

Передбачуваний винахід відноситься до ветеринарної мікробіології і біотехнології, зокрема до способів виготовлення інактивованих вакцин, а саме для профілактики сальмонельозу та ешерихіозу тварин, яка може бути використана для імунопрофілактики захворювань сальмонельозної та/або ешерихіозної етіології.

Існує спосіб одержання формолтіомерсальної вакцини проти колібактеріоза і паратифу хутрових звірів, птиці, телят і поросят, який передбачає культивування виробничих штамів сальмонел і ешерихій в рідкому живильному середовищі, розбавлення бактеріальної суспензії до концентрації 4млрд.мкр.кл. в 1мл фізіологічним розчином NaCl, внесення в одержану суспензію ад'юванту та інактивацію одержаної суміші формаліном, консервуванні тіомерсаном (Ветеринарные препараты. Справочник. Под ред. Д.Ф.Осидзе, 1981, с. 223).

Недоліком цього способу виготовлення біопрепарату є те, що застосування одержаного таким способом препарату індукує у тварин наробку антитіл переважно до соматичних (O-) антигенів сальмонел та ешерихій відповідних серотинів.

В той же час відомо, що на початкових етапах розвитку сальмонельозної та ешерихіозної інфекцій провідна роль належить бактеріальним структурам, які забезпечують колонізацію епітеліоцитів збудниками, зокрема антигенами адгезії, а на більш пізніх стадіях - суттєвого значення набувають токсини збудників (Далина А.М. Адгезивные свойства энтеробактерий (сальмонелл и шигелл) - возбудителей острых кишечных инфекций. Автореф. дисс. ... канд. мед. наук., М.- 1989 г.; Езепчук Ю.В. Патогенность как функция биомолекул - М.: Медицина, 1985.-240 с.; Головкин А.Н. Средства диагностики и специфической профилактики колибактериоза телят на основе факторов патогенности возбудителя //Диссертация на соискание степени доктора ветеринарных наук., Харьков, 1996).

Існують способи одержання інактивованої вакцини проти сальмонельозів тварин" (патент України № 33502), спосіб одержання асоційованої вакцини "Бівак" проти інфекційного ринотрахеїту та паратифу - 3 ВРХ" (А.С. № 1092778; кл. А61К39/00); вакцини "Рококол" інактивованої проти ешерихіозу та рота, коронавірусних інфекцій телят (патент України № 45698). Дані способи одержання вакцин є близькими за технічним рішенням до об'єкту, що заявляється. Але за їх допомогою неможливо одержати препарат для вакцинопрофілактики сальмонельозу та ешерихіозу тварин, їх застосування не забезпечує попередження захворювань телят на сальмонельоз та ешерихіоз.

Прототипом об'єкту, що заявляється, може бути "Спосіб одержання антиадгезивної та антитоксичної сироватки проти сальмонельозів та ешерихіозів тварин" (патент України № 32341 А від 14.04.1999, кл. А61К39/085). Спосіб виконується таким чином: на живильних середовищах культивують виробничі штами з метою накопичення бактеріальної маси, виготовляють антигени, їх інактивують і використовують для гіперімунізації донорів сироватки крові, але цей спосіб неможливо використовувати для одержання інактивованої вакцини проти сальмонельозу та ешерихіозу тварин.

В основу винаходу поставлено задачу розробити спосіб виготовлення інактивованої вакцини проти сальмонельозу та ешерихіозу тварин, що включає культивування виробничих штамів бактерій в живильних середовищах, накопичення бактеріальної маси, виготовлення антигенів та їх інактивацію, шляхом використання, як полівалентного комплексу протективних антигенів, анатоксинів і адгезинів сальмонел, ешерихій та як ад'ювант гідрооксиду алюмінію, щоб забезпечити виготовлення інактивованої вакцини проти сальмонельозу та ешерихіозу тварин.

Порівняльний аналіз з відомими технічними рішеннями в галузі ветеринарної мікробіології та біотехнології дозволяє зробити висновок, що в способі виготовлення вакцини проти сальмонельозу та ешерихіозу тварин використовується біологічно-активні бактеріальні структури і речовини, які забезпечують реалізацію потенційної властивості бактерій викликати інфекційне захворювання, а саме забезпечують перші етапи взаємодії мікро- і макроорганізмів (збудника та сприйнятливої тварини), а як проєктивні антигени використовується полівалентний комплекс антигенів (екзотоксинів та адгезинів) виробничих штамів сальмонел і ешерихій, що відповідає критеріям "новизна" та "суттєві ознаки".

Спосіб виконують таким чином. До складу вакцини вводять екзотоксини виробничих штамів сальмонел і ешерихій та відокремлені від бактеріальних клітин адгезивні антигени, при чому адгезивні антигени відокремлюють шляхом прогрівання, суспензії бактеріальної маси в фосфатно-сечовинному буфері при 60-62°C - 30-35 хвилин, ізольовані антигени знешкоджують формаліном, а як ад'ювант використовують гідрооксид алюмінію. Для виготовлення комплексного антигену використовують штами *Salmonella typhimurium*, *Salmonella dublin*, *Salmonella enteritidis*, що утворюють екзотоксини і адгезивні антигени та штами *Escherichia coli*, що утворюють термолабільний і термостабільний ентеротоксини та адгезивні антигени типів K 99, F 41, Att 25, K88 ab, K88 ac, K88 ad.

Виробничі токсинпродукуючі штами бактерій (сальмонел і ешерихій) культивують в пробірках з рідким живильним середовищем Хоттінгера при 37°C протягом 48-72 годин. Отриманими матричними культурами засівають ємності з бульйоном Хоттінгера і культивують при 37°C протягом 12-16 годин. Після чого бактеріальну масу відокремлюють за допомогою центрифугування або сепарацією, в супернатанти вносять 0,4-0,5% формаліну і витримують в термостаті при 37°C 15 діб.

Виробничі штами бактерій (сальмонел і ешерихій) продуценти фімбріальних адгезивних антигенів вирощують на агарі Хоттінгера при 37°C протягом 24 годин, після чого пересівають на бульйон Хоттінгера культивують в пробірках при 37°C протягом 48-72 годин. Отриманими матричними культурами засівають ємності з бульйоном Хоттінгера і культивують при 37 С протягом 12-16 годин, в бактеріальну суспензію вносять 10 М фосфатно-сечовинному буфері (рН - 7.0-7.2), отриману суміш інкубують при 62-65°C 30-35 хвилин. Після чого бакмасу відокремлюють центрифугуванням або сепарацією, в супернатанти вносять 0,5% формаліна і витримують при 37°C 10-15 діб. Препарати анатоксинів і адгезинів сальмонел і ешерихій (окремо) об'єднують, у співвідношенні 1:1.

Одержані сальмонельозні і ешерихіозні антигени об'єднують у співвідношенні 1:1. У одержану таким чином суміш антигенів вносять 30% за об'ємом стерильного гідроксиду алюмінію.

Приклад 1. Виробничі штами бактерій

З метою виготовлення вакцини використовували штами *Escherichia coli*, що утворюють термолабільний і

термостабільний ентеротоксини та адгезивні антигени типів K 99, F 41, Att 25, K88 ab, K88 ac, K88 ad, та штами *Salmonella typhimurium*, *Salmonella dublin*, *Salmonella enteritidis*, що утворюють екзотоксини і адгезивні антигени.

Приклад 2. Виготовлення вакцини

Препарати сальмонельозних і ешерихіозних антигенів об'єднували у такому співвідношенні: 35% сальмонельозного комплексного антигену, 35% ешерихіозного комплексного антигену; в одержану суміш вносять 30% гідрооксиду алюмінію (6%) та формалін.

Приклад 3. Визначення стерильності та нешкідливості

Стерильність антигенів визначали за ГОСТ 28085-89, Нешкідливість - за ГСТУ 46.024-2002.

Приклад 4. Визначення залишкової кількості формаліну

Залишкова кількість формаліну у вакцині не повинна бути вищою за 0,5%.

Приклад 5. Визначення імуногенності вакцини

40-ти білим мишам масою 18-20г підшкірно вводили вакцину дворазово з інтервалом між ін'єкціями 10-14 діб в об'ємі 0,5см³. Через 14 діб після останнього введення препарату дослідних тварин заражали інтраперитоніально раніше визначеними летальними дозами контрольних штамів *Salmonella dublin* (окремо) і *Escherichia coli* (окремо). Спостереження за зараженими тваринами вели 10 діб. Препарат вважали активним в тому разі, коли за термін спостереження загибель серед заражених патогенними сальмонелами і ешерихіями тварин не перевищувала 30%.

Вакцина, виготовлена за цим способом, знайде застосування в тваринницьких господарствах приватного і громадського сектора власності, неблагополучних щодо сальмонельозу та ешерихіозу телят, поросят, ягнят, хутрових звірів, т.п., а також в господарствах з іншою епізоотичною ситуацією, для проведення профілактичних та оздоровчих заходів при сальмонельозах та ешерихіозах тварин.