



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 100370

(13) C2

(51) МПК

A61K 39/112 (2006.01)

A61P 31/04 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(21)	Номер заявки:	а 2009 07289	(56)	Перелік документів, взятих до уваги експертизою: NASSAR T J ET AL: "USE OF LIVE AND INACTIVATED SALMONELLA ENTERITIDIS PHAGE TYPE 4 VACCINES TO IMMUNISE LAYING HENS AGAINST EXPERIMENTAL INFECTION" REVUE SCIENTIFIQUE ET TECHNIQUE - OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES / SCIENTIFIC AND TECHNICAL REVIEW - INTERNATIONAL OFFICE OF EPIZOOTICS, OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES, PARIS, FR, vol. 13, no. 3, 1994, pages 855-867, XP009073376 ISSN: 0253-1933. LILLEHOJ E P ET AL: "VACCINES AGAINST THE AVIAN ENTEROPATHOGENS EIMERIA, CRYPTOSPORIDIUM AND SALMONELLA" ANIMAL HEALTH RESEARCH REVIEWS, CABI PUBLISHING, GB, vol. 1, no. 1, June 2000 (2000-06), pages 47-65, XP001203522 ISSN: 1466-2523. WIGLEY PAUL ET AL: "Oral infection with the Salmonella enterica serovar Gallinarum 9R attenuated live vaccine as a model to characterise immunity to fowl typhoid in the chicken" BMC VETERINARY RESEARCH, BIOMED CENTRAL, LONDON, GB, vol. 1, no. 1, 12 September 2005 (2005-09-12), page 2, XP021011435 ISSN: 1746-6148. BARROW P A ET AL: "Vaccination against Salmonella infections in food animals: rationale, theoretical basis and practical application" 2000, A. WRAY & C. WRAY, SALMONELLA IN DOMESTIC ANIMALS (PAGE(S) 323-339), XP009099313 pages 327-329. SMITH H W: "The use of live vaccines in experimental Salmonella gallinarum infection in chickens with observations on their interference effect." THE JOURNAL OF HYGIENE SEP 1956, vol. 54, no. 3, September 1956 (1956-09), pages 419-432, XP009099363 ISSN: 0022-1724. ZHANG-BARBER L ET AL: "Vaccination for control of Salmonella in poultry" VACCINE, BUTTERWORTH SCIENTIFIC, GUILDFORD, GB, vol. 17, no. 20-21, 4 June 1999 (1999-06-04), pages 2538-2545, XP004169663 ISSN: 0264-410X (Abstract). CHACANA P A ET AL: "Protection conferred by a live Salmonella Enteritidis vaccine against fowl typhoid in laying hens" AVIAN DISEASES, AMERICAN ASSOCIATION OF AVIAN PATHOLOGISTS, KENNET SQ., PA, US, vol. 50, no. 2, June 2006 (2006-06), pages 280-283, XP009099039 ISSN: 0005-2086 (Abstract).
(22)	Дата подання заявки:	10.12.2007		
(24)	Дата, з якої є чинними права на винахід:	25.12.2012		
(31)	Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	60/869,524		
(32)	Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	11.12.2006		
(33)	Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку:	US		
(41)	Публікація відомостей про заявку:	12.10.2009, Бюл.№ 19		
(46)	Публікація відомостей про видачу патенту:	25.12.2012, Бюл.№ 24		
(86)	Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ	PCT/US2007/086979, 10.12.2007		
(72)	Винахідник(и): Ле Гро Франсуа-Ксав'є (FR), Лемьєр Стефан (FR)			
(73)	Власник(и): МЕРІАЛ ЛІМІТЕД, 3239 Satellite Boulevard, Duluth, GA 30096, United States of America (US)			
(74)	Представник: Слободянюк Алла Василівна, реєстр. №25			

(54) СПОСІБ ВАКЦИНАЦІЇ ПТАХІВ ПРОТИ SALMONELLA

(57) Реферат:

UA 100370 C2

Винахід належить до способу вакцинації птахів проти *Salmonella*, який передбачає щонайменше одне первинне введення атенуйованої імуногенної композиції або вакцини, яка включає фармацевтично або ветеринарно прийнятний ексципієнт, розріджувач або середовище й щонайменше одну атенуйовану *Salmonella*, які вводять тварині-птахові перед щонайменше одним бустерним введенням інактивованої імуногенної композиції або вакцини, що містить інактивовану *Salmonella*, де атенуйовану *Salmonella* вибирають із *Salmonella* B-групи, а атенуйовану *Salmonella* вибирають із *Salmonella* D-групи, відповідно до якого первинне введення та бустерне введення здійснюють із інтервалом в 2-18 тижнів.

Галузь техніки, до якої відноситься винахід

Даний винахід відноситься до вакцинації тварин проти *Salmonella*, зокрема до вакцинації тварин - птахів. Даний винахід також включає набори та застосування імуногенних композицій або вакцин проти *Salmonella*.

5 Рівень техніки

Salmonella spp. є факультативними внутрішньоклітинними патогенами, які викликають локалізовані або системні інфекції, на додачу до хронічного безсимптомного стану, при якому тварина може бути носієм. Вони мають глобальне значення для економіки та охорони здоров'я. Тиф птахів і пулороз у домашніх птахів продовжують спричиняти економічні втрати в тих країнах, де промислове птаховництво продовжує інтенсифікуватися та де звичайним є утримання птахів на відкритому повітрі. Також збільшується кількість серотипів, які викликають гастроентерит у людей. Витрати або недоцільність модернізації гігієнічних заходів або терапії разом із зростаючими проблемами стійкості до антибіотиків указують на те, що більш привабливою як допоміжний засіб до існуючих заходів контролю стає вакцинація домашніх птахів (Zhang-Barber L. et al., Vaccine, 1999, 17(20-21): 2538-45).

Salmonella є одним з головних збудників харчових інфекцій у людей. За висновком Комісії по зоонозам (European Commission: Trends and sources of zoonotic infections in animals, feed, food and man in the European Union and Norway in 2003) в 15 країнах-учасниках Євросоюзу та Норвегії в 2003 р. повідомлялося про 135546 випадків сальмонельозу в людей.

Птаховництво, особливо в Європі та у Сполучених Штатах Америки, перебуває під посиленням контролем органів охорони здоров'я та споживачів для зниження ризиків зараження людей бактеріями *Salmonella*, джерелом яких є домашні птахи, і зокрема сальмонельозом (ослаблення патогенів та HACCP у США, Директива Ради ЄС 92/117/ЄЕС у Євросоюзі).

Оскільки *Salmonella* здатна інфікувати багато популяцій тварин (наприклад, ссавців, птахів), завжди існує ризик захворіти на сальмонельоз, не залежно від країни, пори року або технології обробки їжі.

Зоонозні фактори *Salmonella* spp. шлунково-кишкової інфекції в людей лікували доступними антибактеріальними засобами. З початку 1990-х років з'явилися штами *Salmonella*, стійкі до широкого спектра антибактеріальних засобів, що зробило лікування інфекції менш ефективним і підвищило для людей ризик зараження шлунково-кишковою інфекцією, спричиненою *Salmonella* spp.

Як і в попередні роки, домінувала *Salmonella enterica*, підвид *enterica*, серовар Enteritidis (*Salmonella* Enteritidis), яка є причиною 61,8 % (2002: 67,1 %) всіх зареєстрованих випадків у Євросоюзі та Норвегії. Захворюваність в окремих країнах коливалася від 87,9 % в Австрії до 33,3 % у Франції. *Salmonella enterica*, підвид *enterica*, серовар Typhimurium (*Salmonella* Typhimurium) посідала друге місце, викликаючи 16,5 % всіх випадків захворювання. Захворюваність в окремих країнах коливалася від 5,8 % в Австрії до 28,7 % в Ірландії. Як і в попередні роки, слідом за *Salmonella* Enteritidis та *Salmonella* Typhimurium більшість випадків було викликано *Salmonella enterica*, підвид *enterica*, серовар Virchow (*Salmonella* Virchow); *Salmonella enterica*, підвид *enterica*, серовар Infantis (*Salmonella* Infantis) і *Salmonella enterica*, підвид *enterica*, серовар Hadar (*Salmonella* Hadar). Кожний із цих сероварів залучений менше ніж в 1 % всіх зареєстрованих випадків.

Основним джерелом зараження є зараження при вживанні в їжу яєць і м'яса домашніх птахів. Зниження таких ризиків досягають за допомогою комбінації методів, які застосовуються протягом усіх етапів виробництва яєць і м'яса, серед яких оптимальне ведення сільського господарства, гігієнічні технології та вакцинація.

Законодавство співтовариства відносно гігієни харчування та нагляду за зоонозами включає цілий ряд положень, за допомогою яких прагнуть контролювати та попереджати забруднення продуктів харчування бактеріями *Salmonella*. Вважають, що заходи для зменшення поширеності *Salmonella* у живих організмах є одним з найбільш ефективних способів зниження забруднення харчових продуктів і кількості випадків сальмонельозу в людей.

В 2003 р. було опубліковано нове Європейське законодавство у відношенні зоонозів; Регламент 2160/2003 забезпечує систему нормативів для пригнічення патогенів у харчовому ланцюзі, в основному для популяцій тварин, і здійснення національних планів контролю щодо виконання цих нормативів. Первинною мішенню є *Salmonella* spp., зокрема серовари, які, як думають, мають важливе значення з погляду охорони здоров'я. Нормативи в різних популяціях тварин підвищуються в наступному порядку: племінні стада *Gallus gallus*, кури-несучки, бройлери, індики та свині, яких забивають на м'ясокомбінатах. Аж до теперішнього часу нормативи були встановлені тільки для племінних стад *Gallus gallus* (Регламент 1003/2005); норматив був установлений як 1 %, що означає, що наприкінці 2009 р. максимальний відсоток

стад, позитивних щодо *Salmonella Enteritidis*, *Salmonella Typhimurium*, *Salmonella Infantis*, *Salmonella Hadar* та *Salmonella Virchow* на рівні Євросоюзу складе 1 %.

Що стосується фахівців з розведення тварин, то Регламент 1091/2005 забороняє використання антибактеріальних засобів як способу контролю у відношенні *Salmonella*, у той час як застосування вакцин схвалене і рекомендується. Висновки та рекомендації Науково-дослідної експертної групи з біологічної небезпеки на запит Комісії відносно використання вакцин для контролю за *Salmonella* у домашніх птахів (The EFSA Journal (2004) 114, 1-74) значною мірою сприяє застосуванню вакцин для контролю за *Salmonella* на рівні ферм. Зокрема, висновки експертної комісії серед інших полягають у наступному:

- Основа успішного контролю за інфекціями *Salmonella* на фермах домашніх птахів полягає в задовільному веденні сільського господарства та методах гігієни (включаючи всі аспекти захисту кормів, птахів, ведення господарства, очищення та дезінфекції, контролю за гризунами, тощо), а також у тестуванні та видаленні з виробництва тварин з позитивними результатами аналізів. Вакцинацію курчат розглядають як засіб підвищення стійкості птахів проти впливу *Salmonella* і зниження виділення мікроорганізмів.

- Існують експериментальні дані та деякі результати експлуатаційних спостережень, відповідно до яких знижений рівень екскреції з фекаліями та системної інвазії мікроорганізмами *Salmonella* у вакцинованих птахів призведе до зменшення зараження столових яєць і навколишнього середовища.

- Якщо програма контролю націлена на виробників курей-несучок/бройлерів або курей-несучок, а частота захворювань у стаді є високою, то для зниження виділення мікроорганізмів і зараження яєць може бути корисною вакцинація. Якщо частота захворювань у стаді є низькою, то вакцинація може бути не настільки корисною, але усе ще може використовуватися як один із профілактичних заходів для підтримування низької захворюваності.

Існують більше ніж 2000 сероварів бактерій *Salmonella*.

Відповідно до класифікації Кауфмана та Уайта (http://en.wikipedia.org/wiki/Kauffman-White_classification) допускають серологічні різновиди роду *Salmonella*, щоб відрізнити їх один від одного. Ця схема диференціює ізоляти шляхом визначення поверхневих антигенів, які виробляються бактеріями. У першу чергу визначають "O" тип антигенів. "O" антигени є полісахаридами, асоційованими з ліпополісахаридом зовнішньої мембрани бактерій. Після визначення групи "O" антигенів визначають "H" антиген. "H" антигени є білками, асоційованими з бактеріальним джгутиком. Сальмонели існують у двох фазах; рухливій фазі та нерухомій фазі. Їх також відносять до специфічної та неспецифічної фаз. Залежно від фази, у якій виявляють сальмонелу, продукуються різні "H" антигени. Патогенні штами *Salmonella typhi* несуть додатковий антиген "Vi", який названий так через підвищену вірулентність штамів, які виробляють цей антиген, який асоційований з бактеріальною капсулою.

У відповідності до класифікації Кауфмана та Уайта встановлюють "O" - групи сероварів сальмонели.

Проти зараження курчат бактеріями *Salmonella* групи C була розроблена атенуйована вакцина основою якої є *Salmonella Hadar* з делеціями генів *суа/crp*, а також основою якої є *Salmonella Hadar* з делецією гена *pho* (Roland K. et al., Avian Dis., 2004, 48(3): 445-52). Хоча варіант із делеціями генів *суа/crp* викликав підвищений рівень антитіл в сироватці крові, він не забезпечував імунну відповідь, спрямовану проти зараження бактеріями *Salmonella Hadar*.

Chacana et al. (Chacana P.A. et al., Avian Dis., 2006, 50(2): 280-3) показали, що атенуйована вакцина проти *Salmonella* може викликати перехресний імунітет проти представників однієї й тої ж серогрупи схеми Кауфмана-Уайта. Проти тифу птахів застосовували імунітет, забезпечений за допомогою TAD *Salmonella vac E*, атенуйованої вакцини на основі *Salmonella Enteritidis*. Три групи курей-несучок вакцинували за допомогою різних протоколів вакцинації, починаючи з першого дня життя, і потім інфікували їх за допомогою 2×10^5 КУО вірулентного штамів *Salmonella Gallinarum* або на 28-ому тижні, або на 52-ому тижні життя. Оцінювали смертність, виділення мікроорганізмів з фекаліями або інвазію органів бактеріями *Salmonella Gallinarum*. Вакцина на основі *Salmonella Enteritidis* була здатна викликати перехресний імунітет у відношенні *Salmonella Gallinarum*, обох штамів D-групи сальмонели відповідно до класифікації Кауфмана-Уайта. На 28-ому тижні кури, вакциновані трьома пероральними дозами або двома пероральними дозами разом з підшкірно введеною дозою, були захищені вакциною. Однак на 52-ому тижні, якщо кури були інфіковані через 36 тижнів після завершальної імунізації, вакцина не забезпечувала захисту.

Внаслідок величезної кількості сероварів *Salmonella*, існує необхідність у вакцинах, спрямованих проти бактерій *Salmonella*, які здатні викликати захисну імунну відповідь проти більше ніж одного серовара *Salmonella* та/або проти більше ніж однієї групи відповідно до

класифікації Кауфмана-Уайта.

Розкриття винаходу

Відповідно, даний винахід відноситься до стратегії вакцинації, який ґрунтується, щонайменше, на одному первинному введенні атенуйованої імуногенної композиції або вакцини на основі *Salmonella* й, щонайменше, одному бустерному введенні атенуйованої імуногенної композиції або вакцини на основі *Salmonella*. Ця стратегія вакцинації є ефективною для профілактики переносу гомологічних або гетерологічних *Salmonella* у вакцинованих суб'єктів.

Метою даного винаходу також є запропонувати способи застосування імуногенних композицій або вакцин для попередження зараження птахів гомологічними та/або гетерологічними *Salmonella*, для яких проводять, щонайменше, одне первинне введення атенуйованої імуногенної композиції або вакцини на основі *Salmonella* птахам перед, щонайменше, одним бустерним введенням інактивованої імуногенної композиції або вакцини на основі *Salmonella*, яку здійснюють через кілька тижнів, зокрема, від 2 тижнів до 18 тижнів після єдиного або первинного введення.

Метою цього винаходу також є запропонувати способи застосування імуногенних композицій або вакцин для попередження переносу гомологічних або гетерологічних *Salmonella* у птахів, при яких проводять, щонайменше, одне первинне введення атенуйованої імуногенної композиції або вакцини на основі *Salmonella* групи D птахам перед, щонайменше, одним бустерним введенням інактивованої імуногенної композиції або вакцини на основі *Salmonella* групи B та *Salmonella* групи D, яке здійснюють через кілька тижнів, зокрема, від 2 тижнів до 18 тижнів після єдиного або першого первинного введення. Приклади *Salmonella* груп B та D наведені в цьому документі.

Метою цього винаходу також є запропонувати набори для вакцинації птахів, які включають, щонайменше, два флакони та вкладений аркуш із інструкціями щодо введення, перший флакон, який містить імуногенну композицію або вакцину на основі атенуйованої *Salmonella*, і другий флакон, який містить імуногенну композицію або вакцину на основі інактивованої *Salmonella*. Необов'язково можуть бути включені додаткові флакони, які включають імуногенну композицію або вакцину на основі атенуйованої *Salmonella* для багаторазового введення при первинній імунізації та/або флакони, які включають імуногенну композицію або вакцину на основі інактивованої *Salmonella* для багаторазового бустерного введення.

Слід зазначити, що в цьому описі й, зокрема, у формулі винаходу, такі терміни як "включає", "включали", "які включають" та подібні до них, можуть мати значення, які визначені в законі про патенти США; наприклад, вони можуть означати "охоплює", "охоплювали", "які охоплювали" та подібні до них; а такі терміни як "який складається в основному з" та "складається в основному з" мають значення, яке приписує їм закон про патенти США, наприклад, у них допускається присутність елементів, які не були точно перераховані, але в них виключені елементи, які виявлені в попередньому рівні техніки або які зачіпають основні або нові характеристики винаходу.

Ці та інші втілення розкриті або є очевидними, або охоплені докладним описом винаходу, наведеним нижче.

Короткий опис фігур

Наведений нижче опис, який поданий у вигляді прикладів та який не покликаний обмежити винахід описаними специфічними втіленнями, варто розглядати у зв'язку із прикладеними фігурами, які включені сюди як посилання:

Фігура 1 ілюструє відсоток повторної локалізації штамів *Salmonella* для експериментального зараження в селезінках курчат через 4-7 днів після зараження;

фігура 2 ілюструє середні цифри штамів *Salmonella* для експериментального зараження в сліпій кишці курчат через 4-7 днів після зараження та стандартні відхилення.

Для фігури 1 і фігури 2 "Control" ("контроль") представляє невакциновану контрольну групу, що відповідає G.00; "L+K" є групою, вакцинованою двічі, перший раз вакциною на основі атенуйованої *Salmonella* і другий раз вакциною на основі інактивованої *Salmonella*, що відповідає G.01; "Killed" ("убита") – група, вакцинована тільки вакциною на основі інактивованої *Salmonella*, що відповідає G.02.

Здійснення винаходу

Даний винахід відноситься до способів застосування імуногенних композицій або вакцин на тваринах-птахів для підвищення імунної відповіді, щонайменше, проти однієї гетерологічної *Salmonella*, при яких тварині-птахові проводять, щонайменше, одне первинне введення атенуйованої імуногенної композиції або вакцини, яка включає фармацевтично або рно прийнятний ексципієнт, розріджувач або середовище, і, щонайменше, один атенуйований серовар *Salmonella* однієї з *Salmonella*, перед, щонайменше, одним бустерним введенням

інактивованої імуногенної композиції або вакцини, яка включає фармацевтично або рно прийнятний ексципієнт, розріджувач або середовище, і, щонайменше, один атенуйований серовар *Salmonella* однієї з *Salmonella*, з інтервалом у кілька тижнів, зокрема, з інтервалом від 2 тижнів до 18 тижнів. Джерелом походження атенуйованої *Salmonella* та інактивованої *Salmonella* може бути той самий серовар або це можуть бути різні серовари. Гетерологічна *Salmonella* є бактерією, яка відрізняється від тих, які застосовують в імуногенних композиціях або вакцинах, що їх вводять при первинній імунізації або під час бустерного введення, наприклад, бактерії *Salmonella* іншого серовара або іншої групи *Salmonella* відповідно до класифікації Кауфмана-Уайта.

Способи, які є предметом винаходу, можна застосовувати на тваринах-птахах для того, щоб створити перехресний імунітет у тварин-птахів проти захворювання, яке викликається, щонайменше, однією гетерологічною бактерією *Salmonella*, та/або для того, щоб попередити перенесення, щонайменше, однієї гетерологічної бактерії *Salmonella* у тварин-птахів.

Способи запропоновані даним винаходом також можна застосовувати на тваринах-птахах для того, щоб зменшити кількість бактерій *Salmonella* C-групи в селезінці та/або в сліпій кишці інфікованих тварин-птахів, зокрема, щоб зменшити кількість бактерій *Salmonella* C1 - групи та бактерій *Salmonella* C2-групи в селезінці та/або в сліпій кишці інфікованих тварин-птахів або щоб зменшити кількість бактерій *Salmonella* B-групи та бактерій *Salmonella* C-групи в селезінці та/або в сліпій кишці інфікованих тварин-птахів. Приклади бактерій *Salmonella* C-груп представлені в цьому документі.

Термін "імуногенна композиція" відноситься до будь-якої композиції, здатної після її ін'єктування тварині-птахові викликати або стимулювати імунну відповідь проти *Salmonella*.

Термін "вакцинна композиція" або "вакцина" відноситься до будь-якої композиції, здатної після її ін'єктування тварині, зокрема тварині-птахові, викликати або стимулювати захисну імунну відповідь проти захворювань, які були викликані бактеріями *Salmonella* та/або викликати або стимулювати захисну імунну відповідь для того, щоб попередити або зменшити перенесення бактерій *Salmonella* у тварин, зокрема у тварин-птахів.

Режим первинної бустерної імунізації передбачає, щонайменше, одне первинне введення та щонайменше, одне бустерне введення із застосуванням, щонайменше, одного загального поліпептиду, антигену, епітопа або імуногену. Вакцина, застосована при первинному введенні, може відрізнятися за своєю природою від тієї вакцини, що її застосовують пізніше для бустерного введення. Первинне введення може включати одне або кілька введень. Подібним чином, бустерне введення може включати одне або кілька введень.

Способи запропоновані винаходом передбачають, щонайменше, одне первинне введення й, щонайменше, одне бустерне введення тварині, бажано птахові, ефективної кількості імуногенної композиції або вакцини відповідно до винаходу. Тварина може бути самцем або самою. Це введення може бути, зокрема, зроблене за допомогою внутрішньом'язової (IM), внутрішньошкірної (ID) або підшкірної (SC) ін'єкції або за допомогою інтраназального або перорального введення, де пероральне введення включає, але не обмежується тільки цим, введення їжі або питної води, гелів або розпорошуваних розчинів.

Фармацевтично або рно прийнятні ексципієнти, розріджувачі або середовища можуть бути водою, водою для ін'єкції, сольовим розчином або буфером. До атенуйованої імуногенної композиції або вакцини можна додавати стабілізатор, такий як гліцерин, розчин глюцидів, наприклад, розчин сахарози.

Атенуйована імуногенна композиція або вакцина, яка застосовується при первинному введенні, відповідно до способів запропонованих даним винаходом включає фармацевтично або рно прийнятний ексципієнт, розріджувач або середовище й, щонайменше, одну атенуйовану бактерію *Salmonella*. Атенуйована бактерія *Salmonella* може бути вибрана із групи, яка складається з бактерій *Salmonella* D-групи та *Salmonella* B-групи, бажано серед D-групи, яка складається з *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Panama, *Salmonella* Dublin, *Salmonella* Gallinarum, *Salmonella* Pullorum, і серед B-групи, яка складається з *Salmonella* Typhimurium, *Salmonella* Braenderup, *Salmonella* Agona, *Salmonella* Bredeney, *Salmonella* Heidelberg, *Salmonella* Indiana, *Salmonella* Saint-Paul, *Salmonella* Brandenburg. У кращому втіленні атенуйована імуногенна композиція або вакцина, яка застосовується при первинному введенні, відповідно до способів запропонованих даним винаходом включає фармацевтично або рно прийнятний ексципієнт, розріджувач або середовище й, щонайменше, одну атенуйовану бактерію *Salmonella* D-групи. В іншому кращому втіленні атенуйована імуногенна композиція або вакцина, яка застосовується при первинному введенні, відповідно до способів запропонованих даним винаходом, включає фармацевтично або рно прийнятний ексципієнт, розріджувач або середовище й, щонайменше, одну атенуйовану бактерію *Salmonella* B-групи. В

іншому кращому втіленні атенуйована імуногенна композиція або вакцина, яка застосовується при первинному введенні, відповідно до способів запропонованих даним винаходом включає фармацевтично або рно прийнятний ексципієнт, розріджувач або середовище й, щонайменше, одну атенуйовану бактерію *Salmonella* D-групи й, щонайменше, одну атенуйовану бактерію *Salmonella* B-групи. У найкращому втіленні атенуйована імуногенна композиція або вакцина, яка застосовується при первинному введенні, відповідно до способів запропонованих даним винаходом включає фармацевтично або рно прийнятний ексципієнт, розріджувач або середовище й, атенуйовану *Salmonella* Enteritidis. В іншому найбільш кращому втіленні атенуйована імуногенна композиція або вакцина, яка застосовується при первинному введенні, відповідно до способів запропонованих даним винаходом включає фармацевтично або рно прийнятний ексципієнт, розріджувач або середовище та атенуйовану *Salmonella* Enteritidis та атенуйовану *Salmonella* Typhimurium.

Приклади різних груп відповідно до класифікації Кауфмана-Уайта включають групи A, B, C1-3, D, E1-4, F, G, H та I, приклади яких представлені нижче.

Наприклад, A-група включає *Salmonella enterica*, підвид *enterica*, серовар Paratyphi A (*Salmonella* Paratyphi A), *Salmonella* Paratyphi A варіант durazzo.

Наприклад, B-група включає *Salmonella enterica*, підвид *enterica*, серовар Paratyphi B (*Salmonella* Paratyphi B); *Salmonella* Paratyphi B варіант odense; *Salmonella enterica*, підвид *enterica*, серовар Java (*Salmonella* Java); *Salmonella enterica*, підвид *enterica*, серовар Typhimurium (*Salmonella* Typhimurium); *Salmonella enterica*, підвид *enterica*, серовар Braenderup (*Salmonella* Braenderup); *Salmonella enterica*, підвид *enterica*, серовар Agona (*Salmonella* Agona); *Salmonella enterica*, підвид *enterica*, серовар Bredeney (*Salmonella* Bredeney); *Salmonella enterica*, підвид *enterica*, серовар Heidelberg (*Salmonella* Heidelberg); *Salmonella enterica*, підвид *enterica*, серовар Indiana (*Salmonella* Indiana); *Salmonella enterica*, підвид *enterica*, серовар Saint-Paul (*Salmonella* Saint-Paul); *Salmonella enterica*, підвид *enterica*, серовар Brandenburg (*Salmonella* Brandenburg); *Salmonella enterica*, підвид *enterica*, серовар Limete (*Salmonella* Limete); *Salmonella enterica*, підвид *enterica*, серовар Agama (*Salmonella* Agama); *Salmonella enterica*, підвид *enterica*, серовар Derby (*Salmonella* Derby); *Salmonella enterica*, підвид *enterica*, серовар Salinatis (*Salmonella* Salinatis); *Salmonella enterica*, підвид *enterica*, серовар Stanley (*Salmonella* Stanley).

Наприклад, C1-група включає *Salmonella enterica*, підвид *enterica*, серовар Paratyphi C (*Salmonella* Paratyphi C); *Salmonella enterica*, підвид *enterica*, серовар Infantis (*Salmonella* Infantis); *Salmonella enterica*, підвид *enterica*, серовар Mbandaka (*Salmonella* Mbandaka); *Salmonella enterica*, підвид *enterica*, серовар Livingstone (*Salmonella* Livingstone); *Salmonella enterica*, підвид *enterica*, серовар Virchow (*Salmonella* Virchow); *Salmonella enterica*, підвид *enterica*, серовар Ohio (*Salmonella* Ohio); *Salmonella enterica*, підвид *enterica*, серовар Montevideo (*Salmonella* Montevideo); *Salmonella enterica*, підвид *enterica*, серовар Tennessee (*Salmonella* Tennessee); *Salmonella enterica*, підвид *enterica*, серовар Rissen (*Salmonella* Rissen); *Salmonella enterica*, підвид *enterica*, серовар Decatur (*Salmonella* Decatur); *Salmonella enterica*, підвид *enterica*, серовар Bareilly (*Salmonella* Bareilly); *Salmonella enterica*, підвид *enterica*, серовар Menston (*Salmonella* Menston); *Salmonella enterica*, підвид *enterica*, серовар Oranienburg (*Salmonella* Oranienburg); *Salmonella enterica*, підвид *enterica*, серовар Thompson (*Salmonella* Thompson).

Наприклад, C2-група включає *Salmonella enterica*, підвид *enterica*, серовар Hadar (*Salmonella* Hadar); *Salmonella enterica*, підвид *enterica*, серовар Newport (*Salmonella* Newport); *Salmonella enterica*, підвид *enterica*, серовар Kottbus (*Salmonella* Kottbus).

Наприклад, C3-група включає *Salmonella enterica*, підвид *enterica*, серовар Kentucky (*Salmonella* Kentucky); *Salmonella enterica*, підвид *enterica*, серовар Albany (*Salmonella* Albany).

Наприклад, D-група включає *Salmonella enterica*, підвид *enterica*, серовар Typhi (*Salmonella* Typhi); *Salmonella enterica*, підвид *enterica*, серовар Enteritidis (*Salmonella* Enteritidis); *Salmonella enterica*, підвид *enterica*, серовар Panama (*Salmonella* Panama); *Salmonella enterica*, підвид *enterica*, серовар Dublin (*Salmonella* Dublin); *Salmonella enterica*, підвид *enterica*, серовар Gallinarum (*Salmonella* Gallinarum); *Salmonella enterica*, підвид *enterica*, серовар Pullorum (*Salmonella* Pullorum); *Salmonella enterica*, підвид *enterica*, серовар Ndolo (*Salmonella* Ndolo); *Salmonella enterica*, підвид *enterica*, серовар Miami (*Salmonella* Miami); *Salmonella enterica*, підвид *enterica*, серовар Sendai (*Salmonella* Sendai).

Наприклад, E1-група включає *Salmonella enterica*, підвид *enterica*, серовар Give (*Salmonella* Give); *Salmonella enterica*, підвид *enterica*, серовар Anatum (*Salmonella* Anatum); *Salmonella enterica*, підвид *enterica*, серовар London (*Salmonella* London); *Salmonella enterica*, підвид *enterica*, серовар Meleagridis (*Salmonella* Meleagridis).

Наприклад, E2-група включає *Salmonella enterica*, підвид *enterica*, серовар Cambridge

(*Salmonella* Cambridge); *Salmonella enterica*, підвид *enterica*, серовар Newington (*Salmonella* Newington).

Наприклад, E3-група включає *Salmonella enterica*, підвид *enterica*, серовар Minneapolis (*Salmonella* Minneapolis).

5 Наприклад, E4-група включає *Salmonella enterica*, підвид *enterica*, серовар Simsbury (*Salmonella* Simsbury); *Salmonella enterica*, підвид *enterica*, серовар Senftenberg (*Salmonella* Senftenberg).

Наприклад, F-група включає *Salmonella enterica*, підвид *enterica*, серовар Aberdeen (*Salmonella* Aberdeen).

10 Наприклад, G-група включає *Salmonella enterica*, підвид *enterica*, серовар Cubana (*Salmonella* Cubana); *Salmonella enterica*, підвид *enterica*, серовар Poona (*Salmonella* Poona).

Наприклад, H-група включає *Salmonella enterica*, підвид *enterica*, серовар Heves (*Salmonella* Heves); *Salmonella enterica*, підвид *enterica*, серовар Onderstepoort (*Salmonella* Onderstepoort).

15 Наприклад, I-група включає *Salmonella enterica*, підвид *enterica*, серовар Brazil (*Salmonella* Brazil); *Salmonella enterica*, підвид *enterica*, серовар Hvittefoss (*Salmonella* Hvittefoss).

Деякі атенуйовані вакцини на основі *Salmonella* і деякі інактивовані вакцини на основі *Salmonella* є наявними в продажу.

Патенти США U.S. Patent Nos. 7,045,122; 6,923,957; 6,905,691; 6,605,285; 5,843,426; 5,733,760; 5,424,065; 5,389,368 та 6,592,869 мають відношення до вакцин на основі *Salmonella*, що включають атенуйовані та інактивовані вакцини.

20 Вид *Salmonella* може бути раціонально атенуйовано шляхом введення в геном певних нереверсивних мутацій для того, щоб одержати штами живої вакцини. Ідентифіковано деякі гени, які при мутації атенуюють *Salmonellae*. Зокрема, штами сальмонели, які несуть нереверсивні мутації в генах, залучених у метаболічний шлях біосинтезу попередників хоризматів, створюють прекрасні пероральні вакцини, які викликають сильні гуморальні, місцеві та клітинні імунні реакції в організмі-хазяїні (Chatfield S.N. et al., Vaccine, 1989, 7(6): 495-8; Chatfield S.N. et al., FEMS Immunol. Med. Microbiol., 1993, 7(1): 1-7), це стосується також генів аро метаболічного шляху біосинтезу ароматичних сполук (EP-B1-0322237) і мутантів регулятора транскрипції Rfa бактерій *Salmonella Typhimurium*, застосування яких є доцільним як атенуйованих пероральних вакцин проти сальмонельозу в мишей (Nagy G. et al., Infect. Immun., 2006, 74(10): 5914-25).

35 Бактерії *Salmonella* можна атенувати за допомогою модифікації структури генома бактерій, наприклад, шляхом делеції частини гена *Salmonella*, шляхом вставки гетерологічної нуклеотидної послідовності в ген *Salmonella* та/або шляхом заміни частини гена *Salmonella* на гетерологічну нуклеотидну послідовність. Можна атенувати *Salmonella* шляхом введення мутацій, які (i) забезпечують аутокотрофність, (ii) зачіпаючи метаболізм цукрів і біосинтез ліпополісахаридів або (iii) впливають на деякі загальні способи конструкції регуляторних генів, необхідних для повного прояву вірулентності.

40 Наприклад, атенуйовані бактерії *Salmonella* можуть бути бактеріями, які включають для атенуації, щонайменше, одну дрейф-мутацію метаболізму стійкості до стрептоміцину або рифампіцину (EP-B1-0642796), такими як атенуйований штам *Salmonella* Enteritidis Sm 24/Rif 12/Ssq (EP-B1-0642796), штам *Salmonella* Enteritidis, атенуйований за допомогою першої мутації в регуляторній ділянці гена *rho*, яка викликає конститутивну експресію гена під контролем зазначеної ділянки, і другої мутації в гені *pag* або *prg* (EP-B1-0563311); штам *Salmonella* Enteritidis, атенуйований за допомогою нереверсивної мутації в гені *htr* (US-A-5.804. 194); атенуйований штам *Salmonella*, який демонструє аутокотрофність у відношенні одного або декількох факторів росту, обраних із групи, яка складається з фенілаланіну, тирозину, триптофану та параамінобензойної кислоти, так що він не здатний рости на мінімальному середовищі за відсутності зазначеного одного або декількох факторів росту (US-A-6,231,871), як наприклад, штам *Salmonella* Typhimurium STM-1, депонований в Австралійській урядовій аналітичній лабораторії під кодом доступу N93/43266 (US-A-6,231,871); аутокотрофні мутанти *Salmonella* Enteritidis, отримані шляхом N-метил-N'-нітро-N-нітрозогуанідинового мутагенезу, такі як штам E 3/49, штам 1/37, штам C7/1, штам C7/2, штам C7/18, штам C7/19, штам E1/23, штам E1/25, штам E2/7, штам E3/44 та штам E3/51 (Martin G. et al., Berl. Münch. Tierärztl. Wschr., 1996, 109(10): 325-9); атенуйований штам *Salmonella* Typhimurium, який несе нереверсивну мутацію в кожному із двох дискретних генів аро метаболічного шляху біосинтезу ароматичних сполук, таких як *aroA* та *aroC*, *aroA* та *aroD*, *aroA* та *aroE* (EP-B1-0322237); атенуйований штам *Salmonella* Enteritidis, генетично зумовлене похідне гена *aroC* (штам LVR02, дивися Betancor L. et al., Vet. Microbiol., 2005, 107(1-2): 81-9); і атенуйований штам *Salmonella* Typhimurium, який має мутацію, яка інактивує ген, обраний з поміж: *hupA*, *dksA*, *rfaY*, *sipC* або *clpB* (WO-A1-

98/02523).

Атенуюючі мутації також можна одержати шляхом вставки транспозона. Наприклад, транспозон у мутанті EZ870 вводять до нуклеотидної послідовності *Salmonella Enteritidis*, яка є гомологічною (98,4 % ідентичних пар основ в області, яка перекривається, 188 п.о.) до гену *spiC* *Salmonella Typhimurium* (код доступу U51927, Ochman H., Soncini F.C. Solomon F. and Groisman E.A., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 93, 7800-7804, 1996). Генетично модифікований штам *Salmonella enteritidis* EZ870 має номер депонування LMGP-18484 у Колекції культур BCCM/LMG Laboratorium voor Microbiologie, Ledeganckstraat 35, B-9000 Gent, Belgium (WO-A-99/37759).

Інактивована імуногенна композиція або вакцина, яка застосовується при бустерному введенні, відповідно до способів запропонованих даним винаходом включає фармацевтично або рно прийнятний ексципієнт, розріджувач або середовище та, щонайменше, одну інактивовану *Salmonella*. Інактивовану *Salmonella* можна вибирати із групи, яка складається з *Salmonella* E-групи, *Salmonella* D-групи, *Salmonella* C-групи та *Salmonella* B-групи, бажано із групи, яка складається з *Salmonella* E1-групи, *Salmonella* E4-групи, *Salmonella* D-групи, *Salmonella* C1-групи, *Salmonella* C2-групи, *Salmonella* C3-групи та *Salmonella* B-групи, і ще більш бажано з E1-групи, яка складається з *Salmonella* Anatum, з E4-групи, яка складається з *Salmonella* Senftenberg, з D-групи, яка складається з *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Panama, *Salmonella* Dublin, *Salmonella* Gallinarum, *Salmonella* Pullorum, з C1-групи, яка складається з *Salmonella* Infantis, *Salmonella* Mbandaka, *Salmonella* Livingstone, *Salmonella* Virchow, *Salmonella* Ohio, *Salmonella* Montevideo, *Salmonella* Tennessee, *Salmonella* Rissen, з C2-групи, яка складається з *Salmonella* Hadar, *Salmonella* Newport, *Salmonella* Kottbus, з C3-групи, яка складається з *Salmonella* Kentucky, *Salmonella* Albany і з B-групи, яка складається з *Salmonella* Typhimurium, *Salmonella* Braenderup, *Salmonella* Agona, *Salmonella* Bredeney, *Salmonella* Heidelberg, *Salmonella* Indiana, *Salmonella* Saint-Paul, *Salmonella* Brandenburg.

У кращому втіленні інактивована імуногенна композиція або вакцина, яка застосовується при бустерному введенні, відповідно до способів запропонованих даним винаходом включає фармацевтично або рно прийнятний ексципієнт, розріджувач або середовище й, щонайменше, одну інактивовану *Salmonella* B-групи й, щонайменше, одну інактивовану *Salmonella* D-групи. В іншому кращому втіленні інактивована імуногенна композиція або вакцина, яка застосовується при бустерному введенні, відповідно до способів запропонованих даним винаходом включає фармацевтично або рно прийнятний ексципієнт, розріджувач або середовище й, щонайменше, одну інактивовану *Salmonella* B-групи, щонайменше, одну інактивовану *Salmonella* C-групи й, щонайменше, одну інактивовану *Salmonella* D -групи. У найкращому втіленні інактивована імуногенна композиція або вакцина, яка застосовується при бустерному введенні, відповідно до способів запропонованих даним винаходом включає фармацевтично або рно прийнятний ексципієнт, розріджувач або середовище та інактивовану *Salmonella* Typhimurium та інактивовану *Salmonella* Enteritidis. В іншому найкращому втіленні інактивована імуногенна композиція або вакцина, яка застосовується при бустерному введенні, відповідно до способів запропонованих даним винаходом включає фармацевтично або рно прийнятний ексципієнт, розріджувач або середовище та інактивовану *Salmonella* Typhimurium та інактивовану *Salmonella* Enteritidis й, щонайменше, одну інактивовану *Salmonella* C2-групи. В іншому найкращому втіленні інактивована імуногенна композиція або вакцина, яка застосовується при бустерному введенні, відповідно до способів запропонованих даним винаходом включає фармацевтично або рно прийнятний ексципієнт, розріджувач або середовище та інактивовану *Salmonella* Typhimurium та інактивовану *Salmonella* Enteritidis й, щонайменше, одну інактивовану *Salmonella* C2 -групи та, щонайменше, одну інактивовану *Salmonella* C1 -групи.

Salmonella можна хімічно інактивувати шляхом обробки інактивуючими агентами, такими як формальдегід, етиленімін, похідні етиленімінаміду (наприклад, етиленіміну), пропіленімін, β-пропіолактон, тимеросал, ацетон або термоінактивації. У кращому втіленні інактивуючим агентом є формальдегід.

У певних аспектах кращі способи застосування імуногенних композицій або вакцин на тваринах-птахах відповідно до винаходу передбачають, щонайменше, одне первинне введення атенуйованої імуногенної композиції або вакцини, яка включає фармацевтично або рно прийнятний ексципієнт, розріджувач або середовище й, щонайменше, одну атенуйовану *Salmonella* D-групи, які вводять тварині-птахові перед, щонайменше, одним бустерним введенням інактивованої імуногенної композиції або вакцини, яка включає фармацевтично або рно прийнятний ексципієнт, розріджувач або середовище, щонайменше, одну інактивовану *Salmonella* B-групи й, щонайменше, одну інактивовану *Salmonella* D-групи, з інтервалом у кілька тижнів, наприклад, з інтервалом від 2 тижнів до 18 тижнів. У специфічному втіленні такого кращого способу атенуйовані бактерії *Salmonella* D-групи представлені *Salmonella* Enteritidis,

імуногенної композиції або вакцини, яка включає фармацевтично або рно прийнятний ексципієнт, розріджувач або середовище й, щонайменше, одну атенуйовану *Salmonella* D-групи та, щонайменше, одну атенуйовану *Salmonella* B-групи, які вводять тварині-птахові перед, щонайменше, одним бустерним введенням інактивованої імуногенної композиції або вакцини, яка включає фармацевтично або рно прийнятний ексципієнт, розріджувач або середовище, щонайменше, одну інактивовану *Salmonella* B-групи, щонайменше, одну інактивовану *Salmonella* C1-групи, щонайменше, одну інактивовану *Salmonella* C2-групи та, щонайменше, одну інактивовану *Salmonella* D-групи, з інтервалом у кілька тижнів, наприклад, з інтервалом від 2 тижнів до 18 тижнів. У специфічному втіленні цього кращого способу атенуйовані бактерії *Salmonella* D-групи представлені *Salmonella* Enteritidis, атенуйовані бактерії *Salmonella* B-групи представлені *Salmonella* Typhimurium, інактивовані бактерії *Salmonella* B-групи представлені *Salmonella* Typhimurium, інактивовані бактерії *Salmonella* D-групи представлені *Salmonella* Enteritidis, інактивовані бактерії *Salmonella* C2-групи представлені *Salmonella* Hadar та інактивовані бактерії *Salmonella* C1-групи представлені *Salmonella* Virchow та/або *Salmonella* Infantis.

До бактеріальної суспензії можна додавати допоміжний засіб (засоби), зокрема, до бактеріальної суспензії, отриманої після культивування та інактивації. Допоміжний засіб можна вибирати з поміж гідрооксиду алюмінію, сапоніну, будь-якої емульсії води-в-олії або емульсії олії-у-воді, які є сумісними із тканинами птахів (дивися, наприклад, Herbert W.J., The Lancet, 1965, October 16: 771; Brugh M. et al., Am. J. Vet. Res., 1983, 44(1): 72-5; Boersma W.J.A. et al., 44th Forum in Immunology, "Characteristics and use of new-generation adjuvants", 503-511; Gast et al., Avian Diseases, 1993, 37 (4): 1085-91; Stone, Avian Diseases, 1993, 37: 399-405; Stone et al., Avian Diseases, 1990, 34: 979-983; Stone et al., Avian Diseases, 1983, 27(3): 688-697; US-A-3.919.411; WO-A-05/009462, всі роботи включені сюди як посилання).

Перелік прикладів допоміжних засобів включає, але не обмежується тільки ними, емульсії олії-у-воді, води-в-олії-у-воді на основі мінеральної олії та/або рослинної олії та неіонних поверхнево-активних сполук, таких як блок-співполімери, Tween[®], Span[®]. Такі емульсії, зокрема, представлені емульсіями, описаними на сторінці 147 у книзі "Vaccine Design – The Subunit and Adjuvant Approach", Pharmaceutical Biotechnology, 1995, volume 6, edited by Michael F. Powell and Mark J. Newman, Plenum Press, New York and London, або TS-емульсії, зокрема, TS6-емульсія, і LF-емульсії, зокрема, LF2-емульсія (відносно та TS-, і LF-емульсій дивися WO-A-04/024027). Інші придатні допоміжні засоби представлені, наприклад, вітаміном Е, сапоніном та полімером зшитої акрилової або метакрилової кислоти, наприклад, Carborol[®] (Noveon; дивися WO-A-99/51269; WO-A-99/44633), Havlogen[®], гідрооксид алюмінію або алюмінію фосфат ("Vaccine Design, The subunit and adjuvant approach", Pharmaceutical Biotechnology, vol. 6, Edited by Michael F. Powell and Mark J. Newman, 1995, Plenum Press New York), біологічні допоміжні засоби (наприклад, C4b, зокрема, мишачий C4b (Ogata R T et al., J. Biol. Chem. 1989, 264(28): 16565-16572) або кінський C4b, GM-CSF, зокрема, кінський GM-CSF (US-A-6,645,740)), токсини (наприклад, холерні токсини CTA або CTB, термолабільні токсини *Escherichia coli* LTA або LTB (Olsen C W et al., Vaccine, 1997, 15(10): 1149-1156; Fingerut E et al., Vaccine, 2005, 23(38): 4685-4696; Zurbriggen R et al., Expert Rev Vaccines, 2003, 2(2): 295-304; Peppoloni S et al., Expert Rev Vaccines, 2003, 2(2): 285-293)), та CpG (наприклад, CpG #2395 (дивися Jurk M et al., Immunobiology 2004, 209(1-2): 141-154), CpG #2142 (дивися SEQ. ID. NO: 890 в EP-B1-1,221,955), CpG #2135, CpG #2007, CpG #2336). Полімери зшитої акрилової або метакрилової кислоти, особливо ті, які зшиті за допомогою простих поліалкенілових ефірів, цукрів або поліспиртів, відомі за назвою карбомерів (Pharmeuropa, vol. 8, no. 2, June 1996). Фахівець у даній галузі техніки також може звернутися до патенту США U.S. Patent No. 2,909,462, який пропонує такі акрилові полімери, зшиті за допомогою полігідроксильної сполуки, що має у своєму складі, щонайменше, три гідроксильні групи, бажано не більше ніж вісім таких груп, атоми водню, щонайменше, трьох гідроксильних груп замінені ненасиченими аліфатичними радикалами, які містять у своєму складі, щонайменше, два атоми вуглецю. Кращі радикали також містять від 2 до 4 атомів вуглецю, наприклад, це вініли, аліли та інші етиленові ненасичені групи. Ненасичені радикали можуть також містити інші замісники, такі як метил. Особливо придатними є продукти торгової марки Carborol[®] (Noveon). Вони зшиті за допомогою алілсахарози або за допомогою аліллпентаеритритолу. Серед них можна послатися на Carborol 974P, 934P, 934, 940 та 971P.

Імуногенні композиції та вакцини відповідно до винаходу можуть бути ліофільно висушеними, бажано зі стабілізатором. Ліофільне висушування можна проводити відповідно до добре відомих стандартних методів ліофільного висушування. Фармацевтично або рно-прийнятні стабілізатори можуть бути вуглеводами (наприклад, сорбітом, манітом, лактозою,

сахарозою, глюкозою, декстраном, трегалозою), глутаматом натрію (Tsvetkov T. et al., Cryobiology 1983, 20(3): 318-23; Israeli E et al., Cryobiology 1993, 30(5): 519-23), білками, такими як пептон, альбумін, лактоальбумін або казеїн, речовинами, які містять білки, такими як знежирене молоко (Mills C K et al., Cryobiology 1988, 25(2): 148-52; Wolff E et al., Cryobiology 1990, 27(5): 569-75), та буферами (наприклад, фосфатним буфером, фосфатним буфером лужних металів). Щоб розчиняти ліофілізовані препарати можна використовувати допоміжний засіб.

Перелік прикладів придатних олій включає, але не обмежується тільки ними, мінеральне олію, таке як парафінову олію, Drakeol[®] 6VR, Marcol[®] 80; Marcol[®] 52; терпенові олії, такі як сквален та сквалан; рослинні олії, такі як соєва олія, маслинова олія, кукурудзяна олія, олія жожоба, арахісова олія, бавовняна олія, соняшникова олія, сафролова олія, кунжутна олія, абрикосова олія, олія авокадо, олія зародків пшениці, олія канолі, лляна олія та мигдальна олія; рибацій жир, такий як жир акули, жир хорлостета, жир американського оселедця та жир печінки тріски; тваринні олії, такі як норкова олія, сало та курячий жир.

Перелік прикладів поверхнево-активних сполук, які застосовуються в емульсійних вакцинах, включає Arlacel[®] 80 (сорбітану моноолеат), Tween[®] 80 (Polysorbate 80), Span[®] 80, Span[®] 85, Arlacel[®] 83 (сорбітану сесквіолеат), Arlacel[®] 85 (сорбітану сесквіолеат) і, наприклад, Tween[®] 61 (поліоксietiленовий ефір сорбіту). Поверхнево-активні сполуки, придатні для емульсійних вакцин типу води-в-олії (тваринному та рослинному), включає, наприклад, неочищений жовтий та очищений бджолиний віск. Крім того, поверхнево-активні сполуки, придатні для вакцин, які містять сквален або сквалан, включають Arlacel[®] та Tween[®] 80.

Бажано допоміжний засіб представлений олією для утворення емульсії води-в-олії, який включає парафінову олію та поверхнево-активні сполуки, зокрема, парафінову олію, складний ефір поліспиртів та жирних кислот і складний ефір етоксильованих поліспиртів та жирних кислот.

Перелік тварин-птахів, які можуть бути вакциновані за допомогою способу запропонованого даним винаходом, включає курчат, курей, індиків, качок, каченят, гусей, гусенят, цесарок, фазанів, бентамок, перепілок, голубів.

Способи запропоновані даним винаходом відносяться, щонайменше, до одного первинного введення атенуованої імуногенної композиції або вакцини на основі Salmonella й, щонайменше, до одного бустерного введення імуногенної композиції або вакцини на основі інактивованої Salmonella. Тварина-птах одностеного віку може бути вакцинованим за допомогою способу запропонованого даним винаходом, це означає, що тварині-птахові одностеного віку можна робити єдине або перше первинне введення. Переважно єдине або перше первинне введення роблять тваринам-птахам у віці від одного дня до приблизно 28 днів, а більш бажано це введення здійснювати у віці від одного дня до приблизно 15 днів. Якщо проводять, щонайменше, два первинних введення, то ці первинні введення здійснюють бажано з інтервалом від 2 до 4 тижнів. Бустерне введення здійснюють через від 2 до 18 тижнів після єдиного або першого первинного введення, бажано через від 3 до 10 тижнів після єдиного або першого первинного введення, і ще краще через від 3 до 6 тижнів після єдиного або першого первинного введення. Якщо проводять, щонайменше, два бустерних введення, то ці бустерні введення здійснюють бажано з інтервалом від 2 до 12 тижнів.

У кращому втіленні способи запропоновані даним винаходом передбачають два первинних введення та два бустерних введення. Первинні введення здійснюють, бажано, з інтервалом від 2 до 4 тижнів. Перше бустерне введення проводять через від 6 до 10 тижнів після первинного введення, і, бажано, через від 8 до 10 тижнів після першого первинного введення. Друге бустерне введення проводять через від 14 до 18 тижнів після першого первинного введення, і, бажано, через від 15 до 16 тижнів після першого первинного введення.

В іншому кращому втіленні способи запропоновані даним винаходом передбачають два первинних введення та одне бустерне введення. Первинні введення проводять бажано з інтервалом від 2 до 4 тижнів. Бустерне введення проводять через від 6 до 18 тижнів після першого первинного введення, і бажано через від 6 до 16 тижнів після першого первинного введення, а ще краще через від 11 до 16 тижнів після першого первинного введення.

В іншому кращому втіленні способи запропоновані даним винаходом передбачають одне первинне введення та два бустерних введення. Перше бустерне введення проводять через від 2 до 10 тижнів після первинного введення, і, бажано, через від 3 до 6 тижнів після первинного введення. Друге бустерне введення проводять через від 12 до 18 тижнів після первинного введення, і, бажано, через від 14 до 16 тижнів після первинного введення.

В іншому кращому втіленні способи запропоновані даним винаходом передбачають одне первинне введення та одне бустерне введення. Бустерне введення проводять через від 2 до 18

тижнів після первинного введення, і, бажано, через від 3 до 10 тижнів після первинного введення, а ще краще, через від 3 до 6 тижнів після первинного введення.

Придатні способи введення імуногенних композицій або вакцин відповідно до способів запропонованих даним винаходом для первинного введення передбачають пероральні способи, наприклад, за допомогою питної води, або офтальмологічні шляхи, наприклад, за допомогою розпилення.

Дози атенуйованих імуногенних композицій або вакцин для первинного введення відповідно до способів запропонованих даним винаходом включають приблизно від 0,1 мл до приблизно 2,0 мл, бажано приблизно від 0,2 мл до приблизно 1,0 мл, а ще краще, приблизно від 0,4 мл до приблизно 0,6 мл. Ці дози містять приблизно від 10^6 колонієутворюючих одиниць на дозу (КУО/дозу) до приблизно 10^{10} КУО/дозу кожного штаму *Salmonella*, і бажано близько 10^8 КУО/дозу кожного штаму *Salmonella*. Якщо тварині-птахові вводять атенуйовану імуногенну композицію або вакцину з питною водою, то ці дози розбавляють приблизно від 1 мл до приблизно 5 мл питної води на тварину-птаха.

Перелік придатних шляхів введення імуногенних композицій або вакцин відповідно до способів запропонованих даним винаходом для бустерного введення включає підшкірні (SC) шляхи та внутрішньом'язеві (IM) шляхи. Імуногенну композицію або вакцину відповідно до способів запропонованих даним винаходом можна вводити за допомогою шприца з голкою або за допомогою безголкового пристосування (такого, наприклад, як Pigjet, Avijet, Dermojet, Vitajet або Biojector (Bioject, Oregon, USA), дивися US-A-2006/0034867).

Дози інактивованих імуногенних композицій або вакцин для бустерного введення відповідно до способів запропонованих даним винаходом можуть становити приблизно від 0,05 мл до приблизно 2,0 мл, бажано приблизно від 0,1 мл до, приблизно, 1,0 мл, а ще краще, приблизно, від 0,2 мл до, приблизно, 0,4 мл. Ці дози містять приблизно від 10^6 КУО/дозу перед інактивацією до приблизно 10^{10} КУО/дозу перед інактивацією кожного штаму *Salmonella* і, бажано, близько 10^8 КУО/дозу перед інактивацією кожного штаму *Salmonella*.

Інший аспект винаходу представлений набором для вакцинації тварин-птахів відповідно до даного винаходу. В одному втіленні набір включає, щонайменше, два флакони та вкладений аркуш із інструкціями щодо введення, перший флакон містить атенуйовану імуногенну композицію або вакцину на основі *Salmonella* для первинного введення відповідно до способів запропонованих даним винаходом, а другий флакон включає імуногенну композицію або вакцину на основі інактивованої *Salmonella* для бустерного введення відповідно до способів запропонованих даним винаходом. Необов'язково, набір може включати флакони, які включають атенуйовану імуногенну композицію або вакцину на основі *Salmonella* для багаторазового первинного введення, та/або флакони, які включають імуногенну композицію або вакцину на основі інактивованої *Salmonella* для багаторазового бустерного введення.

В іншому втіленні набір для вакцинації тварин-птахів включає, щонайменше, два флакони та вкладений аркуш із інструкціями щодо введення, перший флакон, який включає атенуйовану імуногенну композицію або вакцину на основі *Salmonella* D-групи, і другий флакон, який включає імуногенну композицію або вакцину на основі інактивованої *Salmonella* B-групи та інактивованої *Salmonella* D-групи. Необов'язково, набір може включати флакони, які включають атенуйовану імуногенну композицію або вакцину на основі *Salmonella* D-групи для багаторазового первинного введення, і/або флакони, які включають імуногенну композицію або вакцину на основі інактивованої *Salmonella* B-групи та інактивованої *Salmonella* D-групи для багаторазового бустерного введення.

Винахід тепер буде детально описано за допомогою наведених нижче необмежуючих прикладів.

Відомості, які підтверджують можливість здійснення винаходу

Приклад 1

Для одержання атенуйованої вакцини використали ауксотрофний за аденіном/гістидіном мутантний штам *Salmonella* Enteritidis фэготип 4 (PT4) з подвійним маркером, отриманий за допомогою N-метил-N'-нітро-N-нітрозогранідинового мутагенезу. Цей штам *Salmonella* був названий штамом E 3/49 (Martin G. et al., Berl. Munch. Tierarztl. Wschr., 1996, 109(10): 325-9).

Штам *Salmonella* E 3/49 культивували в неаерованому поживному, середовищі, яке містило дріжджовий екстракт, триптон, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$, $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ і воду для ін'єкції, pH $7,6 \pm 0,2$, протягом 18-24 годин при $37^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$. Культури стабілізували за допомогою 10 %-ного (об./об.) гліцерин, заповнювали контейнери аліквотами об'ємом 1,8 мл і зберігали при $-80^\circ\text{C} \pm 5^\circ\text{C}$.

Те ж саме поживне середовище додаванням глюкози використовували для культивування бактеріального штаму. Культури були неаерованими культурами протягом від 8 до 24 годин або культурами в колбах, які струшуються, протягом 8-16 годин при $37^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$. Інокулят становив

0,2-10 об. %.

Культури зберігали за температури від +2 °C до +8 °C до 4 днів.

Отримані бактерії збирали та розводили забуференим фізіологічним розчином залежно від кількості організмів та 20 %-ним (об./об.) розчином сахарози (максимальна концентрація 60 %).

5 Значення pH вакцини доводили до $7,0 \pm 0,5$ за допомогою NaOH або CH_3COOH .

Бактеріальну суспензію потім ліофілізували для зберігання.

10 Лотки поступово охолоджували до 0 °C від дна у напрямку нагору. Вакцину заморожували в ліофілізаторі за мінімальної температури -40 °C протягом приблизно 3-4 годин. Після того як досягався необхідний знижений тиск, починали основний процес висушування (температуру лотків контролювали при максимальному значенні, яке становило +10 °C), доти, доки не досягали температури продукту, яка дорівнювала +5 °C. Потім проводили вторинне висушування за максимальної температури в лотку +35 °C протягом максимально 12 годин.

Після висушування флакони заповнювали сухим стерильним азотом, автоматично закорковували, чистили та зберігали в холодній кімнаті.

15 В атенуйованій вакцині, отриманій після розчинення в 0,5 мл питної води для введення тварині-птахові, титр атенуйованої *Salmonella Enteritidis* становив 10^8 колонієутворюючих одиниць (КУО) на дозу.

Приклад 2

20 Для одержання інактивованої вакцини використовували два різних штами *Salmonella*: штам *Salmonella Enteritidis* PT 4 і штам *Salmonella Typhimurium* DT 104.

Кожен штам *Salmonella* культивували в триптиказному соєвому поживному бульйоні в 0,25 %-ному м'якому агарі (TSA).

25 Отриману бактерію збирали, розводили у воді для ін'єкції та заморожували за обраної температури -70 °C у поліетиленових пакетах у присутності кріопротектора (20 %-ного гліцерину та 5 %-ний сахарози) для зберігання.

30 Для інактивації штаму *Salmonella Enteritidis* PT 4, пакети, які містять штам *Salmonella Enteritidis* PT 4, розморожували та бактеріальну суспензію переносили в стерильний посуд. До бактеріальної суспензії додавали 35 %-ний розчин інактивуючого агента формальдегіду до концентрації 3,88 % (об'єм розчину формальдегіду/ об'єм культури). Після складання суміші шляхом перемішування суспензію переносили в інший стерильний посуд. Інактивацію проводили за умов перемішування, протягом 24 годин при 24 °C.

Для інактивації штаму *Salmonella Typhimurium* DT 104 проводили ту ж саму процедуру, яка була описана для штаму *Salmonella Enteritidis* PT 4.

35 Інактивовану бактерію зберігали за температури +5 °C +/- 3 °C до застосування в композиції.

Інактивовану бактерію *Salmonella Enteritidis* PT 4 та інактивовану бактерію *Salmonella Typhimurium* DT 104 змішували та складали композицію за допомогою емульсійного допоміжного засобу води-в-олії, який включає парафінову олію, складний ефір поліолу та жирної кислоти та складний ефір етоксильованого поліолу та жирної кислоти.

40 До кінцевого продукту додавали консервант (наприклад, тімеросал) у кінцевій концентрації 100 мкг на мл.

В інактивованій вакцині титр штаму *Salmonella Enteritidis* PT 4 становив $10^{8,3}$ КУО/дозу до інактивації, а для штаму *Salmonella Typhimurium* DT 104- 10^8 КУО/дозу до інактивації.

Приклад 3

45 У нульовий день дослідження D0 випадковим способом відбирали 30 одноденних SPF (які не містять специфічних патогенів) курчат, потім розділяли їх на три групи, по 10 курчат у кожній.

Групи позначали в такий спосіб:

– G.00 = контрольна група

– G.01 = атенуйована вакцина прикладу 1 (вік 1 день) + інактивована вакцина прикладу 2 (вік 21 день)

50 – G.02 = інактивована вакцина прикладу 2 (вік 21 день)

Після ідентифікації кожную групу розміщували в окремі секції аж до 53-го дня D53.

У нульовий день D0 тварин групи G.01 вакцинували однією дозою (щонайменше, 10^8 КУО) атенуйованої вакцини прикладу 1 об'ємом 0,5 мл за допомогою перорального способу, доставляючи вакцину безпосередньо в ротову порожнину.

55 На 21-день (D21) тварин групи G.01 і групи G.02 вакцинували за допомогою однієї дози інактивованої вакцини прикладу 2 за допомогою внутрішньом'язевого способу в ліву глибоку ділянку грудного м'яза в кількості 0,3 мл/дозу, титр *Salmonella Enteritidis* становив $10^{8,3}$ КУО на дозу перед інактивацією, титр *Salmonella Typhimurium* становив 10^8 КУО на дозу перед інактивацією.

60 Групу G.01 вакцинували останньою, щоб не допустити перехресного забруднення

атенуйованим вакцинним штамом.

На 49-ий день (D49) у всіх групах безпосередньо перед контрольним зараженням відбирали кров, потім проводили тестування зібраної сироватки крові на специфічні антитіла. Групи G.00, G.01 та G.02 аналізували за допомогою тесту IDEXX ELISA і за допомогою тесту Slow Agglutination Test (SAT).

За день до контрольного зараження (D48) за кімнатної температури розморожували одну аліквоту *Salmonella* Heidelberg (*Salmonella* групи B), потім суспендували в 100 мл триптонового середовища із соєвим поживним бульйоном фірми Bio Mérieux (TSB) та інкубували при 37 °C протягом 14 годин.

Отриману бактеріальну суспензію центрифугували, і осад штаму висівали на свіже попередньо прогріте середовище TSB та інкубували при 37 °C протягом оптимального часу росту (5 годин).

Як тільки титр зростаючої бактеріальної культури, яку оцінювали за допомогою оптичного поглинання (яке вимірювали при 620 нм), ставав досить високим і становив 10^9 КУО/0,2 мл, її використали для інфікування курчат.

Серійні 10-разові розведення інокулята в TSB висівали на триптиказо-соєвий агар (TSA) та інкубували 24 години при 37 °C для підрахунку в 3 повторях.

На 49-ий день (D49) всі групи заражали бульйонною культурою *Salmonella* Heidelberg з титром $10^{8,9}$ КУО в 0,2 мл. Кожне з курчат інфікували пероральним способом.

Через чотири дні після інфікування (D53) всіх курчат піддавали евтаназії. У стерильних умовах збирали зразки селезінки та сліпої кишки від кожного курчати та поміщували їх у попередньо позначені окремі пробірки. Після закінчення збору зразків пробірки обробляли для повторного виділення *Salmonella*.

- кожен селезінку подрібнювали в шприці на 10 мл і розводили в 10 мл забуференого водного розчину пептону (BPW),

- 200 мкл із розведення поміщували на чашку із середовищем XLT4 + ампіцилін (додаючи з розрахунку 50 мкг/мл) для підрахунку (посівний матеріал розподіляли поверхнею агару). Чашки інкубували при 37 °C протягом 48 годин.

Фаза попереднього збагачення (PE)

- всі розведення селезінки потім інкубували при 37 °C протягом 16-20 годин,

- повний обробці в наступних фазах піддавали тільки ті селезінки, які були негативними при прямому визначенні.

Фаза збагачення (E)

- інокуляція суспензії селезінок "PE" у соєвий бульйон Рапапорта–Василіадіса (RVS) у співвідношенні 1:100 (5 мкл в 500 мкл) та інкубація при 42 °C протягом 24 годин.

Селективне виділення

- культивування суспензії селезінок "E" на середовищі XLT4 + ампіцилін, потім інкубація при 37 °C протягом 48 годин – об'єм посіву 10 мкл. Типова колонія *Salmonella* була чорною або мала чорний центр; і якщо був присутній такий тип колонії, то зразок оцінювали як позитивний.

Результати виражали в ссу/орган.

Зібраний вміст сліпої кишки (близько 1 г) в асептичних умовах поміщували в стерильну пробірку, зважували та розводили 1:10 мас/об. у середовищі BPW аж до $10e^{-7}$.

Розведення 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-5} та 10^{-7} інкубували при 37 °C протягом 16-20 годин (PE) і потім проводили фазу збагачення (E) і селективного виділення так само, як для зразків селезінки.

Ідентифікували колонії *Salmonella* і відзначали позитивні чашки.

Результати повторного виділення аналізували в такий спосіб:

для селезінки:

- негативні зразки після попереднього збагачення та збагачення оцінювали як 0 ссу/орган,

- зразки, негативні при прямому культивуванні, які були позитивними після попереднього збагачення та збагачення оцінювали як 10 ссу/зразок,

для вмісту сліпої кишки:

- напівкількісний результат виражали в ссу/г вмісту органа за допомогою методу розведення та позитивності (тобто 50 мкл + 450 мкл аж до розведень 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-5} та 10^{-7} при позитивному результаті відповідали $10^{2,3}$, $10^{3,3}$, $10^{5,3}$ та $10^{7,3}$ ссу *Salmonella*/г вмісту сліпої кишки, відповідно).

Дані за титрами специфічних антитіл для всіх імунізованих і неімунізованих курчат через 4 тижні після вакцинації підсумовані в Таблиці 1.

Значення виражені за допомогою середніх геометричних титрів (GMT) для аналізу SAT і за допомогою середніх арифметичних титрів (AMT) для результатів S/N та IP тесту *Salmonella* Enteritidis ELISA.

Таблиця 1

Групи	SAT – GMT	SALMONELLA ENTERITIDIS ELISA – AMT	
	SALMONELLA TYPHIMURIUM	Співвідношення S/N	Одиниці IP
G.00	<10	0,72	28
G.01	197	0,37	63
G.02	171	0,41	59

Серологічні результати SAT та ELISA, отримані для невакцинованої групи, були постійно негативними.

5 Що стосується результатів SAT для Salmonella Typhimurium, то інактивована вакцина сама як така демонструвала постійну сероконверсію (171 одиниця SAT) з несподіваним синергічним ефектом (15,2 %) атенуйованої вакцини на основі Salmonella Enteritidis на компонент Salmonella Typhimurium (197 одиниць SAT).

10 Що стосується результатів тесту Salmonella Enteritidis ELISA у групах G.01 та G.02, то AMT демонструє більше значення одиниць IP (6,8 %) для атенуйованої плюс інактивованої вакцини, ніж для тільки інактивованої вакцини, 63 та 59, відповідно, з 10/10 позитивними результатами на групу.

15 Таблиця 2 підсумовує результати повторного виділення Salmonella Heidelberg із селезінок і вмісту сліпих кишок через 4 дні після інфекції (виражені у вигляді відношення позитивні проби/загальна кількість проб та \log_{10} ссу/селезінку або г).

Таблиця 2

Групи	Селезінка				Вміст сліпої кишки					
	-/Tot.	+/Tot. d. p.	+/Tot. a. e.	log ₁₀ ссу/ селезінку	-/Tot.	+/Tot. розведення а. е.				log ₁₀ ссу/ грам
						-2	-3	-5	-7	
G.00	3/10	3/10	4/10	1.2	0/10	10/10	10/10	7/10	0/10	4,7
G.01	10/10	0/10	0/10	0.0	2/10	8/10	1/10	0/10	0/10	1,9
G.02	8/10	1/10	1/10	0.3	0/10	10/10	8/10	1/10	0/10	3,5

-: негативні проби

+: позитивні проби

d. p.: пряме культивування

a. e.: після збагачення

20 Як зазначено в Таблиці 2, через 4 дні після інфекції штам для контрольного зараження Salmonella Heidelberg демонстрував свою здатність проникати та заселяти внутрішні органи контрольної групи з 0/10 негативними зразками та значною величиною підрахунку Salmonella, яка становила $10^{1,2}$ ссу/орган та $10^{4,7}$ ссу/г у селезінкі та вмісті сліпої кишки, відповідно.

25 Щодо результатів для селезінки, найкращий захист від зараження Salmonella Heidelberg був отриманий за допомогою інактивованої вакцини, об'єднаної з атенуйованою вакциною (G.01) з $\Delta = 10^{1,2}$ ссу/селезінку в порівнянні з контрольною групою. Значні результати були досягнуті в групі G.02 за допомогою застосування тільки інактивованої вакцини ($\Delta = 10^{0,9}$ ссу/селезінку в порівнянні з контрольною групою).

30 Щодо результатів для вмісту сліпої кишки, інактивована вакцина, об'єднана з атенуйованою вакциною (G.01), демонструвала дуже гарний рівень захисту з $\Delta = 10^{2,8}$ ссу/селезінку в порівнянні з контрольною групою. Інактивована вакцина демонструвала значний рівень захисту вмісту сліпої кишки з $\Delta = 10^{1,2}$ у порівнянні з контрольною групою.

35 Серологічні результати для групи G.01 показали синергічний ефект ін'єкції атенуйованої вакцини в перший день життя на сероконверсію інактивованої вакцини. Обумовлений кількісно праймінг-ефект становив 6,8 % для компонента Salmonella Enteritidis (63 одиниці ELISA IP) і несподівано 15,2 % для компонента Salmonella Typhimurium (197 одиниць SAT) у порівнянні із застосуванням тільки інактивованої вакцини.

40 Інактивована вакцина разом з атенуйованою вакциною демонструвала повний захисний ефект у відношенні селезінки та також проти інвазії вмісту сліпої кишки Salmonella Heidelberg у порівнянні з самою інактивованою вакциною як такою з $\Delta = 10^{1,2}$ ссу/селезінку та $\Delta = 10^{2,8}$ ссу/грам вмісту сліпої кишки в порівнянні з контрольними результатами. Серед груп існує виразне посилення захисту, індуковане попередньою імунізацією атенуйованою вакциною на основі Salmonella Enteritidis, відносно інактивованої вакцини Salmonella Enteritidis+Salmonella

Typhimurium.

Приклад 4

Проводили експеримент, аналогічний до експерименту, описаного в прикладі 3, з тією лише різницею, що штамом *Salmonella* для контрольного зараження була не *Salmonella* Heidelberg, а *Salmonella* Infantis.

Дані за титрами специфічних антитіл для всіх імунізованих та неімунізованих курчат через 4 тижні після вакцинації підсумовані в Таблиці 3.

Значення виражені за допомогою середніх геометричних титрів (GMT) для аналізу SAT і за допомогою середніх арифметичних титрів (AMT) для результатів S/N та IP тесту *Salmonella* Enteritidis ELISA.

Таблиця 3

Групи	SAT – GMT	SALMONELLA ENTERITIDIS ELISA – AMT	
	SALMONELLA TYPHIMURIUM	Співвідношення S/N	Одиниці IP
G.00	<10	1,27	00
G.01	184	0,40	60
G.02	139	0,44	56

Серологічні результати SAT та ELISA, отримані для невакцинованої групи, були постійно негативними.

Що стосується результатів SAT для *Salmonella* Typhimurium, то інактивована вакцина сама як така демонструвала постійну сероконверсію (139 одиниць SAT) з несподіваним синергічним ефектом атенуйованої вакцини на основі *Salmonella* Enteritidis на компонент *Salmonella* Typhimurium (184 одиниць SAT).

Що стосується результатів тесту *Salmonella* Enteritidis ELISA у групах G.01 та G.02, то AMT демонструє більше значення одиниць IP для атенуйованої плюс інактивованої вакцини, ніж тільки для інактивованої вакцини, 60 та 56, відповідно, з 10/10 позитивними результатами на групу.

Таблиця 4 підсумовує результати повторного виділення *Salmonella* Infantis із селезінок і вмісту сліпих кишків через 7 днів після інфекції (виражені у вигляді відношення позитивні проби/загальна кількість проб та \log_{10} ссу/селезінку або г).

Таблиця 4

Групи	Селезінка				Вміст сліпої кишки				
	-/Tot.	+/Tot. d. p.	+/Tot. a. e.	\log_{10} ссу/ селезінку	-/Tot.	+/Tot. розведення а. е.			\log_{10} ссу/ грам
						-5	-7		
G.00	0/10	9/10	1/10	2,3	0/10	10/10	4/10		6,1
G.01	5/10	3/10	2/10	0,9	1/10	1/10	0/10		2,9
G.02	5/10	2/10	3/10	0,7	0/10	3/10	0/10		3,9

-: негативні проби

+: позитивні проби

d. p.: пряме культивування

a. e.: після збагачення

Як зазначено в Таблиці 4, через 7 днів після інфекції штам для контрольного зараження *Salmonella* Infantis демонстрував свою здатність проникати та заселяти внутрішні органи контрольної групи з 0/10 негативними зразками та значною величиною підрахунку *Salmonella*, яка становила $10^{2,3}$ ссу/орган та $10^{6,1}$ ссу/г у селезінкі та вмісті сліпої кишки, відповідно.

Щодо результатів для селезінок, гарний захист від зараження *Salmonella* Infantis був отриманий за допомогою інактивованої вакцини, об'єднаної з атенуйованою вакциною (G.01) с $\Delta = 10^{1,4}$ ссу/селезінку в порівнянні з контрольною групою.

Щодо результатів для вмісту сліпої кишки, інактивована вакцина, об'єднана з атенуйованою вакциною (G.01), демонструвала дуже гарний рівень захисту з $\Delta = 10^{3,2}$ ссу/селезінку в порівнянні з контрольною групою. Інактивована вакцина демонструвала значний рівень захисту вмісту сліпої кишки з $\Delta = 10^{2,2}$ у порівнянні з контрольною групою.

Серологічні результати для групи G.01 показали синергічний ефект ін'єкції атенуйованої вакцини в перший день життя на сероконверсію інактивованої вакцини. Обумовлений кількісно

праймінг-ефект становив 7 % для компонента *Salmonella Enteritidis* (60 одиниць ELISA IP) і 32 % для компонента *Salmonella Typhimurium* (184 одиниці SAT) у порівнянні із застосуванням тільки інактивованої вакцини.

- 5 Інактивована вакцина разом з атенуйованою вакциною демонструвала більш виражений захисний ефект, головним чином, відносно вмісту сліпої кишки ($\Delta = 10^{3,2}$ ссу/грам) і подібний захист самою інактивованою вакциною як такою відносно селезінки з $\Delta = 10^{1,4}$ ссу/орган у порівнянні з контрольними результатами.

Приклад 5

- 10 Проводили експеримент, аналогічний до експерименту, описаного в прикладі 3, з тією лише різницею, що штамом *Salmonella* для контрольного зараження була не *Salmonella Heidelberg*, а *Salmonella Virchow*.

Дані за титрами специфічних антитіл для всіх імунізованих і неімунізованих курчат через 4 тижні після вакцинації підсумовані в Таблиці 5.

- 15 Значення виражені за допомогою середніх геометричних титрів (GMT) для аналізу SAT і за допомогою середніх арифметичних титрів (AMT) для результатів S/N та IP тесту *Salmonella Enteritidis* ELISA.

Таблиця 5

Групи	SAT – GMT	SALMONELLA ENTERITIDIS ELISA – AMT	
	SALMONELLA TYPHIMURIUM	Співвідношення S/N	Одиниці IP
G.00	<10	1,07	00
G.01	160	0,44	56
G.02	149	0,50	50

- 20 Серологічні результати SAT та ELISA, отримані для невакцинованої групи, були постійно негативними.

Що стосується результатів SAT для *Salmonella Typhimurium*, то інактивована вакцина сама як така демонструвала постійну сероконверсію (149 одиниць SAT) з несподіваним синергічним ефектом атенуйованої вакцини на основі *Salmonella Enteritidis* на компонент *Salmonella Typhimurium* (160 одиниць SAT).

- 25 Що стосується результатів тесту *Salmonella Enteritidis* ELISA у групах G.01 та G.02, То AMT демонструє більше значення одиниць IP для атенуйованої плюс інактивованої вакцини, ніж тільки для інактивованої вакцини, 56 та 50, відповідно, з 10/10 позитивними результатами на групу.

- 30 Таблиця 6 підсумовує результати повторного виділення *Salmonella Virchow* із селезінок та вмісту сліпих кишків через 4 дні після інфекції (виражені у вигляді відношення позитивні проби/загальна кількість проб та \log_{10} ссу/селезінку або г).

Таблиця 6

Групи	Селезінка				Вміст сліпої кишки				
	-/Tot.	+/Tot. d. p.	+/Tot. a. e.	\log_{10} ссу/ селезінку	-/Tot.	+/Tot. розведення а. е.			\log_{10} ссу/ грам
							-5	-7	
G.00	0/10	8/10	2/10	2,4	0/10		10/10	6/10	6,5
G.01	9/10	0/10	1/10	0,1	0/10		5/10	1/10	4,5
G.02	6/10	2/10	2/10	0,6	0/10		8/10	3/10	5,5

-: негативні проби

- 35 +: позитивні проби

d. p.: пряме культивування

a. e.: після збагачення

- 40 Як зазначено в Таблиці 6, через 4 дні після інфекції штам для контрольного зараження *Salmonella Virchow* демонстрував свою здатність проникати та заселяти внутрішні органи контрольної групи з 0/10 негативними зразками та значною величиною підрахунку *Salmonella*, яка становить $10^{2,4}$ ссу/орган та $10^{6,5}$ ссу/г у селезінці та вмісті сліпої кишки, відповідно.

Щодо результатів для селезінки, найкращий захист від зараження *Salmonella Virchow* був отриманий за допомогою інактивованої вакцини, об'єднаної з атенуйованою вакциною (G.01) с

$\Delta = 10^{2,3}$ ссу/селезінку в порівнянні з контрольною групою. Гарні результати були досягнуті також у групі G:02 за допомогою застосування тільки інактивованої вакцини ($\Delta = 10^{1,8}$ ссу/селезінку в порівнянні з контрольною групою).

Щодо результатів для вмісту сліпої кишки, інактивована вакцина, об'єднана з атенуйованою вакциною (G.01), демонструвала дуже гарний рівень захисту з $\Delta = 10^{2,0}$ ссу/селезінку в порівнянні з контрольною групою. Інактивована вакцина демонструвала значний рівень захисту вмісту сліпої кишки з $\Delta = 10^{1,0}$ у порівнянні з контрольною групою.

Серологічні результати для групи G.01 показали синергічний ефект ін'єкції атенуйованої вакцини в перший день життя на сероконверсію інактивованої вакцини. Обумовлений кількісно праймінг-ефект становив 12 % для компонента *Salmonella Enteritidis* (56 одиниць ELISA IP) і несподівано 7,4 % для компонента *Salmonella Typhimurium* (160 одиниць SAT) у порівнянні із застосуванням тільки інактивованої вакцини.

Інактивована вакцина разом з атенуйованою вакциною демонструвала більш виражений захисний ефект головним чином у відношенні захисту селезінки, але також проти інвазії вмісту сліпої кишки *Salmonella Virchow* у порівнянні з самою інактивованою вакциною як такою з $\Delta = 10^{2,3}$ ссу/селезінку та $\Delta = 10^{2,0}$ ссу/грам вмісту сліпої кишки в порівнянні з контрольними результатами.

Приклад 6

Проводили експеримент, аналогічний до експерименту, описаного в прикладі 3, з тією лише різницею, що штамом *Salmonella* для контрольного зараження була не *Salmonella Heidelberg*, а *Salmonella Hadar*. Кінцеве титрування інокулама для контрольного зараження склало 10^9 КУО/0,2 мл.

Дані за титрами специфічних антитіл для всіх імунізованих і неімунізованих курчат через 4 тижні після вакцинації підсумовані в таблиці 7.

Значення виражені за допомогою середніх геометричних титрів (GMT) для аналізу SAT і за допомогою середніх арифметичних титрів (AMT) для результатів S/N та IP тесту *Salmonella Enteritidis* ELISA.

Таблиця 7

Групи	SAT – GMT	SALMONELLA ENTERITIDIS ELISA – AMT	
	SALMONELLA TYPHIMURIUM	Співвідношення S/N	Одиниці IP
G.00	<10	0,88	12
G.01	211	0,42	58
G.02	171	0,49	51

Серологічні результати SAT та ELISA, отримані для невакцинованої групи, були постійно негативними.

Що стосується результатів SAT для *Salmonella Typhimurium*, то інактивована вакцина сама як така демонструвала постійну сероконверсію (171 одиниця SAT) з несподіваним синергічним ефектом атенуйованої вакцини на основі *Salmonella Enteritidis* на компонент *Salmonella Typhimurium* (211 одиниць SAT).

Що стосується результатів тесту *Salmonella Enteritidis* ELISA у групах G.01 та G.02, то AMT демонструє більше значення одиниць IP (6,8 %) для атенуйованої плюс інактивованої вакцини, ніж тільки для інактивованої вакцини, 58 та 51, відповідно, з 10/10 позитивними результатами на групу.

Таблиця 8 підсумовує результати повторного виділення *Salmonella Hadar* із селезінок і вмісту сліпих кишок через 4 дні після інфекції (виражені у вигляді відношення позитивні проби/загальна кількість проб та \log_{10} ссу/селезінку або г).

Таблиця 8

Групи	Селезінка				Вміст сліпої кишки				
	-/Tot.	+/Tot. d. p.	+/Tot. a. e.	\log_{10} ссу селезінка	-/Tot.	+/Tot. розведення а. е.			\log_{10} ссу грам
								-5	
G.00	2/10	4/10	4/10	1,3	0/10			9/10	5,1
G.01	6/10	0/10	4/10	0,4	0/10			5/10	4,3
G.02	3/10	4/10	3/10	1,1	0/10			5/10	4,3

- : негативні проби
 +: позитивні проби
 d. p.: пряме культивування
 а. е.: після збагачення

Як зазначено в Таблиці 8, через 4 дні після інфекції штам для контрольного зараження *Salmonella* Hadar демонстрував свою здатність проникати та заселяти внутрішні органи контрольної групи з 2/10 та 0/10 негативними зразками та значною величиною підрахунку *Salmonella*, яка становить $10^{1,3}$ ссу/орган та $10^{5,1}$ ссу/г у селезінці та вмісті сліпої кишки, відповідно.

Що стосується результатів для селезінки, то найкращий захист від зараження *Salmonella* Hadar був отриманий за допомогою інактивованої вакцини, об'єднаної з атенуйованою вакциною (G.01) с $\Delta = 10^{0,9}$ ссу/селезінку в порівнянні з контрольною групою. Незначні результати були досягнуті також у групі G:02 за допомогою застосування тільки інактивованої вакцини ($\Delta = 10^{0,2}$ ссу/селезінку в порівнянні з контрольною групою).

Що стосується результатів для вмісту сліпої кишки, то інактивована вакцина, об'єднана з атенуйованою вакциною (G.01) або інактивованою вакциною (G.02), демонструвала однаковий рівень захисту з $\Delta = 10^{0,8}$ ссу/селезінку в порівнянні з контрольною групою.

Серологічні результати для групи G.01 показали синергічний ефект ін'єкції атенуйованою вакциною в перший день життя на сероконверсію інактивованої вакцини. Обумовлений кількісно праймінг-ефект становив 14 % для компонента *Salmonella* Enteritidis (58 одиниць ELISA IP) і несподівано 23 % для компонента *Salmonella* Typhimurium (211 одиниць SAT) у порівнянні із застосуванням тільки інактивованої вакцини.

Інактивована вакцина разом з атенуйованою вакциною демонструвала більш виражений захисний ефект, головним чином, проти інвазії вмісту сліпої кишки *Salmonella* Hadar у порівнянні з самою інактивованою вакциною як такою в порівнянні з контрольними результатами.

Таблиця 9 підсумовує результати прикладів 3-6 щодо виділення *Salmonella* із селезінки інфікованих курчат після контрольного зараження гетерологічним сероваром *Salmonella*.

Таблиця 9

Кількість зразків селезінки для виявлення позитивних проб/негативних проб після контрольного зараження для різних типів обробки

Оброблювані групи	Позитивні селезінки	Негативні селезінки	Всього
Атенуйована + інактивована вакцина	10	30	40
Тільки інактивована вакцина	18	22	40
Всього	28	52	80

Ці результати показують достовірну різницю з ризиком 6,5 % в K2-тесті та достовірну різницю з одностороннім ризиком 5 % у точному тесті Фішера між групою, вакцинованою двічі відповідно до способу запропонованого даним винаходом (наприклад, перший раз атенуйованою вакциною на основі *Salmonella* і другий раз інактивованою вакциною на основі *Salmonella*), і групою, вакцинованою тільки інактивованою вакциною на основі *Salmonella*.

Спосіб застосування первинного введення атенуйованої вакцини на основі *Salmonella* Enteritidis (група D) підвищував ефективність бівалентної олійної інактивованої вакцини на основі *Salmonella* Enteritidis/*Salmonella* Typhimurium проти контрольного зараження гетерологічним сероваром із групи B, а також із груп C1 та C2, які не були присутніми в застосованих вакцинних складах. Це посилення значною мірою було продемонстроване за допомогою зниження інвазії селезінки після контрольного зараження гетерологічним сероваром *Salmonella*, шляхом порівняння із групою, двічі вакцинованою відповідно до способу запропонованого даним винаходом, і групою, вакцинованою тільки інактивованою вакциною на основі *Salmonella*.

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

1. Спосіб вакцинації птахів проти *Salmonella*, який передбачає:

щонайменше одне первинне введення атенуйованої імунотенної композиції або вакцини, яка включає фармацевтично або ветеринарно прийнятний ексципієнт, розріджувач або середовище й щонайменше одну атенуйовану *Salmonella*, які вводять тварині-птахів перед щонайменше

одним бустерним введенням інактивованої імуногенної композиції або вакцини, яка включає фармацевтично або ветеринарно прийнятний ексципієнт, розріджувач або середовище, і щонайменше одну інактивовану Salmonella,

5 де щонайменше одну атенуйовану Salmonella або щонайменше одну інактивовану Salmonella вибирають із Salmonella B-групи та щонайменше одну атенуйовану Salmonella або щонайменше одну інактивовану Salmonella вибирають із Salmonella D-групи, відповідно до якого первинне введення та бустерне введення здійснюють із інтервалом в 2-18 тижнів.

2. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що Salmonella B-групи включає Salmonella Typhimurium, Salmonella Braenderup, Salmonella Agona, Salmonella Bredeney, Salmonella Heidelberg, Salmonella Indiana, Salmonella Saint-Paul, Salmonella Brandenburg.

3. Спосіб за п. 2, який **відрізняється** тим, що щонайменше одна атенуйована Salmonella або щонайменше одна інактивована Salmonella з Salmonella B-групи є Salmonella Typhimurium.

4. Спосіб за п. 3, який **відрізняється** тим, що Salmonella D-групи включає Salmonella Enteritidis, Salmonella Panama, Salmonella Dublin, Salmonella Gallinarum, Salmonella Pullorum.

15 5. Спосіб за п. 4, який **відрізняється** тим, що щонайменше одна атенуйована Salmonella або щонайменше одна інактивована Salmonella з Salmonella D-групи є Salmonella Enteritidis.

6. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що щонайменше одна атенуйована Salmonella є Salmonella D-групи, щонайменше одна інактивована Salmonella є Salmonella B-групи;

20 спосіб, крім того, передбачає щонайменше одне введення Salmonella D-групи в проміжку приблизно від 2 до приблизно 18 тижнів після введення щонайменше однієї інактивованої Salmonella B-групи.

7. Спосіб вакцинації птахів проти Salmonella, який передбачає:

25 щонайменше одне первинне введення інактивованої імуногенної композиції або вакцини, яка включає фармацевтично або ветеринарно прийнятний ексципієнт, розріджувач або середовище й щонайменше одну інактивовану Salmonella, які вводять тварині-птахів перед щонайменше одним бустерним введенням атенуйованої імуногенної композиції або вакцини, яка включає фармацевтично або ветеринарно прийнятний ексципієнт, розріджувач або середовище, і щонайменше одну атенуйовану Salmonella,

30 щонайменше одну атенуйовану Salmonella або щонайменше одну інактивовану Salmonella вибирають із Salmonella B-групи та, принаймні, одну атенуйовану Salmonella, або принаймні одну інактивовану Salmonella вибирають з Salmonella D-групи, згідно якого первинне введення та бустерне введення здійснюють з інтервалом у 2-18 тижнів.

8. Спосіб за п. 7, який **відрізняється** тим, що Salmonella B-групи включає Salmonella Typhimurium, Salmonella Braenderup, Salmonella Agona, Salmonella Bredeney, Salmonella Heidelberg, Salmonella Indiana, Salmonella Saint-Paul, Salmonella Brandenburg.

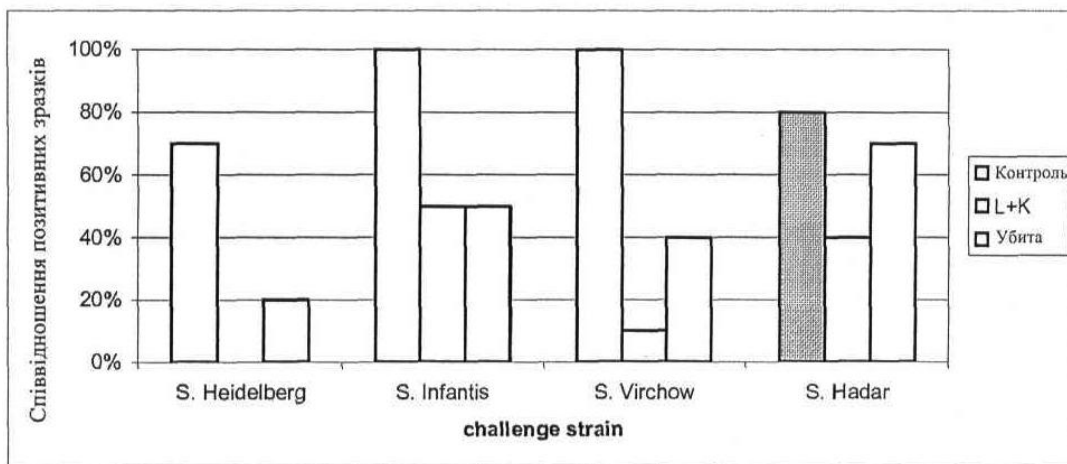
35 9. Спосіб за п. 8, який **відрізняється** тим, що щонайменше одна атенуйована Salmonella або щонайменше одна інактивована Salmonella з Salmonella B-групи є Salmonella Typhimurium.

10. Спосіб за п. 7, який **відрізняється** тим, що Salmonella D-групи включає Salmonella Enteritidis, Salmonella Panama, Salmonella Dublin, Salmonella Gallinarum, Salmonella Pullorum.

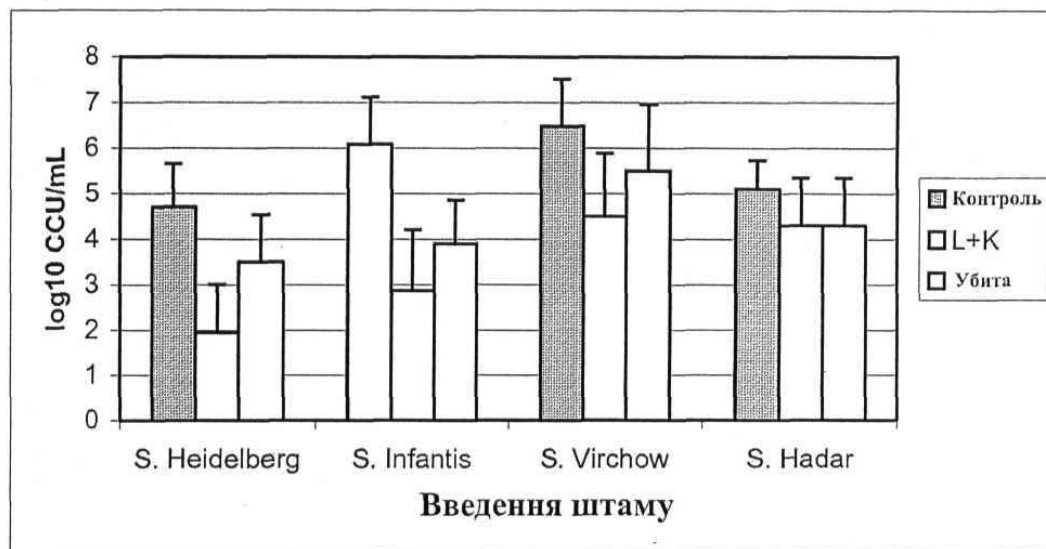
40 11. Спосіб за п. 10, який **відрізняється** тим, що щонайменше одна атенуйована Salmonella або щонайменше одна інактивована Salmonella з Salmonella D-групи є Salmonella Enteritidis.

12. Спосіб за п. 11, який **відрізняється** тим, що атенуйовані бактерії Salmonella D-групи представлені Salmonella Enteritidis, інактивовані бактерії Salmonella B-групи представлені Salmonella Typhimurium та інактивовані бактерії Salmonella D-групи представлені Salmonella Enteritidis.

45



Фіг. 1



Фіг. 2

Комп'ютерна верстка Л.Литвиненко

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Урицького, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут промислової власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601