

субстрат ретінде, одан әрі ветеринариялық мақсатта қолданылатын диагностикалық және алдын алу дәрмектерін әзірлеу мен өндіру барысында қолданылуы мүмкіндігі зор.

Culture of cells diploid human embryonic fibroblasts ЭФЧ 01/05 susceptible to viruses аujeszky, sheep pox, ecthyma of sheep and classical swine fever. Cell culture EFH 01/05 can be used as a substrate for the cultivation of viruses, for further development and production of diagnostic and preventive medicines veterinary supplies.

УДК 619:615

СУСПЕНЗИОННОЕ КУЛЬТИВИРОВАНИЕ ВАКЦИННОГО ШТАММА «55-ВНИИВВиМ» С ПОМОЩЬЮ КАЧАЛОЧНОЙ УСТАНОВКИ

Саханин В.С.

Казахский национальный аграрный университет

Сибирская язва относится к числу особо опасных инфекций. Эта болезнь, в основном поражает сельскохозяйственных животных – крупный и мелкий рогатый скот, лошадей, ослов, верблюдов, остается бичом для животноводства многих стран и приносит большой экономический ущерб. Болеют ею и дикие млекопитающие (травоядные, хищные, а также всеядные). Высокая заболеваемость обусловлена тем, что возбудитель сибирской язвы способен десятилетиями сохраняться в почве в виде спор и образовывать стойкие почвенные очаги, существование которых в разных регионах мира, в том числе и на территории Казахстана, создает постоянную угрозу эпизоотий и эпидемических вспышек. [1].

В результате разработки и внедрения в практику живых вакцин против сибирской язвы заболеваемость скота сведена до единичных случаев. Однако ликвидировать ее полностью не удастся как в нашей стране, так и во многих странах мира. Противосибирезвенные прививки лишь профилактируют заражение животных, но не исключают постоянную угрозу заражения и при ослаблении резистентности организма возможно проявление болезни. Учитывая выше перечисленное можно заключить, что производство вакцины против сибирской язвы требует совершенствования и является актуальным вопросом современной микробиологии.

В настоящее время для профилактической иммунизации против сибирской язвы используется штамм «55-ВНИИВВиМ», а для накопления биомассы сибирезвенного микроба применяют следующие методы:

1. Суспензионное культивирование в биореакторах объемом 100,0 – 1000,0 литров.
2. Культивирование на поверхности твердых питательных сред.

При изготовлении сибирезвенной вакцины суспензионным способом в биореакторах хранить большие объемы спорового материала, находящегося в реакторе, при температуре 15-20 °С длительное время (10 суток) не технологично и не экономично, а дополнительная манипуляция с концентратом бактериальной массы увеличивает риск ее контаминации и, следовательно, выбраковки. Для увеличения скорости осаждения бактериальной массы используется флокулянт, при внесении которого также возможна контаминация посторонней микрофлорой готового продукта. В качестве запорной арматуры в обвязке реактора используются мембранные вентили, при попадании твердого предмета на мембрану может разгерметизироваться реактор и, следовательно, произойдет выбраковка питательной среды. Для приготовления не больших партий вакцины против сибирской язвы данный метод не целесообразен.

Накопление бактериальной массы с использованием твердых питательных сред имеет ряд существенных недостатков. При этой технологии практически все операции выполняются вручную, а процесс является весьма трудоемким и обладает низким уровнем механизации. У такой технологии имеются отрицательные стороны с точки зрения биологии. При промышленном производстве сибирезвенных вакцин образуются огромные популяции клеток, они на поверхности питательного агара формируют многослойную культуру. Клетки в ней находятся в не одинаковых условиях. Нижний их слой контактирует с агаром, получает необходимые

питательные вещества и растет. Верхний слой, в силу отсутствия поступления питательных веществ, заканчивает рост и начинает споруливать.

Таким образом, культура является несинхронной: часть ее размножается, часть — спорулирует. К образовавшимся спорам по межклеточным пространствам могут попасть питательные вещества и некоторые споры вновь прорастают в вегетативные клетки. В этих условиях происходят спонтанные мутации, которые приводят к накоплению в популяции мутантных форм, особенно в случае, если такие мутанты характеризуются большей скоростью роста и повышенной жизнеспособностью по сравнению с исходными формами. Процесс постепенного вытеснения менее приспособленных форм более приспособленными, так называемая автоселекция, протекает без участия специалиста, а часто и вопреки его ожиданиям.

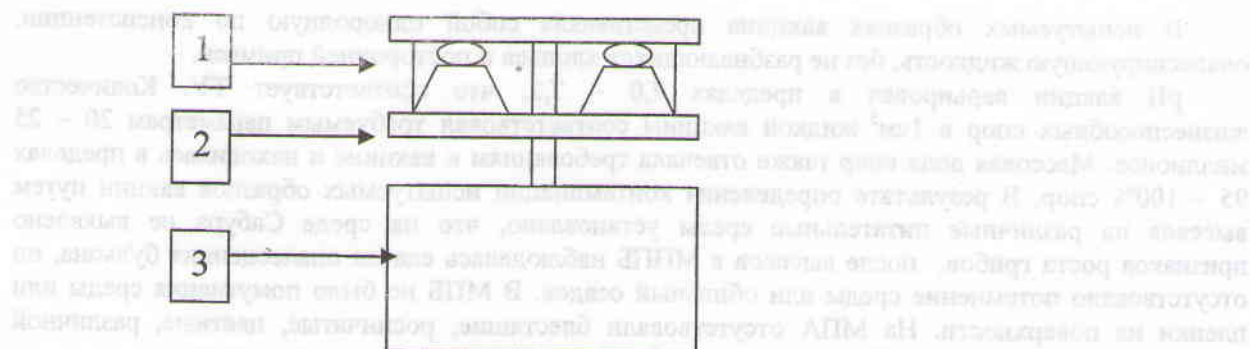
У возбудителя сибирской язвы показательным примером служит фазовая диссоциация, представляющая собой частый (1 событие на 10^2 – 10^3 клеток) переход колоний в одну из трех форм ($R \rightarrow O \rightarrow S$ -форму). Эти формы возбудителя различаются по структуре клеточной стенки, по вирулентности и иммуногенности [2].

Поэтому с целью улучшения качества сибиреязвенных вакцин, исключения условий для фазовой диссоциации при изготовлении вакцины против сибирской язвы на твердых питательных средах, а так же для устранения недостатков суспензионного культивирования с помощью биореакторов необходимо было разработать новую технологию, в основе которой лежит культивирование вакцинных штаммов в жидкой питательной среде (суспензионным способом).

Материалы и методы Работа проведена на кафедре эпизоотологии и ОВД Казахского Национального Аграрного Университета (КазНАУ) и ТОО «Вита-СТ» г. Степногорск Акмолинской области. В опытах по проверке качества вакцины, приготовленной различными способами, использовано 34 морские свинки, 6 кроликов и 20 белых мышей. Для приготовления испытуемых вариантов вакцин применяли бескапсульный сибиреязвенный штамм «55-ВНИИВВиМ», а в качестве заражающего использовали штамм М-71 (штамм второй вакцины Ценковскогo). Подробно методы определения качества испытуемых вариантов вакцин отражены в результатах исследования.

Скорость потребления кислорода микроорганизмами зависит от разности концентраций его внутри и вне клетки. Процесс потребления кислорода сопровождается непрерывным уменьшением его концентрации у внешней оболочки. Это ведет к уменьшению активности роста клетки. Для сохранения постоянной разности концентраций у внешней оболочки клетки, необходимо создание условий непрерывного перемешивания клетки по всему объему жидкости. То же самое происходит и с концентрацией питательных веществ вне клетки и в нутрии ее: скорость их проникновения в клетку непрерывно уменьшается вследствие уменьшения разности их концентраций по обе стороны клеточной стенки. Не менее важным при этом является поддержание максимальной скорости выхода продуктов обмена из клетки. Для обеспечения всех этих условий необходимо интенсивное перемешивание культуральной жидкости [3]. Учитывая, что при производстве вакцины против сибирской язвы поверхностным методом и суспензионным методом в биореакторах имеется ряд недостатков и трудностей мы предлагаем в качестве метода накопления бактериальной массы использовать метод, при котором питательные вещества и кислород к бактериальной клетке будет поступать при помощи механического перемешивающего устройства — качалочной установки. Схематично данная установка изображена на рисунке 1.

Качалки предназначены для непрерывного перемешивания жидкостей в колбах с целью обогащения кислородом. Взбалтывание микроорганизмов на качалке выполняет две функции: осуществляет массоперенос между различными фазами (газовой, жидкой и твердой) культуры и перемешивает клетки так, чтобы поддерживались гомогенные химические и физические условия.



- 1 - Качалочные колбы объемом 2-3 литра.
- 2 - Платформы для фиксации колб. (18 мест фиксации).
- 3 – Электромотор.

Рисунок 1. Качалочная установка

Процесс культивирования на качалочных установках состоит из следующих стадий:

1. приготовление питательной среды;
2. засев колб;
3. культивирование на качалках при 37 °С (18-24 часа);
4. выдержка при 30 °С (6-12 часов);
5. отбор проб на спорообразование и высев на стерильность с последующим переносом колб в холодильник при 4 °С;
6. отбор над осадочной жидкости и объединение спорового материала;
7. приготовление серий вакцины.

Питательную среду разливали по стеклянным (металлическим) качалочным колбам объемом два литра.

В результате данного метода суспензионного культивирования мы устраняем необходимость использовать флокулянт тем, что споровый материал отстаивается необходимое для осаждения в естественном гравитационном поле время – данный метод осаждения является наиболее технологически простым среди существующих методов и позволяет отделить споры в стерильных условиях. Устраняется необходимость постоянного контроля над процессом культивирования. Ввиду того, что для культивирования используются отдельные колбы можно без особых затрат, в случае необходимости, приготовить не большие объемы вакцины против сибирской язвы.

Недостатком этого метода является то, что работать приходится с относительно большим количеством колб и данный метод культивирования является менее технологичным по сравнению с реакторным методом производства.

Сравнительную характеристику суспензионных методов производства, таких как метод глубинного культивирования в биореакторе (100,0 литров) и предлагаемый качалочный метод мы проводили с использованием известной питательной среды (дрожже-пептонная).

Результаты исследований При сравнительной характеристике методов суспензионного культивирования в биореакторе и на качалках полученные результаты, отраженные в таблице 1.

Таблица 1. Сравнительная характеристика методов суспензионного накопления бактериальной массы.

№	наименование	выход спорового материала (млн м.к.мл)	качество получаемого материала*
1	реактор	450	соответствует
2	качалки	520	соответствует

* - оценку качества производили согласно требованиям, предъявляемым к вакцине против сибирской язвы.

В результате эксперимента установлено, что все испытуемые образцы вакцин, приготовленные из бактериальной массы, полученной с использованием качалочной установки и реактора, отвечают требованиям для вакцины против сибирской язвы сельскохозяйственных животных.

В испытуемых образцах вакцина представляла собой однородную по консистенции, опалесцирующую жидкость, без не разбивающихся хлопьев и посторонней примеси.

рН вакцин варьировал в пределах 7,0 – 7,2, что соответствует ТУ. Количество жизнеспособных спор в 1 см³ жидкой вакцины соответствовал требуемым параметрам 20 – 25 миллионов. Массовая доля спор также отвечала требованиям к вакцине и находилась в пределах 95 – 100% спор. В результате определения контаминации испытуемых образцов вакцин путем высевов на различные питательные среды установлено, что на среде Сабура не выявлено признаков роста грибов, после высевов в МППБ наблюдалась слабая опалесценция бульона, но отсутствовало потемнение среды или обильный осадок. В МПБ не было помутнения среды или пленки на поверхности. На МПА отсутствовали блестящие, росинчатые, цветные, различной формы и величины колонии бактерий, а также белые или лучистые колонии плесени.

При определении типичности роста микроорганизмов посеvy исследуемых образцов ежедневно просматривали в течение всего срока наблюдения. При этом отклонений от показателей, отраженных в ТУ не отмечено.

Для определения однородности колоний, исследовали колонии, выросшие на поверхности агара на триптическом переваре сердца. Во всех испытуемых образцах колонии имели типичную характеристику.

Определение капсульных форм сибирезвеноного микроба производили путем инъекции взвеси спор белым мышам. В приготовленных из органов и брюшного экссудата мазках были только бескапсульные бациллы (палочки).

Для определения безвредности испытуемых вариантов вакцины против сибирской язвы брали по три клинически здоровых кролика на каждый вариант вакцины и вводили подкожно в область наружной поверхности бедра по 100 – 125 млн спор каждому. В результате все подопытные кролики остались живыми, у некоторых наблюдалась температурная реакция в течение 1 – 3 суток, а также у двух животных был отмечен отек, не распространившийся за пределы наружной поверхности бедра.

При определении остаточной вирулентности каждого варианта вакцин брали по 12 морских свинок (массой 350-400 грамм) на каждый вариант, которым подкожно вводили по 10 – 12,5 млн спор в область живота. В результате чего у всех испытуемых животных наблюдался отек в месте введения вакцины, у некоторых животных некроз кожи. Данный результат соответствует требованиям для производства вакцины. Через 12 – 14 суток после вакцинации по 10 животных с каждого варианта привитых морских свинок и 10 контрольных (не вакцинированных) морских свинок аналогичной массы подвергали заражению референс – заражающей культурой (штамм второй вакцины Ценковскго М-71 или 71/12) в дозе по 1 млн жизнеспособных спор. Культуру вводили в область живота по 0,5 см³ каждому животному. Результаты определения иммуногенности предоставлены в таблице 2.

Таблица 2. Иммуногенность вакцины приготовленной с использованием различной технологии накопления спорowego материала.

метод накопления вакцины	количество вакцинированных животных	количество зараженных животных	количество выживших животных	количество павших животных	результат
ректорный	10	10	10	0	иммуногена
качалочный	10	10	10	0	иммуногена
контроль	-	10	0	10	

Обсуждение результатов Из результатов, приведенных в таблице 2 делаем выводы, что вакцина, произведенная с использованием качалочной установки по иммуногенности не уступает вакцине произведенной с использованием реактора.

Как видно из таблицы 1 при качалочном методе производства процент выхода спорowego материала выше, чем при глубинном культивировании. Данный результат достигается вследствие отсутствия давления на делящуюся клетку в процессе культивирования, а качество получаемого материала соответствует требованиям предъявляемым к вакцине против сибирской язвы.

Учитывая выше перечисленное, мы предлагаем для производств не больших партий вакцины против сибирской язвы, а также для приготовления посевного материала для реакторов использовать в качестве метода накопления спорowego материала технологию с использованием качалочных установок.

Выводы

1. При накоплении биомассы сибиреязвенного микроба штамма «55-ВНИИВВиМ» на твердой питательной среде имеет место неоднородное спорулирование. Наибольшее количество спор наблюдается на поверхности биомассы, что отрицательно сказывается на однородности биологических свойств вакцины.

2. При выращивании *Bac.anthraxis* штамма «55-ВНИИВВиМ» глубинным методом происходит равномерное спорулирование, что создает предпосылки получения высококачественной вакцины против сибирской язвы.

3. Наибольшее накопление биомассы сибиреязвенного микроба штамма «55-ВНИИВВиМ» глубинным методом наблюдается при использовании качалок, что связано с созданием равноценных условий обогащения питательной среды атмосферным воздухом.

1. Ипатенко Н.Г., Гаврилов В.А. Сибирская язва. изд., - М.: Колос, 1996.

2. Ипатенко Н.Г., Яковлева Т.Н. Свойства не типичных форм *Bac. anthracis* // Ветеринария, 1996. - №5 - с. 21 - 26.

3. Никитин Г.А.. «Биохимические основы микробиологических производств» Киев изд. - «Вища школа» 1981 г. стр 103

* * *

Автордың жүргізген зерттеулері нәтижесінде қатты қоректік ортада сібір жарасы микробының «55-ВНИИВВ и М» штаммының биомассасы жиналғанда біртекті споралану көрінеді. Споралардың көп саны биомасса бетінде байқалады, ол өз кезегінде вакцинаның биологиялық қасиеттеріне теріс әсер етеді.

«55-ВНИИВВ и М» штамды *Bac.anthraxis* тереңдетілген немесе әмбебап әдісімен өсіру кезінде бір қалыпты споралану жүреді, сәйкесінше вакцинаның жоғары сапалы қасиеттерін алуға септігін тигізеді.

Тендік немесе әмбебап әдіспен «55-ВНИИВВ и М» штамды сібір жарасы микробы биомассасының ең көп шоғырлануы тербегіштің қолдану кезінде байқалады, яғни қоректік ортаны атмосфералық ауамен байыту толыққанды жағдайға байланысты.

As the result of researches it is established that in accumulation of biomass of «55-ВНИИВВиМ» anthrax microbe strain on the firm nutrient medium takes place heterogeneous sporing.

The greatest quantity of spores is observed on a biomass surface that can negatively affect on homogeneity of biological properties of a vaccine by industrial production. At cultivation of *Bac.anthraxis* strain «55-ВНИИВВиМ» by deep methods occurs even sporing that creates prerequisites for getting high-quality vaccine against Siberian ulcer. The greatest accumulation of biomass of «55-ВНИИВВиМ» anthrax microbe strain by deep method is observed on using shakers that connected with creation of equivalent conditions of nutrient medium enriching with atmospheric air.

УДК 619: 616-99 - 07

НЕКОТОРЫЕ ВОПРОСЫ РАЦИОНАЛЬНОЙ ПРОФИЛАКТИКИ ПРОТОЗОЙНЫХ БОЛЕЗНЕЙ.

Сулейменов Т.Т.

Казахский национальный аграрный университет

Введение

В аграрном секторе экономики создали непредвиденные трудности в организации ветеринарно - медицинского обеспечения животноводства, контроля за эпизоотической и эпидемической обстановкой. В результате все большее распространение получают ассоциированные смешанные, атипичные и даже новые паразитозы. Подобные изменения настоятельно требуют повышения качества, наиболее полного, исчерпывающего диагностического исследования, разработки принципиально новых, интегрированных методов терапии и профилактики.