



Республика Таджикистан

(19) **TJ** (11) **677**
(51) **МПК А 61К 39/00**

ГОСУДАРСТВЕННОЕ ПАТЕНТНОЕ
ВЕДОМСТВО

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

1

2

(21) 1500910

(22) 12.01.2015

(46) Бюл. 104, 2015

(71) Махмудов К.Б. (TJ); Саттори И. (TJ).

(72) Махмудов К.Б. (TJ); Саттори И. (TJ);

Ахмеджонова Л.(TJ).

(73) Махмудов К.Б. (TJ); Саттори И. (TJ).

(54) **СПОСОБ ПРИГОТОВЛЕНИЯ АССОЦИИРОВАННОЙ ВАКЦИНЫ ДЛЯ ПРОФИЛАКТИКИ САЛЬМОНЕЛЛЕЗА И ПАСТЕРЕЛЛЕЗА СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ ЖИВОТНЫХ**

(56) 1. Всероссийский государственный центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов, № 2394.

2. Патент Российской Федерации (RU) № 2220743.

(57) Изобретение относится к области ветеринарной медицины и может быть применено для профилактики сальмонеллеза и пастереллеза сельскохозяйственных животных.

Способ включает засев и отдельное управляемое культивирование вакцинных штаммов сальмонелл и пастерелл. Далее осуществляют инактивацию культур формалином и с добавлением гидроксида алюминия адсорбируют их на адьюванте. В качестве вакцинных штаммов используют патогенные бактерии сальмонеллеза-Salmonella dublin-Г№12 и ЛМ№10 и пастереллеза-Pasteurella multocida-В№2 и Д№5, полученных путем отбора патогенных возбудителей из пораженных органов от больных и павших сельскохозяйственных животных из местных эпизоотических очагов.

Изобретение относится к области ветеринарной медицины и может быть применено для профилактики сальмонеллеза и пастереллеза сельскохозяйственных животных из местных штаммов.

Известен способ изготовления ассоциированной инактивированной вакцины против стрептококкоза и пастереллеза [1], включающий раздельное выращивание в жидкой питательной среде с добавлением глюкозы штаммов *Streptococcus epidemicus* ВГНКИ НК- ДЕП, *Pasteurella multocida* ВГНКИ и *Pasteurella multocida* ВГНКИ № 1015 в течение 18-24 часов, замораживание – оттаивание полученных культур, отделение жидких фракций, инактивацию культур возбудителей 0,3-0,4% раствором формалина, объединение полученных антигенов в равных соотношениях по объему и последующее внесение адъювантов-гидроокиси алюминия и сапонины.

Недостатком данного способа является более сложный и дорогостоящий способ приготовления.

В качестве прототипа принят способ изготовления ассоциированной вакцины против сальмонеллеза и пастереллеза и стрептококков поросят [2], включающий засев и раздельное управляемое культивирование вакцинных штаммов сальмонелл, пастерелл и стрептококков с последующей инактивацией культур формальдегидом, адсорбцией их на адъюванте и смешиванием адсорбированных культур. В качестве вакцинного штамма сальмонелл используют штамм *S.cholerae-suis* №370, инактивацию которого проводят формальдегидом.

Указанный способ имеет ряд недостатков, к числу которых относятся избыточная концентрация формальдегида в инактивированных культурах *Salmonella cholerae-suis*, что отрицательно влияет на иммуногенность препаратов и продолжительное время инактивации.

Целью заявляемого изобретения является разработка способа изготовления универсальной высокоиммуногенной специфичной ассоциированной вакцины из местных штаммов, обеспечивающей надежную защиту животных от сальмонеллеза и пастереллеза, вызываемых патогенными бактериями *Pasteurella multocida* и *Salmonella dublin*.

Поставленная цель достигается тем, что для приготовления ассоциированной вакцины осуществляют предварительное выделение из местных эпизоотических очагов штаммов патогенных возбудителей болезней- *Pasteurella multocida*-В№2 и Д№5, *Salmonella Dublin*-Г№12 и ЛМ№10, их идентификация, наработка биомассы культуры возбудителя раздельным культивированием и инактивация биомассы культуры возбудителя химическим реагентом.

Для достижения технического результата осуществляют следующие действия:

- проведение эпизоотологического анализа распространения инфекционных болезней сальмонеллеза и пастереллеза сельскохозяйственных животных;

- получение местных бактериальных штаммов путем отбора от пораженных органов от больных и павших сельскохозяйственных животных из местных эпизоотических очагов;

- проверка морфологии микробных клеток патогенных возбудителей;

- изучение биологических свойств патогенных бактерий местных штаммов *Pasteurella multocida*-В№2 и Д№5 и *Salmonella dublin*-Г№12 и ЛМ№10;

- купажирование, засев и раздельное управляемое культивирование вакцинных штаммов пастерелл, сальмонелл;

- приготовление образцов антигенов пастерелл, сальмонелл и обезвреживание действием химических факторов (инактивирование формалином);

- проверка на стерильность (проведение посевов на специальные питательные среды);

- изучение безвредности и реактогенности вакцины;

- проверка активности вакцины;

- определение оптимальной иммунизирующей дозы, напряженности и продолжительности иммунитета после применения вакцины на крупном рогатом скоте и овцах;

- изготовление экспериментальных образцов ассоциированной вакцины против сальмонеллеза и пастереллеза из местных штаммов;

- проведение количественной характеристики на лабораторных и подопытных сельскохозяйственных животных в зависимости между дозой антигена в составе вакцины и защитой от летальной дозы возбудителя;

- повышение качества препарата и стандартности биологических свойств вакцины.

Способ приготовления осуществляется следующим образом.

Проведена оптимизация условий культивирования сальмонеллеза и пастереллеза, посев на дифференциально-диагностические среды. Суспензию культур бактериальных инфекций подвергают купажированию 32-36 часов, выращивают раздельно в мясо-пептонном бульоне с глюкозой до концентрации микробных клеток 8 млрд. в 1 см³ и выделяют чистые культуры вирулентных штаммов возбудителей сальмонеллеза *Salmonella dublin* и пастереллеза *Pasteurella multocida*. Концентрацию выращенных культур определяли по стандарту мутности ГОСУДАРСТВЕННОГО ИНСТИТУТА СТАНДАРТИЗАЦИИ И КОНТРОЛЯ ИМ. ТАРАСЕВИЧА (ГИСК). Затем добавляли инактивирующие вещества формалин и выдерживали двое суток при t⁰-36-37°С в термостате. После смешивания культуры микроорганизмов сальмонелл и пастерелл добавляли адъювант-гидроокись алюминия. Формалин вносят в культуру возбудителей до концентрации 0,4-0,5%, гидроокись алюминия до концентрации 4 – 5 %.

Соотношение компонентов для приготовления суспензии клеток чистой культуры вирулентных штаммов возбудителей сальмонеллеза

Salmonella dublin и пастереллеза *Pasteurella multocida* приведено в Табл. 1 (масс. %):

Таблица 1

Суспензия клеток чистой культуры возбудителя сальмонеллеза, выделенного из местных эпизоотических очагов в питательной среде с титром 8 млрд. микробных клеток в 1 см ³	47,0-48,0
Суспензия клеток чистой культуры возбудителя пастереллеза выделенного из местных эпизоотического очагов в питательной среде с титром, 8 млрд. микробных клеток в 1 см ³	47,0-48,0
Формалин	0,4-0,5
Гидроокись алюминия	4 - 5

В антиген добавляют гидроокись алюминия 4-5%, при этом для получения вакцинного препарата антиген используют в количестве, достаточном для стимуляции активной иммунной реакции в организме животных при введении им целевого препарата.

Для проверки морфологии микробных клеток вирулентных штаммов возбудителей сальмонеллеза *Salmonella dublin* и пастереллеза *Pasteurella multocida* (из местного эпизоотического очага), делают мазки на предметном стекле, мазки окрашивают и просматривают под микроскопом. Возбудители сальмонеллеза *Salmonella dublin* - в мазках должны быть мелкие, прямые, с закругленными концами грамотрицательные палочки, а также частицы гидроокиси алюминия.

Возбудители пастереллеза *Pasteurella multocida* - небольшие, грамотрицательные, неподвижные и не образующие спор бактерии, располагающаяся изолированно, парами и иногда - в виде цепочек.

Для проверки на стерильность делают посевы на специальные питательные среды в пробирках (МПА - мясо-пептонный агар, МПБ - мясо-пептонный бульон с глюкозой, МППБ - мясо-пептонный печеночный бульон под вазелиновым маслом и агар Сабуро или среду Чапека, чтобы исключить контаминацию грибковой микрофлорой). При выдерживании в течение 10 дней в термостате при 36-37°C посевы должны оставаться стерильными.

В лабораторных и производственных условиях проведено изучение безвредности, реактогенных свойств и иммуногенной активности разработанной ассоциированной вакцины.

Для проверки безвредности в лабораторных условиях отбирают десять клинически здоровых белых мышей массой 18-20 г. и вводят им подкожно вакцину в дозе 0,5 мл и 5-ти кроликам, массой 1,5-2,0 кг, которым вакцину вводили подкожно по 3,0 мл. За лабораторными животными вели наблюдение в течение 10 дней, регистрируя при этом заболеваемость, гибель и местную реакцию на введение ассоциированной вакцины.

Животные должны оставаться здоровыми, без заметной местной и общей реакции в течение всего периода наблюдения. В случае падежа мышей или кроликов при повторной проверке вакцину бракуют. Экспериментальные серии ассоциированной вакцины против сальмонеллеза и пастереллеза с/х животных оказались безвредными, авирулентными и ареактогенными.

В процессе проведения основного опыта были сформированы 2 опытные группы по 5 кроликов в каждой. Кроликам первой группы вводили ассоциированную вакцину (соотношение сальмонеллезного и пастереллезного компонентов 1:1) в дозе 3 мл, двукратно с интервалом 14 дней, животным второй группы вводили ассоциированную вакцину (соотношение сальмонеллезного и пастереллезного компонентов - 1:2) - в дозе 3 мл., также двукратно с интервалом 14 дней. Кроликам контрольной группы (5 голов) подобранным по принципу аналогов, вводили физиологический раствор. Через 14 дней после повторной вакцинации проводили исследование сыворотки крови опытных и контрольных животных с целью определения титров специфических антител в реакции агглютинации.

Наиболее иммуногенной считали ассоциированную вакцину (с определенным соотношением сальмонеллезного и пастереллезного компонентов), обеспечивающую максимальный титр соответствующих антител.

При определении оптимального соотношения сальмонеллезного и пастереллезного компонентов в ассоциированной вакцине на лабораторных животных установлено, что титр специфических антител (отношение пастерелл к сальмонеллам) в сыворотке крови у кроликов первой группы при соотношении сальмонеллезного и пастереллезного антигена 1:1 составил в среднем 1:640 и 1:800 соответственно.

При соотношении компонентов 1:2 в ассоциированной вакцине титр специфических антител в сыворотке крови у кроликов второй группы в среднем составил 1:320 и 1:1120 соответственно. Результаты опытов показали, что соотношение 1:1 сальмонеллезного и пастереллезного компонентов в ассоциированной вакцине против сальмонеллеза и пастереллеза является наиболее оптимальным, так как способствует наибольшей выработке специфических антител. Таким образом, приготовленный препарат представляет собой ассоциированную вакцину на основе местных бактериальных штаммов для животноводческих хозяйств.

Общее время, связанное с приготовлением конечной формы ассоциированной вакцины составляло 1,5 месяца.

Перед применением препарата в хозяйстве показатели реактогенности и безвредности оценивают на группе изолированных телят, используя при этом от 5 до 10 животных, которым вводят подкожно по 3 мл вакцины. Наблюдение за животными проводилось в течение 14 - 20 дней.. После получения хороших результатов на изолированных телятах, вакцинации подвергают двукратно стельных сухостойных коров и суягных овцематок за 40 и 20 дней до отела, а также телят и ягнят с 2-ух месячного возраста. Для этого проводят подкожную иммунизацию животных ассоциированной вакциной в области шеи. При этом 1 доза препарата составляет 3 мл при первичной вакцинации и 5 мл при повторной

вакцинации для взрослых животных, для телят и ягнят 2 и 3 мл соответственно. В результате проведенной работы гибель КРС в хозяйстве снизилась в 3 раза по сравнению с предыдущими годами, когда данная работа не проводилась.

Пример 1. Способ получения препарата с оптимальными значениями параметров на основе бактериальных штаммов сальмонелл и пастерелл из местных эпизоотических очагов для приготовления ассоциированной вакцины против заболеваний крупного и мелкого рогатого скота, включающий предварительное выделение из местных эпизоотических очагов штаммов возбудителей сальмонеллеза и пастереллеза, полученных путем отбора сальмонелл и пастерелл из пораженных органов от больных и павших сельскохозяйственных животных из местных эпизоотических очагов, их идентификацию, раздельное культивирование, наработку биомассы культур возбудителей микробиологическим способом. В ассоциированной вакцине против сальмонеллеза и пастереллеза сельскохозяйственных животных, содержащей суспензию инактивированных антигенов *Pasteurella multocida* и *Salmonella Dublin* местных штаммов, адъювант, согласно изобретению в качестве антигенов, содержит суспензию клеток чистых культур возбудителей *Pasteurella multocida* и *Salmonella dublin* из местных штаммов (соотношение сальмонеллезного и пастереллезного компонентов 1:1), а также формалин и гидроокись алюминия, при следующем соотношении компонентов, масс. % (таблица 2):

Таблица 2

Суспензия клеток чистой культуры возбудителя сальмонеллеза, выделенного из местных эпизоотических очагов в питательной среде с титром 8 млрд. микробных клеток в 1 см ³	47,0-48,0
Суспензия клеток чистой культуры возбудителя пастереллеза, выделенного из местных эпизоотических очагов в питательной среде с титром 8 млрд. микробных клеток в 1 см ³	47,0-48,0
Формалин	0,4- 0,5
Гидроокись алюминия	4 - 5

Пример 2. Способ получения препарата с максимальными значениями параметров на основе бактериальных штаммов сальмонелл и пастерелл из местных эпизоотических очагов для приготовления ассоциированной вакцины против заболеваний крупного и мелкого рогатого скота, включающий предварительное выделение из местных эпизоотических очагов штаммов возбудителей

сальмонеллеза и пастереллеза, полученных путем отбора сальмонелл и пастерелл из пораженных органов от больных и павших сельскохозяйственных животных из местных эпизоотических очагов, их идентификацию, раздельное культивирование, наработку биомассы культур возбудителей микробиологическим способом.

В ассоциированной вакцине против сальмонеллеза и пастереллеза сельскохозяйственных животных, содержащей суспензию инаktivированных антигенов *Pasteurella multocida*-В№2 и Д№5 и *Salmonella dublin*-Г№12 и ЛМ№10 местных штаммов, адъювант. Согласно изобретению в качестве антигенов, содержит

суспензию клеток чистых культур возбудителей *Pasteurella multocida* и *Salmonella dublin* из местных штаммов (соотношение сальмонеллезного и пастереллезного компонентов 1:2), а также формалин и гидроокись алюминия, при следующем соотношении компонентов, мас. % (таблица 3):

Таблица 3

Суспензия клеток чистой культуры возбудителя сальмонеллеза, выделенного из местных эпизоотических очагов в питательной среде с титром 8 млрд. микробных клеток в 1 см ³	23,5-24,0
Суспензия клеток чистой культуры возбудителя пастереллеза выделенного из местных эпизоотических очагов в питательной среде с титром 8 млрд. микробных клеток в 1 см ³	70,5-70,1
Формалин	0,4- 0,5
Гидроокись алюминия	4 - 5

При определении оптимального соотношения сальмонеллезного и пастереллезного компонентов в ассоциированной вакцине установлено, что титр специфических антител (соотношение сальмонеллезного и пастереллезного компонентов 1:1) Пример 1 является наиболее оптимальным, так как способствует наибольшей выработке специфических антител у привитых животных.

Изготовленная ассоциированная вакцина против сальмонеллеза и пастереллеза оказалась стерильной, безвредной и ареактогенной для лабораторных животных.

Заявляемый способ позволяет повысить иммуногенную активность и специфическую безопасность препарата.

Формула изобретения

Способ приготовления ассоциированной вакцины для профилактики сальмонеллеза и пастереллеза сельскохозяйственных животных, включающий засев и раздельное управляемое культивирование вакцинных штаммов сальмонелл и пастерелл, с последующей инаktivацией культур раствором формалина, адсорбцию их на адъюванте (гидроокись алюминия), **отличающийся тем,**

что в качестве вакцинных штаммов используют патогенные бактерии сальмонеллеза- *Salmonella dublin*-Г№12 и ЛМ№10 и пастереллеза-*Pasteurella multocida*-В№2 и Д№5, полученные путем отбора патогенных возбудителей из пораженных органов от больных и павших сельскохозяйственных животных из местных эпизоотических очагов.

Компьютерный набор: Фатхуллаева М.С.

Заказ

Тираж

Подписное

Национальный патентно-информационный центр РТ
734042, г. Душанбе, ул. Айни, 14а