

ТЕХНОЛОГИЯ ИЗГОТОВЛЕНИЯ БИВАЛЕНТНОЙ ВАКЦИНЫ ПРОТИВ ЛИСТЕРИОЗА ЖИВОТНЫХ ИЗ ШТАММОВ УСХИ-19 И УСХИ-52

**Самуйленко А.Я., Павленко И.В., Раевский А.А., Анисимова Л.В., Соловьев Л.Б., Еремец В.И.,
Меньшенин В.В., Нежута А.А.**

*ГНУ Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт биологической промышленности
Россельхозакадемии, г. Щёлково, Московская обл.*

Листериоз является широко распространенной инфекционной болезнью, наносящей значительный ущерб животноводству, и представляет серьезную угрозу здоровью людей. Сложность борьбы с этой инфекцией обусловлена особенностями биологии ее возбудителя, наличием большого числа как патогенных, так и непатогенных штаммов. Экономический ущерб от листериоза связан с большой летальностью, снижением продуктивности животных, абортными, а также затратами на ветеринарно-санитарные ограничительные мероприятия. Листериоз животных зарегистрирован в 82 странах мира. Россия входит в их число.

Традиционные питательные среды, используемые для культивирования листерий не стандартны, не оптимальны по своему составу и имеют высокую стоимость. Усовершенствование питательной среды для выращивания листерий приведет к оптимизации её состава.

Технология изготовления бактериальных вакцин – многоцелевая проблема, одним из ключевых направлений которой является разработка современных процессов культивирования микроорганизмов, позволяющая увеличить выход конечного продукта и получить эффективные ветеринарные препараты. До настоящего времени процесс неуправляемого культивирования листерий длится 16-18 часов и при этом выход накопления биомассы невысок. Управляемое культивирование может привести к сокращению времени выращивания микроорганизмов и повысить выход конечного продукта.

Сублимационное высушивание является конечной стадией производства сухих биопрепаратов, при этом важное значение отводится защитным средам, которые влияют не только на процесс высушивания бактериальной массы, но и на сохраняемость её свойств, особенно при длительном хранении.

Поэтому, изыскание оптимальных защитных сред, которые могут обеспечить высокую эффективность биологических препаратов по окончании сублимационной сушки и при последующем хранении, является насущной проблемой.

В связи с вышеизложенным, весьма актуальной задачей при производстве вакцин против листериоза сельскохозяйственных животных является разработка технологических этапов. Основными технологическими этапами являются: разработка питательных сред для культивирования листерий; разработка управляемого режима культивирования и оптимизация защитных сред высушивания.

Материалы и методы. Исследования проводились в отделе противобактериальных препаратов ВНИИБП.

Разработка управляемого технологического процесса культивирования листерий проводилась в лабораторных ферментерах АНКУМ-2М, оснащенных системами контроля и регулирования основных технологических параметров – температура, pH, окислительно-восстановительный потенциал (еН), парциальное давление растворенного кислорода (рО₂).

Образцы культуры исследовали в динамике роста по следующим показателям: морфология, оптическая плотность, концентрация жизнеспособных клеток, культурально-биохимические свойства бактерий, а также определяли длительность фаз роста, максимальную удельную скорость роста листерий и время генерации.

Защитная среда оптимизировалась используя план полного факторного эксперимента (ПФЭ 2⁴). Полученное уравнение адекватно описывало процесс.

Для работы использовали вакцинные штаммы листерий УСХИ-19 и УСХИ-52, относящиеся к I и II серогруппам соответственно.

Результаты исследования. Для выращивания листерий были разработаны питательные среды на основе перевара Хоттингера и аминокислот. Данные по накоплению бактериальной массы и концентрации жизнеспособных клеток показали, что экспериментальные среды обладают высокими ростовыми свойствами.

На начальном этапе разработки были проведены исследования динамики роста и изменения основных параметров культивирования листерий по традиционной технологии.

Анализ традиционного процесса культивирования позволил сделать заключение о неоптимальности технологических параметров (pH, еН, рО₂ и др.) при выращивании листерий. Культивирования листерий по традиционной технологии длится 16-18 часов и при этом максимальное накопление листерий составляет не более 6 млрд м.к./см³, что оказалось связано с несвоевременной подачей глюкозы.

Исходя из этого, в последующем в соответствии с поставленной задачей был разработан управляемый процесс культивирования листерий в ферментерах, регламентирующий добавление в питательную среду глюкозы, уровень окислительно-восстановительного потенциала культуральной жидкости по фазам роста, стабилизацию растворенного кислорода и pH на оптимальных уровнях, подачу пеногасителя и т.д. Оптимальная продолжительность процесса составила 8-9 часов, а накопление – 12-14 млрд м.к./см³.

Сущность разработанного процесса культивирования заключается в том, что на усовершенствованной питательной среде проводили выращивание листерий при 37 °С в течение 8 часов. После засева еН культуральной жидкости снижали до минус 175 мВ путем выдержки культуры без подачи воздуха на аэрацию и выключенной мешалке. После чего до конца процесса культивирования с помощью изменения расхода воздуха и скорости вращения мешалки поддерживали парциальное давление растворенного в культуральной жидкости кислорода на уровне 15 % от насыщения кислородом воздуха. pH культуральной жидкости регулировали подачей 10 %-го раствора NaOH, а дробную подачу глюкозы осуществляли дозами до концентрации 0,2 % при лимитировании роста листерий глюкозой, характеризующегося резким повышением рО₂ при неизменных показателях расхода воздуха и оборотов мешалки и прекращением снижения pH культуральной жидкости.

Разработанная питательная среда и режимы управляемого культивирования листерий позволяют уменьшить продолжительность фазы приспособления до 0,5 часа, увеличить максимальное накопление бактерий в 2 раза и сократить время культивирования также в 2 раза.

Полученные культуры листерий при управляемом выращивании в ферментерах по биологическим свойствам были типичными. В процессе экспериментов была оптимизирована защитная среда на калий-фосфатном буферном растворе.

Разработанная защитная среда высушивания позволила увеличить сохраняемость жизнеспособных микроорганизмов в вакцине при длительном хранении после сушки на 20-40 %, чем при использовании традиционной защитной среды.

На рисунке 1 показана зависимость сохраняемости листерий в процессе длительного хранения вакцины (срок наблюдения 10 месяцев), изготовленной с использованием разработанной питательной среды, управляемого процесса культивирования и защитной среды высушивания.

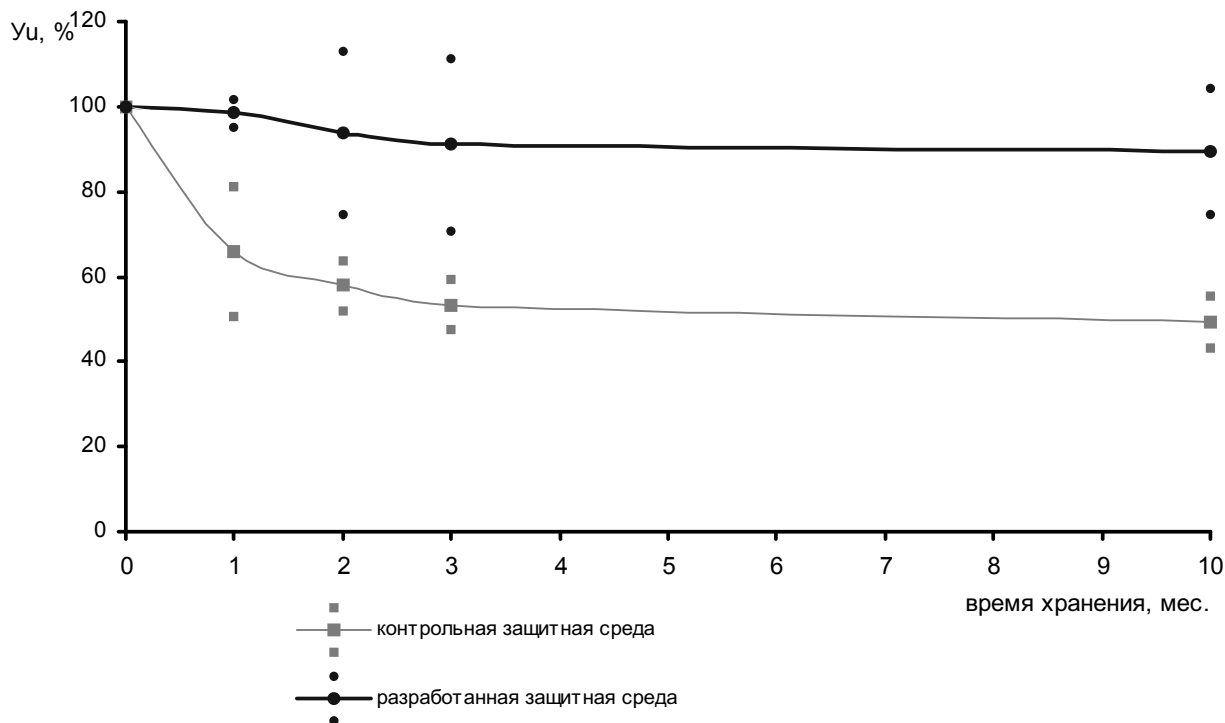


Рис. 1 Сохраняемость листерий в процессе длительного хранения вакцины, изготовленной с использованием разработанной питательной среды, управляемого процесса культивирования и разработанной защитной среды.

Из культур листерий выращенных в условиях эксперимента, были изготовлены опытно-промышленные серии вакцин, которые были испытаны в хозяйствах с положительным результатом.

Выводы. Для выращивания листерий были разработаны питательные среды на основе перевара Хоттингера и аминокислот.

Определены основные параметры роста листерий – pH, pO_2 и eH и разработан управляемый процесс периодического культивирования их по значимым технологическим параметрам.

Определены оптимальные концентрации компонентов защитной среды высушивания для изготовления сухой живой вакцины против листериоза.

Применение разработанной технологии получения вакцины против листериоза сельскохозяйственных животных позволило в 2 раза повысить накопление листерий за счет лучших ростовых качеств разработанной питательной среды по сравнению с инструктивной.

Разработанный управляемый режим культивирования листерий позволил увеличить максимальное накопление бактерий в 2 раза и сократить время культивирования с 16-18 до 7-9 часов.

Разработанная защитная среда высушивания увеличивает сохраняемость жизнеспособных микроорганизмов в вакцине в процессе хранения на 20 % больше по сравнению с инструктивной.

Список литературы

1. Бакулов, И.А. «Основные вехи истории изучения листериоза животных и людей» // Мат. Межд. симп. «Листериоз на рубеже тысячелетий». Псков. 1999. – 43-47.
2. Бирюков, В.В., Кантере, В.М. Оптимизация периодических процессов микробиологического синтеза. М., Наука, – 1985. – 293 с.
3. Кантере, В.М. Теоретические основы технологии микробиологических производств. М., Агропромиздат. – 1991. – 272 с.
4. Нежута, А.А., Токарик, Э.Ф., Самуйленко, А.Я., Безгин, В.М., Сербис, Е.С. Теоретические и практические основы технологии сублимационного высушивания биопрепаратов. Курск. Издательство Курской государственной сельскохозяйственной академии. – 2002. – 240 с.
5. Самуйленко, А.Я., Рубан, Е.А. Основы биотехнологии производства биологических препаратов. (Теоретические основы, оборудование, технологические линии). М., – 2000. – 782 с.

DEVELOPMENT OF TECHNOLOGY FOR PRODUCTION OF DRY LIVE BIVALENT VACCINE AGAINST THE LISTERIOSIS ANIMALS FROM STRAINS USHI-19 AND USHI-52

Samuylenko A.Ya., Pavlenko I.V., Rayevsky A.A., Anisimova L.V., Solovyev L.B., Eremec V.I., Men'shenin V.V., Nezhuta A.A.
All-Russian Scientific Research and Technological Institute of Biological Industry Schelkovo, Moscow region

The technology of dry live bivalent vaccine against listeriosis in farm animals from strains USHI-19 and USHI-52 is presented in the article. Optimized culture medium of cultivation of *Listeria* in liquid medium, drying the envelope, as well as improve the quality, stability and standardization of biological properties of the drug.