

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

C12N 15/74 (2025.08); A61K 39/0258 (2025.08); A61K 31/04 (2025.08)

(21)(22) Заявка: 2024125075, 27.08.2024

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
27.08.2024Дата регистрации:
03.10.2025

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 27.08.2024

(45) Опубликовано: 03.10.2025 Бюл. № 28

Адрес для переписки:

308015, г.Белгород, ул. Победы, 85, НИУ
"БелГУ", Токтарева Татьяна Михайловна

(72) Автор(ы):

Пильтяй Александр Геннадьевич (RU),
Фоминова Ирина Олеговна (RU),
Грановский Игорь Эдуардович (RU),
Коваленко Дмитрий Вадимович (RU),
Дейкин Алексей Васильевич (RU),
Земскова Марина Юрьевна (RU),
Дуванова Юлия Михайловна (RU),
Кузницын Рафаил Александрович (RU),
Пильгуй Лидия Сергеевна (RU)

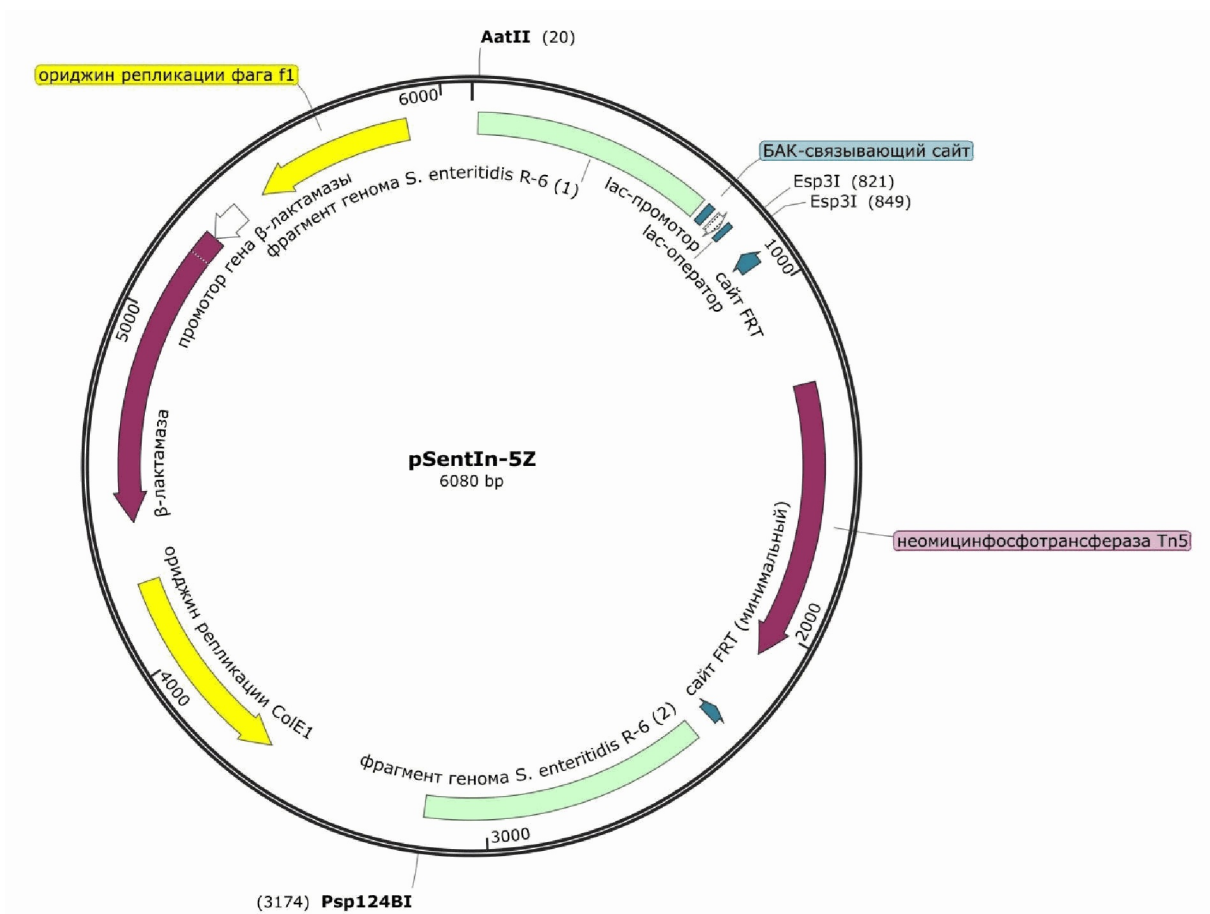
(73) Патентообладатель(и):

Федеральное казенное предприятие
"Ставропольская биофабрика" (RU)(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: KR 1020130011809 A, 30.01.2013. RU
2292913 C1, 10.02.2007. RU 2371197 C1,
27.10.2009. RU 2404803 C1, 27.11.2010.(54) Способ получения штамма *Salmonella enteritidis* R-6 esp-chromo, штамм *Salmonella enteritidis* R-6 esp-chromo, вакцина на основе штамма *Salmonella enteritidis* R-6 esp-chromo и способ ее получения

(57) Реферат:

Изобретение относится к области биотехнологии и генетической инженерии, а именно к ветеринарной микробиологии. Предложен штамм *Salmonella enteritidis* R-6 esp-chromo, экспрессирующий оперон espABCD штамма *Escherichia coli* 388 и имеющий иммуногенногенную активность по отношению к сальмонеллезу и к колибактериозу одновременно, депонирован во Всероссийской коллекции микроорганизмов ИБМФ им. Г.К. Скрыбина, регистрационный номер - «ВКМ В-

3828D». Также предложен способ получения штамма, вакцина с иммуногенногенной активностью по отношению к сальмонеллезу и к колибактериозу на его основе и способ получения вакцины. Изобретение позволяет достичь высокой иммуногенности, обеспечивающей одновременный защитный эффект 80% в отношении штамма *S. Enteritidis* и в отношении штамма *E. Coli* в острых опытах. 4 н.п. ф-лы, 5 ил., 2 табл., 4 пр.



Фиг.1



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.

C12N 15/74 (2006.01)*C12N 15/31* (2006.01)*A61K 39/108* (2006.01)*A61P 31/04* (2006.01)(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC

C12N 15/74 (2025.08); A61K 39/0258 (2025.08); A61K 31/04 (2025.08)(21)(22) Application: **2024125075, 27.08.2024**(24) Effective date for property rights:
27.08.2024Registration date:
03.10.2025

Priority:

(22) Date of filing: **27.08.2024**(45) Date of publication: **03.10.2025** Bull. № 28

Mail address:

**308015, g. Belgorod, ul. Pobedy, 85, NIU "BelGU",
Toktareva Tatyana Mikhajlovna**

(72) Inventor(s):

**Piltiai Aleksandr Gennadevich (RU),
Fominova Irina Olegovna (RU),
Granovskii Igor Eduardovich (RU),
Kovalenko Dmitrii Vadimovich (RU),
Deikin Aleksei Vasilevich (RU),
Zemskova Marina Iurevna (RU),
Duvanova Iuliia Mikhailovna (RU),
Kuznitsyn Rafail Aleksandrovich (RU),
Pilgui Lidiia Sergeevna (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Federalnoe kazennoe predpriatie
"Stavropolskaia biofabrika" (RU)****(54) METHOD FOR OBTAINING THE SALMONELLA ENTERITIDIS R-6 ECP-CHROMO STRAIN, THE SALMONELLA ENTERITIDIS R-6 ECP-CHROMO STRAIN, A VACCINE BASED ON THE SALMONELLA ENTERITIDIS R-6 ECP-CHROMO STRAIN, AND A METHOD FOR OBTAINING IT**

(57) Abstract:

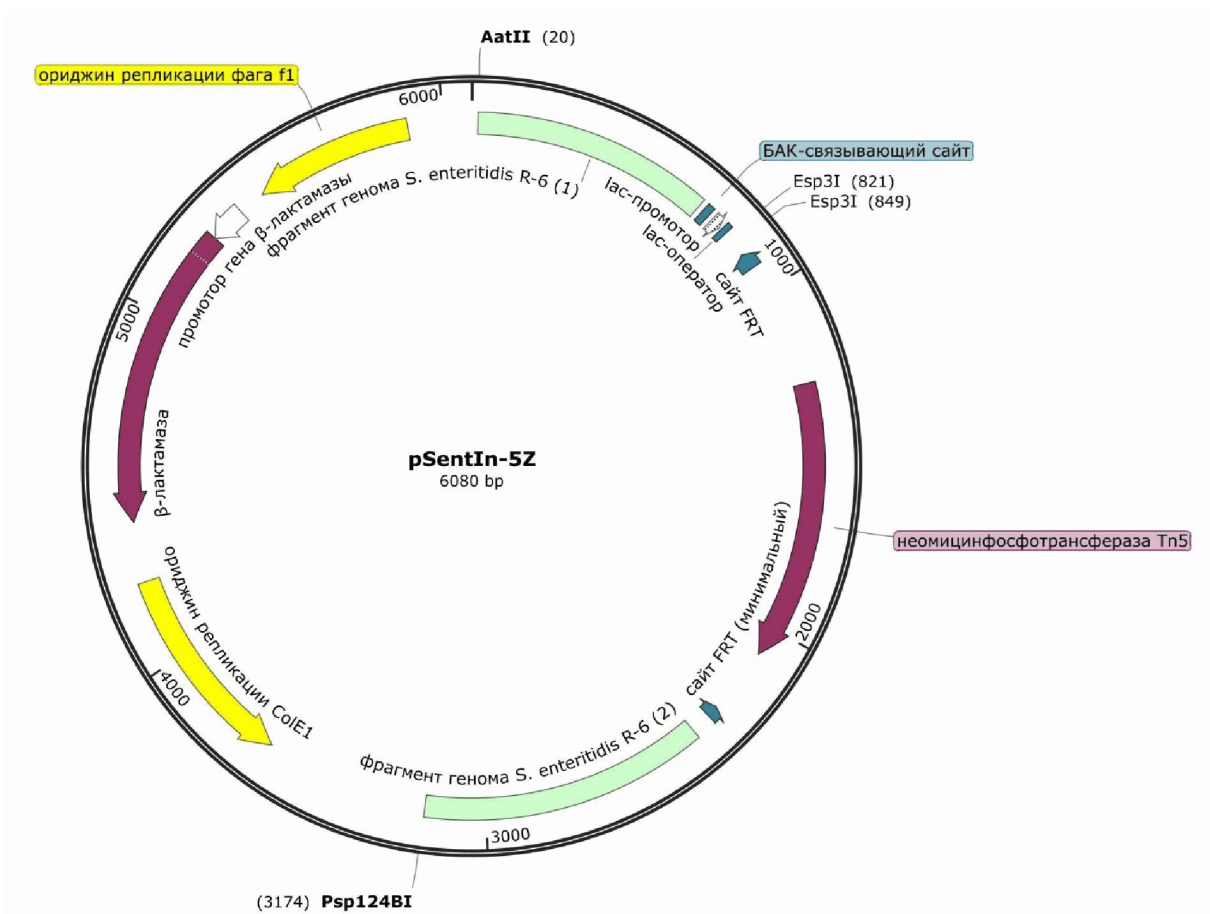
FIELD: biotechnology.

SUBSTANCE: the invention relates to the field of biotechnology and genetic engineering, namely veterinary microbiology. A strain of *Salmonella enteritidis* R-6 ecp-chromo is proposed, which expresses the ecpABCD operon of *Escherichia coli* strain 388 and has immunogenic activity against salmonellosis and colibacillosis simultaneously. deposited in the All-Russian Collection of Microorganisms of the G.K. Skryabin IBMF, registration number "BKM B-3828D".

A method for obtaining the strain, a vaccine with immunogenic activity against salmonellosis and colibacillosis based on it, and a method for obtaining the vaccine are also proposed.

EFFECT: high immunogenicity, providing a simultaneous protective effect of 80% against the *S. Enteritidis* strain and against the *E. Coli* strain in acute experiments.

4 cl, 5 dwg, 2 tbl, 4 ex



Фиг.1

Изобретение относится к области биотехнологии и генетической инженерии, а именно к ветеринарной микробиологии, в частности к получению штамма *Salmonella enteritidis* R-6 esp-chromo, пригодного для использования в вакцинах для профилактики сальмонеллеза и колибактериоза птиц.

В настоящий момент птицеводство является одной из ключевых отраслей в сельском хозяйстве. Выращивание птицы обосновано как с экономической, так и с потребительской точки зрения за счет плодовитости, скороспелости и значительной рентабельности мяса птицы, а также в связи с увеличением количества населения.

При этом существует проблема растущей заболеваемости у домашней птицы в условиях содержания на фермах. Лечение и профилактика возложенные на ветеринаров и фермеров не всегда могут выполняться, по причине невысокой эффективности существующих препаратов, большом количестве побочных эффектов и противопоказаний.

Известно, что колибактериоз (эшерихиоз) и сальмонеллез распространенные диагнозы в ветеринарии. Колибактериоз - локальная или системная инфекция, вызываемая микроорганизмом *Escherichia coli*. Развивается у цыплят с ослабленной или поврежденной иммунной системой, развивающаяся у птиц как вторичная или системная болезнь. *Escherichia coli* занимает доминирующее место, и ее удельный вес в спектре выделенной микрофлоры составляет 40,7-41,6%. (Новикова О.Б., Павлова М.А., Бартенев А.А. О проблеме колибактериоза в птицеводстве // Эффективное животноводство. 2018. №6 (145). URL: <https://cyberleninka.ru/article/ri/o-probleme-kolibakterioza-v-ptitsevodstve> (дата обращения: 16.02.2024).

Доминирующая роль *E. coli* в инфекционной патологии птиц значительно осложняет эпизоотическую ситуацию в хозяйстве вследствие того, что кишечная палочка является фундаментом для развития смешанных инфекций. Колибактериоз часто протекает в ассоциации с сальмонеллезом, не менее деструктивным инфекционным заболеванием, которое характеризуется разным течением болезни (сверхострым, острым, подострым и хроническим).

Исходя из всего вышеперечисленного, данные заболевания регистрируются во всех регионах мира и представляют большую опасность, в связи с этим становится очевидной актуальность борьбы с данным заболеванием.

Известно изобретение RU 2216350 C2 в котором описано получение штамма *Salmonella typhimurium* 14 - МГАВМиБ - ДЕЛ", депонированного во Всероссийской государственной коллекции штаммов микроорганизмов, используемых в ветеринарии и животноводстве. Штамм *Salmonella typhimurium* 14 выращивают в реакторах в казеиновом бульоне.

Посевная доза составляет 150-300 млн. м.к. на 1 см³ питательной среды. Культивирование проводят в течение 16-18 часов при температуре 36-37°C при постоянном перемешивании и интенсивной аэрации из расчета объем стерильного воздуха на объем среды в минуту (в соотношении 1:3). Концентрация микробных клеток через 16-18 ч составляет 40-50 млрд. м.к. по оптическому стандарту мутности ГИСК им. К.А. Тарасовича, что дало возможность применить штамм для изготовления вакцины против сальмонеллеза сельскохозяйственных животных и пушных зверей. Вакцина, изготовленная с использованием предложенного штамма, обеспечивает 90%-ный защитный эффект от заражения вирулентными эпизоотическими штаммами на 5-7 сутки.

Недостатком штамма является невозможность его использования для создания вакцины против сальмонеллеза и колибактериоза одновременно.

Известно изобретение по патенту RU 2218177 C2 (Опубликовано: 10.12.2003), в

котором описано получение штамма бактерий *Salmonella enteritidis*. Штамм *Salmonella enteritidis* 22 депонирован 27 апреля 2001 года, регистрационный номер "штамм *Salmonella enteritidis* 22 МГАВМиБ - ДЕЛ", во Всероссийской государственной коллекции штаммов микроорганизмов, используемых в ветеринарии и животноводстве. Штамм *Salmonella enteritidis* 22 выращивают в реакторах в казеиновом бульоне. Плотность посева 150-250 млрд. м.к. на 1 см³ питательной среды. Культивирование проводят при температуре 36-37°C при интенсивном механическом перемешивании и аэрацией воздухом из расчета объем стерильного воздуха 1 л питательной среды в соотношении 1:3. Через 16 ... 18 ч культивирования концентрация микробных клеток достигает 40-50 млрд. м.к. по оптическому стандарту мутности ГИСК им. К.А. Тарасевича, что дало возможность применить штамм для изготовления вакцины против сальмонеллеза сельскохозяйственных животных и пушных зверей. Вакцина, изготовленная с использованием предложенного штамма, обеспечивает защитный эффект от заражения вирулентными эпизоотическими штаммами на 5-7 сутки.

Недостатком штамма является невозможность его использования для создания вакцины против сальмонеллеза и колибактериоза одновременно

Известно изобретение по патенту RU 2292913 C1 (Опубликовано 10.02.2007), в котором описана вакцина ассоциированная против сальмонеллеза и колибактериоза нутрий, которая в качестве антигенов содержит суспензию клеток чистой культуры возбудителей сальмонеллеза *Salmonella typhimurium* и возбудителя *Escherichia coli*, полученных путем отбора пораженных органов от павших нутрий из местного эпизоотического очага, приготовления суспензии, посева на дифференциально-диагностические среды, выделения чистых культур возбудителей и их отдельного выращивания в мясо-пептонном бульоне с глюкозой с концентрацией микробных клеток 4-5 млрд. в 1 см³. Вакцина также содержит формалин и гидроокись алюминия при следующем соотношении компонентов, мас. %: суспензия клеток чистой культуры возбудителя сальмонеллеза *Salmonella typhimurium*, выделенного из местного эпизоотического очага в питательной среде с титром 4-5 млрд. микробных клеток в 1 см³ 37,0-40,5, суспензия клеток чистой культуры возбудителя *Escherichia coli*, выделенного из местного эпизоотического очага в питательной среде с титром 4-5 млрд. микробных клеток в 1 см 37,0-40,5, глюкоза 2,0-1,0, формалин 2,0-1,5, гидроокись алюминия остальное.

Недостатком изобретения является невозможность применения на птицах, а также сложность получения культур клеток и невозможность получения из одного штамма суспензии для создания вакцины против сальмонеллеза и колибактериоза одновременно.

Известно изобретение RU 2507253 C2 (Опубликовано: 20.02.2014) в котором описано получение генетически модифицированной бактерии *Salmonella enterica*, которая содержит, по меньшей мере, один оперон *pgl* из *Campylobacter jejuni* или его функциональное производное и относится к презентации, по меньшей мере, одного N-гликана из *Campylobacter jejuni* или производного этого N-гликана на их клеточной поверхности. В бактерии один или несколько генов для биосинтеза бациллозамина инаktivированы мутацией и/или частичной или полной делецией генов *pglD*, *E*, *F*, *G*. Способ получения генетически модифицированной бактерии *Salmonella enterica* включает стадию введения в *Salmonella enterica*, по меньшей мере, одним плазмидным вектором или геномной интеграцией, по меньшей мере, одного оперона *pgl* из *C.jejuni* или его функционального производного, предпочтительно, по меньшей мере, одного оперона *pgl*, в котором один или несколько, предпочтительно все гены для биосинтеза

бациллозамина инаktivированы, и предпочтительно введения в ген *wbaP* мутаций и/или делеций, приводящих к полной инаktivации биосинтеза О-антигена. Использование изобретения обеспечивает безопасность и эффективность профилактики инфекции у людей и лечения животных, в частности домашнего скота и домашней птицы. Однако

5 указанное изобретение направлено на применение модифицированной бактерии в фармакологических композициях медицинского и ветеринарного назначения, а также на способы лечения и/или профилактики инфекций *Campylobacter* и необязательно *Salmonella*.

Недостатком данного технического решения является его направленность на лечение

10 и профилактику инфекций *Campylobacter jejuni*, невозможность его использования для создания вакцины против сальмонеллеза и колибактериоза одновременно.

Известна инаktivированная вакцина против колибактериоза, сальмонеллеза, клебсиеллеза и протейной инфекции молодняка сельскохозяйственных животных и пушных зверей, полученная из инаktivированных штаммов энтеробактерий *E. coli* 09: K99, *E. coli* 0138:K88, *S. dublin*, *S. enteritidis*, *S. typhimurium*, *K. pneumoniae*, *P. vulgaris*, *P. Mirabilis*. Иммуитет у животных формируется через 2 недели и активен течение 6 месяцев [Овчинников А.К. Адьювантно-продолгующее действие споробактерина при вакцинации телят против сальмонеллеза // Известия Оренбургского государственного аграрного университета. 2005. №8-1. С. 87-88]

15

Недостаток, необходимость использования большого количества инаktivированных штаммов, и направленность для использования против колибактериоза, сальмонеллеза, клебсиеллеза и протейной инфекции только молодняка сельскохозяйственных животных и пушных зверей.

20

В птицеводческих хозяйствах Российской Федерации чаще применяется

25 эмульсированная форма вакцины на основе штамма *S. enteritidis* «С-5-АТ». Ремонтный молодняк вакцинируют с целью защиты цыплят, полученных от вакцинированных птиц, за счет трансовариального иммунитета. [Рождественская Т.Н. Специфическая профилактика *Salmonella enteritidis* - инфекции птиц // Научно-производственное предприятие «Авивак» - 20 лет на службе птицеводства России. 2010. С. 93-9]. Недостаток

30 - узкая направленность, только для профилактики сальмонеллеза.

Также предложена инаktivированная вакцина «Авивак-Сальмо-Коли-Пастовак». В эксперименте уже после первой иммунизации цыплят титр антител превышал минимально положительный показатель (1:1 029) в 2 и 5,4 раза. После второй иммунизации на 195-255 день титр антител установлен на значениях 1:5 626-1:5 867

35 [Рождественская Т.Н. Создание комплексной системы профилактики бактериальных болезней птиц в хозяйствах промышленного типа: автореф. дис. докт. ветер. наук. СПб., 2011. 52 с.].

Недостаток - необходимость использования нескольких штаммов для изготовления вакцины.

40

Сотрудниками Всероссийского научно-исследовательского ветеринарного института птицеводства разработана инаktivированная эмульгированная вакцина под торговым названием «Сальмокрон», которая содержит культуры *Salmonella enteritidis* (SE), *Salmonella typhimurium* (ST), *Salmonella gallinarum* (SG) с добавлением монтанид ISA 70 в качестве адьюванта. Вакцинации подлежат родительское поголовье и куры-несушки

45 промышленного стада в возрасте 7-10 и 12-15 недель, но не позднее чем за 4 недели до начала яйцекладки. Применение в птицеводческих хозяйствах вакцины «Сальмокрон» позволяет создать стабильное благополучие в отношении сальмонеллеза [166, Разработка инаktivированной вакцины против сальмонеллеза птиц / Э.Д. Джавадов,

А.С. Дубовой, М.Е. Дмитриева, О.Б. Новикова // Вопросы нормативно-правового регулирования в ветеринарии. 2010. №2. С. 45-48.].

Недостаток - узкая направленность, только для профилактики сальмонеллеза.

Ставропольская биофабрика для лечения и специфической профилактики сальмонеллеза кур предлагает использовать препарат «Сальмофаг энтеритидис», представляющий собой сухую живую вакцину из фагоустойчивых штаммов *S. enteritidis* R-6 и *S. typhimurium* K-5, и фаголизат культур *S. enteritidis*, *S. gallinarum-pullorum*, *S. typhimurium* [Новый препарат для лечения и профилактики сальмонеллеза птицы / Литвинова З.А., Мандро Н.М. Современные методы профилактики сальмонеллеза сельскохозяйственных животных в Приамурье 191 А.Н. Панин, С.В. Ленев, Ю.А. Малахов, Э.А. Светоч // Доклады российской академии сельскохозяйственных наук. 2006. №3. С. 53-56].

Недостаток - сложный состав и узкая направленность, только для профилактики сальмонеллеза.

Задача изобретения заключается в получении штамма *Salmonella enteritidis* R-6 *esp*-chromo, экспрессирующего антиген штамма *E. coli* 388, с иммуногенногенной активностью по отношению к сальмонеллезу и к колибактериозу одновременно.

В качестве независимого изобретения, настоящее изобретение также относится к штамму *Salmonella enteritidis* R-6 *esp*-chromo, а также к вакцине на основе штамма *Salmonella enteritidis* R-6 *esp*-chromo, и способу получения указанной вакцины.

Техническим результатом является решение поставленных задач, а именно штамм *Salmonella enteritidis* R-6 *esp*-chromo с иммуногенногенной активностью по отношению к сальмонеллезу и к колибактериозу одновременно, способ получения штамма *Salmonella enteritidis* R-6 *esp*-chromo путем трансформации плазмидой, экспрессирующей антиген штамма *E. coli* 388, вакцина на основе указанного штамма, обладающая высокой иммуногенностью, обеспечивающей одновременный защитный эффект 80% в отношении штамма *S. Enteritidis* и в отношении штамма *E. Coli* в острых опытах и способ ее получения.

Технический результат достигается предложенным штаммом *Salmonella enteritidis* R-6 *esp*-chromo, способом получения указанного штамма путем интеграции *esp*-оперона *Escherichia coli* 388 в геном *Salmonella enteritidis* R-6 и удаление гена устойчивости к канамицину, вакциной с иммуногенной активностью по отношению к сальмонеллезу и к колибактериозу одновременно, содержащей эффективное количество культуры штамма *Salmonella enteritidis* R-6 *esp*-chromo в количестве 10-30 млрд/см³ живых микробных клеток, и способом получения вакцины на основе штамма *Salmonella enteritidis* R-6 *esp*-chromo, включающим культивирование рекомбинантного штамма *Salmonella enteritidis* R-6 *esp*-chromo до начала стационарной фазы роста, когда количество живых микробных клеток перестает увеличиваться, и накопление бактерий по оптическому стандарту составляет не менее 10 млрд в 1 см³ бульона, после чего выращенную культуру охлаждают и концентрируют, полученный концентрат разводят средой высушивания до концентрации 100 млрд. микробных клеток в 1 см³ по оптическому стандарту и расфасовывают в стерильные емкости, затем вакцину высушивают методом сублимации в вакууме при условии получения содержания эффективного количества живых микробных клеток в 1 см³ вакцины 10-30 млрд.

Предложенный штамм *Salmonella enteritidis* R-6 *esp*-chromo - отнесен к семейству *Enterobacteriaceae*, к роду *Salmonella*, получен в 2023 году Федеральным казенным предприятием «Ставропольская фабрика», в рамках выполнения научно-

исследовательских работ по теме: «Создание рекомбинантных вакцинных штаммов *Salmonella enteritidis* R-6, экспрессирующих антиген штамма *Escherichia coli* 388» с институтом биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина Российской академии наук - обособленного подразделения Федерального государственного

5 бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук» (ИБФМ РАН).

Предложенный штамм депонирован 22.03.2024, регистрационный номер - «ВКМ В-3828D» во Всероссийской коллекции микроорганизмов ИБМФ им. Г.К. Скрыбина РАН Московская область, г. Пушкино, проспект Науки, д. 5.

10 Предложенный штамм *Salmonella enteritidis* R-6 ecp-chromo обладает следующими свойствами:

Морфологические признаки:

Грамотрицательные палочки без спор и капсул, подвижны.

Культуральные свойства:

15 На МПБ - равномерное помутнение через 8-10 часов роста.

На МПА через 18 часов колонии в «S» форме, диаметром 1-2 мм.

На ПЖА (0,3%) - диффузный рост.

Ферментативные свойства:

20 Ферментирует с образованием кислоты и газа глюкозу, маннит, сорбит, дульцит, арабинозу, ксилозу. Не ферментирует лактозу, сахарозу, не свертывает молоко, не разжижает желатин, образует сероводород, не образует индол.

Антигенная структура:

"O"-9, "H"-g, m.

Серологические свойства:

25 Агглютинируется сальмонеллезными монорецепторными сыворотками.

Генетические маркеры:

Устойчив к рифампицину и стрептомицину. Содержит ecpABCD оперон из *E. coli* 388 в составе хромосомы. Вирулентность для белых мышей:

30 LD₅₀ для белых мышей массой 18-20 г. - $3,5 \times 10^6$ микробных клеток при подкожном введении. Иммуногенность:

В отличие от эпизоотических штаммов обладает низкой стабильной остаточной вирулентностью. Пригодность для изготовления живых вакцин. Фагоцитируемость:

Устойчив к действию вирулентных бактериофагов.

Применяемый способ хранения и поддержания штамма:

35 В лиофилизированном виде, при температуре 2-8°C.

Периодичность посева на питательных средах:

На ПЖА до 3 месяцев.

Условия транспортировки: При температуре 2-8 С.

рок хранения: 5 лет.

40 Изобретение характеризуется следующими графическими материалами.

Фигура 1. Карта плазмиды pSentIn-5z

Фигура 2. Карта встраиваемого фрагмента плазмиды pSentIn-5z, полученного методом ПЦР и содержащего участки генома *S. enteritidis* R-6 в области гена *cbpA*, lac-промотор *E. coli* и ген неомифосфотрансферазы, фланкированный сайтами FRT. Отрезками

45 выше и ниже карты указано положение олигонуклеотидных праймеров, использованных для получения отдельных ПЦР-фрагментов.

Фигура 3. Карта плазмиды pSentIn- ecpABCD

Фигура 4. Скрининг канамицин-устойчивых клонов *S. enteritidis* R-6, содержащих

вставку *espABCD* и *Kan^R*. Представлена электрофореграмма фрагментов геномной ДНК, наработанных при помощи ПЦР с праймерами *cbp2 up* и *cbp2 lo*: 1 - 6 - *S. enteritidis* R-6 [*espABCD KanR*] - расчетный размер - 7292 п. н.; 7 - *S. enteritidis* R-6 - расчетный размер - 953 п. н.

Фигура 5 Электрофореграмма фрагментов геномной ДНК, наработанных при помощи ПЦР с праймерами *cbp2 up* и *cbp2 lo*: 1 - *S. enteritidis* R-6 - расчетный размер - 953 п. н.; 2 - *S. enteritidis* R-6 [*espABCD KanR*] - расчетный размер - 7292 п. н.; 3 - *S. enteritidis* R-6 [*espABCD*] - расчетный размер - 5899 п. н.

Штамм *Salmonella enteritidis* R-6 получен из Всероссийской коллекции штаммов микроорганизмов Федерального государственного бюджетного учреждения «Всероссийский государственный Центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов» (ФГБУ «ВГНКИ») в рамках договора поставки штаммов от 30.09.2021 г. №ДШ-5721.

Пример 1. Получение генно-инженерных конструкций

Для интеграции в геном штамма *Salmonella enteritidis* R-6 был выбран участок *esp*-оперона размером около 5,5 т.п.н., который содержит ОРС *espABCD*. Праймеры, использованные при конструировании, приведены в таблице 1. Плазмида *pSentIn-5z* (фигура 1) была получена на основе вектора *pGEM-5z* путем встраивания в сайты *AatII* и *PspI24BI* фрагмента ДНК, который содержит *lac*-промотор *Escherichia coli*, ген неоминифосфотрансферазы, сайты FRT для удаления гена неоминифосфотрансферазы из генома, а также протяженные участки генома *S. enteritidis* R-6 из области гена *cbpA*, для интеграции фрагмента плазмиды *pSentIn-espABCD* в геном.

Таблица 1. Список олигонуклеотидных праймеров.

Пр аймер	Последовательность 5'-3'
cbp 2 lo	TTACGCCATTATGGGCGTGAAACCGACGGACG ATCTCAAGACGATTAAGACCGCC
cbp 2 up	GGTGTGCAAACAAAATTCGGTGATGGTAAAGG TGACAGTGATGTTAGCCATTATGC
cbp In-1 lo	TGCGCTCATGGCGATAGGCGGTCTTAATCGTCT
cbp In-1 up	TTATAGACGTCATTCACGGAAGACACAAAATC G
cbp In-2 lo	TTTTTGAGCTCTTATTTTGTTTACATTCTATTAC ATTTTTG
cbp In-2 up	GTCAGCTCGAGGGAAGCATAATGGCTAACATC ACTG
KD 4-1 lo	CATTATGCTTCCCTCGAGCTGACATGGGAATTA GCCATGG
KD 4-1 up	GACGTTTCGTACATCCGTCTCAAGCTTGATTGTG TAGGCTGGAGCTGCTTC
lacI n-1 lo	GCTTGAGACGGATGTACGAACGTCTCCCATGG CTGTTTCCTGTGTGAAA
lacI n-1 up	GACCGCCTATCGCCATGAGCGCAACGCAATTA ATG

Полученная плазмида pSentIn-5z была проверена секвенированием.

Плазмида pSentIn-espABCD (фигура 3) была получена на основе плазмиды pSentIn-5z путем клонирования под контроль lac-промотора фрагмента плазмиды pGEM-espABCD (фиг. 2), содержащего гены espABCD штамма *Escherichia coli* 388

Сущность изобретения пояснена перечнем последовательности фрагмента плазмиды pSentIn-espABCD содержащий esp-оперон и фланкирующие его последовательности, вырезанные при помощи эндонуклеаз рестрикции *ZraI* и *EcoICRI*.

Пример 2. Получение штамма *Salmonella enteritidis* R-6 esp-chromo путем интеграции

еср-оперона *Escherichia coli* 388 в геном *Salmonella enteritidis* R-6 и удаления гена устойчивости к канамицину.

Фрагмент плазмиды pSentIn-есрABCD, содержащий еср-оперон и фланкирующие его последовательности, вырезан при помощи эндонуклеаз рестрикции *ZraI* и *EcoICRI* и выделен из агарозного геля в препаративном количестве. Данный фрагмент был использован для электропорации клеток *Salmonella enteritidis* R-6, содержащих плазмиду pKD20. Для селекции рекомбинантов после электропорации указанные клетки высевали на агаризованную среду с канамицином.

В результате были отобраны устойчивые к канамицину клоны *Salmonella enteritidis* R-6 [есрABCD Kan^R], которые на фиг. 4 обозначены позициями 1-6, и проверены при помощи ПЦР с праймерами *cbp2* up и *cbp2* lo на наличие вставки есрABCD Kan^R.

Затем из фрагмента плазмиды pSentIn-есрABCD, которая встроилась в хромосомную ДНК *Salmonella enteritidis* R-6, с помощью FLP-рекомбиназы был вырезан ген неомизинфосфотрансферазы, для чего один из отобранных клонов был электропорирован плазмидой pCP20.

Таким образом был получен рекомбинантный штамм *Salmonella enteritidis* R-6 еср-chromo.

Полученные после электрокорпорации клоны были проверены на потерю гена неомизинфосфотрансферазы и плазмиды pCP20 с помощью спот-теста: это проявлялось в появлении чувствительности к канамицину и ампициллину. Полученные клоны *Salmonella enteritidis* R-6 еср-chromo также были проверены с помощью ПЦР с праймерами *cbp2* up и *cbp2* lo для подтверждения удаления канамициновой кассеты (фигура 5).

Пример 3. Получение вакцины

Рекомбинантный штамм *Salmonella enteritidis* R-6 еср-chromo выращивают в ферментере со стерильной питательной средой бульон Хоттингера. Оптимальная посевная доза составляет $9 \pm 1\%$ от объема питательной среды. При засеве добавляют 40% раствор глюкозы до концентрации 0,1%, в перерасчете на сухое вещество, тщательно перемешивают и оставляют в покое на 2 часа. Затем культуру выращивают при непрерывной аэрации воздухом в соотношении объем реактора к объему воздуха 1:2 в час и перемешивании 120-180 об/мин мешалки, при температуре $37 \pm 1^\circ\text{C}$.

Культивирование прекращают в начале стационарной фазы роста, когда количество живых бактерий перестает увеличиваться, накопление бактерий по оптическому стандарту к этому времени обычно составляет не менее 10 млрд. в 1 см бульона. В этот срок при данных условиях удается получить максимальное количество живых микробных клеток вакцинного штамма. Культивирование в большие сроки ведет к переходу культуры в фазу отмирания и резкому сокращению числа живых клеток.

Выращенную культуру охлаждают до температуры 6-8°C, концентрируют, полученный концентрат разводят средой высушивания, содержащей в массе %: сахарозу - 8, желатин - 1, пептон - 0,5, тиомочевину - 0,5, воду для инъекций до 100, до концентрации 100 млрд. микробных клеток в 1 см³ по оптическому стандарту и расфасовывают в стерильные стеклянные емкости вместимостью 20 см³ по 10 см³, вместимостью 100 см³ по 30 см³. Вакцину высушивают методом сублимации в вакууме при условии получения содержания эффективного количества живых микробных клеток в 1 см³ вакцины 10-30 млрд.

Вакцину контролируют на основании стандарта ФКП «Ставропольская биофабрика» СТО 00482861-0174-2024 по следующим показателям: внешний вид; наличие

механический включений, трещин флаконов; типичность роста, контаминацию посторонней микробной и грибной микрофлорой, количество бактерий в одной иммунизирующей дозе, млн; массовую доли влаги в %; время ресуспендирования; безвредность, иммуногенногенная активность по отношению сальмонеллезу, иммуногенная активность по отношению к колибактериозу.

Методы контроля вакцины заключаются в следующем: типичность роста и определение контаминации посторонней микробной и грибной микрофлорой вакцины проверяют в пяти флаконах путем посева из каждого флакона 0,1 см³ взвеси вакцины на мясопептонный бульон, мясопептонный агар, мясопептонный бульон под вазелиновым маслом, агар Сабуро в две пробирки каждой среды и засевают по 3-4 чашки с МПА по Дригальскому. Посевы выдерживают в течение 10 суток при температуре 37°C на среде Сабуро - при 20-24°C. Вакцина не должна быть контаминирована посторонней микробной и грибной микрофлорой. При росте рекомбинантного штамма на МПА через 24 ч должны вырасти бесцветные, прозрачные, гладкие, гомогенные колонии в «S»-форме, на МПБ через 24 ч - равномерное помутнение. В мазках должны быть грамотрицательные палочки.

Для определения времени ресуспендирования три флакона с вакциной разводят физиологическим раствором в количестве равном объему вакцины до высушивания, после чего флаконы встряхивают. Содержимое флаконов должно ресуспендироваться в течение от 1 до 3 мин с образованием гомогенной взвеси без хлопьев и осадка.

Определение количества живых бактерий в одной иммунизирующей дозе: вакцину в трех флаконах разводят до первоначального объема стерильным физиологическим раствором, затем содержимое смешивают в стерильном флаконе и готовят десятикратные разведения от 10⁻¹ до 10⁻⁹, путем последовательного переноса 0,5 см³ взвеси культуры в пробирки с 4,5 см³ стерильного физиологического раствора. В процессе разведения перенос взвеси в следующую пробирку производят со сменой стерильной пипетки. Для испытания используют два разведения вакцины: 10⁻⁸, 10⁻⁹. Из каждого разведения проводят посевы по 0,1 см³ на поверхность МПА или стандартизованную питательную среду, используя по 5 чашек Петри на каждое разведение. Посевы инкубируют при температуре 37±1°C в течение 24-36 ч, после чего подсчитывают количество выросших колоний и определяют концентрацию живых микробных клеток в 1,0 см³.

Количество доз вакцины во флаконе устанавливают путем умножения показателя количества живых микробных клеток в 1,0 см³ вакцины на объем вакцины во флаконе и деления результата на 100 млн. В одной иммунизирующей дозе должно содержаться не менее 100 млн живых микробных клеток *Salmonella enteritidis* R-6 esp-chromo. Для определения безвредности готовят объединенную пробу из трех флаконов. Содержимое каждого флакона ресуспендируют стерильным физиологическим раствором, до концентрации 20 млн. микробных клеток в 1 см по стандартному образцу мутности.

Пример 4 Анализ иммуногенности вакцины на основе штамма *S. enteritidis* R-6 esp-chromo.

Определение иммуногенной активности по отношению к *Salmonella enteritidis*:

Для испытания вакцины на иммуногенную активность в отношении штамма *Salmonella Enteritidis*, используют 20 мышей массой 16-18 г. Мышей разделяют на 2 группы по 10 животных в каждой: 1 группа - контроль, без введения вакцины, 2 группа - опытная, с введением вакцины.

Вакцину вводят 10 белым мышам из опытной группы подкожно в область спины в дозе 20 млн живых микробных клеток в объеме 0,5 см³ однократно. Через 14 суток 10 иммунизированных и 10 белых мышей из контрольной группы заражают подкожно подтитрованной культурой штамма *S. enteritidis* S-7 летальной дозой 400 тыс/см³ 2LD₅₀ в объеме 0,5 см. Срок наблюдения 10 суток.

Вакцину считают активной при выживании не менее восьми мышей из опытной группы и гибели не менее восьми животных из контрольной группы.

Определение иммуногенной активности по отношению к *Escherichia coli*.

Для испытания вакцины на иммуногенную активность в отношении штамма *E. coli* используют 20 белых мышей массой 16-18 г. Мышей разделяют на 2 группы по 10 животных в каждой: 1 группа - контроль, без введения вакцины. 2 группа - опытная, с введением вакцины.

Вакцину вводят однократно десяти белым мышам из опытной группы подкожно в область спины в дозе 2 млн/см³ живых микробных клеток по оптическому стандарту мутности в объеме 0,5 см³. Через 14 суток вакцинированных мышей и мышей из контрольной группы заражают подкожно производственным штаммом *E. Coli* №388. с использованием суточной агаровой культуры в концентрации 10 млн /см³ в объеме 0,5 см³. Наблюдение за опытными животными ведут в течение 5 суток.

Вакцину считают активной если в опытной группе выжило не менее семи из десяти белых мышей, а в контрольной пало не менее семи из десяти.

Результаты представлены в таблице 2.

Таблица 2. Контроль опытной серии вакцины против сальмонеллеза и колибактериоза птиц живой,сухой, из рекомбинантного штамма *Salmonella Enteritidis* R-6 esp-chromo (флаконы по 10 см³)

Наименование показателя	Характеристика и норма	Дата начала контроля	Дата окончания контроля	Результат
Влажность, %	1,0-4,0			
Общая концентрация м.к.				101 млрд/см ³
Концентрация жизнеспособных м.к.		07.05.24	08.05.24	18 млрд/см ³
Количество доз		07.05.24	08.05.24	1800 доз
Безвредность	08.05.24 Вакцинация 10 мышей, подкожно в области спины в дозе 40 млн ж. м.к. в объеме 0,5 см ³ .		18.05.24	безвредная
Иммуногенная активность в отношении штамма <i>S. Enteritidis</i>	08.05.24 1-кратная вакцинация 10 мышей опытной группы подкожно в дозе 20 млн ж.м.к. в объеме 0,5 см ³ .	22.05.24 заражение опытной и контрольной групп мышей культурой контрольного штамма <i>S. Enteritidis</i> S-7	01.06.24	Контрольная группа - 80% летальность (пали 8 из 10 на 5-7 сутки) Опытная группа - 20% летальность (пали 2 из 10 на 5-10 сутки)
Иммуногенная активность в отношении штамма <i>E. Coli</i>	08.05.24 1-кратная вакцинация 10 мышей подкожно в дозе 2 млн/см ³ ж.м. к. по оптическому стандарту мутности, в объеме 0,5 см ³ .	06.06.24 заражение опытной и контрольной группы производственным штаммом <i>E. Coli</i> №388	13.06.24	Контрольная группа - 80% летальность (пали 8 из 10 на 5-7 сутки) Опытная группа - 20% летальность (пали 2 из 10 на 5-10 сутки)

Данные из таблицы 2 подтверждают, что созданная вакцина из штамма *Salmonella Enteritidis* R-6 esp-chromo обладает высокой иммуногенностью, обеспечивает одновременный защитный эффект 80% в отношении штамма *S. Enteritidis* и в отношении штамма *E. Coli* в острых опытах.

Таким образом, поставленная задача по созданию штамма *Salmonella Enteritidis* R-6 esp-chromo с иммуногенногенной активностью по отношению к сальмонеллезу и к колибактериозу одновременно, разработке способа получения штамма *S. Enteritidis* R-6 esp-chromo, разработке вакцины на основе указанного штамма и способа ее

получения решена.

1 gtcattcacg gaagacacaa aatcgtagat gtacccgtaa tgtgggcggc gaaatagccc
 61 gtggaggcga aaacggcagg cgcatgaccc ggacaggcgc cagtaaggaa agcagtagac
 121 aaagcgcaag gatagcgcct tcaaagagta ccggaggcgc cgccagcagc gacttggcgc
 5 181 ttaattcgca gggggtgacc ggcgagccgt catctgtcga ggaggagcg ctgatcaccg
 241 cagcagagge cgtgcctgc atctgcaagg cgtgcaggcc cgccatcgt tgcgcggtac
 301 aaaccattac cagcacacat gcaaggcaaa gaaaccacca gcccatcgt tgtgtttcg
 361 ccattgcgcc ctcactgttt aacgcgagtt atcttagcca ctggcgcggt tttggcaacc
 421 tttccctgt aaagtattgt cggcgcgctg cgcaaccttc tgatagtcga acaacgtaat
 10 481 ttattcttac taatgatata actggtgttt tcatacgcaac ttttcaggtt tacctacac
 541 ttagtggaga aacctttttg gggtccttc tgatgtatt gatttagcga gatgatgcta
 601 tggaaacttaa ggattattac gccattatgg gcgtgaaacc gacggacgat ctcaagacga
 661 ttaagaccgc ctatgccat gagegcaacg caattaatgt gagttagctc actcattagg
 721 caccacaggc ttacacttt atgctccgg ctcgtatgtt gtgtggaatt gtgagcggat
 15 781 aacaatttca cacaggaaac agccatgaag aagaaggttc tggcaatagc tctggtaacg
 841 gtgtttaccg gtacagggtg agcgcaggct gctgacgtaa cagtcaggc ttagcgacc
 901 tggtcagcaa cagcaaaaaa agacaccacc agtaagctgg ttgtgacgcc actcggtagc
 961 ctggcggtcc agtatgccga aggcattaaa ggtttaact cacaaaaagg tctattgac
 1021 gtggctatcg agggtgactc aacggctacc gcctttaaac tgacctacg cctatcacc
 20 1081 aacaccttaa cccagttgga tacctcaggt tccacactga atgtgggcgt ggattataac
 1141 ggcgcggcag tcgaaaaaac tggcgatacc gtgatgatcg ataccgcaa cggcgtagc
 1201 ggcggcaacc ttagccact ggctaacggt tacaatgcca gcaatcgta caccgcacag
 1261 gatggttca cttctccat catcagcggc accaccaatg gtaccaccgc agtaaccgat
 1321 tacagcactc taccggaagg catctggagc ggcgacgta gcgtacagtt cgacgtacc
 25 1381 tggaccagtt aatctctcg atgtaccagc aggggtacc cctgtctta ttctggagc
 1441 gaattgttat gaaaaagcac cttctgcctc tcgctctgct gtttccgga ataccaccg
 1501 cccaggcgtc ggatgtcggc gatatatcat cgtttatgaa cagtgcagc agcacgtaa
 1561 gcaaaacgat ccaaaacagt accgacagtg gccgcctcat caatatccgt ctgaacggc
 1621 tctcttcacc gcttgacgac ggcgaggtta tcgcaatgga caagccggat gatttgctac
 30 1681 tcactccgc cagcttctg ctaccgccc aagccagcga agtgatccg ttctctata
 1741 agggaccagc agatgaaaaa gagcgtact accgcattgt ctggtttgat caggccctca
 1801 gtgatgcga gcgcgataat gccaaccgta gcgtgtggc cactgcttc gccgcacg
 1861 gcaccattct ggctgcgca ccccgccagg caaactacca cttcagta gccaacggt
 1921 ccttgacaaa tacaggaaat gcgacgtgc ggatcctgc ctacggccc tgctgaaag
 35 1981 ccgccaatgg taaggagtgt aaagagaatt actacctgat gccgggcaag tcgcgtcgtt
 2041 ttaccgcgt ggacacggcg gatacaaaag gacgggttc actttggcag ggtgataagt
 2101 tcattccgt gaaatagata gctgtgcaga tggataacga caatgcctt acgacggtc
 2161 tccccaggac tgaagccca gttgccttc ggcatgtct tttgttcgt tcagcccgat
 2221 gccagcgtc ctgacataag tgcgcagcaa atagggtggg tgattattcc gcaggccttc
 40 2281 agtcaggcgc ttcaggacgg catgagcgc ccgctctata ttcatctgc cggtagccag
 2341 ggctgccagg acgatcagc aatcggcagc gctttatct ggttgatga tggacagtta
 2401 gcgcatccga aaatacagct ggaagagagt gaagataacg ccagtgtcag cgaacaaact
 2461 cgacagcaac tgatgactc ggccaacgcc ccgttaatg aggcccttac catccccgt
 2521 actgacaacg cgcagttgga tctcagctt cgccaactgc tgctgcagct ggtggtaag
 45 2581 cgcgaagcgc tgggcaccgt actacgtca ctagcgaag acatcgggca gtccagtgtt
 2641 aacacctca gcagtaatct gagctataac ttggcgtct ataacaacca gttgcgtaac
 2701 ggcgggagca acacctcag ctatctgctg ctgaataacg ttactgcgt gcgcgaacat
 2761 cacgtggtgc tcgacggctc actgtacggg attggtagcg gtcaacagga cagtgaatta

2821 tataaagcga tgtatgaacg cgattttgct ggtcaccgat ttgccggtgg aatgctcgac
 2881 acctggaact tgcagtcctt agggccgatg accgccattt cagcagggaa gatttacggc
 2941 ctttctggg gaaaccagge cagctccacc atcttcgaca gcagccaate ggccacgcca
 3001 gtgatgcctt ttaccggc ggccggcgaa gtacatctca cccgtgatgg gcgactacta
 5 3061 agcgttcaga acttcacat gggcaatcat gaagtggata cccgggggtct accgtacggt
 3121 atttacgatg tggaagtga ggtaatcgtt aacggctcgc tgatcagcaa acgcaccag
 3181 cgggtcaata agctgtttag ccggggacgt ggcgtcgtg caccgctggc gtggcagata
 3241 tggggcggtg gctttcatat ggatcgtcgg tcggaaaacg ggaaaaagac gcgaccagcc
 3301 aaagagagtt ggctggcagg tgcctcgacc tccggctcac tgagtacgtt tagctgggcg
 10 3361 gcaacgggat atggatacga taatcaggcg gtgggtgaaa cccgtctgac gctgccgtt
 3421 gggggggcg tcaacgttaa cctgcaaac atgctggcca gtgacagctc atggagcaac
 3481 atcgccagca tcagcgccac tctacctgga ggcttcagtt cgctgtgggt taaccaggaa
 3541 aaaacccgca ttggcaatca attgcgacgt agcgtatgcc acaaccgtgc aatcggcggc
 3601 acactcaacc tgaactact gtggtcgaag ctgggtacgt tcagcatcag ctacaatgat
 15 3661 gaccgcccgt acaacagcca ttattacag gcagattact atcaaagtgt ctacagcgtt
 3721 acctttggtt cgcttggcct gcgggcccgt attcagcgt ataacaacgg cgacagcagc
 3781 gccaatagac ggaaatatat cgctctcgat ctctcgctac cactgggcaa ctggtttagc
 3841 gcagggatga cccatcaaaa cggctacacc atggcaaac tgcagcacg caaacagttt
 3901 gatgaaggaa ccattcgac tgttgggtcc aatctgtcac gagccatctc cggcgatacc
 20 3961 ggtgatgaca aaaccctcag cgggtgggcg tatgcacagt tcgacgctcg ttacgccagc
 4021 ggaacgtga acgtcaatag cgcggcgac ggctacatca atactaattt gaccgccaac
 4081 ggcagcgtcg gctggcaggg taaaacatc gctgccagcg ggcggaccga tggcaacgct
 4141 ggggtgatat tcgactcgg cctggagaac gatggtcaga tcagcgcaa aatcaacggg
 4201 cggattttcc cgcttaacgg caagcgtaac tatctcccgc tctctcccta tggaagatat
 25 4261 gaggtggagt tgcagaacag caaaaactca ctgcacagt acgatcgt cagcggtcgc
 4321 aaaagtcatc tgactctcta tccaggcaat gtcgtgtca ttgagccaga ggtgaagcag
 4381 atggttaccg tctccggtcg tatccgtcg gaagacggca cactgctggc taacgcacgg
 4441 attacaaccc atatcgcccg aaccgaacc gatgaaaacg gcgagttgt catggacgtg
 4501 gataagaaat acccactat cgattttgc tacagtggca ataaacctg cgaagtggca
 30 4561 ctggaactca accaggcgcg cgggtccgtc tgggtcgtg atgtgtctg cagcggcctc
 4621 tcatcgtggg cggcgggtgac gcagacagga gaagagaatg agagttaacc tactgatagc
 4681 gatgataatc ttgcgctaa tctggcctgc aaccgcctc agagcggcag tgagcaaac
 4741 aacctgggcg gatgctccgg cacgcgagtt tgtgtttgc gaaaacaact cagacgaaa
 4801 cttttctgc actcctggcg gggcgtgga tccgcgctg accggtgcca accgctggac
 35 4861 cggtttaaaa tacaatgggt caggaacct ctatcagcaa agcctcggct acattgataa
 4921 cggttacaac accggcctt ataccaactg gaagttgat atgtggctgg aaaattcacc
 4981 agtttcatct cctttaactg gcttgcgtc catcaactgg tacgcagggt gtaatatgac
 5041 caccagtctt atctgcccgc aaaccaccga cgcagtgga tttatggcg cgacggtgac
 5101 cagcggcggc gcgaaatgga tgcacggcat gttgtcagac gcgttttacc agtatctgca
 40 5161 acaaatgccc gtcggcagca gctttacaat gaccatcaat gctgccaga cctctgtgaa
 5221 ctatgacgcc aacagcggcg cacgctgtaa ggatcaggcc tccggcaact ggtatgttcg
 5281 caacgtcacc catacgaaag cagcaaatct gcggttgata aataccact cgctggcgga
 5341 agtatttacc aacagcgac gagtaccgac tctggcgaa gggaacgcc actgccggac
 5401 gcaaaccatc ggcagccgtt caggattaag ttgtaagatg gttactata ccctgcaaac
 45 5461 aaacggactc agcaacacct caatccatat attcccggcg atcgccaact cgtcgttagc
 5521 ctcggccgctc gggcgctacg atatgcagtt cagtctgaat ggcagttcat ggaaaccggt
 5581 gagcaatact gcctattact acacttcaa cgagatgaag agcgcagact cgatctatgt
 5641 tttctctcg agcaacttct taaacagat ggtgaacctc gggatcagcg atatcaaac

5701 caaagatcta ttcaactttc gctttcagaa caccacatca cggagtgctg gctggtatga
 5761 attttctacc tccaacacgc tgattatcaa acccctgat ttcagcatca gtattatctc
 5821 cgtgaatat actcagacac cgtcgcggga gggatatgtt ggcagcggcg agtcggcact
 5881 cgatttcggg tataatgtaa ccaccagcgg taaaacagct gccgacgaag tgctgatcaa
 5 5941 ggtgaccgga cccgcgcagg tgattggcgg gcgctctat tgtgtcttca gctccgatga
 6001 cggtaaggcg aaagtaccgt tcccggcgac gctttcctt attaccgca acggagctac
 6061 aaaaacctac gatgccgggt gcgatgatag ctggcgggat atgaccgatg cgctgtggtt
 6121 gaccacaccg tggactgata tctctggcga agtggggcag atggataaga ccacagtcaa
 6181 atttcgatt ccaatggata acgccattc tctgcgtacg gtagatgata acggctggtt
 10 6241 tggcgaagtc agcgcttcag gagagattca tggtcaggcg acgtggcgta acattaacta
 6301 aggcctgct gacagtggc tgatgctgg caagcttgat tgttaggct ggagctgctt
 6361 cgaagtctct atactttcta gagaatagga acttcggaat aggaactaag gaggatattc
 6421 atatggacca tggetaattc ccatgtcagc tcagggaag cataatggct aacatcactg
 6481 tcaccttac catcccgaa tttgtttgc acaccggcg gacggaagag gagctaaacg
 15 6541 aaatcgtcgg acttggcgta attgagcctt acgaagacga taacgccgac tggcaattcg
 6601 acgatcgcgc agcgagcgtg gtacaacgcg cgctacgctt acgtgaggag ctggcgctcg
 6661 actggcctgg gatcgcggtc gcgttaacgc tgctggaaga gaattcacgg ctgcgcgaag
 6721 aaaaccggtt actactgcaa cgcctttctc gctttatctc gcatecctaa tccacgataa
 6781 aggcaataaa ccgagggtgg gctttctgcc caccgccgat ttacatgcac ccggtataat
 20 6841 accagaatgc ctctgacata cttccccaa cggaagaaat atagccttt accgcgcaca
 6901 acccgatcaa cgaaccgcca atgtcagcca ttaatgcgcc attggaaga tcatcgttta
 6961 aataaagacc agccacacgt tcacatttt tagatacgtc ggttatttt acacgttagc
 7021 gatcatttat tgcctgaaga atatattctt tactgtttt gtactctctg gttgatacgt
 7081 accttctccc tgcaatgcc gggtaaaatg taccgctgcg cttacagggt gcggtattta
 25 7141 taaataagaa atacaacagt cactacagt ttaataatc agcgtataa catccactac
 7201 cgcccaatat ttaccacag tctaaaatac aaaaatgtaa tagaatgtaa aaaaaataag
 7261 ag

(57) Формула изобретения

- 30 1. Штамм *Salmonella enteritidis* R-6 ecp-chromo, экспрессирующий оперон ecpABCD штамма *Escherichia coli* 388 и имеющий иммуногенногенную активность по отношению к сальмонеллезу и к колибактериозу одновременно, депонирован во Всероссийской коллекции микроорганизмов ИБМФ им. Г.К. Скрыбина, регистрационный номер - «ВКМ В-3828D».
- 35 2. Способ получения штамма *Salmonella enteritidis* R-6 ecp-chromo по п. 1, включающий интеграцию в геном *Salmonella enteritidis* R-6 фрагмента плазмиды pSentIn-ecpABCD, карта которой изображена на фиг. 3, содержащего оперон ecpABCD штамма *Escherichia coli* 388 и фланкированный сайтами FRT ген неомицинфосфотрансферазы, с последующим удалением гена неомицинфосфотрансферазы.
- 40 3. Вакцина на основе штамма *Salmonella enteritidis* R-6 ecp-chromo по п. 1 с иммуногенногенной активностью по отношению к сальмонеллезу и к колибактериозу, содержащая эффективное количество культуры указанного штамма в количестве 10-30 млрд/см³ живых микробных клеток.
- 45 4. Способ получения вакцины на основе штамма *Salmonella enteritidis* R-6 ecp-chromo по п. 3, включающий культивирование рекомбинантного штамма *Salmonella enteritidis* R-6 ecp-chromo до начала стационарной фазы роста, когда количество живых микробных клеток перестает увеличиваться и накопление бактерий составляет не менее 10 млрд в 1 см³ бульона, после чего выращенную культуру охлаждают и концентрируют,

полученный концентрат разводят средой высушивания до концентрации 100 млрд
микробных клеток в 1 см³ и расфасовывают в стерильные ёмкости, затем вакцину
высушивают методом сублимации в вакууме при условии получения содержания
5 эффективного количества живых микробных клеток в 1 см³ вакцины 10-30 млрд.

10

15

20

25

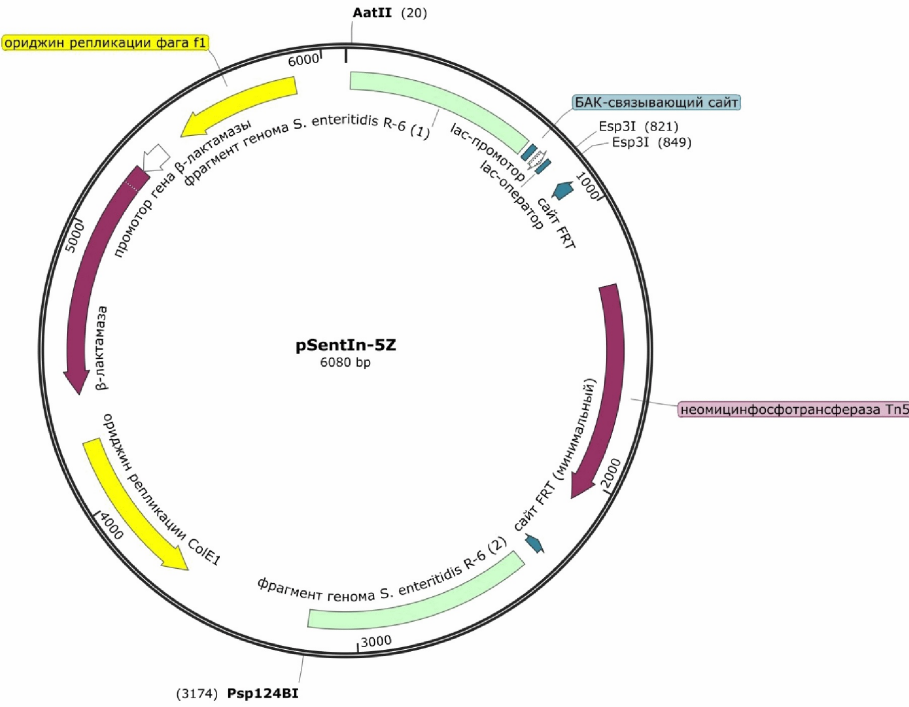
30

35

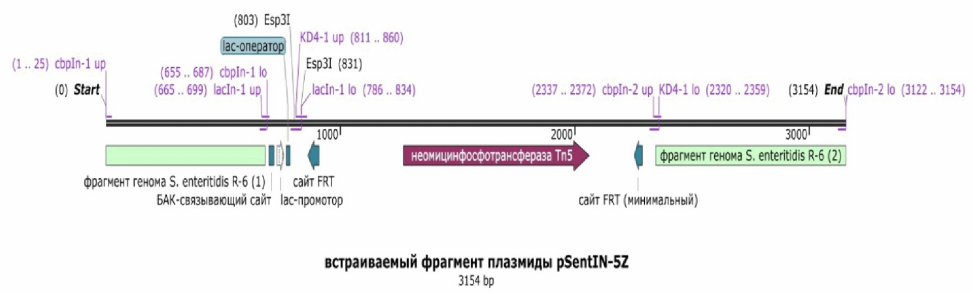
40

45

1

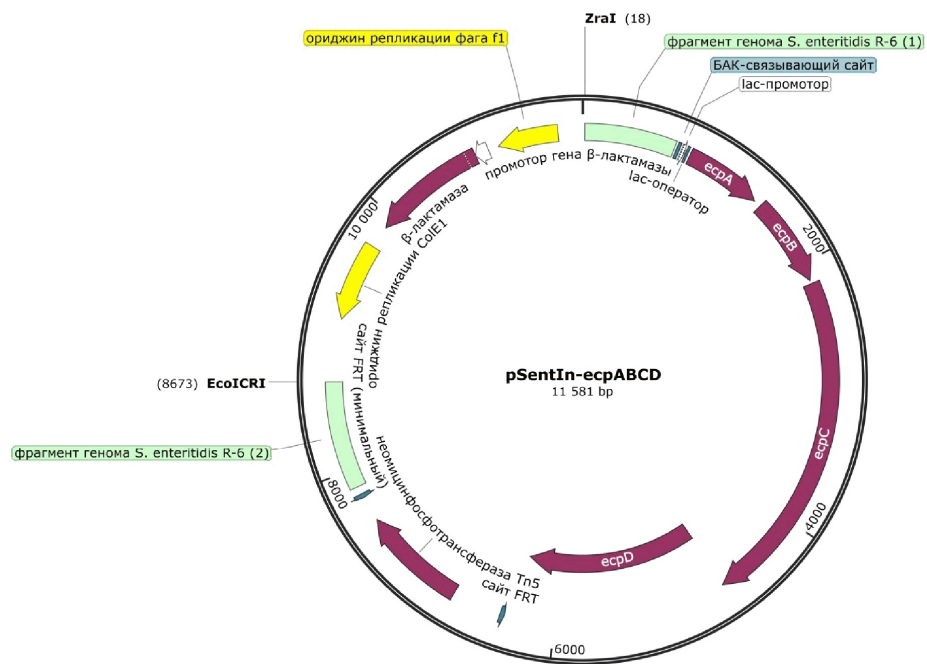


Фиг. 1

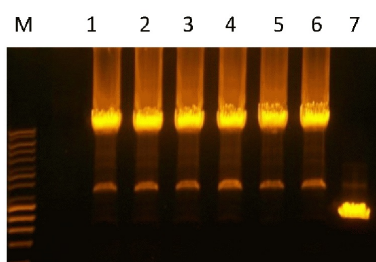


Фиг. 2

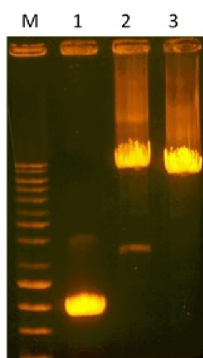
2



Фиг.3



Фиг. 4



Фиг. 5