроля иммуногенности инактивированной вакцины против ринопневмонии и сальмонеллезного аборта лошадей / Неустроев М.П. [и др.] // Российская сельскохозяйственная наука. – 2016. – №4. – С. 74-77.
7. Справочник по микробиологическим и вирусологическим методам исследования / под ред. М.О. Биргера. – 3-е изд. перераб. и доп. – М.: Медицина, 1982. – С. 183-198.

References

1. Gulyukin M.I. Prevention of mass infectious diseases of horses in herd horse breeding / Gulyukin M.I., Yurov K.P. // *Veterinary medicine and feeding*. - 2004. – No. 4. – pp. 22-24.
2. . Neustroev M.P., Petrova S.G., Ordakhov I.A. Salmonella abortion of horses (etiology, epizootology, control and prevention measures): - Monograph;. Novosibirsk: Ed. SibAK LLC, 2019. – p. 9.
- 3.
4. . Neustroev M.P. The results of the development of a vaccine against salmonella abortion of horses / Neustroev M.P., Petrova S.G. // *Russian agricultural science*. – 2020. – No. 4. – pp. 69-72.
5. Sultanov A.A. Diagnostics and prevention of salmonella abortion of mares / Sultanov A.A. [et al.] // *International Journal of Applied and Fundamental Research*. – 2015. – No. 12 (part 10) – P. 1883-1887.
6. Neustroev M.P. Results of laboratory control of immunogenicity of inactivated vaccine against rhinopneumonia and salmonella abortion of horses / Neustroev M.P. [et al.] // *Russian agricultural science*. - 2016. – No.4. – pp. 74-77.
7. Handbook of microbiological and virological research methods / edited by M.O. Birger. – 3rd ed. overworking and additional - M.: Medicine, 1982. – P. 183-198.