Изготовление и иммуногенные свойства вакцины против стрептококковых заболеваний КРС

Production and immunogenic properties of vaccine against streptococcal diseases of cattle

Самуйленко А.Я.

Московская обл

DOI CrossRef: 10.30917/ATT-VK-1814-9588-2018-3-1
УДК 619 : 579.862.1

Ключевые слова: стрептококки, культивирование, морфология, инактивация, концентрирование, адъювант.

Key words: streptococci, cultivation, morphology, inactivation, concentration, adjuvant.

Резюме. Целью нашей работы было изготовления вакцины против стрептококковых заболеваний крупного рогатого скота. Из известных библиографических источников выяснили, что основными возбудителями стрептококкоза КРС являются микроорганизмы серологических групп В, С и D, являющихся основными этиологическими факторами заболевания стрептококкозом взрослого крупного рогатого скота и телят. Для решения поставленной задачи использовали такие штаммы стрептококков как *Streptococcus agalactiae* (серогруппа В), *Streptococcus zooepidemicus* (серогруппа С) и *Enterococcus faecalis* (серогруппа D). Культивирование проводили в режиме управляемого периодического культивирования с помощью многофункциональных лабораторных комплексных приборов и устройств АНКУМ-2М, объемом 10 литров. Инактивацию полученной микробной взвеси проводили с помощью формальдегида.

Summary. The aim of our investigations was to develop technological processes of manufacture of a vaccine against streptococcal cow diseases. From well-known bibliographic sources we found out that the main pathogens – microorganisms streptococcus is cow serogroups В, С, D, which are the main etiological factors of the disease streptococcus is adult cow and calves. To solve this problem using streptococcal strains such as the *Streptococcus agalactiae* (serogroup В), *Streptococcus zooepidemicus* (serogroup С) and *Enterococcus faecalis* (serogroup D). Cultivation was carried out in batch culture mode managed by a multi-functional complex laboratory instruments and devices АНКУМ-2М, 10-quart capacity. The inactivation of bacterial suspension was obtained performed using formaldehyde.

Введение

Стрептококкоз крупного рогатого скота как моноинфек-

цию, так и смешанную регистрируют в скотоводческих хозяйствах. У коров стрептококкоз проявляется в виде абортот, метритов и маститов. Телята болеют с первых дней рождения – это пупочный сепсис, поражение суставов, энтерит, пневмония. Летальность среди молодняка достигает 60%.

У переболевших животных значительно уменьшается молочная продуктивность, нарушается воспроизводительная функция, снижается в санитарном отношении качество продукции.

Результаты обследования некоторых неблагополучных по стрептококкозу хозяйств показали, что в возникновении заболевания большое значение имеет действие различных предрасполагающих факторов: неполноценный рацион кормления, нарушение параметров микроклимата, отсутствие моциона, стрессы и др.

Исходя из существующей в России ситуации, можно утверждать, что в ближайшие годы проводить профилактику стрептококкоза путем создания оптимальных условий кормления и содержания животных в большинстве не представляется возможным, поэтому главное – специфическая профилактика заболеваний.

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.

Для приготовления вакцины против стрептококковых заболеваний крупного рогатого скота необходимо использовать полноценные в антигенном отношении культуры стрептококков серогрупп В, С и D.

Культивирование микроорганизмов – один из наиболее значимых технологических этапов в производстве биологических препаратов, предназначенных для специфической профилактики инфекционных заболеваний бактериальной 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 [1,2]. Для этого необходимо создавать оптимальные условия культивирования с учетом физиологического состояния микроорганизмов.

Цель исследований – отработать биологические процессы производства и разработать технологию изготовления полиштамменной гидроокисьюалюминиевой формол вакцины против стрептококковых заболеваний крупного рогатого скота.

В соответствии с этим было необходимо: отработать технологию управляемого глубинного культивирования от-

Информация об авторах / Information about the authors

Самуйленко А.Я., доктор ветеринарных наук, академик РАН, профессор

Школьников Е.Э., кандидат биологических наук, зав.отделом бактериальных препаратов

Соловьев Л.Б., кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник отдела противобактериальных препаратов

Еремец В.И., доктор биологических наук, зам.директора по научной работе, профессор

ФГБНУ ВНИТИБП

Samujlenko A. Ja. Shkol'nikov E. Je. Solov'ev L.B. Eremec V.I.

работанных штаммов стрептококков в лабораторных условиях, приготовить опытные серии полиштаммовой ГОА-вакцины против стрептококковых заболеваний КРС и испытать их иммуногенные свойства в условиях реальных животноводческих хозяйств.

Материалы и методы

В работе использовали производственные штаммы – *Streptococcus agalactiae* (серогруппа В), *Streptococcus zooepidemicus* (серогруппа С) и *Enterococcus faecalis* (серогруппа D).

Выращивали стрептококки в 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 [1,3,4]. Полноту инаktivации определяли путем высевов на МПА и МПБ, адьювант – 3 %-й гель гидрата окиси алюминия.

Культуры стрептококков исследовали по морфологическим и культуральным свойствам, жизнеспособности, оптической плотности.

В биореакторе, оснащенный барботером, установлены датчики измерения температуры, pH, окислительно-восстановительного потенциала среды (Eh), а также растворенного в культуральной жидкости кислорода (pO_2).

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

Результаты исследования

При анализе изменений основных параметров (pH, pO_2 и еН) 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 pH- 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 pH и pO_2 .

По результатам анализа существующего процесса выращивания стрептококков, был разработан режим управляемого культивирования.

Питательную среду в ферментере засеивали культурой стрептококков и выращивали в течение 6...8 часов при 37 °С. 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 pH 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 неизменном расходе воздуха и оборотах мешалки, прекращением снижения pH 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 и увеличивается в 3–4 раза накопление стрептококков при сохранении типичных биологических свойств (3,4).

После установления стерильности путем высевов на питательные среды МПА, МПБ в биореактор добавляли стерильный 3%-й гель алюминия гидрата окиси по ГОСТ 18287-81 в количестве 15% общего объема культуры и перемешивали. Сорбцию вели при 18...20 °С в течение 3...5 сут. До полной прозрачности над осадочной жидкостью. После отстаивания, баккультуру концентрировали путем декантации 1/4...1/5 объема над осадочной жидкостью. Адсорбированную культуру подщелачивали 10%-м раствором NaOH до pH 7,2...7,6. Смесь культур фасовали в стерильные флаконы по 100 см³.

Заключение

На основании исследований по оптимизации технологических процессов, изготовлена опытная серия полиштаммовой гидроокисьалюминовой формол вакцины против стрептококковых инфекций крупного рогатого скота.

Формол вакцина полиштаммовая гидроокисьалюминовая против стрептококковых инфекций крупного рогатого скота безвредна и иммуногенна, может быть рекомендована к испытанию для профилактики инфекций стрептококковой этиологии КРС. Опытная серия вакцины с положительным эффектом испытана в реальных хозяйствах Краснодарского края.

Литература

1. Бушуева Н.Б. Разработка технологии культивирования и инаktivации бактерий при изготовлении ассоциированной вакцины против стрептококкоза, гемофила и пастереллеза свиней (Полипневмовак): Тез. доклада Всерос.научно-практ. Конференции "Научные основы производства ветеринарных биологических препаратов"/Н.Б.Бушуева, А.А.Раевский, Л.В.Анисимова, Л.А. Коротева, - Щелково, 2000. -С.139-140.
2. Инфекционная патология животных/ под ред. Самуйленко А.Я.-М. 2009.-Т.3.- С. 473 - 497.
3. Раевский А.А. Усовершенствование технологии культивирования и инаktivации бактерий при изготовлении ассоциированной вакцины против сальмонеллеза, пастереллеза и энтерококковой инфекции поросят: тез. доклада Всерос. науч.-практ. Конф. "Научные основы технологии промышленного производства ветеринарных биологических препаратов"/А.А.Раевский, Л.В.Анисимова, М.Я.Ярцев и др.-Щелково, 1998.- С.31-33.
4. Раевский А.А. Исследование и разработка управляемых процессов культивирования стрептококков: мат. Междун. науч.-практ. конф. "Ветеринарная биотехнология : настоящее и будущее" /А.А.Раевский, Л.В.Анисимова, Л.В. Коротева и др.- Щелково, 2004.- С.200 - 203.