

**ВИВЧЕННЯ ЕФЕКТИВНОСТІ АТЕНУЙОВАНОЇ ВАКЦИНИ ПРОТИ КЛАСИЧНОЇ ЧУМИ СВИНЕЙ
ВІДПОВІДНО ДО ФАРМАКОПЕЇ 2005 РОКУ**

Драгіка Стоянович, Радомір Ратаяк, Ясна Проданов-Радуловіч, Майя Велнер, Радослав Дожен
Науковий Ветеринарний Інститут Нові Сад, Сербія

У статті представлено матеріали щодо вивчення ефективності атенуваної вакцини проти класичної чуми свиней відповідно до фармакопеї 2005 року. Проведено дослідження, в якому було доведено захисний ефект вакцини Лавір-К, що містить китайський штамп вірусу класичної чуми свиней і використовується в Сербії для системної імунопрофілактики.

УДК 636.09:619:579.887.111

ДОСЛІДЖЕННЯ ЕФЕКТИВНОСТІ ЗАХИСНИХ СЕРЕДОВИЩ ДЛЯ ЛІОФІЛІЗАЦІЇ МІКОПЛАЗМ

Андрущенко В.В., Ушкалов В.О.

Державний науково-контрольний інститут біотехнології і штамів мікроорганізмів, м. Київ

У природі мікроорганізми постійно перебувають у динамічному стані, а саме росту, розмноження і відмирання. Кожна клітина мікроорганізму має відповідні фази росту та певний період життя. У більшості випадків вегетативні форми мікроорганізмів мають досить невеликий життєздатний проміжок часу, насамперед поза межами природного середовища існування. Особливо цей момент важливий у сфері біотехнології та виробництві біологічних препаратів. У лабораторіях, де вивчають біологічні властивості і підтримують штами мікроорганізмів, виняткову увагу надають вивченню довготривалого зберігання культур у ліофілізованому стані. Адже, забезпечувати стабільні властивості більшості штамів мікроорганізмів впродовж значного проміжку часу, постійно їх пасажуючи на поживних середовищах, неможливо. Отже, основним технологічним прийомом для зберігання виробничих штамів є ліофілізація [1].

Щоб отримати повноцінну і стабільну в біологічному відношенні культуру мікроорганізму, необхідно забезпечити відповідні умови, а саме: якісне поживне середовище для накопичення біомаси; належні умови і тривалість культивування з урахуванням особливостей фаз росту кожного штаму; стабілізуюче захисне середовище; відпрацьований режим ліофілізації; температурний режим зберігання після сублимаційного висушування [2].

Представники класу *Mollicutes* є найменшими самореплікуючими прокаріотами, в яких відсутня ригідна клітинна стінка, яка характерна для бактерій. Вони мають лише цитоплазматичну мембрану товщиною біля 75 Å, яка складається із двох електронно-щільних і проміжного оптично світлого шарів, у склад яких входять полярні ліпіди (фосфоліпіди, гліцериди) та протеїни, що обумовлює специфіку морфологічних і фізіологічних властивостей таких як поліморфізм, пластичність, осмотична нестійкість до дії детергентів [3].

Враховуючи особливості морфологічних структур мікоплазм, завдяки своїй унікальній субклітинній будові, необхідно особливо ретельно ставитися до підбору оптимального стабілізуючого захисного середовища для ліофілізації представників класу *Mollicutes*.

Мета роботи. Провести підбір та вивчити вплив різних захисних середовищ на збереженість мікоплазм під час ліофілізації і впродовж тривалого зберігання.

Матеріали і методи. Для дослідження збереженості мікоплазм під час ліофілізації та впродовж тривалого зберігання нами було обрано чотири варіанти захисного середовища: інактивована сироватка крові коня (1:1) – № 1, інактивована сироватка крові коня (1:3) – № 2, середовище Файбіча – № 3 і середовище МГ (1:1) – № 4, виготовлені в секторі живильних середовищ та ліофілічної сушки ДНКІБШМ.

Моделлю для вивчення були обрані наступні тест-культури мікоплазм: *Mycoplasma arginini* G 230, *Mycoplasma gallisepticum* ATCC 19610, *Mycoplasma hyorhinis* ATCC 17981 та *Acholeplasma laidlawii* ATCC 23206, отримані з колекції штамів мікроорганізмів ДНКІБШМ.

Кожен штамп, з метою накопичення бактеріальної маси, вирощували на поживному середовищі для культивування мікоплазм та ахолоплазм, виготовленого в ДНКІБШМ згідно ТУ У 24.2 – 19024865-013: 2008 (РП № 3904-14-0402-08). Культивували культури у пробірках закритих гумовими корками, у термостаті за температури $37 \pm 0,5$ °C впродовж 24-72 год, враховуючи особливості фаз росту кожного із досліджуваних штамів, відповідно до їх паспортних характеристик.

Отриману бактеріальну суспензію кожного штаму поміщали в окремі скляні стерильні флакони і додавали потрібну кількість відповідного стабілізуючого захисного середовища. Ретельно змішували та фасували автоматичною піпеткою-дозатором по 1 см³ у пеніцилінові флакони. Тест-культури піддавали ліофілізації. Після ліофілізації визначали наявність вакууму в кожному флаконі. Флакони без вакууму бракували. Ліофілізовані культури зберігали в побутовому холодильнику за температури від 2 °C до 8 °C.

Одночасно, до змішування із захисним середовищем, в отриманому бактеріальному зборі кожного штаму визначали кількості живих мікробних клітин в 1 см³. Визначення кількості живих мікробних клітин мікоплазм в 1 см³ проводили методом граничних десятикратних розведень з наступним висівом бактеріальної суспензії по 0,1 см³ на щільне агаризоване середовища для культивування мікоплазм та ахолоплазм, використовуючи на кожне розведення по дві чашки Петрі. Засіяні чашки Петрі поміщали в термостат і культивували за температури $37 \pm 0,5$ °C впродовж 3-5 діб. Підрахунок колоній мікоплазм та ахолоплазми, що виростили на щільному середовищі, здійснювали за допомогою мікроскопу, проглядаючи кожну чашку при збільшенні $\times 40$. Кількості живих клітин в 1 см³ бактеріальної суспензії обраховували за загальноприйнятною методикою.

З метою визначення впливу захисного середовища на збереженість тест-культури мікоплазм під час ліофілізації та впродовж тривалого зберігання, висушених на різних захисних середовищах, здійснювали кількісний облік життєздатних клітин через 10-20 днів після ліофілізації, а також через 6, 12 та 18 місяців, методом граничних десятикратних розведень, описаного вище.

Результати досліджень. Результати досліджень, наведені в таблиці 1, свідчать, що на рівень збереженості тест-культури класу *Mollicutes* суттєво впливає склад захисного середовища.

Так, найвищий відсоток збереженості ми отримали під час ліофілізації штаму *M. arginini* G 230 з використанням стабілізуючого захисного середовища № 4 та № 3. Збереженість становить відповідно 97,41 % та 60,56 %. Захисне середовище № 1 і № 2 забезпечує збереженість лише на 10,4 % і 19,74 % відповідно.

Дещо гірші одержали результати збереженості під час ліофілізації штаму *M. hyorhinis* ATCC 17981 з використанням захисного середовища № 4, № 3 та № 2, відсоток живих мікробних клітин яких склав 30,33 %, 29,65 % та 15,96 % відповідно. Надзвичайно низький відсоток збереженості отримано при використанні середовища № 1 – 1,3 %.

Таблиця 1 – Вплив різних захисних середовищ на збереженість тест-культур класу *Mollicutes* за умов ліофілізації

№ п/п	Назва та позначення тест-культури	Захисне середовище	Концентрація живих мікробних клітин, КУО/см ³		Збереженість, %
			До ліофілізації	Після ліофілізації	
1	<i>Mycoplasma arginini</i> G 230	№ 1	2,7×10 ⁷	1,4×10 ⁶	10,4
		№ 2		4,0×10 ⁶	19,74
		№ 3		1,63×10 ⁷	60,56
		№ 4		2,63×10 ⁷	97,41
2	<i>Mycoplasma gallisepticum</i> ATCC 19610	№ 1	4,25×10 ⁸	7,38×10 ⁶	1,74
		№ 2		1,37×10 ⁷	3,22
		№ 3		2,21×10 ⁷	5,2
		№ 4		1,03×10 ⁸	24,24
3	<i>Mycoplasma hyorhinis</i> ATCC 17981	№ 1	8,77×10 ⁸	6,73×10 ⁶	1,3
		№ 2		1,05×10 ⁸	15,96
		№ 3		1,3×10 ⁸	29,65
		№ 4		1,33×10 ⁸	30,33
4	<i>Acholeplasma laidlawii</i> ATCC 23206	№ 1	4,4×10 ⁹	2,33×10 ⁷	1,06
		№ 2		2,83×10 ⁷	1,29
		№ 3		5,5×10 ⁸	25
		№ 4		1,1×10 ⁸	5

Тест-культури *M. gallisepticum* ATCC 19610 та *A. laidlawii* ATCC 23206 виявились найменш стійкими до процесу ліофілізації, так як втрати живих мікробних клітин в залежності від захисного середовища суттєві, що становлять від 98,04 % до 94,8 %, за виключенням середовища № 3 для штаму *A. laidlawii* ATCC 23206 втрата якого становить 75 %, та середовища № 4 для штаму *M. gallisepticum* ATCC 19610 – 75,76 %.

Також нами були проведені дослідження щодо визначення стабільності тест-культур класу *Mollicutes* ліофілізованих з використанням різних захисних середовищ в процесі тривалого зберігання за температури від 2 °С до 8 °С, результати яких наведено в таблиці 2.

Таблиця 2 – Стабільність тест-культур класу *Mollicutes* ліофілізованих з використанням різних захисних середовищ в процесі тривалого зберігання за температури від 2 °С до 8 °С

№ п/п	Назва та позначення тест-культури	Захисне середовище	Концентрація живих мікробних клітин, КУО/см ³				Збереженість на 18 міс., %
			0,5 міс.	6 міс.	12 міс.	18 міс.	
1	<i>Mycoplasma arginini</i> G 230	№ 1	1,4×10 ⁶	1,13×10 ⁶	1,05×10 ⁶	5,63×10 ⁵	40,22
		№ 2	4,0×10 ⁶	3,73×10 ⁶	3,17×10 ⁶	2,71×10 ⁶	67,75
		№ 3	1,63×10 ⁷	1,5×10 ⁷	1,2×10 ⁷	5,65×10 ⁶	34,66
		№ 4	2,63×10 ⁷	2,27×10 ⁷	1,14×10 ⁷	6,3×10 ⁶	23,95
2	<i>Mycoplasma gallisepticum</i> ATCC 19610	№ 1	7,38×10 ⁶	5,0×10 ⁶	1,03×10 ⁶	5,4×10 ⁵	7,32
		№ 2	1,37×10 ⁷	1,04×10 ⁷	9,08×10 ⁶	8,65×10 ⁶	63,14
		№ 3	2,21×10 ⁷	9,18×10 ⁶	8,23×10 ⁶	2,15×10 ⁶	9,73
		№ 4	1,03×10 ⁸	9,25×10 ⁷	4,48×10 ⁷	1,43×10 ⁷	13,88
3	<i>Mycoplasma hyorhinis</i> ATCC 17981	№ 1	6,73×10 ⁶	6,05×10 ⁶	5,95×10 ⁶	5,88×10 ⁶	87,37
		№ 2	1,05×10 ⁸	8,78×10 ⁷	8,2×10 ⁷	3,5×10 ⁷	33,33
		№ 3	1,3×10 ⁸	1,03×10 ⁸	2,75×10 ⁷	3,1×10 ⁶	2,39
		№ 4	1,33×10 ⁸	1,1×10 ⁸	9,33×10 ⁷	1,47×10 ⁷	10,05
4	<i>Acholeplasma laidlawii</i> ATCC 23206	№ 1	2,33×10 ⁷	2,28×10 ⁷	2,25×10 ⁷	3,2×10 ⁶	13,73
		№ 2	2,83×10 ⁷	2,7×10 ⁷	1,23×10 ⁶	7,4×10 ⁵	2,62
		№ 3	5,5×10 ⁸	5,15×10 ⁸	1,58×10 ⁸	4,85×10 ⁶	0,88
		№ 4	1,1×10 ⁸	9,65×10 ⁷	1,5×10 ⁷	1,0×10 ⁷	9,09

Встановлено, що під час тривалого зберігання тест-культур у ліофілізованому стані за температури 2-8 °С концентрація живих мікробних клітин усіх штамів за період дослідження (18 місяців), досить суттєво знижується. Виключенням є лише *M. arginini* G 230, збереженість якого, не залежно від захисного середовища, впродовж 18 місяців становить від 23,95 % (середовище № 4) до 67,75 % (середовище № 2), що вказує на фізіологічну особливість даного штаму. При цьому було з'ясовано, що для кожного із штамів можна підібрати оптимальне захисне середовище (із досліджуваних), яке б забезпечувало найвищий відсоток збереження життєздатних мікробних клітин у процесі довготривалого зберігання. Слід зазначити, що за результатами наших досліджень таким захисним середовищем виявилась сироватка крові коня в різних співвідношеннях (середовище № 1 та № 2), про що наглядно демонструють наведені дані рис. 1-4. Так, найвищий відсоток збереженості штаму *M. gallisepticum* ATCC 19610 забезпечує захисне середовище № 2, що складає 63,14 %. Для культур *M. hyorhinis* ATCC 17981 та *A. laidlawii* ATCC 23206 оптимальним виявилось середовищем № 1 (87,37 %) і (13,73 %) відповідно.

Рис. 1 Зниження кількості живих мікробних клітин *M. arginini* G 230 в процесі зберігання

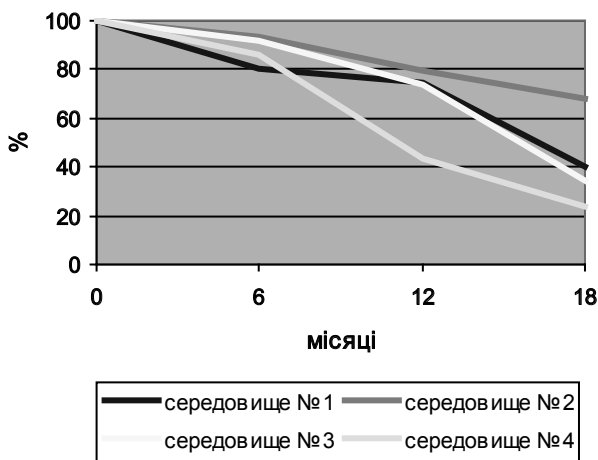


Рис. 2 Зниження кількості живих мікробних клітин *M. gallisepticum* ATCC 19610 в процесі зберігання

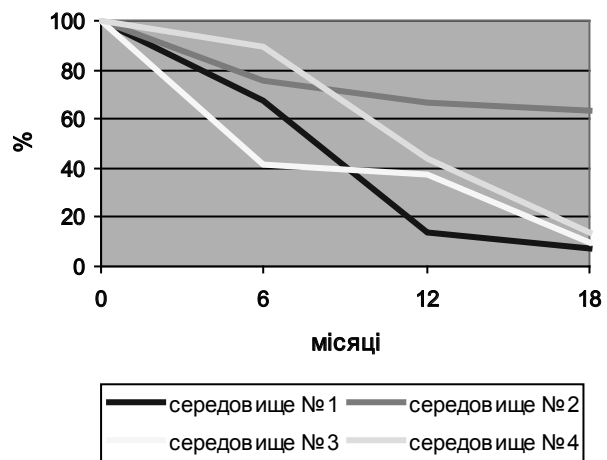


Рис. 3 Зниження кількості живих мікробних клітин *M. hyorhinae* ATCC 17981 в процесі зберігання

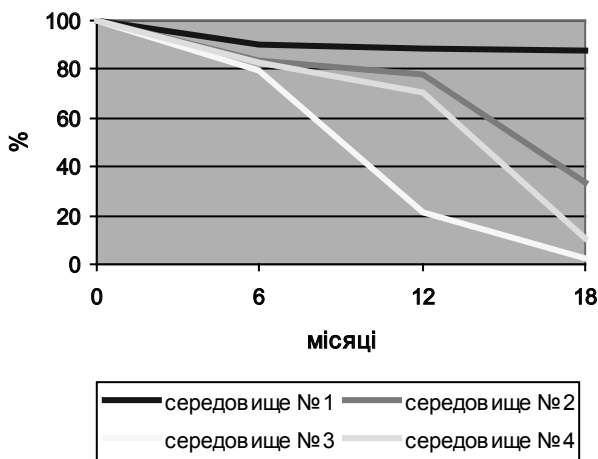
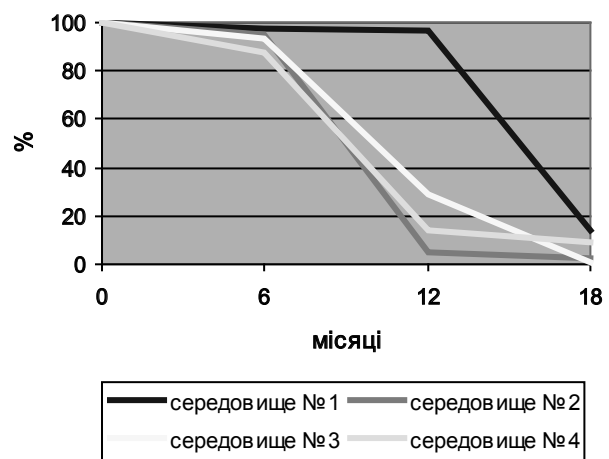


Рис. 4 Зниження кількості живих мікробних клітин *A. laidlawii* ATCC 23206 в процесі зберігання



Висновки.

1. Зберігання штамів мікроорганізмів у ліофілізованому стані на сьогодні залишається оптимальним способом тривалого зберігання, незважаючи на значні втрати мікробних клітин у процесі ліофілізації.
2. У результаті проведених експериментальних досліджень встановлено, що для кожного зі штамів в межах виду, необхідний індивідуальний підхід щодо підбору оптимального захисного середовища.
3. Для довготривалого зберігання штамів мікоплазм оптимальним захисним середовищем, яке забезпечує найвищий відсоток збереженості, є середовище під № 1 та № 2. Але, як видно з таблиці 1 втрати життєздатності всіх досліджуваних штамів мікоплазм на етапі ліофілізації суттєвіші, а ніж при використанні захисних середовищ № 3 і № 4.

Список літератури

1. Виговська, Л.М. Робота зі штамми мікроорганізмів / Л. Виговська, В. Ушкалов, Л. Акименко [та ін.] // Ветеринарна медицина України. – 2007. – № 12. – С. 17-19. 2. Данилова, М.В. Ліофілізація бактерій / М.В. Данилова, І.М. Надирова, В.І. Кудрявцев // Методи хранения коллекционных культур микроорганизмов. – М.: Наука, 1967. – С. 119-135. 3. Самуйленко, А.Я. Инфекционная патология животных. В 2 т. [Текст] / Под ред. А.Я. Самуйленко, Б.В. Соловьева, Е.А. Непоклонова, Е.С. Воронина. – М.: ИКЦ «Академкнига», 2006. – Том II. – 807 с. ISBN 5-94628-8.

INVESTIGATION OF THE EFFECTIVENESS OF PROTECTIVE MEDIA FOR LYOPHILIZATION OF MYCOPLASMAS

Andrushchenko V.V., Ushkalov V.A.

State Scientific Control Institute of Biotechnology and Strains of Microorganisms, Kiev

The results of studying of the effectiveness of the use of protective as the buffer mixtures on the safety of the test cultures of mycoplasmas in the process of freeze-drying that during long-term preservation. Found that the number of viable mycoplasmas in the process of lyophilization, most strains regardless of a protective media, is rapidly decreasing. For long term storage of mycoplasma in lyophilized condition optimally protective medium at present, is a horse serum.