



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК  
A61K 39/116 (2021.08); A61P 31/04 (2021.08)

(21)(22) Заявка: 2021111697, 23.04.2021

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
23.04.2021

Дата регистрации:  
07.12.2021

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 23.04.2021

(45) Опубликовано: 07.12.2021 Бюл. № 34

Адрес для переписки:

125212, Москва, ул. Адмирала Макарова, 10,  
ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского  
Роспотребнадзора, патентный отд.

(72) Автор(ы):

Алипер Тарас Иванович (RU),  
Капустин Андрей Владимирович (RU),  
Лаишевцев Алексей Иванович (RU),  
Терехов Павел Юрьевич (RU),  
Шемельков Евгений Владимирович (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Общество с ограниченной ответственностью  
"Ветбиохим" (RU)

(56) Список документов, цитированных в отчете  
о поиске: RU 2179861C2, 27.02.2002.  
Инструкция против сальмонеллеза,  
пастереллеза, стрептококкоза поросят  
"ВЕРРЕС-СПС", - ООО "Ветбиохим", стр. 1-  
3; 29.02.2016., найдено в интернет 22.09.2021,  
адрес сайта: [https://www.vidal.ru/veterinar/  
verres-sps-29780#composition](https://www.vidal.ru/veterinar/verres-sps-29780#composition). RU 2118169 C1,  
27.08.1998.

(54) Поливалентная инактивированная вакцина против стрептококкозов свиней, способ ее получения и применения

(57) Реферат:

Группа изобретений относится к области биотехнологии. Предлагаемая вакцина против стрептококкозов свиней поливалентная инактивированная содержит в своем составе следующие компоненты из расчета на одну иммунизирующую дозу препарата (2 см<sup>3</sup>): инактивированные формалином протективные антигены штаммов *Streptococcus suis* № УР-4-ВБХ - 3,5 млрд. мкр. кл.; *Streptococcus porcinus* УР-3-ВБХ - 3,5 млрд. мкр. кл.; *Streptococcus pyogenes* ОБ-4-ВБХ - 3,5 млрд. мкр. кл.; *Streptococcus dysgalactiae* УР-16-ВБХ - 3,5 млрд. мкр. кл., а также фармацевтически приемлемые целевые добавки. Способ получения вакцины включает культивирование производственных штаммов; инактивацию культуральной жидкости; концентрирование антигенов; определение полноты инактивации антигенов; составление

серии вакцины; контроль стерильности вакцины и безвредности вакцины; определение иммуногенной и антигенной активности вакцины. Вакцина применяется в качестве профилактического средства при введении супоросным свиноматкам внутримышечно в область верхней трети шеи (за ухом) в дозе 2 мл двукратно: первый раз - за 50-55 суток до опороса, второй раз - за 25-30 суток до опороса. В последующем вакцину вводят за 25-30 суток до каждого последующего опороса однократно в той же дозе. Не допускается проведение вакцинации свиноматок позже чем за 25-30 суток до опороса, а также лактирующих животных. Поросят вакцинируют, начиная с 14-дневного возраста. Вакцину вводят внутримышечно в бедренную группу мышц двукратно с интервалом 21-24 дня в дозе 2 мл, дополнительную

ревакцинацию проводят в возрасте 4 мес. однократно. Вакцина обладает усиленной иммуногенной и антигенной активностью, индуцирует напряженный и продолжительный иммунитет у свиней против стрептококкозов,

вызванных видами *S. suis*, *S. dysgalactiae*, *S. rogcinus* и *S. pyogenes*, что значительно отличает ее от существующих вакцин данного направления. 3 н. и 5 з.п. ф-лы, 5 табл., 7 пр.

R U 2 7 6 1 3 7 9 C 1

R U 2 7 6 1 3 7 9 C 1



FEDERAL SERVICE  
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.  
*A61K 39/116* (2006.01)  
*A61P 31/04* (2006.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC

*A61K 39/116 (2021.08); A61P 31/04 (2021.08)*(21)(22) Application: **2021111697, 23.04.2021**(24) Effective date for property rights:  
**23.04.2021**Registration date:  
**07.12.2021**

Priority:

(22) Date of filing: **23.04.2021**(45) Date of publication: **07.12.2021 Bull. № 34**

Mail address:

**125212, Moskva, ul. Admirala Makarova, 10,  
FBUN MNIEM im. G.N. Gabrichevskogo  
Rospotrebnadzora, patentnyj otd.**

(72) Inventor(s):

**Aliper Taras Ivanovich (RU),  
Kapustin Andrej Vladimirovich (RU),  
Laishevtsev Aleksej Ivanovich (RU),  
Terekhov Pavel Yurevich (RU),  
Shemelkov Evgenij Vladimirovich (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Obshchestvo s ogranichennoj otvetstvennostyu  
"Vetbiokhim" (RU)**

(54) **POLYVALENT INACTIVATED VACCINE AGAINST SWINE STREPTOCOCCOSIS, METHOD FOR ITS PRODUCTION AND USE**

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology.

SUBSTANCE: inventions group relates to the field of biotechnology. The proposed vaccine against swine streptococcosis, polyvalent inactivated, contains the following components per one immunizing dose of the drug (2 cm<sup>3</sup>): formalin-inactivated protective antigens of *Streptococcus suis* strains No. UR-4-VBH - 3.5 billion mcr. cl.; *Streptococcus porcinus* UR-3-VBH - 3.5 billion mcr. cl.; *Streptococcus pyogenes* OB-4-VBH - 3.5 billion mcr. cl.; *Streptococcus dysgalactiae* UR-16-VBK<sub>h</sub> - 3.5 billion mcr. cl., as well as pharmaceutically acceptable target additives. The method for obtaining a vaccine includes the cultivation of industrial strains; inactivation of the culture fluid; concentration of antigens; determination of the completeness of antigen inactivation; preparation of a vaccine batch; control of the sterility of the vaccine and the safety of the vaccine; determination of the immunogenic and antigenic activity of the vaccine. The vaccine is used as a prophylactic agent when

administered to pregnant sows intramuscularly in the upper third of the neck (behind the ear) in a dose of 2 ml twice: the first time - 50-55 days before farrowing, the second time - 25-30 days before farrowing. Subsequently, the vaccine is administered 25-30 days before each subsequent farrowing once in the same dose. It is not allowed to vaccinate sows later than 25-30 days before farrowing, as well as lactating animals. Piglets are vaccinated starting at 14 days of age. The vaccine is injected intramuscularly into the femoral muscle group twice with an interval of 21-24 days at a dose of 2 ml, additional revaccination is carried out at the age of 4 months. once.

EFFECT: vaccine has enhanced immunogenic and antigenic activity, induces intense and long-term immunity in pigs against streptococcosis caused by *S. suis*, *S. dysgalactiae*, *S. porcinus* and *S. pyogenes* species, which significantly distinguishes it from the existing vaccines of this direction.

8 cl, 5 tbl, 7 ex

Группа изобретений относится к ветеринарии, а именно к ветеринарной микробиологии и биотехнологии и может быть использована в свиноводстве для обеспечения эпизоотического благополучия по стрептококкозам, вызванным *Streptococcus suis*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus porcinus* и *Streptococcus dysgalactiae*.

5 Стрептококкозы являются целой группой инфекционных заболеваний, широко распространенной в свиноводстве, свойственной для различных возрастных и физиологических групп животных [Спиридонов А.Г. и др. Этиология инфекционных диарей новорожденных поросят и телят / Ветеринарная медицина. 2011. В. 95. С. 264-265; Ефанова Л.И. и др. Этиологическая структура факторных инфекций свиней и крупного рогатого скота в хозяйствах ЦЧЗ России / Вестник Курской ГСХА, 2012. №12. С. 71-72; Малик Е.В. Этиологическая структура стрептококкозов свиней / Автореферат диссертации на соискание ученой степени к.в.н./ 2000 г., с. 28; Панин А.Н. Стрептококкозы свиней / Диссертация на соискание ученой степени д.в.н. / 1992 г., с. 45]. Основные экономические потери формируются за счет падежа и выбраковки поросят, снижения продуктивности свиноматок из-за возникающих маститов и эндометритов, снижения привесов, а также повышения затрат на проведение лечебно-профилактических мероприятий [Манжурина О.А., Скогорева А.М., Пархоменко Ю.С., Чернышова И.С., Семенова Е.В. Изучение резистентности к антибактериальным препаратам *Streptococcus suis* на свиноводческом комплексе Белгородской области // В сборнике: Ветеринарно-санитарные аспекты качества и безопасности сельскохозяйственной продукции Материалы II-й международной конференции по ветеринарно-санитарной экспертизе. 2017. С. 175-179].

Стрептококкозы на свиноводческих предприятиях часто становятся причиной развития артритов, омфалитов, менингитов, маститов, септицемии, лимфаденита, пневмонии и других поражений. При этом сама группа инфекций относится к факторным и, как правило, проявляется на фоне первичных вирусных или бактериальных инфекций, микоплазмоза, стрессов и нарушения зооветеринарных норм содержания [Капустин А.В., Лаишевцев А.И. Современная этиологическая структура стрептококкозов свиней // В сборнике: Единый мир - единое здоровье 2018. С. 218-220].

В свою очередь, обеспечение эпизоотического благополучия свинокомплексов является важной задачей для ветеринарной службы. В данном случае проблема может быть решена двумя способами, первый из которых - использование антибактериальных препаратов для лечения, а второй - использование средств специфической профилактики. На фоне широкого распространения антибиотикорезистентности, в том числе у микроорганизмов рода *Streptococcus*, первый вариант является малоэффективным [Lebel G., Piche F., Frenette M., Grenier D., Gottschalk M. Antimicrobial activity of Nisin against the swine pathogen *Streptococcus suis* and its synergistic interaction with antibiotics Peptides. 2013. Т. 50. С. 19-23]. Использование средств специфической профилактики (вакцин) является более перспективным, чем антибиотикотерапия. Важным условием в достижении высокой протективной активности вакцины, является ее антигенный состав, который должен быть ориентирован на современные эпизоотические данные и этиологическую структуру стрептококкозов.

В настоящее время уже разработан и активно применяется ряд иммунобиологических средств против рассматриваемой патологии, но все они имеют ограниченный антигенный состав и в полной мере не ориентированы на этиологическую структуру инфекции. Кроме того, антигенный состав вакцин по стрептококковому компоненту не актуализировался уже последние 30-35 лет, а это привело к тому, что в препараты включены виды стрептококков, не имеющие на сегодняшний день первостепенного

этиологического значения, например *Streptococcus zooepidemicus*, но при этом в вакцинах нет многих актуальных видов [Terekhov P.Yu., Matyash E.A., Yakimova E.A., Kapustin A.V., Belyaeva A.S., Laishevtsev A.I. A new look at the etiological structure of pig streptococcosis // В сборнике: IOP Conference Series: Earth and Environmental Science conference proceedings. Krasnoyarsk Science and Technology City Hall of the Russian Union of Scientific and Engineering Associations. 2020. С. 32052]. Так, зарегистрированные препараты содержат в своем составе антигены *Streptococcus suis* и *Streptococcus zooepidemicus* несмотря на то, что в последние годы исследованиями доказано существенное изменение этиологической структуры инфекции. Наиболее часто от заболевших и павших поросят с типичным клинико-морфологическим проявлением стрептококковой инфекции выделяются: *Streptococcus dysgalactiae* и *Streptococcus massiliensis* в 50% предприятий; *Streptococcus porcinus*, *Streptococcus mutans* и *Streptococcus pyogenes* в 37,5% случаев; *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus gallolyticus*, *Streptococcus rubneri* и *Streptococcus uberis* в 25% случаев; *Streptococcus iniae*, *Streptococcus lutetiensis*, *Streptococcus pneumoniae* и *Streptococcus suis* в 12,5% случаев, то есть количество случаев выделения *Streptococcus suis* незначительное, а *Streptococcus zooepidemicus* не выявляется при стрептококкозах свиней вообще [Laishevtsev A.I., Kapustin A.V., Palazyuk S.V., Matyash A.E. Etiological structure of streptococcosis of pigs in various regions of the Russian Federation // Russian Journal of Agricultural and Socio-Economic Sciences. 2018. №2 (74). С. 257-260]. Из всех выделенных стрептококков патогенностью обладали именно *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus porcinus*, *Streptococcus pyogenes* и *Streptococcus suis*, в то время как другие виды не обладали данным свойством.

Приведенные результаты подтверждаются иностранными учеными, которые в своих трудах так же демонстрируют важную этиологическую роль бактерий вида *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus porcinus*, *Streptococcus pyogenes* и *Streptococcus suis* [Kasuya, K., Yoshida, E., Harada, R., Hasegawa, M., Osaka, H., Kato, M., Shibahara, T. Systemic *Streptococcus dysgalactiae* Subspecies *equisimilis* Infection in a Yorkshire Pig with Severe Disseminated Suppurative Meningoencephalomyelitis. *Journal of Veterinary Medical Science*. 2014. 76(5), 715-718.; Oh, S.-I., Kim, J. W., Jung, J.-Y., Chae, M., Lee, Y.-R., Kim, J. H., ByungJae So, Kim, H.-Y. Pathologic and molecular characterization of *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* infection in neonatal piglets. *Journal of Veterinary Science*. 2018. 19(2), 313.; Katsumi, M., Kataoka, Y., Takahashi, T., Kikuchi, N., Hiramune, T. Biochemical and Serological Examination of BETA, -hemolytic *Streptococci* Isolated from Slaughtered Pigs. *Journal of Veterinary Medical Science*. 1998. 60(1), 129-131.; Arai, S., Kim, H., Watanabe, T., Tohya, M., Suzuki, E., Ishida-Kuroki, K., Sekizaki, T. Assessment of pig saliva as a *Streptococcus suis* reservoir and potential source of infection on farms by use of a novel quantitative polymerase chain reaction assay. 2018. *American Journal of Veterinary Research*, 79(9), 941-948.; Van Samkar, A., Brouwer, M. C, Schultsz, C, van der Ende, A., & van de Beek, D. *Streptococcus suis* Meningitis: A Systematic Review and Meta-analysis. *PLOS Neglected Tropical Diseases*. 2015. 9(10), e0004191.; Tang, J., Wang, C, Feng, Y., Yang, W., Song, H., Chen, Z., Gao, G. F. Streptococcal Toxic Shock Syndrome Caused by *Streptococcus suis* Serotype 2. *PLoS Medicine*. 2006. 3(5), e151.]. Ввиду того, что различные виды стрептококков не обладают возможностью формирования перекрестного иммунного ответа, существующие препараты не способны в полной мере защитить животных от стрептококкозов, вызванных иными видами.

Решением проблемы является разработка эффективной современной вакцины с расширенным и актуализированным антигенным составом из этиологически значимых для свиноводства видов стрептококков, способа ее получения и применения.

Предлагаемое изобретение реализуется в рамках следующих положений: «Стратегии

предупреждения распространения антимикробной резистентности в Российской Федерации на период до 2030 года», утвержденной распоряжением Правительства РФ от 25.09.17 г. №2045-р, Стратегии национальной безопасности Российской Федерации, утв. Указом Президента РФ от 31.12.15 г. №683 "О Стратегии национальной безопасности Российской Федерации", и Основ государственной политики в области обеспечения химической и биологической безопасности Российской Федерации на период до 2025 года и дальнейшую перспективу, утв. Президентом РФ от 01.11.13 г. № Пр-2573, а также положений Политической декларации заседания высокого уровня Генеральной Ассамблеи по проблеме устойчивости к противомикробным препаратам, принятой на 71-ой сессии Генеральной Ассамблеи ООН (резолюция A/RES/71/3 от 05.10.16 г.), и Глобального плана действий по борьбе с устойчивостью к противомикробным препаратам, принятого на 68-ой сессии Всемирной ассамблеи здравоохранения (резолюция WHA68.7 от 26.05.15 г.), определяющих комплексный и межсекторальный подход для отраслей, где используются противомикробные препараты (здравоохранение, сельское хозяйство, в том числе растениеводство, животноводство, разведение аквакультуры, а также производство пищевой продукции и очистка воды).

#### Уровень техники

В Российской Федерации на момент реализации настоящей разработки были зарегистрированы следующие препараты для специфической профилактики стрептококкоза свиней:

1) Вакцина против сальмонеллеза, пастереллеза и стрептококкоза поросят "ВЕРРЕС-СПС" - ООО "Ветбиохим", Россия. Средство изготовлено из производственных штаммов *Salmonella choleraesuis* и *Salmonella typhimurium*, *Pasteurella multocida* типов А и D, *Streptococcus suis* серогрупп С и R, инактивированных формалином и адсорбированных на геле гидроокиси алюминия;

2) Вакцина против сальмонеллеза, пастереллеза и стрептококкоза поросят - ФКП "Армавирская биофабрика", Россия. Вакцина изготовлена из культур бактерий *Salmonella choleraesuis* 370, *Salmonella typhimurium* 371, *Pasteurella multocida* серовары А, В, Д, *Streptococcus* серогруппы С и R, инактивированных формальдегидом с добавлением адьюванта- геля гидрата окиси алюминия;

3) Вакцина против респираторных болезней свиней поливалентная инактивированная «Донобан-10» - "KBNP, INC.", Республика Корея. Средство изготовлено из суспензии инактивированных бактериальных клеток бордетелл *Bordetella bronchiseptica* cDNT (SB-11), пастерелл *Pasteurella multocida* тип А NSPA (SB-40) и *Pasteurella multocida* тип D cDNT (SB-54), актинобацилл *Actinobacillus pleuropneumoniae* серотип 2 NAS2 (SB-03) и *Actinobacillus pleuropneumoniae* серотип 5 NAS5 (SB-04), микоплазм *Mycoplasma hyopneumoniae* NSM (SB-34), стрептококков *Streptococcus suis* тип 2 NSS2 (SB-50), штаммов гемофил *Haemophilus parasuis* серотип 1 NSH1 (SB-30), *Haemophilus parasuis* серотип 4 NSH4 (SB-31) и *Haemophilus parasuis* серотип а 5 NSH5 (SB-32), а также дермонекротического токсина (cDNT) *Bordetella bronchiseptica* и *Pasteurella multocida* тип D; белка клеточных стенок (OMP) *Pasteurella multocida* тип А; *Actinobacillus pleuropneumoniae* серотип 2 и 5, инактивированных формалином (в концентрации 0,2%), с добавлением в качестве консерванта тиомерсала (0,01%), адьювантов: гидрата окиси алюминия (20%) и ISA 25 (3%) и изотонического раствора натрия хлорида до 2 мл;

4) Вакцина против стрептококкоза инактивированная эмульгированная «СтрептВак-П», ФГБУ «ВНИИЗЖ», Россия. Вакцина изготовлена из инактивированных формальдегидом бактериальных клеток *Streptococcus suis* серогруппы D типа 2, штамм №4232 с добавлением масляного адьюванта - Montanide ISA 206 (50%) и

фосфатнобуферного раствора (до 50%).

Помимо зарегистрированных на территории РФ средств специфической профилактики стрептококкоза свиней известны (сняты с производства, или зарегистрированы в странах Таможенного Союза):

5 1) Вакцина против стрептококкоза свиней инактивированная эмульгированная «Стрептовак-С», ОАО «БелВитунифарм», Республика Беларусь. Вакцина содержит антиген *Streptococcus suis* с М-белком, инактивированные формалином в концентрации 0,4% и эмульгированные в масляном адьюванте;

10 2) Вакцина против стрептококкоза сельскохозяйственных животных, плотоядных и грызунов «Стрептоевак», ООО «Торговый дом «БиАгро», Россия. В состав вакцины входят культуры стрептококков серологической группы С, инактивированные формалином и сорбированные на гидрате окиси алюминия.

15 Кроме приведенных средств известны биопрепараты, в состав которых включены стрептококки, расклассифицированные в род *Enterococcus*: в частности, *Enterococcus faecalis* (ранее *Streptococcus faecalis*), которые в настоящем изобретении не рассматриваются.

20 Все приведенные средства, направленные на специфическую профилактику стрептококкоза свиней, являются ограниченными по антигенному составу, что в свою очередь снижает их протективную активность в отношении всех значимых для отрасли видов стрептококков, не включенных в состав препарата, а именно *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus porcinus*, *Streptococcus pyogenes*.

25 Помимо известных коммерческих препаратов, известна вакцина ассоциированная инактивированная против парвовирусной болезни, стрептококкоза и сальмонеллеза свиней [диссертация Нурғалиев Ф.М., Казань, 2006 г.]. Предложенная комбинация антигенов обусловлена тем, что эти бактериальные и вирусные болезни в 40% случаев являются причиной нарушений функций органов репродуктивной системы свиней [Гаффаров, Х.З. Инфекционные болезни свиней и современные средства борьбы с ними / Х.З. Гаффаров, Е.А. Романов. Москва: «Аквариум», 2004. -200 с.]. Вакцина изготовлена из штамма "У-13" парвовируса, штамма "С-05" *Streptococcus suis* и штамма "К-03" *Salmonella choleraesuis*, выделенных из абортированных плодов свиноматок. Штаммы депонированы и используются в качестве производственных. Инактивацию бактериальной массы всех штаммов проводят формалином. Адьювант - гель гидрата окиси алюминия (ГОА) и/или масляный адьювант (МА), состоящий из минерального масла с ланолином. Вирусную суспензию штамма ПВС, обладающую до инактивации 30 гемагглютинирующей активностью 1:512, смешивали с бактериальными суспензиями сальмонелл и стрептококков, содержащих по 10 млрд.м.к./мл в равных соотношениях, рН вакцины 7,2-7,4. К недостаткам препарата стоит отнести: узкий видовой спектр стрептококков, введенных в состав вакцины; обладая иммуногенностью в отношении других актуальных инфекций поросят, она защищает животных лишь от одного вида 40 *Streptococcus suis*; содержит очень высокие дозы бактериальных антигенов (10 млрд.м.к./мл, тогда как аналогичные вакцины содержат в 3-10 раз меньше антигена), что делает производство нерентабельным.

Из источников патентной информации известна «Вакцина ассоциированная гидроокисьалюминиевая против инфекционных пневмоний свиней бактериальной 45 этиологии и способ ее изготовления» [патента RU 2191598 C2 опубл. 2002.10.27]. Вакцина содержит бактериальную массу *Pasteurella multocida* серовариантов А, В и D, *Haemophilus pleuropneumonia* серогрупп 1 и 2 и стрептококков серогрупп С и R, смешанных в равных объемах. При изготовлении вакцины используют щадящие режимы инактивации и

управляемый процесс культивирования. Вакцина обеспечивает защиту от инфекционных пневмоний свиней, вызванных широким спектром бактерий. Недостатками данной вакцины являются узкий спектр антигенной активности против стрептококков, причем вид *S. zooeridemicus* (серогруппа C), как уже было сказано, не представляет клинического значения при стрептококкозах свиней в настоящее время.

Известен «Способ получения вакцины ассоциированной против колибактериоза, стрептококкоза и энтерококковой инфекции телят и поросят» [патент RU 2429012 C1 опубл. 2011.09.20; патент RU 2650268 C1 опубл. 2018.04.17]. Указанная вакцина изготавливается из эпизоотических штаммов *Escherichia coli*, *Streptococcus bovis*, *Enterococcus faecalis*, выделенных из пораженных органов телят и поросят. Недостатком способа является то, что при производстве препарата используются полевые изоляты микроорганизмов, что противоречит требованиям ФЗ-61 «Об обращении лекарственных средств». Кроме того, недостатком способа и самой вакцины является перегруженность бактериальной массой клеток *Escherichia coli*, несущих лишнюю антигенную нагрузку, что негативно сказывается на формировании у животных иммунной защиты против стрептококков и энтерококков. Недостатком способа приготовления препарата является и несбалансированный антигенный состав, более ориентированный на профилактику болезней телят, поскольку содержит антигены *Streptococcus bovis*, не актуальные для свиней, и *Enterococcus faecalis*, относящийся к оппортунистическим микроорганизмам и имеющий слабое этиологическое значение при кокковых инфекциях у поросят.

Известна «Вакцинная композиция против инфекции, вызванной *Streptococcus suis*» [патент RU 27355101 А опубл. 2018.05.29]. Данная разработка ориентирована на использование полипептида и вектора с полинуклеотидом в качестве активного иммуногенного ингредиента при производстве вакцины против *Streptococcus suis*.

Известна «Композиция вакцины против *Streptococcus suis*, способ ее получения и применения» (*Streptococcus suis vaccine composition, and preparation method and application thereof*) [патент CN104248754А опубл. 2014.2.31]. Предложенный препарат содержит два вида иммунопротекторных антигенов *Streptococcus suis* - 34KDA и протеантиген SaoA и адьювант. Получение антигена возможно путем использования генно-инженерных методов, в частности за счет вектора экспрессии полинуклеотида.

Дополнительно, данное изобретение может содержать полный бактериальный антиген *Streptococcus suis* штамма SC типа 2. Помимо этого, предложенная композиция может иметь в своем составе иммуностимуляторы, такие как альфа-интерферон, бета-интерферон, гамма-интерферон, а также интерлейкин-22, антиоксидант, поверхностно-активное вещество, окрашивающий агент, эфирное масло, буферный агент, диспергатор, пропеллент и антисептик.

Известна «Аттенуированная вакцина *Streptococcus suis* и способ ее получения» (*It is attenuated Streptococcus suis vaccine and production and preparation method thereof*) [патент CN 104780935 В опубл. 2015.7.15]. Данное изобретение основано на использовании ослабленного штамма *Streptococcus suis* в качестве основного

компонента вакцины против стрептококкоза свиней. Известно изобретение «Аттенуированные вакцины против *Streptococcus suis* и способы их получения и применения» (*Attenuated Streptococcus suis vaccines and methods of making and use thereof*) [патент AU2016222520В2 опубл. 2018.03.22]. Изобретение ориентировано на использовании ослабленных штаммов *Streptococcus suis* при производстве живых вакцин

против стрептококкоза. Известно изобретение «Комбинированная инактивированная вакцина против контагиозной плевропневмонии и стрептококкоза свиней, вызванных *Streptococcus suis* и способ ее получения» (*Porcine contagious pleuropneumonia and Streptococcus suis disease combined inactivated vaccine and preparation method thereof*) [патент

CN 103566364 А опубл. 2014.2.12]. Изобретение направлено на создание и использование ассоциированной инактивированной вакцины, изготовленной в комбинации штаммов *Actinobacillus pleuropneumonia* серотипа 1, 5, 7 и двух высоковирулентных штаммов *Streptococcus suis*. Недостатком данных изобретений стоит считать узкий антигенный спектр, не позволяющий обеспечить необходимую протективную активность против инфекций вызванных другими видами стрептококков, свойственными для свиноводства.

Наиболее близким аналогом (прототипом) заявляемой вакцины является «Вакцина против сальмонеллеза, пастереллеза и стрептококкоза поросят» - «ВЕРРЕС-СПС» - ООО "Ветбиохим", Россия. Средство представляет собой суспензию для инъекций (инактивированную вакцину). Вакцина изготовлена из производственных штаммов *Salmonella choleraesuis* №370 и *Salmonella typhimurium* №371, *Pasteurella multocida* тип А №1231 и тип D - «Т-80», *Streptococcus* серогруппы С штамм П-2082 и *Streptococcus suis* серогруппы R штамм «Касли», инактивированных формалином (в концентрации 0,3%) и адсорбированных на геле гидроокиси алюминия (20%). По внешнему виду вакцина представляет собой жидкость светло-желтого цвета с серо-белым осадком, легко разбивающимся при взбалтывании. Срок годности вакцины - 18 месяцев с даты выпуска при соблюдении условий хранения и транспортирования. У животных вакцина вызывает формирование иммунитета к сальмонеллезу, пастереллезу и стрептококкозу через 10-12 суток после введения второй дозы препарата, который сохраняется до 5 месяцев. Одна иммунизирующая доза вакцины (3 мл) содержит: инактивированные микробные клетки штаммов сальмонелл *Salmonella choleraesuis* и *Salmonella typhimurium* - не менее  $4 \cdot 10^9$  КОЕ каждого; пастерелл *Pasteurella multocida* тип А и D - не менее  $5 \cdot 10^9$  КОЕ каждого; стрептококков *Streptococcus* серогруппа С и *Streptococcus suis* серогруппы R - не менее  $3 \cdot 10^9$  КОЕ каждого. Вакцина безвредна и ареактогенна, лечебными свойствами не обладает. Недостатком прототипа является его ограниченный антигенный состав. В частности, препарат имеет в своем составе антигены *Streptococcus zooepidemicus* и *Streptococcus suis*, но не *Streptococcus porcinus*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus dysgalactiae*.

Наиболее близким аналогом (прототипом) способа изготовления предложенной вакцины является «Вакцина ассоциированная гидроокисьалюминиевая против инфекционных пневмоний свиней бактериальной этиологии и способ ее изготовления» [патента RU 2191598 C2 опубл. 2002.10.27]. Способ изготовления вакцины ассоциированной гидроокисьалюминиевой против инфекционных пневмоний свиней бактериальной этиологии включает засев вакцинных штаммов пастерелл, гемофильных бактерий и стрептококков, их раздельное культивирование в жидкой питательной среде на основе перевара Хоттингера в ферментерах с последующей инактивацией культур формальдегидом, адсорбцией их на адьюванте и смешиванием инактивированных культур, отличается тем, что при культивировании штаммов стрептококков сразу после засева окислительно-восстановительный потенциал культуральной жидкости снижают до (-150) - (-200) мВ, после чего до окончания процесса культивирования поддерживают уровень кислорода  $pO_2$  в культуральной жидкости на уровне 15-25% от насыщения кислородом воздуха, рН культуральной жидкости регулируют на уровне 6,8-7,2 ед. рН, а дробную подачу глюкозы осуществляют дозами до концентрации 0,05-0,2% при лимитировании роста стрептококков глюкозой. Кроме того, данный способ подразумевает инактивацию культур стрептококков формальдегидом при температуре 43-48°C в течение 12-36 ч, причем конечная концентрация формальдегида в культуре составляет 0,02-0,08%. Недостатком данного способа является акцентирование

изобретения только на способе культивирования штаммов стрептококков, а не на  
полной последовательности производства готового препарата и его контроля. Кроме  
того, при культивировании стрептококков предлагается использование только бульона  
Хоттингера, что ограничивает саму технологию производства вакцин против  
5 стрептококкоза, так как известны и иные рост обеспечивающие питательные среды. В  
отличие от прототипа, заявляемое изобретение подразумевает использование вместо  
гидроокиси алюминия карбопола-971, что позволяет усилить антигенную активность  
препарата и обеспечить его высокую специфическую эффективность. Кроме того, во  
вновь предложенном препарате и способе его производства приведены и  
10 охарактеризованы методы контроля антигенной и иммуногенной активности вакцин  
против стрептококкоза свиней.

Наиболее близким аналогом (прототипом) способа применения является изобретение  
«Аттенуированные вакцины против *Streptococcus suis* и способы их получения и  
применения» (Attenuated *Streptococcus suis* vaccines and methods of making and use thereof)  
15 [патент AU 2016222520 B2, опублик. 2018.03.22]. Изобретение ориентировано на  
использовании ослабленных штаммов *Streptococcus suis* при производстве живых вакцин  
против стрептококкоза. По сравнению с эпизоотическими (полевыми) культурами  
стрептококков, предложенные вакцинные штаммы могут иметь один или несколько  
полиморфных вариаций (более 25) в нуклеотидной последовательности, что позволяет  
20 снижать вирулентность данных культур. В частности, такие аминокислотные замены  
находятся в генах вирулентности *gpsL-S12* (рибосомный белок субъединицы 30S), АТЦ-  
связывающий мембранный белок АВС-транспортера (АВС-АТРВМР) и регулятор  
транскрипции *marR*. Способ получения рассматриваемого изобретения включает  
несколько последовательных стадий, а именно: 1) выращивание родительского штамма  
25 *Streptococcus suis* в присутствии мутагенного агента; 2) высеив выживших клеток в  
соответствующую среду; 3) тестирование отдельных колоний путем инфицирования  
свиней для определения вирулентности. Штамм признается ослабленным, если после  
инфицирования свиней он не проявляет каких-либо клинических признаков инфекции.  
При составлении серии препарата, согласно изобретению, может быть использован  
30 адъювант, который представляет собой любое вещество, усиливающее иммунный ответ,  
по сравнению с серией вакцины, не имеющей адъювант в своем составе. Разработчиками  
делается акцент на том, что адъюванты на основе хитозана являются наиболее  
подходящими при составлении серии препарата. Способ применения рассматриваемого  
изобретения на свиньях имеет несколько вариаций. Первый вариант подразумевает  
35 «простую» (prime) иммунизацию животных, когда животным однократно или  
множественно вводится предложенный препарат. Вторая схема вакцинации  
ориентирована на прайм-бустерную (prime-boost) систему, которая подразумевает одну  
первичную иммунизацию и одну усиленную иммунизацию. Таким образом, серия  
вакцины для первичной иммунизации должна отличаться от серии вакцины для  
40 усиленной иммунизации. Вакцинация животных проводится с интервалом 1-6 недель,  
но предпочтительным является интервал 3-5 недель. Оценка эффективности  
предложенного препарата производится за счет инфицирования животных (свиней)  
через 2-4 недели после их последней иммунизации. Сама процедура инфицирования  
может быть произведена внутримышечно, подкожно, спрей методом, интраназально,  
45 интратрахеально, перорально, внутрикулярно. Недостатком рассматриваемого  
изобретения является ограниченный антигенный состав предлагаемого препарата, не  
способного обеспечить необходимую протективную защиту животных против  
стрептококков, кроме *Streptococcus suis*. Способ производства средства в полной мере

не охватывает все технологические манипуляции, необходимые для выпуска серии вакцины, а ориентированы исключительно на этап культивирования производственных штаммов. Способ применения рассматриваемого прототипа, согласно патенту, ориентируется на иммунизацию свиноматок, в то время как предложенное изобретение акцентирует важность иммунизации не только свиноматок, но и их потомства. Данный подход способствует увеличению срока напряженности иммунитета у поросят, что благоприятно влияет на обеспечение эпизоотического благополучия на свинокомплексе.

Технической проблемой, на решение которой направлено данное изобретение, является необходимость создания безопасной вакцины против стрептококкоза свиней на основе сбалансированного антигенного состава, содержащего наиболее распространенные на территории РФ виды *Streptococcus* spp., способа ее получения и применения.

Техническим результатом предлагаемого изобретения является создание вакцины с усиленной иммуногенной и антигенной активностью, индуцирующей напряженный и продолжительный иммунитет у свиней против стрептококкозов, вызванных видами *S.suis*, *S.dysgalactiae*, *S.porcinus* и *S.pyogenes*, что приводит к расширению арсенала поливалентных инактивированных вакцин, направленных на специфическую профилактику инфекционных болезней свиней.

Раскрытие сущности изобретения

Вакцина против стрептококкозов свиней поливалентная инактивированная

Заявленная вакцина против стрептококкозов свиней инактивированная содержит в своем составе следующие компоненты из расчета на одну иммунизирующую дозу препарата (2 см<sup>3</sup>): инактивированные формалином протективные антигены штаммов *Streptococcus suis* № УР-4-ВБХ - 3,5 млрд. мкр. кл.; *Streptococcus porcinus* УР-3-ВБХ - 3,5 млрд. мкр. кл.; *Streptococcus pyogenes* ОБ-4-ВБХ - 3,5 млрд. мкр. кл.; *Streptococcus dysgalactiae* УР-16-ВБХ - 3,5 млрд. мкр. кл., а также фармацевтически приемлемые целевые добавки.

В качестве фармацевтически приемлемых целевых добавок вакцина, помимо антигенов, содержит:

- инактивант, необходимый для обеззараживания бактериальных антигенов. В качестве инактиванта используется формалин из расчета 0,3% к объему бульонной культуры, содержащий не менее 37% формальдегида;

- консервант, необходимый для производства многодозовых фасовок препарата. В качестве стандартного консерванта используется водный раствор мертиолята натрия, вводимый в препарат из расчета 1:10000;

- разбавитель, необходимый для разведения концентрированного бактериального антигена до требуемой концентрации. В качестве растворителя используется стерильный фосфатно-буферный солевой раствор (PBS);

- адьювант, необходимый для неспецифического усиления иммунного ответа к антигенам. В качестве адьюванта в предлагаемой вакцине применяют 2% раствор Карбопол-971, который вносят в количестве 10% от объема препарата;

- для установления оптимального уровня водородных ионов в препарате используется 20% раствор гидроксида натрия, уровень pH препарата составляет 6,2-7,8.

В готовом виде вакцина против стрептококкозов свиней инактивированная представляет собой суспензию для инъекций, цвет которой может варьировать от светлосерого до желто-серого, с серо-белым осадком, легко разбивающимся при взбалтывании в гомогенную взвесь.

Срок годности препарата составляет 18 месяцев с даты выпуска.

Входящие в состав вакцины бактериальные штаммы *Streptococcus suis* № УР-4-ВБХ, *Streptococcus porcinus* УР-3-ВБХ, *Streptococcus pyogenes* ОБ-4-ВБХ, *Streptococcus dysgalactiae* УР-16-ВБХ являются новыми производственными культурами и впервые используются в составе вакцинных препаратов для широкого применения. Все вновь предложенные штаммы бактерий депонированы в Государственной коллекции патогенных микроорганизмов и клеточных культур «ГКПМ-Оболенск» Федеральное бюджетное учреждение науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» (ФБУН ГНЦ ПМБ). Все культуры идентифицированы на базе лаборатории микробиологии с музеем типовых культур ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН посредством изучения культуральных, морфологических, ферментативных свойств и определением нуклеотидной последовательности гена 16S rRNA.

#### Характеристика штаммов

Производственно-контрольные штаммы *Streptococcus suis* УР-4-ВБХ, *Streptococcus porcinus* УР-3-ВБХ, *Streptococcus pyogenes* ОБ-4-ВБХ, *Streptococcus dysgalactiae* УР-16-ВБХ используются для производства иммунобиологических лекарственных средств для ветеринарного применения впервые. Культуры обладают устойчивостью к диссоциации, технологичны, образуя рост на большинстве жидких питательных сред, а также вирулентны для лабораторных животных. Установление значения LD<sub>50</sub> для каждого штамма возбудителя позволяет использовать их в качестве штаммов «пробойников» при контроле иммуногенной активности предложенного препарата.

#### Характеристика производственно-контрольных штаммов:

1) Штамм *Streptococcus suis* № УР-4-ВБХ имеет следующие характеристики и свойства:

Штамм депонирован в Государственной коллекции патогенных микроорганизмов и клеточных культур «ГКПМ-Оболенск» под регистрационным № В-8345.

Дата, источник и место выделения: 08.2016 года от павших поросят, принадлежащих ООО СПК Машкино, Коломенский район Московская обл.

Морфология: клетки сферические или немного овальные, диаметром 0,5-2,0 мкм, расположены парами или цепочками, неподвижные, неспорообразующие.

Грамположительные. Каталазоотрицательные. Факультативные анаэробы. Растет лучше на богатых питательных средах.

Культуральные свойства: при росте в жидких питательных средах образует равномерное помутнение среды с последующим выпадением культуры в осадок; на кровяном агаре в чашках Петри через 18-24 часа культивирования - мелкие, диаметром около 1 мм, круглые, полупрозрачные колонии. Колонии окружены зоной β-гемолиза.

Биохимические свойства: Культура *S. suis* №УР-4-ВБХ: VP -, гидролиз эскулина +, бета-глюкоронидаза +, ферментирует с образованием кислоты: глюкозу +, инулин +, лактозу +, мальтозу +, салицин +, трегалозу +, сахарозу +, арабинозу -, глицерол -, маннитол -, мелицитозы -, рибозу -, сорбитол -.

Вирулентность: Производственный штамм *S. suis* № УР-4-ВБХ вызывает гибель белых мышей массой 16-18 гр. при внутрибрюшинном введении культуры. Величина LD<sub>50</sub> - 1,08\*10<sup>9</sup> мкр. кл. Гибель белых мышей наступает в течение 4-10 суток после заражения.

2) Штамм *Streptococcus pyogenes* № ОБ-6-ВБХ имеет следующие характеристики и свойства:

Штамм депонирован в Государственной коллекции патогенных микроорганизмов и клеточных культур «ГКПМ-Оболенск» под регистрационным № В-8344.

Дата, источник и место выделения: 07.2015 года от павших поросят ООО

«ПсковАгроИнвест», Псковский район Псковской обл.

Морфология: Клетки сферические или немного овальные, диаметром 0,5-2,0 мкм, расположены парами или цепочками, неподвижные, неспорообразующие.

5 Грамположительные. Факультативные анаэробы. Каталазоотрицательные. Растет лучше на богатых питательных средах.

Культуральные свойства: при росте в бульоне образуют равномерное помутнение среды с последующим выпадением культуры в осадок; на кровяном агаре в чашках Петри через 18-24 часа культивирования - мелкие, диаметром около 1 мм, круглые, полупрозрачные колонии. Колонии окружены зоной β- гемолиза.

10 Биохимические свойства: *S. pyogenes* № ОБ-6-ВБХ: ONPG -, VP -, ферментирует с образованием кислоты: фруктозу +, глюкозу +, галактозу +, лактозу +, салицин +, сахарозу +, адонитола -, арабинозу -, дульцитол -, сорбитол -.

15 Вирулентность: Производственный штамм *S. pyogenes* № ОБ-6-ВБХ вызывает гибель белых мышей массой 16-18 гр. при внутрибрюшинном введении культуры. Величина LD<sub>50</sub> -  $1,08 \cdot 10^9$  мкр. кл. Гибель белых мышей наступает в течение 4-10 суток после заражения.

3) Штамм *Streptococcus porcinus* № УР-3-ВБХ имеет следующие характеристики и свойства:

20 Штамм депонирован в Государственной коллекции патогенных микроорганизмов и клеточных культур «ГКПМ-Оболенск» под регистрационным № В-8343.

Дата, источник и место выделения: 12.2015 года от павших поросят СПА «Колхоз имени Ворошилова», Новоалександровский район Ставропольского края.

25 Морфология: клетки сферические или немного овальные, диаметром 0,5-2,0 мкм, расположены парами или цепочками, неподвижные, неспорообразующие. Грамположительные. Факультативные анаэробы. Каталазоотрицательные. Растет лучше на богатых питательных средах.

30 Культуральные свойства: при росте в бульоне образуют равномерное помутнение среды с последующим выпадением культуры в осадок; на кровяном агаре в чашках Петри через 18-24 часа культивирования - мелкие, диаметром около 1 мм, круглые, полупрозрачные колонии. Колонии окружены зоной β- гемолиза.

Биохимические свойства: культура *S. porcinus* № УР-3-ВБХ: VP +, эскулин +, арабиноза -, дульцитол -, глюкоза -, инозитол -, лактоза -, мальтоза +, маннитол +, раффиноза +, рамноза -, салицин +, сорбитол +, трегалоза +.

35 Вирулентность: Производственный штамм *porcinus* № УР-3-ВБХ: вызывает гибель белых мышей массой 16-18 гр. при внутрибрюшинном введении культуры. Величина LD<sub>50</sub> -  $1,08 \cdot 10^9$  мкр. кл. Гибель белых мышей наступает в течение 4-10 суток после заражения.

40 4) Штамм *Streptococcus dysgalactiae* № УР-16-ВБХ имеет следующие характеристики и свойства:

Штамм депонирован в Государственной коллекции патогенных микроорганизмов и клеточных культур «ГКПМ-Оболенск» под регистрационным № В-8342.

Дата, источник и место выделения: 11.2016 года от маститной свиноматки АО «Агрофирма Дмитрова Гора», Конаковский район Тверской области.

45 Морфология: клетки сферические или немного овальные, диаметром 0,5-2,0 мкм, расположены парами или цепочками, неподвижные, неспорообразующие. Грамположительные. Факультативные анаэробы. Каталазоотрицательные. Растет лучше на богатых питательных средах.

Культуральные свойства: при росте в бульоне образует равномерное помутнение среды с последующим выпадением культуры в осадок; на кровяном агаре в чашках Петри через 18-24 часа культивирования - мелкие, диаметром около 1 мм, круглые, полупрозрачные колонии. Колонии окружены зоной  $\beta$ -гемолиза.

5 Биохимические свойства: Культура штамма *S. dysgalactiae* № УР-16-ВБХ: VP-, эскулин-, арабиноза+, дульцитол-, фруктоза+, галактоза+, глюкоза+, инозитол-, лактоза+, мальтоза+, маннитол-, раффиноза-, салицин-, сорбитол-, сахароза+, трегалоза+, ксилоза+.

Вирулентность: Производственный штамм *S. dysgalactiae* № УР-16-ВБХ вызывает гибель белых мышей массой 16-18 гр. при внутрибрюшинном введении культуры.

10 Величина  $Ld_{50}$  -  $1,08 \cdot 10^9$  мкр. кл. Гибель белых мышей наступает в течение 4-10 суток после заражения.

Способ получения вакцины:

15 Вакцина изготовлена из четырех штаммов рода *Streptococcus*: *S. suis* № УР-4-ВБХ, *S. pyogenes* № ОБ-6-ВБХ, *S. porcinus* № УР-3-ВБХ, *S. dysgalactiae* № УР-6-ВБХ. Все штаммы выделены при бактериологических исследованиях патологического материала от животных, павших или вынужденно убитых, с признаками инфекционного заболевания, клинически соответствующего стрептококковой инфекции.

Все штаммы хранятся в виде живых лиофилизированных культур.

20 Для изготовления экспериментальных и опытно-промышленных серий вакцины используются полуфабрикаты - инактивированные формалином (0,3% к объему) антигены *Streptococcus suis*, *S. porcinus*, *S. pyogenes*, *S. dysgalactiae*, полученные методом глубинного культивирования и концентрированные до  $100 \pm 5$  млрд.м.к./см<sup>3</sup>.

Способ получения вакцины против стрептококкоза свиней инактивированной.

25 Получение заявляемого препарата подразумевает реализацию следующих последовательных этапов:

- 1) Культивирование производственных штаммов глубинным методом;
- 2) Инактивацию полученной культуральной жидкости;
- 3) Концентрирование антигенов;
- 30 4) Определение полноты инактивации антигенов;
- 5) Составление серии вакцины;
- 6) Контроль стерильности вакцины;
- 7) Определение безвредности вакцины;
- 8) Определение иммуногенной и антигенной активности вакцины.

35 Для глубинного культивирования стрептококков при производстве вакцины, могут быть использованы бульон Хоттингера, триптон-соевый бульон, мясопептонный забуференный бульон и иные среды, обладающие необходимыми ростообеспечивающими свойствами.

Последовательность подготовки маточной расплодки штаммов стрептококков:

40 - в первый день лиофилизированные культуры ресуспендируют в физиологическом растворе, переносят в пробирки для первичного накопления и высевают на агаризированную ростообеспечивающую среду для оценки морфологии колоний. Подготовка каждого штамма производится по отдельности. Культивирование первой генерации продолжается в течение 18-24 часов в аэробных условиях при температуре 37°C;

45 - на второй день первичную расплодку контролируют по типичности роста, схожести морфологических и тинкториальных свойств культуры, а также на отсутствие посторонней микрофлоры в жидких и на агаризированных расплодках. При

соответствии первой генерации штамма заявленным требованиям проводят пересев для получения второй генерации. Полученные посевы культивируют в течение 18-24 часов в аэробных условиях при температуре 37°C. Для получения максимального накопления бактериальных клеток в бульонной среде пробирки помещают на шейкер для постоянного помешивания при 120-150 об/мин.;

- на третий день, после проведения контроля качества расплодки по ранее обозначенным параметрам, проводят пересев бульонной культуры каждого штамма из пробирок во флаконы со свежей питательной средой (не менее 100 мл). Полученные посевы культивируют в течении 18-24 часов в аэробных условиях при температуре 37°C. Для получения максимального накопления бактериальных клеток в бульонной среде флаконы помещают на шейкер для постоянного помешивания при 120-150 об/мин.;

- на четвертый день, после предварительного контроля расплодки, проводится пересев всего объема флакона в бутылки с питательной средой, которые в последующем используются для засева в реакторы. Маточную культуру готовят из расчета 10% к объему питательной среды в реакторе. Культивируют посеvy 18-24 часа в аэробных условиях при температуре 37°C;

- на пятый день проводят культивирование производственных штаммов в ферментере при температурном режиме 37°C и значении рН среды 7,2-7,8. Для достижения максимального накопления бактериальных клеток, в питательную среду дополнительно вносят 1-3% сыворотки крови крупного рогатого скота или лошади. При слабо выраженном росте стрептококков дополнительно вносят 2-3% свежеприготовленного дрожжевого экстракта, что обеспечивает стабильно высокое накопление бактериальной массы.

Для поддержания необходимого уровня питательных веществ в среду вносят 40%-ный раствор глюкозы из расчета 0,5-1 литр глюкозы на 100 литров питательной среды 1 раз в час, в зависимости от интенсивности роста культуры. Уровень рН во время культивирования поддерживается 10%-ным раствором щелочи. Данный способ культивирования позволяет добиться через 12-14 часов культивирования накопления биомассы до 8,0 млрд. м.к./см.

Для инактивации выращенной культуральной жидкости стрептококков в ферментер вносят формалин, содержащий не менее 37% формальдегида, 0,3% к объему культуральной жидкости. Инактивацию проводят в течение 3 суток при комнатной температуре (22±2°C) и периодическом перемешивании через каждые 12 часов.

Концентрирование культур проводят центрифугированием при 5-6 тыс.об./мин. в течение 2 часов или сепарированием при 12-15 тысячах оборотах в зависимости от используемого оборудования.

Полноту инактивации бактериальной массы стрептококков проверяют путем посева концентрированного антигена на ростообеспечивающие питательные среды согласно ГОСТ 25085, а также по безвредности инактивированной бактериальной массы в биопробе на лабораторных мышах массой 16-18 гр., которым подкожно однократно вводятся антигены, предварительно разведенные 1:10 водой для инъекций, в объеме 0,5 см<sup>3</sup>. Для оценки безвредности каждой серии антигена каждого штамма стрептококков используется по три подопытные мыши. Наблюдение за опытными животными продолжается в течение 10 суток. Препарат считается инактивированным в случае отсутствия роста культур стрептококков и иных микроорганизмов на питательных средах, а также отсутствию каких-либо местных и системных реакций, в том числе гибели, у подопытных животных.

Составление серии вакцины.

Предлагаемая вакцина против стрептококков свиней инактивированная производится путем смешивания определенных объемов инактивированных антигенов *S. suis*, *S. pyogenes*, *S. porcinus* и *S. Dysgalactiae* с адьювантом - 2% раствором карбопола-971 (10% от объема), консервантом - 10% раствором мертиолята натрия (до конечной концентрации 1:10000) и разбавителем - фосфатно-буферным раствором (PBS) до требуемого объема.

При компоновке препарата в стерильный реактор вносят необходимое количество PBS, после чего в него поэтапно добавляют антигены четырех производственных культур с установленной концентрацией. После равномерного смешивания инактивированных бактериальных антигенов, в реактор подают адьювант в количестве 10% от объема препарата, и консервант - раствор мертиолята натрия в объеме 1 часть консерванта на 10000 частей препарата, после чего вносят разбавитель до требуемого объема. Концентрация бактериальных антигенов в препарате составляет 14 млрд.м.к./см<sup>3</sup>, что соответствует 3,5 млрд. мкр. кл. /см каждого штамма. После получения, при постоянном помешивании однородной суспензии, устанавливается рекомендуемый уровень водородных ионов (6,2-7,8). Пропись состава вакцины объемом 100 литров (50 тысяч доз) приведена в таблице №1.

**Таблица №1. Состав вакцины против стрептококкоза свиней инактивированной \***

Компоненты	Содержание компонента в вакцине	
	% от объема	на 100 л
Антиген <i>Streptococcus suis</i> УР-4-ВБХ	1,75	1,75
Антиген <i>Streptococcus porcinus</i> УР-3-ВБХ	1,75	1,75
Антиген <i>Streptococcus pyogenes</i> ОБ-4-ВБХ	1,75	1,75
Антиген <i>Streptococcus dysgalactiae</i> УР-16-ВБХ	1,75	1,75
Карбопол 971 2% раствор	10,0	10,0
Формалин (37% формальдегида) из расчета 1 мл/л	0,1	0,1
Мертиолят (1:10000)	0,01	0,01
PBS	82,19	82,69
NaOH 10% (приблизительно 5-7 мл/л)	0,7	0,7
Уровень pH = 6,2-7,8		

\*- приведенная рецептура является приблизительной, поскольку объем вносимых бактериальных антигенов может меняться в зависимости от исходной концентрации сырья. Данный расчет составлен при использовании бактериальных антигенов с концентрацией 100 млрд. мкр. кл. /см<sup>3</sup>.

Формалин, используемый в качестве инактиванта на этапе получения инактивированных антигенов, также имеет второе предназначение - консервация готового продукта, после составления серии препарата. Данный подход особенно необходим для препаратов, выпускаемых в многодозовых флаконах, так как неоднократное введение иглы во флакон, способно привести к контаминации вакцины, ввиду этого формалин так же стоит рассматривать как целевую добавку.

Контроль стерильности вакцины выполняется в соответствии с ГОСТ 28085-2013 «Средства лекарственные биологические для ветеринарного применения».

Определение иммуногенной активности вакцины проводят с использованием белых мышей и культур стрептококков *S. suis* УР-4-ВБХ, *S. porcinus* УР-3-ВБХ, *S. pyogenes*

ОБ-4-ВБХ, *S. dysgalactiae* УР-16-ВБХ.

Для проведения испытаний формируют восемь групп белых мышей массой 16-20 г. по 10 голов в каждой (всего 4 опытные группы и 4 контрольные группы: по 1 опытной и контрольной группе на каждый штамм). Вакцину вводят белым мышам опытных групп двукратно с интервалом 21-24 дня подкожно в области холки в дозе по 0,5 мл. Контрольных мышей не иммунизируют. Через 14-16 дней после повторного введения проводят заражение вакцинированных и контрольных мышей-аналогов каждым штаммом, входящим в состав препарата (например: 1 опытную и контрольную группу - *Streptococcus suis* УР-4-ВБХ; 2 опытную и контрольную группу - *Streptococcus porcinus* УР-3-ВБХ; 3 опытную и контрольную группу - *Streptococcus pyogenes* ОБ-4-ВБХ; 4 опытную и контрольную группу - *Streptococcus dysgalactiae* УР-16-ВБХ). Для заражения используют суточные агаровые культуры стрептококков, которые вводят белым мышам внутрибрюшинно в дозе 5 LD<sub>50</sub> в объеме 0,5 мл. Срок наблюдения за всеми животными составляет 10 суток. Значение LD<sub>50</sub> заражающих культур стрептококков определяют путем подтитровки на белых мышах той же партии, каждый раз перед проведением опыта по оценке иммуногенности серии вакцины в связи с быстрой утратой штаммами вирулентности при пересевах. Одновременно с заражением мышей проводится контроль метода введения, для чего дополнительно используются 10 мышей, которым внутрибрюшинно вводится стерильный физиологический раствор в дозе 0,5 мл. Срок наблюдения за всеми животными составляет 10 суток. Серию вакцины считают активной, если по окончании срока наблюдения остаются живыми не менее 80% иммунизированных белых мышей в каждой опытной группе, при гибели не менее 80% белых мышей в каждой контрольной группе. При этом, на момент окончания учета результатов, должны выжить не менее 90% мышей, которым вводили физиологический раствор; в противном случае опыт повторяют.

Выпущенные описанным способом три серии вакцины были апробированы в условиях вивария, а также на свиноводческих предприятиях, неблагополучных по стрептококкозам. В рамках апробации была подтверждена безвредность препарата и его специфическая эффективность.

Контроль антигенной активности предложенного препарата проводится в пробирочной реакции агглютинации.

Для проведения исследования вакцину предварительно вводят 40 белым мышам массой 16-18 г двукратно подкожно с интервалом 21-24 дня в области холки в объеме 0,5 мл. Через 14-16 дней после повторного введения у вакцинированных и контрольных мышей-аналогов проводят взятие крови для получения сывороток (фатально). Всю полученную сыворотку крови от мышей объединяют в общий пул и используют для постановки реакции агглютинации с целью определения титра антител к *S. suis*, *S. dysgalactiae*, *S. porcinus*, *S. pyogenes* - положительная проба. С целью контроля фонового уровня антител у подопытных животных дополнительно производят отбор крови у 10 невакцинированных мышей. Сыворотки перед использованием прогревают на водяной бане при 56°C в течение 30 мин.

Полученную сыворотку подвергают двукратному разведению: 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32 стерильным физиологическим раствором. Антиген для опыта получают путем культивирования контрольно-производственных штаммов на агаре МПА. В последующем культуру смывают стерильным физиологическим раствором. Прогревают при 56°C в течение 30 мин, и доводят до концентрации 2 млрд. мкр. кл. см<sup>3</sup>. В последующем производится смешивание сыворотки и антигена соответствующего

штамма в равных объемах (по 0,5 см<sup>3</sup>). Контролем служит испытываемая культура, смешанная с физиологическим раствором (рН 7,2-7,4) и с нормальной кроличьей сывороткой, разведенной 1:10 (для исключения самоагглютинации культуры). Помимо этого, в контроле также исследуются сыворотки, полученные от невакцинированных мышей. Смешанные сыворотки с антигеном инкубируются при 37°С в течение 18-24 часов.

Результаты исследования интерпретируют следующим образом:

«++++» - полное просветление жидкости, антиген осел на дне пробирки в виде «зонтика», при встряхивании пробирки осадок разбивается в хлопья при прозрачной жидкости (100%-ная агглютинация);

«+++» - неполное просветление жидкости, четко выраженный «зонтик» (75%-ная агглютинация);

«++» - имеются просветления жидкости, «зонтик» умеренно выражен (50%-ная агглютинация);

«+» - едва заметное просветление, «зонтик» едва заметен, при встряхивании обнаруживается небольшое количество хлопьев агглютината (25%-ная агглютинация);

«-» - просветления жидкости нет, «зонтик» отсутствует, осадок легко взмучивается при отсутствии хлопьев агглютината.

Вакцину считают иммуногенной, если в сыворотке крови вакцинированных мышей в реакции агглютинации титр специфических антител к антигенам *S. suis*, *S. dysgalactiae*, *S. porcinus* и *S. ruogenes* не менее, чем на 2(log<sub>2</sub>) выше по сравнению с соответствующим значением в сыворотке крови мышей контрольной группы. При этом агглютинация антигенов и сыворотки должна проходить не менее чем на 3 креста. Так же должна отсутствовать самоагглютинация антигена с физиологическим раствором и нормальной кроличьей сывороткой.

Способ применения поливалентной инактивированной вакцины против стрептококкоза свиней

Вакцина предназначена для профилактики стрептококкозов у свиней всех возрастных групп в хозяйствах, неблагополучных по указанным заболеваниям. Вакцина вызывает формирование иммунитета к стрептококкозам, вызываемым *S. suis*, *S. ruogenes*, *S. porcinus* и *S. dysgalactiae* через 12-14 дней после повторного введения, который сохраняется не менее 6 месяцев. Колостральный иммунитет у поросят, полученных от иммунизированных свиноматок, сохраняется до 21 дня. Вакцина безвредна, лечебными свойствами не обладает.

Вакцину вводят супоросным свиноматкам внутримышечно в область верхней трети шеи (за ухом) в дозе 2 мл двукратно: первый раз - за 50-55 суток до опороса, второй раз - за 25-30 суток до опороса. В последующем вакцину вводят за 25-30 суток до каждого последующего опороса однократно в той же дозе. Не допускается проведение вакцинации свиноматок позже, чем за 25-30 суток до опороса, а также лактирующих животных.

Поросят вакцинируют, начиная с 14-дневного возраста. Вакцину вводят внутримышечно в бедренную группу мышц двукратно с интервалом 21-24 дня в дозе 2 мл, дополнительную ревакцинацию проводят в возрасте 4 мес. однократно.

Запрещено иммунизировать клинически больных и/или ослабленных животных.

Осуществление изобретения

Приведенные ниже примеры являются иллюстративными и, тем самым, не ограничивают рамки настоящего изобретения.

Пример №1. Культивирование производственных штаммов *S. suis* УР-4-ВБХ, *S.*

porcinus УР-3-ВВХ, *S. pyogenes* ОБ-4-ВВХ, *S. dysgalactiae* УР-16-ВВХ проводили глубинным методом, каждый штамм выращивался отдельно.

Подготовка посевного материала проводилась следующим образом: в первый день работы проводили подготовку первой генерации посевного материала, для чего в ампулу с лиофильно высушенным штаммом вносили питательный бульон в объеме 1 мл для восстановления лиофилизата. Полученную суспензию в объеме 0,5 см<sup>3</sup> переносили в пробирки с питательным бульоном и параллельно проводили рассев суспензии на чашки Петри с агаром Хоттингера с 10% дефибрированной кровью барана. Посевы культивировали 24±2 ч при температуре 37±1°С, после чего проводили изучение полученных колоний стрептококков по культуральным, морфологическим и тинкториальным свойствам, с целью определения типичности роста и отсутствия роста посторонней микрофлоры. Также культуры микроскопировали после окрашивания по методу Грама. При соответствии производственных штаммов заявленным требованиям и отсутствию посторонней микрофлоры полученные культуры пересеивали во флаконы с питательным бульоном для накопления биомассы (1 пробирка на 250 см<sup>3</sup> питательной среды).

Полученные флаконы культивировали в течение 24±2 часов при температуре 37±1°С для получения второй генерации штамма. Культуры во флаконах контролировали по культуральным, морфологическим и тинкториальным свойствам, с целью определения типичности роста и отсутствия роста посторонней микрофлоры.

Для получения необходимого количества бактериальной массы штаммов стрептококков проводили засев ферментера Sartorius «BIOSTAT-A». Культивирование штаммов проводили в бульоне Хоттингера, при этом объем маточной раскладки, вносимой в ферментер составлял 10% к объему питательной среды. Реакторное культивирование проводили при температуре 37°С и рН 7,0-7,8 в течение 14-16 часов, до прекращения стабильного увеличения концентрации бактериальных клеток. В процессе культивирования уровень водородных ионов питательной среды поддерживали на уровне 7,6-7,8 внесением 20% раствора едкого натра. Дополнительно проводили обогащение среды путем внесения через определенные промежутки времени 40% раствора глюкозы до концентрации 0,5% от объема среды.

Описанная схема культивирования позволяла добиться концентрации бактериальной суспензии стрептококков 8,3±1,8 млрд. мкр. кл. /см<sup>3</sup>.

Пример №2. Инактивация бактериальной массы штаммов стрептококков.

Полученную бактериальную массу стрептококков (пример №1) инактивировали внесением формалина, содержащего не менее 37% формальдегида, из расчета 0,3% к объему культуральной жидкости. Таким образом, к 2750 мл бульонной культуры, полученной методом глубинного культивирования, добавлялось 8,25 мл формалина. Инактивация производилась в течение 72 часов при температуре 21-22°С.

Пример №3. Концентрирование бактериальной массы стрептококков.

Концентрирование полученной инактивированной бактериальной суспензии (пример №2) проводили центрифугированием на оборудовании MPW-380R в течение 1 часа при 3 тысячах оборотах, RCF - 1861. После центрифугирования и отделения надосадочной жидкости (фугата), бактериальную массу собирали в отдельную стерильную емкость, определяли ее объем и концентрацию и хранили при температуре 2-8°С до дальнейшего использования. Определение концентрации суспензии проводили с использованием стандартов мутности - набор ОСО мутности бактериальных взвесей ГКПМ ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России. В результате данной манипуляции удается

сконцентрировать бактериальные клетки в 10-15 раз, по сравнению с первоначальным объемом.

Пример №4. Определение полноты инактивации антигенов стрептококков.

Полноту инактивации антигенов оценивали по отсутствию жизнеспособных клеток в бактериальной массе путем посева образцов на ростообеспечивающие питательные среды в соответствии с ГОСТ 28085-2013 «Средства лекарственные биологические для ветеринарного применения. Метод бактериологического контроля стерильности». В результате проведенного контроля трех серий препарата была установлена их стерильность. Ни на одной из используемых сред роста посторонней микрофлоры не выявлено.

Также полноту инактивации оценивали по безвредности полученных антигенов в биопробе на лабораторных мышах массой 16-18 грамм. Бактериальную суспензию каждого штамма разводили водой для инъекций 1:10, тщательно перемешивали и вводили мышам подкожно в объеме 0,5 см, используя по четыре подопытных мыши на каждый антиген. Все антигены, используемые для компоновки трех серий вакцин, были стерильными и не вызывали гибель лабораторных животных в течение 14 дней наблюдения.

Пример №5. Составление серии инактивированной вакцины против стрептококков свиней проводили по следующей методике.

При составлении серии вакцины в стерильной емкости проводили смешивание четырех инактивированных бактериальных антигенов производственных культур с фосфатно-буферным раствором в качестве разбавителя, карбополом 971 в качестве адьюванта, и мертиолятом натрия в качестве консерванта, устанавливая концентрацию бактериальных антигенов 14 млрд. мкр. кл./см<sup>3</sup> (по 3,5 млрд. мкр. кл./см<sup>3</sup> каждого штамма). Компоненты перемешивали до получения однородной суспензии, после чего устанавливали рН серии вакцины на уровне 6,2-7,8. Пропись состава вакцины при использовании данного варианта компоновки, приведена в таблице №2. Состав приведен из расчета объема выпускаемой серии 10 тысяч доз - 20 литров препарата.

**Таблица №2. Состав вакцины против стрептококков свиней инактивированной**

\*

Компоненты	Содержание компонента в вакцине	
	% от объема	на 20 л*
Антиген <i>S. suis</i> УР-4-ВБХ (конц. 108,3 млрд. мк. кл / см <sup>3</sup> )	1,61	0,323
Антиген <i>S. porcicus</i> УР-3-ВБХ (конц. 91,3 млрд. мк. кл / см <sup>3</sup> )	1,91	0,383
Антиген <i>S. pyogenes</i> ОБ-4-ВБХ (конц. 100,9 млрд. мк. кл / см <sup>3</sup> )	1,73	0,347
Антиген <i>S. dysgalactiae</i> УР-16-ВБХ (конц. 94,8 млрд. мк. кл / см <sup>3</sup> )	1,84	0,369
Карбопол 971 2% раствор	10,0	2,0
Формалин (37% формальдегида) из расчета 1 мл/л	0,1	0,02
Мертиолят (1:10000)	0,01	0,002
PBS	82,17	16,43
NaOH 10% (приблизительно 5-7 мл/л)	0,62	0,124
Уровень рН = 7,4		

\* используемый объем зависит от концентрации антигена.

Полученная таким образом вакцина по внешнему виду представляет собой суспензию светло-серого цвета с серо-белым осадком, легко разбивающимся при взбалтывании в гомогенную взвесь.

Пример №6. Определение стерильности вакцины

Контроль стерильности вакцины проводили согласно ГОСТ 28085-2013 «Средства лекарственные биологические для ветеринарного применения. Метод бактериологического контроля стерильности». Так, из каждого флакона (каждой серии) с лекарственным средством проводили посев на жидкие питательные среды - МПБ, МППБ (среда Китт-Тароцци), Сабуро, и на твердые питательные среды - МП А и Сабуро. Посев из каждого флакона проводили на три пробирки и две чашки с питательной средой. При посеве в среду Китт-Тароцци высев делали на две пробирки и два флакона. Для выявления аэробных микроорганизмов и факультативно-анаэробных микроорганизмов высевали по  $0,5 \text{ см}^3$  посевного материала в одну пробирку и  $1-2 \text{ см}^3$  в один флакон, а для выявления анаэробных микроорганизмов - соответственно по 1 и  $5 \text{ см}^3$ . Пробирки и флаконы с посевами на всех средах, кроме среды Сабуро, культивировали в термостате при температуре  $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ , на среде Сабуро - при температуре  $(22,5 \pm 2,5)^\circ\text{C}$ , в течение 7 сут (для анаэробов - 14 сут). По истечении указанного срока делали пересев, за исключением посевов на МПА. Пересевали пробы на те же питательные среды и в тех же объемах, что и при посеве. Вторичные посевы также выдерживали 7 сут (для анаэробов - 14 сут). В результате проведенного контроля трех серий препарата была установлена их стерильность.

Пример №7. Определение значения показателя  $Ld_{50}$  штаммов стрептококков.

Для определения вирулентности штаммов стрептококков использовали белых мышей массой 16-18 гр. Заражение мышей проводили путем внутрибрюшинного введения двукратных разведений суспензии бактериальных культур в концентрациях:  $3,0 \cdot 10^9$  м.к.,  $3,0 \cdot 10^8$  м.к.,  $3,0 \cdot 10^7$  м.к.,  $3,0 \cdot 10^6$  м.к. в объеме  $0,5 \text{ см}^3$ . На каждую заражающую концентрацию использовали 10 мышей. Период наблюдения за животными составлял 10 суток с момента введения культур. Полученные результаты интерпретируют с использованием пробит-анализа при помощи программного обеспечения BioStat 2009.

Проведенные исследования позволили установить значение вирулентности контрольно-производственных штаммов стрептококков, используемых при оценке иммуногенной активности предложенной вакцины. В результате исследований получены следующие результаты значения  $Ld_{50}$  для контрольных штаммов:  $Ld_{50}$  *Streptococcus suis* УР-4-ВБХ -  $1,08 \cdot 10^9$  мкр. кл.;  $Ld_{50}$  *Streptococcus porcinus* УР-3-ВБХ -  $3,25 \cdot 10^9$  мкр. кл.;  $Ld_{50}$  *Streptococcus pyogenes* ОБ-4-ВБХ -  $2,95 \cdot 10^8$  мкр. кл.;  $Ld_{50}$  *Streptococcus dysgalactiae* УР-16-ВБХ -  $3,98 \cdot 10^8$  мкр. кл.

Пример №8. Определение иммуногенной активности вакцины в отношении *S. suis*, *S. pyogenes*, *S. porcinus* и *S. dysgalactiae*.

Для проведения испытаний формировали восемь групп белых мышей массой 16-20 г. по 10 голов в каждой (всего 4 опытные группы и 4 контрольные группы, по 1 опытной и контрольной группе на каждый штамм). Вакцину вводили белым мышам опытных групп двукратно с интервалом 21-24 дня подкожно в область холки в дозе по 0,5 мл. Контрольных мышей не иммунизировали. Через 14 дней после повторной вакцинации проводили заражение 10 вакцинированных и 10 контрольных мышей-аналогов каждым штаммом, входящим в состав препарата. А именно: 1 опытную и контрольную группу заражали штаммом *Streptococcus suis* УР-4-ВБХ; 2 опытную и контрольную группу заражали штаммом *Streptococcus porcinus* УР-3-ВБХ; 3 опытную и контрольную группу заражали штаммом *Streptococcus pyogenes* ОБ-4-ВБХ; 4 опытную и контрольную группу

заражали штаммом *Streptococcus dysgalactiae* УР-16-ВБХ. Суспензию вводили белым мышам внутрибрюшинно в дозе 5 Ld<sub>50</sub> в объеме 0,5 мл. Одновременно с заражением мышей проводили контроль метода введения, для чего дополнительно использовали 10 мышей, которым вводили стерильный физиологический раствор внутрибрюшинно в дозе 0,5 мл. Срок наблюдения за всеми животными составлял 10 суток.

Результаты определения иммуногенной активности трех серий предлагаемой вакцины, приведены в таблице №3.

**Таблица №3.** Результаты определения иммуногенной активности трех серий предлагаемой вакцины.

№ серии вакцины против стрептококка свиней инактивированной	Опытная группа №1 (заражение штаммом <i>S. suis</i> УР-4-ВБХ)	Опытная группа №2 (заражение штаммом <i>S. porcicus</i> УР-3-ВБХ)	Опытная группа №3 (заражение штаммом <i>S. pyogenes</i> ОБ-4-ВБХ)	Опытная группа №4 (заражение штаммом <i>S. dysgalactiae</i> УР-16-ВБХ)	Контрольная группа №1 (заражение штаммом <i>S. suis</i> УР-4-ВБХ)	Контрольная группа №2 (заражение штаммом <i>S. porcicus</i> УР-3-ВБХ)	Контрольная группа №3 (заражение штаммом <i>S. pyogenes</i> ОБ-4-ВБХ)	Контрольная группа №4 (заражение штаммом <i>S. dysgalactiae</i> УР-16-ВБХ)
№1, (было/пало)	10/1	10/0	10/0	10/0	10/10	10/10	10/10	10/10
№2, (было/пало)	10/0	10/0	10/0	10/0	10/10	10/10	10/9	10/10
№3, (было/пало)	10/0	10/1	10/0	10/0	10/10	10/10	10/10	10/10

Полученные результаты свидетельствуют о том, что выживаемость животных опытных групп вне зависимости от использованной серии препарата составила 90-100%, в то время как не менее 90% животных контрольных групп погибли в течение 4-9 суток после заражения (указано минимальное значение по трем сериям препарата), что говорит о высоком уровне иммуногенной активности вакцины.

Пример №9. Определение антигенной активности вакцины по отношению к штаммам *Streptococcus suis*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus porcicus*, *Streptococcus pyogenes* в реакции агглютинации.

#### Проведение испытания

Определение антигенной активности предлагаемой вакцины проводили с использованием белых мышей. Вакцину вводили 40 белым мышам массой 16-18 г двукратно подкожно с интервалом 21 день в область холки в объеме 0,5 мл. Через 14 дней после повторного введения у вакцинированных и контрольных мышей-аналогов проводили взятие крови для получения сывороток. Всю полученную сыворотку крови от мышей каждой группы объединяли в общий пул и использовали для постановки реакции агглютинации с целью определения титра антител к *S. suis*, *S. dysgalactiae*, *S. porcicus*, *S. pyogenes*. Полученные сыворотки перед использованием прогревали на водяной бане при 56°C в течение 30 мин. Полученную сыворотку подвергали двукратному разведению: 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32 стерильным физиологическим раствором. Антиген для опыта получали путем культивирования контрольно-производственных штаммов на агаре МПА. В последующем культуру смывали стерильным физиологическим раствором. Прогревали при 56°C в течение 30 мин, и доводили до концентрации 2 млрд. мкр. кл. см<sup>3</sup>. В последующем производили смешивание сыворотки и антигена соответствующего штамма в равных объемах (по 0,5 см<sup>3</sup>). Контролем

служила испытуемая культура, смешанная с физиологическим раствором (рН 7,2) и с нормальной кроличьей сывороткой, разведенной 1:10 (для исключения самоагглютинации культуры). Помимо этого, в контроле также исследовалась сыворотка, полученная от невакцинированных мышей. Смешанные сыворотки с антигеном инкубировали при 37°C в течение 18 часов.

При испытании предложенным образом трех серий вакцины были получены результаты, свидетельствующие о том, что спустя 14 дней после второй вакцинации лабораторных животных, уровень антител находился в диапазоне 1:8-1:16 выраженные не менее чем на 3 креста. При этом у невакцинированных животных титры антител отсутствовали. Самоагглютинация с физиологическим раствором и нормальными кроличьими сыворотками отсутствовала во всех случаях. Таким образом было доказано, что вакцина обладает необходимым уровнем антигенной активности.

Пример №10. Оценка протективной эффективности вакцины при вакцинации супоросных свиноматок.

Для оценки протективной эффективности предложенной вакцины проведены полевые испытания в свиноводческом комплексе Смоленской области, неблагополучном по стрептококкозам, вызванным *S. suis*, *S. dysgalactiae*, *S. porcinus* и *S. pyogenes*. Свины для опыта подбирались по принципу аналогов, то есть у всех животных в опытной и контрольной группах были идентичные параметры массы тела, возраст, состояние здоровья. Животных содержали в помещениях свинокомплексов отдельно по группам. Кормление осуществлялось специальными концентрированными комбикормами, предназначенными для данных возрастных групп животных.

Оценку эффективности препарата проводили на супоросных свиноматках, которых вакцинировали двукратно с интервалом 24 дня. Наблюдение за вакцинированными животными, а также за поросятами, полученными от вакцинированных и интактных (контрольных) свиноматок, проводили до наступления отъема поросят и перевода их на доращивание в возрасте 24 дня. Оценка эффективности предложенного препарата проводилась по следующим параметрам: сохранность полученных поросят, средний вес поросят при отъеме, среднесуточный привес. Результаты испытания отражены в таблице №4.

**Таблица №4.** Производственные показатели в группах подопытных животных в вакцинированной и контрольной группах.

Группа свиноматок	Кол-во свиноматок в группе	Кол-во полученных поросят	Выжило поросят до отъема	Сохранность, %	Средний вес новорожденных поросят (кг)	Средний вес поросенка при переводе на доращивание (кг)	Средне суточный привес, кг
Опытная	256	2989	2814	94,14	1,22	6,96	0,239
Контрольная	30	334	298	89,22	1,24	6,48	0,218

Полученные результаты показывают, что применение вакцины обеспечивает 94,14% сохранности поросят, полученных от вакцинированных свиноматок, тогда как в контрольной группе (поросята от неиммунных свиноматок) сохранность составила 89,22%. При этом у заболевших и павших поросят отмечены признаки стрептококковой инфекции с поражением суставов и менингитной формой инфекции. В группе поросят, полученных от вакцинированных свиноматок, не зафиксировано заболеваний с признаками, характерными для стрептококковой инфекции.

Также, полученные от вакцинированных свиноматок поросята имели больший вес

при переводе на доращивание в среднем на 0,48 кг. Четко выраженное положительное влияние вакцинации установлено и на среднесуточные привесы поросят: в опытной группе они составляли 239 гр/сутки, а у поросят в контрольной группе 218 гр/сутки, что меньше на 8,78%.

5 Пример №11. Оценка протективной эффективности вакцины при вакцинации поросят.

Для оценки протективной эффективности предложенной вакцины проведены испытания на свиноводческом комплексе Тюменской области, неблагополучном по стрептококкозам, вызванным *S. suis*, *S. dysgalactiae*, *S. porcinus* и *S. pyogenes*. При проведении клинических исследований свиньи различных возрастных групп подбирались по принципу аналогов, то есть у всех животных в опытной и контрольной группах были идентичные параметры массы тела, возраст, состояние здоровья. Животных содержали в помещениях свинокомплексов отдельно по группам. Кормление осуществлялось специальными концентрированными комбикормами, предназначенными для данных возрастных групп животных.

15 Оценку эффективности препарата проводили на поросятах отъемышах, которых вакцинировали двукратно с интервалом 21 день в возрасте 14 и 25 дней. Наблюдение за вакцинированными и контрольными поросятами проводили в течение периода доращивания до перевода на откорм с 27 по 85 день жизни (период доращивания - 58 дней). Оценка эффективности предложенного препарата проводилась по параметрам сохранности полученных поросят, средний вес поросят при переводе на откорм, среднесуточный привес. Результаты испытания отражены в таблице №5.

**Таблица №5. Производственные показатели в группах подопытных животных в вакцинированной и контрольной группах.**

Группа	Кол-во поросят в группе при отъёме	Количество поросят в возрасте 85 дней	Сохранность, %	Средний вес поросят при переводе на доращивание, кг	Средний вес поросенка в 85 дней, кг	Среднесуточные привесы, гр
Опытная	200	193	96,5	7,13	28,22	0,363
Контрольная	100	87	87,0	7,28	26,73	0,335

Применение вакцины обеспечивает 96,50% сохранности вакцинированных поросят, тогда как в контрольной группе сохранность составила 87%, при этом у заболевших и павших поросят отмечены признаки стрептококковой инфекции: септицемия, поражение суставов, менингиты. В группе вакцинированных поросят не зафиксировано заболевания поросят с признаками, характерными для стрептококковой инфекции.

У вакцинированных поросят средний вес при переводе на откорм был в среднем на 1,49 кг выше, чем у животных контрольной группы. Четко выраженное положительное влияние вакцинации установлено и на среднесуточные привесы поросят: в опытной группе они составляли 363 гр/сутки, у поросят в контрольной группе 335 гр/сутки, что меньше на 7,71%.

Как видно из представленных данных, поливалентная инактивированная вакцина против стрептококкозов свиней является безопасным и эффективным иммунобиологическим препаратом и может быть рекомендована для использования в свиноводческих хозяйствах для профилактики стрептококкоза свиней.

#### (57) Формула изобретения

1. Поливалентная инактивированная вакцина против стрептококкозов свиней, содержащая в своем составе следующие компоненты из расчета на одну

иммунизирующую дозу препарата в 2 см<sup>3</sup>: инактивированный протективный антиген штамма *Streptococcus suis* № В-8345 «ГКПМ-Оболенск» - 3,5 млрд. мкр. кл.; инактивированный протективный антиген штамма *Streptococcus porcinus* № В-8343 «ГКПМ-Оболенск» - 3,5 млрд. мкр. кл.; инактивированный протективный антиген штамма *Streptococcus pyogenes* № В-8344 «ГКПМ-Оболенск» - 3,5 млрд. мкр. кл.; инактивированный протективный антиген штамма *Streptococcus dysgalactiae* № В-8342 «ГКПМ-Оболенск» - 3,5 млрд. мкр. кл., а также фармацевтически приемлемые целевые добавки.

2. Вакцина по п. 1, отличающаяся тем, что в качестве фармацевтически приемлемых целевых добавок используют консервант в виде водного раствора мертиолята натрия 10%, вводимого в препарат из расчета 1:10000, а именно 1 часть раствора мертиолята натрия на 10000 частей препарата.

3. Вакцина по п. 1, отличающаяся тем, что в качестве фармацевтически приемлемых целевых добавок используют разбавитель в виде стерильного PBS – фосфатно-буферного солевого раствора в количестве, необходимом для получения 100% объема препарата.

4. Вакцина по п. 1, отличающаяся тем, в качестве фармацевтически приемлемых целевых добавок используют инактивант в виде формалина, содержащего не менее 37% формальдегида, из расчета 0,3% к объему культуральной жидкости.

5. Вакцина по п. 1, отличающаяся тем, что в качестве фармацевтически приемлемых целевых добавок содержит адъювант в виде 2% раствора карбопола-971 в количестве 10% от объема препарата.

6. Вакцина по п. 5, отличающаяся тем, что при использовании в качестве адъюванта карбопола-971 она дополнительно содержит 20%-ный раствор едкого натра в объеме, необходимом для установления оптимального уровня pH 6,2-7,8.

7. Способ получения вакцины по п. 1, включающий культивирование производственных штаммов; инактивацию культуральной жидкости; концентрирование антигенов; определение полноты инактивации антигенов; составление серии вакцины; контроль стерильности и безвредности вакцины; определение иммуногенной и антигенной активности вакцины, отличающийся тем, что в качестве производственных штаммов используются штаммы *Streptococcus suis* № В-8345 «ГКПМ-Оболенск», *Streptococcus porcinus* № В-8343 «ГКПМ-Оболенск», *Streptococcus pyogenes* № В-8344 «ГКПМ-Оболенск», *Streptococcus dysgalactiae* № В-8342 «ГКПМ-Оболенск»; получение антигенов происходит с использованием глубинного культивирования при поддержании уровня pH 6,2-7,8.

8. Способ применения вакцины по п. 1, отличающийся тем, что вакцину вводят супоросным свиноматкам внутримышечно в область верхней трети шеи, за ухом, в дозе 2 мл двукратно: первый раз - за 50-55 суток до опороса, второй раз - за 25-30 суток до опороса, в последующем вакцину вводят за 25-30 суток до каждого последующего опороса однократно в той же дозе; поросят вакцинируют, начиная с 14-дневного возраста, используя внутримышечное двукратное введение в бедренную группу мышц с интервалом 21-24 дня в дозе 2 мл, а дополнительную ревакцинацию проводят в возрасте 4 мес. однократно.