

УДК 619:579.862.1

ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ РАЗРАБОТКИ НОВОЙ ВАКЦИНЫ ПРОТИВ СТРЕПТОКОККОВЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

*Школьников Е.Э., *Гринь С.А., *Анисимова Л.В., *Сокорев Н.В.,
*Еремец В.И., **Красочно П.А., **Мисник А.М.

*ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт биологической промышленности», г. Щелково, Российская Федерация

**УО «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины», г. Витебск, Республика Беларусь

Введение. Стрептококкоз крупного рогатого скота как моноинфекцию, так и смешанную, регистрируют в скотоводческих хозяйствах. У коров стрептококкоз проявляется в виде абортос, метритов и маститов. Телята болеют с первых дней рождения — это пупочный сепсис, поражение суставов, энтерит, пневмония. Летальность среди молодняка может достигать 70%. У переболевших животных значительно уменьшается молочная продуктивность, нарушается воспроизводительная функция, снижается в санитарном отношении качество продукции.

Выпускаемая в настоящее время коммерческая вакцина против энтерококковой инфекции телят, ягнят и поросят обладает невысокой эффективностью. Это объясняется тем, что она содержит антиген только из стрептококков серогруппы D, не предохраняет от таковых серологических групп В и С, которые часто вызывают заболевания не только телят, но и коров (таблица 1).

Разработана моноштаммная гидроокисьалюминиевая формолвакцина против стрептококковых заболеваний КРС. Опытная серия данной вакцины из штамма серогруппы С Str. zooepidemicus П-2082 успешно испытана на коровах в неблагополучных по стрептококкозу хозяйствах. Испытания показали, что эта вакцина в сравнении с коммерческой против энтерококковой инфекции телят, ягнят и поросят более иммуногена и лучше формирует напряженный иммунитет. Однако способ получения такой вакцины - малопродуктивен. Стрептококки культивируют в стеклянных баллонах без контроля основных технологических параметров в течение 18...24 ч, накопление стрептококков не превышает 2 млрд. м.к./см³.

Известно, что увеличение длительности культивирования приводит к потере протективных антигенов, к снижению жизнеспособности бактериальных клеток [9], а значит и к уменьшению иммуногенности.

Культивирование микроорганизмов - один из наиболее значимых технологических этапов в производстве биологических препаратов, предназначенных для специфической профилактики инфекционных заболеваний бактериологической этиологии. Именно на этой технологической стадии производства происходит синтез антигенов, от которых зависит эффективность иммунопрепаратов. При выращивании бактерий следует одновременно с увеличением выхода биомассы добиваться того, чтобы возбудитель не изменял свои биологические свойства [2]. Для этого необходимо создавать оптимальные условия культивирования с учетом физиологического состояния микроорганизмов.

Технология изготовления бактериальных вакцин - многоаспектная проблема, ключевое направление которой - разработка управляемых процессов культивирования микроорганизмов [3, 5-8].

Для изготовления вакцины против стрептококковых инфекций применяют разработанный еще в 60-е годы прошлого века метод инактивации, при котором в бактериальные культуры вводят избыточное количество инактиванта (отрицательно влияет на организм иммунизируемого животного).

Цель исследований - изучить биотехнологические процессы производства и разработать технологию изготовления полиштамменной гидроокись алюминийевой формолвакцины против стрептококкоза крупного рогатого скота.

В соответствии с этим было необходимо: подбирать вакцинные штаммы стрептококков серологических групп В, С и D, отработать технологию управляемого глубинного культивирования отработанных штаммов стрептококков в лабораторных условиях, приготовить опытные серии полиштамменной ГОА-вакцины против стрептококковых заболеваний крупного рогатого скота.

Материалы и методы исследований. В работе использовали производственные штаммы - *Streptococcus agalactiae* (серогруппа В), *Streptococcus zooepidemicus* (серогруппа С) и *Streptococcus faecalis* (серогруппа D).

В таблице 1 приведена характеристика возбудителей стрептококкозов.

Таблица 1 - Характеристика возбудителей стрептококкозов

Вид стрептококка	Серогруппа	Вызываемая патология
<i>Streptococcus agalactiae</i>	В	Мастит
<i>Streptococcus zooepidemicus</i>	С	Гнойные инфекции (респираторные органы, мочеполовая система, мастит, артриты, воспаление пупочного канатика) и др.
<i>Streptococcus faecalis</i>	Д	Энтериты, септицемия.
<i>Streptococcus faecium</i>		Пневмония, асцит, менингит

Выращивали стрептококки в питательной среде, приготовленной по действующей инструкции по изготовлению и контролю вакцины депонированной против стрептококкоза свиней (серогруппы С и R, 1988 год и оптимизированной ранее питательной среде на основе перевара Хоттингера. Производственный штамм *Streptococcus zooepidemicus* (серогруппа С) культивировали по разработанному нами оптимальному режиму периодического управляемого выращивания на многофункциональном лабораторном комплексе приборов и устройств АНКУМ-2М емкостью 10 л.

Стрептококки инактивировали с использованием формальдегида [1, 5, 6]. Полноту инактивации определяли путем высевов на МПА и МПБ, адьювант - 3%-й гель гидрата окиси алюминия.

Культуры стрептококков исследовали по морфологии, культуральным свойствам, жизнеспособности, оптической плотности.

В биореакторе, оснащенном перемешивающим устройством с магнитной муфтой и изменяемой скоростью, барботером, установлены датчики измерения температуры, рН, окислительно-восстановительного потенциала среды (Eh), а также растворенного в культуральной жидкости кислорода (рO₂).

Содержание рН в культуральной жидкости определяли потенциометрически, уровень растворенного кислорода pO_2 - датчиками, изготовленными в СКБ БП (г. Пущино), Eh - с использованием электродов ионной проводимости типа ЭО — 01. Оптическую плотность культуры стрептококков измеряли на фотоколориметре КФК-2 и в блоке аппарата АНКУМ-2М.

Результаты исследований. При анализе измерений основных параметров (рН, pO_2 и Eh) в процессе выращивания стрептококков по инструктивному режиму было установлено, что примерно через три часа культивирования исчерпывается один из элементов питания (глюкоза) и наблюдается подъем pO_2 , прекращение снижения рН - явные признаки лимитирования. Данное предположение подтверждается и изменением оптической плотности культур при выращивании стрептококков в инструктивном режиме — через три часа прекращается логарифмический рост и переход процесса в стадию замедления. Поэтому можно предположить, что для интенсификации выращивания стрептококков в питательной среде на основе бульона Хоттингера необходима дробная подача лимитирующего их рост компонента (глюкозы) питательной среды, а также регулирование рН и pO_2 .

По результатам анализа существующего процесса выращивания стрептококков мы разработали режим управляемого культивирования.

Питательную среду в ферментере засеивали культурой стрептококков и выращивали в течение 6...8 ч при 37°C. После засева окислительно-восстановительный потенциал культуральной жидкости снижался до - 150-200 мВ, до окончания процесса культивирования поддерживали pO_2 на уровне 15...25% от насыщения кислородом воздуха. Регулировали рН культуральной жидкости от 6,8 до 7,2, а глюкозу подавали дозами до концентрации 0,05...0,2%. Лимитирование роста стрептококков глюкозой характеризуется резким повышением pO_2 при неизменных расходе воздуха и оборотах мешалки, прекращением снижения рН культуральной жидкости. Культура в процессе всего культивирования сохраняла свои свойства и была типичной по морфологии - кокки в виде цепочек.

Процесс периодического управляемого культивирования стрептококков характеризуется показателями: длительность фазы приспособления - 2,3...2,6 ч; продолжительность логарифмической фазы роста - 3,3...4,2 ч; максимальная удельная скорость роста — 0,44...1,54 1/ч; максимальное накопление - 3,1 млрд/см³.

Как показали результаты исследований, управляемый режим культивирования по сравнению с существующим процессом ускоряет накопление стрептококков в 2,5 раза, при этом увеличивается удельная скорость роста и немного продолжительность фазы приспособления. С целью уменьшения этого показателя засеивали питательную среду инокулятом, взятым с логарифмической стадии. Показатели роста стрептококков при управляемом режиме культивирования : длительность фазы приспособления - 0,25...0,65 ч; продолжительность логарифмической фазы - 1,85...3,15 ч; максимальная скорость - 0,64...1,5 1/ч; максимальное накопление - 6,3 млрд/см³.

Следовательно, при засеивании питательной среды культурой стрептококков, взятой с логарифмической фазы роста, в сочетании с управляемым процессом культивирования в 2,5...5 раз сокращается фаза приспособления стрептококков при сохранении типичных биологических свойств.

Одним из путей повышения иммуногенности инактивированных вакцин может служить разработка щадящих режимов инактивации микроорганизмов.

Совместное действие сублетальных концентраций формальдегида и нефизиологических температур (выше 37°C) позволяют понизить количество вводимого в бактериальную суспензию формальдегида, добиться полной, необратимой инактивации бактерий и существенно сократить время инактивации (таблица 2).

После установления стерильности путем высевов на питательные среды МПА, МПБ в биореактор добавляли стерильный 3% гель алюминия гидрата окиси по ГОСТ 18287-81 в количестве 15% общего объема культуры ни перемешивали. Сорбцию вели при 18...20°C в течение 3...5 суток. До полной прозрачности надосадочной жидкости.

Таблица 2 – Результаты отработки параметров инактивации стрептококков

Технологические параметры инактивации	Значение параметров инактивации в режимах	
	щадящем	инструктивном
Содержание ФА, %	0,05	0,10...0,15
Температура, °С	45	" 39...40
Время, суток	3...4	7...12

После отстаивания баккультуру концентрировали путем декантации 1/4...1/5 объема надосадочной жидкости. Адсорбированную культуру подщелачивали 10%-ным раствором NaOH до pH 7,2...7,6. Смесь культур фасовали в стерильные флаконы по 100 см³.

На основании исследований по оптимизации технологических процессов изготовлена опытная серия полиштамтной гидроокисьалюминовой формолвакцины против стрептококковых инфекций крупного рогатого скота.

Заключение. Формолвакцина полиштамтная гидроокисьалюминовая против стрептококковых инфекций крупного рогатого скота безвредна и иммуногена, может быть рекомендована к испытанию для профилактики инфекций стрептококковой этиологии крупного рогатого скота.

Литература. 1. Бушуева, Н. Б. Инактивация микроорганизмов при производстве бактериальных вакцин / Н. Б. Бушуева // *Аграрная наука*. - 1998. - № 1. - С.20-21. 2. Разработка технологии культивирования и инактивации бактерий при изготовлении ассоциированной вакцины против стрепто-коккоза, гемофилеза и пастереллеза свиней (Полипневмовак) / Н. Б. Бушуева, А. А. Раевский, Л. В. Анисимова, Л. А. Коротеева // *Научные основы производства ветеринарных биологических препаратов : тез. докл. Всерос. научно-практич. конф.* - Щелково, 2000. - С. 139-140. 3. Инфекционная патология животных / Под ред. А. Я. Самуйленко. - Москва, 2009. - Т. 3. - С. 473-497. 4. Усовершенствование технологии культивирования и инактивации бактерий при изготовлении ассоциированной вакцины против сальмонеллеза, пастереллеза и энтерококковой инфекции поросят / А. А. Раевский [и др.] // *Научные основы технологии промышленного производства ветеринарных биологических препаратов : тез. докл. Всерос. научно-практич. конф.* - Щелково, 1998. - С. 31-33. 5. Разработка управляемого процесса культивирования стрептококков / А. А. Раевский, Л. В. Анисимова, Л. А. Коротеева, Н. Б. Бушуева // *Научные основы производства ветеринарных биологических препаратов : мат. Межд. научн.-практ. конф.* - Щелково, 2003. - С. 68-72. 6. Исследование и разработка управляемых процессов культивирования стрептококков / А. А. Раевский [и др.] // *Ветеринарная биотехнология: настоящее и будущее : мат. Междун.*

научно-практ. конф. - Щелково, 2004. - С. 200-203. 7. Разработка новых технологий изготовления противобактерийных препаратов: сем.-презент. инновац. научн.-техн. проектов «Биотехнология - 2000» / А. А. Раевский [и др.]. - Пуццо, 2000. - С. 28-29. 8. Разработка и испытание инактивированной гидрооксиалюминовой вакцины против инфекционных пневмоний бактериальной этиологии / А. А. Раевский // Научные основы технологии производства ветеринарных биопрепаратов : сб. докл. Междун. конф. мол. уч. - Щелково, 2002. - С. 117-120. 9. Ярцев, М. Я. Состояние и перспективы производства бактериальных вакцин на основе современных технологий / М. Я. Ярцев // Научные основы технологии промышленного производства ветеринарных биологических препаратов : тез. докл. V Всерос. конф. - Щелково, 1996. - С. 93-94.

УДК 619:616.98:578.833.3 -085.371

ПРОФИЛАКТИЧЕСКАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ ВАКЦИНЫ ИНАКТИВИРОВАННОЙ ЭМУЛЬГИРОВАННОЙ ПРОТИВ КОЛИБАКТЕРИОЗА И КЛЕБСИЕЛЛЕЗА ТЕЛЯТ

***Яромчик Я.П., **Шашкова Ю.А., *Бублов А.В., *Билецкий О.Р.,
*Морозов Д.Д., *Васютенок В.И.**

*УО «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной
медицины», г. Витебск, Республика Беларусь

**ОАО «БелВитунифарм», г.п. Должа, Витебский район, Республика Беларусь

Введение. Инфекционные болезни новорожденных телят, сопровождающиеся преимущественным поражением желудочно-кишечного тракта, являются одной из самых актуальных проблем для животноводческой отрасли стран с развитым молочным и мясным скотоводством [4, 8].

Эффективным методом специфической профилактики инфекционных энтеритов остается создание защиты слизистой оболочки кишечника телят с помощью колостральных антител. Вакцинация сухостойных коров последних двух месяцев перед отелом и выпойка новорожденным телятам молозива в первый час их жизни приводит к снижению заболеваемости и уменьшению непроизводительного выбытия молодняка [3, 5, 8, 9].

В связи с несоответствием антигенного состава ряда вакцин с установившейся этиологической структурой эпизоотических штаммов профилактическая эффективность применяемых биопрепаратов не всегда имеет желаемые результаты. Высокий уровень заболеваемости, отход телят и выделение возбудителей эшерихиоза и клебсиеллеза из патологического материала павших телят, полученных от вакцинированных коров, свидетельствуют о недостаточной эффективности средств специфической профилактики этих болезней [1, 2, 6].

Отмечается, что по количеству неблагополучных пунктов, количеству заболевших и павших животных, эшерихиоз удерживает первое место среди болезней бактериальной этиологии на протяжении более 15 лет наблюдения. В ветеринарных диагностических учреждениях от заболевших и павших новорожденных телят выделяют изоляты *E. coli*, содержащие адгезивные антигены А20, К88, К99, F41, 987Р, которые отсутствуют в вакцинах, сконструированных по соматическим антигенам [4, 7].