DOI CrossRef:10.30917/ATT-VK-1814-9588-2019-5-9

УДК 619:615.37:636.5.033

Технологические аспекты разработки новой вакцины против стрептококковых заболеваний КРС

Самуйленко А.Я., академик РАН, д. вет. наук, научный руководитель

Школьников Е.Э., канд. вет. н., заведующий отдела противобактериальных препаратов

Гринь С.А., член-корреспондент РАН, д. биол.н. директор

Анисимова Л.В., канд. биол. н., ведущий научный сотрудник отдела противобактериальных препаратов

Сокорев Н.В., аспирант отдела противобактериальных препаратов

Павленко И.В., д. техн. н., вед. науч. сотр. отдела противобактериальных препаратов

Раевский А.А., к. биол. н. зам. директора

ФГБНУ Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт биологической промышленности Российской академии сельскохозяйственных наук (г. Щелково, Московской области) E-mail: vnitibp@mail.ru

Мисник А.М., ветеринарный врач, ассистент кафедры эпизоотологии инфекционных болезней животных УО «Витебская ордена «Знак Почета» Государственная академия ветеринарной медицины».

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

Резюме. Цель исследований - отработка технологических процессов изготовления полиштамменной гидроокисьюалюминиевой формолвакцины против стрептококковых заболеваний крупного рогатого скота. Из библиографических источников известны основные возбудители- микроорганизмы серологических групп В, С и D, а также этиологические факторы. Для решения поставленной задачи использовали штаммы: *Streptococcus agalactiae* (серогруппа В), *Streptococcus zooepidemicus* (серогруппа С) и *Streptococcus faecalis* (серогруппа D). Культивирование проводили в управляемом периодическом режиме с помощью multifunctional laboratory instruments and devices ANKUM-2M. Инактивировали полученную микробную взвесь объемом 10 л с помощью формальдегида.

Введение

Стрептококкоз крупного рогатого скота как моноинфекцию, 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 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 (табл.1).

Technological aspects of the development of a new vaccine against streptococcal diseases of CATTLE

Samuilenko A.Ya., Shkolnikov E.I., Grin S.A., Anisimova L.V., Sokorev N.V., Pavlenko I.V., Raevsky A.A., Misnik A.M.

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

Abstract: The aim of our work was to develop technological processes of manufacture of a vaccine against streptococcal diseases of cow. From well-known bibliographic sources found out that the main pathogens are microorganisms streptococcus adult cattle and calves. To solve this problem using streptococcal strains such as the *Streptococcus agalactiae* (serogroup B), *Streptococcus zooepidemicus* (serogroup C) and *Streptococcus faecalis* (serogroup D). Cultivation was carried out in batch culture mode managed by a multi-functional complex laboratory instruments and devices ANKUM-2M, volume 10 liters. The inactivation of bacterial suspension obtained was performed using formaldehyde.

Разработана моноштамменная гидроокисьюалюминиевая 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 гидроокисьюалюминиевой формолвакци-

Для цитирования / For citation

Технологические аспекты разработки новой вакцины против стрептококковых заболеваний КРС /А.Я.Самуйленко [и др.] // Ветеринария и кормление. - 2019. - №5 - С. 27-29

Technological aspects of the development of a new vaccine against streptococcal diseases of CATTLE /A.Ya.Samuilenko [et al.]/Veterinaria i kormlenie. - M., 2019 - №5- P.27-29

цины против стрептококкоза крупного рогатого скота.

В соответствии с этим было необходимо: подобрать 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 КРС.

Материалы и методы

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

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, оснащенный перемешивающим устройством с магнитной муфтой и изменяемой скоростью, 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), 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

При анализе измерений основных параметров (pH, 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 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 сре-

ды, 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 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 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 неизменных 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 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 (табл.2).

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 °C в течение 3...5 суток. До полной прозрачности надосадочной жидкости.

После отстаивания баккультуру концентрировали путем декантации 1/4...1/5 объема надосадочной жидкости. Адсорбированную культуру подщелачивали 10% -м ра-

Таблица 1. Штаммы стрептококков / Table 1. Strains of streptococcus

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

Таблица 2. Технологические параметры инактивации / Table 2. Technological parameters of inaktivation

Технологические параметры инактивации	Значение параметров инактивации в режимах	
	щадящем	инструктивном
содержание ФА, %	0,05	0,10...0,15
температура, °C	45	39...40
время, сут.	3...4	7...12

створом NaOH до pH 7,2...7,6. Смесь культур фасовали в стерильные флаконы по 100см³.

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

Заключение

Формолвакцина полиштамменная гидроокисьалюминиевая против стрептококковых инфекций крупного рогатого скота безвредна и иммуногена, может быть рекомендована к испытанию для профилактики инфекций стрептококковой этиологии КРС.

Литература

1. Бушуева Н.Б. Инаktivация микроорганизмов при производстве бактериальных вакцин/ Н.Б.Бушуева// Аграрная наука. - 1998. - №1. - С. 20-21.
2. Бушуева Н.Б. Разработка технологии культивирования и инаktivации бактерий при изготовлении ассоциированной вакцины против стрептококкоза, гемофилеза и пастереллеза свиней (Полипневмовак): тез.докл. Всерос.научно-практич. конф. "Научные основы производства ветеринарных биологических препаратов" / Н.Б.Бушуева, А.А.Раевский, Л.В.Анисимова, Л.А.Коротеева. - Щелково, 2000. - С. 139-140.
3. Инфекционная патология животных /Под.ред. Самуйленко А.Я. - М.,2009. - Т.3. - С. 473-497.
4. Раевский А.А. Усовершенствование технологии культивирова-

ния и инаktivации бактерий при изготовлении ассоциированной вакцины против сальмонеллеза, пастереллеза и энтерококковой инфекции поросят: тез.докл. Всерос. научно-практич. 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.

5. Раевский А.А. Разработка управляемого процесса культивирования стрептококков: мат. Межд. научн.-практ.конф. "Научные основы производства ветеринарных биологических препаратов" / А.А.Раевский, Л.В.Анисимова, Л.А.Коротеева, Н.Б.Бушуева. - Щелково, 2003. - С.68 - 72.

6. Раевский А.А. Исследование и разработка управляемых процессов культивирования стрептококков: мат. Междун.научно-практ. конф. "Ветеринарная биотехнология: настоящее и будущее"/А.А.Раевский, Л.В.Анисимова, Л.А.Коротеева и др. - Щелково, 2004. - С. 200-203.

7. Раевский А.А. Разработка новых технологий изготовления противобактериальных препаратов: сем. - презент.инновацион.научн. - техн. проектов "Биотехнология - 2000" / А.А.Раевский, А.Я.Самуйленко, Л.В.Анисимова и др. - Пушкино, 2000. - С.28-29.

8. Раевский А.А. Разработка и испытание инаktivированной гидроокисьалюминиевой вакцины против инфекционных пневмоний бактериальной этиологии: сб. докл. Междун.конф. мол.уч. "Научные основы технологии производства ветеринарных биопрепаратов" / А.А.Раевский, Л.В.Анисимова, Л.Б.Соловьев и др. - Щелково, 2002. - С. 117-120.

9. Ярцев М.Я. Состояние и перспективы производства бактериальных вакцин на основе современных технологий: тез. докл.V Всерос.конф. "Научные основы технологии промышленного производства ветеринарных биологических препаратов" / М.Я.Ярцев. - Щелково, 1996. - С. 93-94.