

УДК 619: 616. 981. 51

Айтжанов Б.Д., доктор ветеринарных наук, профессор
Кульдеев А.И., кандидат ветеринарных наук, профессор
Сиябеков С.Т., кандидат ветеринарных наук, профессор
Корабаев Е.М., кандидат ветеринарных наук, профессор
НАО «Казахский национальный аграрный университет», г. Алматы, Республики Казахстан

ПУТИ ПОВЫШЕНИЯ ЭФФЕКТИВНОСТИ ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ ПРИМЕНЯЕМЫХ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ВЫСОКОИММУНОГЕННОЙ ВАКЦИНЫ ПРОТИВ СИБИРСКОЙ ЯЗВЫ

Аннотация

В данной статье приводятся результаты сравнительного исследования различных серий питательных сред для наибольшего накопления жизнеспособных спор сибиреязвенного вакцинного штамма 55 ВНИИВВиМ. Проведенными исследованиями установлено, что самое максимальное количество жизнеспособных спор содержалось в питательной среде №3-97%, тогда как в питательных средах № 1 и № 2 этот показатель был в пределах 87 и 90% соответственно. Питательная среда отличалась от других питательных сред содержанием бульона Хоттингера 20-25% с аминным азотом 500-600 мг %.

Массовая доля глицерина в изготовленной серии была в пределах 30%, концентрация жизнеспособных спор -25 млн. микробных клеток в 1см³. Готовая вакцина была расфасована в 100 см³ в стеклянные флаконы.

Ключевые слова: бактерия, питательная среда, возбудитель, сибирская язва, эпизоотологический анализ, иммуногенная активность, сибиреязвенные очаги, инкубационный период.

Введение. Сибирская язва сельскохозяйственных животных наносит животноводству страны большой экономический ущерб, так как эта болезнь поражает все виды домашних и диких животных. Сибирской язвой болеет и человек. В борьбе с сибирской язвой кроме организационно - хозяйственных и ветеринарно-санитарных мероприятий большое значение имеет специфическая профилактика с применением вакцин. В связи с этим разработка высокоэффективных вакцин против этой инфекции приобретает значительную актуальность.

Возбудитель - бацилла антракс (*Bac. Anthracis* лат.) бацилла сибирской язвы. Слова «антракс»- греческого происхождения, от греческого «anthrakos», что означает «уголь», «карбункул», или «углевик», потому что нарыв перед изъязвлением покрывается темной корочкой. Казахи в зависимости от вида животных эту болезнь называют по разному. Например, у овец «топалан», у коз «кебенек», у крупного рогатого скота «карасан», у верблюдов «акшелек», у лошадей «жамандат». У человека «туйнеме» или «куйдирги».

Это заболевание известно с давних пор животноводам, сельскохозяйственным работникам, работникам кожевенных и других предприятий, связанных с обработкой кож, шерсти, конского волоса и пр. В природе бациллы сибирской язвы имеют широкое распространение. К настоящему времени различают 150 вариантов бактерий (штаммов) различной степени заразительности. Бацилла сибирской язвы довольно крупная по размеру бактерия, имеющая палочковидную форму. Может выживать как в аэробных, так и в анаэробных условиях внешней среды. В неблагоприятных условиях возбудитель образует споры, которые форму имеют овальную многослойную оболочку, устойчивых к перепаду различных температур и дезинфицирующим средствам. Инкубационный период заболевания варьируется всего от 24 часов до 3-5 дней.

Очаги сибирской язвы часто встречаются в Азии (Турция, Иран, Китай, Монголия) Южной Африке (Марокко, Египет), Южной Америка (Аргентина) и Австралии. В Европе, России и Соединенных Штатах Америки заболевание встречается сравнительно редко. Из стран СНГ наиболее часто штамма СТИ-1. Со временем настала необходимость повышения ее иммуногенных и снижение реактогенных свойств. Проведенный эпизоотологический анализ

показал, что сибирская язва встречается во всех областях республики. Неблагополучные очаги еще встречаются в южных областях по сравнению с северными областями Казахстана. Особенно часто они регистрируются в Южно-Казахстанской и Жамбылской областях. Средние количественные показатели отмечены в Алматинской, Западно-Казахстанской и Восточно-Казахстанской областях, а самые низкие в Павлодарской, Акмолинской и Северо-Казахстанской областях. Не все сибиреязвенные очаги представляют прямую угрозу заражения. Например, в некоторых неблагополучных пунктах за последние 30-40 лет не отмечено случаев заболевания сибирской язвой. Это показывает, что возбудитель инфекции проявляет свою активность тогда, когда в почве для неё создаются благоприятные условия жизни. Заболевание часто встречается в летнее время года, в частности, в июне, июле и августе и значительно реже в зимние месяцы [1-3].

В системе мер борьбы с этой инфекцией большое значение имеет проведение эпизоотологического анализа и предохранительных прививок с применением вакцин.

В связи с высокой себестоимостью питательных сред из мяса, мясных и рыбных полуфабрикатов возникает необходимость поиска и апробации подходящего для этой цели стандартного и недорогого сырья. Производство полноценных питательных сред на основах, имеющих низкую себестоимость, является актуальным для экспериментальной и практической бактериологии, для выполнения производственных задач. В настоящее время возрастает востребованность сред, дающих возможность решать конкретные микробиологические задачи; например, увеличивать продукцию определенного метаболита, изменять морфологические и обнаруживать новые фенотипические свойства, подтверждать стабильность типовых или селектированных штаммов [4].

Требования к сырью, предназначенному для производства питательных основ, включают содержание необходимого количества полноценного белка, минимальное содержание жира, высокую биологическую ценность, хорошую растворимость, соответствие ГОСТам, экономическую эффективность применения. Растительное сырье отвечает основным предъявляемым требованиям и обладает необходимыми функциональными свойствами. Белки растений представлены большим числом компонентов с различным аминокислотным составом. От животного сырья состав растительного сырья отличается большей стандартностью, имеющей первостепенное значение для воспроизводимости получаемых в экспериментах результатов. Использование гидролизатов растений исключает риск контаминаций животными патогенами [5,6].

Актуальность работ по изучению возможности применения в качестве питательных основ побочных продуктов и отходов пищевых производств обусловлена и обострением экологических проблем, ставящих перед микробиологической отраслью задачи развития малоотходных технологий, рационального использования, и переработки образующихся отходов.

Таким образом, современные требования к качеству и стандартности микробиологических питательных сред для культивирования возбудителей ООИ с одновременным упрощением и удешевлением производства определяют актуальность проведенных исследований. Начиная с девяностых годов в бывшем Советском Союзе, а с 2001 года в нашей Республике применяется вакцина из штамма 55 ВНИИВВиМ Авторами вакцинного штамма были российские ученые Бакулов И.А Гаврилов В.А. [7,8].

Вакцина отличается своей высокой иммуногенностью и низкой реактогенностью, Авторы изготовили вакцину на жидких питательных средах в больших реакторах ферментерах с автоматизированным режимом. Таких возможностей у биокombината не было. Поэтому, перед учеными и сотрудниками предприятия было поставлена задача разработать технология изготовления вакцины из штамма ВНИИВВиМ выращенной на плотной питательной среде, заключенные в 3-5 литровые бутылки. При этом отработаны все технологические параметры. Предложенная технология под названием «Способ получения вакцины против сибирской язвы животных» Национальным Патентным ведомства зарегистрирована в качестве изобретения.

Иммуногенная активность вакцин зависит от ряда причин, таких как особенности биологии микроорганизмов, влияние физико-химических факторов при инактивации, подбор и

изготовление питательных, защитных сред, адьювантов, адсорбентов, иммуностимуляторов и т. д. [9].

Материалы и методы исследования. Исследование проводили в Алматинском биокомбинате и на кафедре Клинической ветеринарной медицины Казахского национального аграрного университета. Для изготовления вакцины использовали бескапсульный сибиреязвенный вакцинный штамм 55-ВНИИВВиМ, а в качестве контрольного штамма использовали штамм 71/12 и М-71. Для выращивания штамма были использованы обычный мясопептонный агар, мясопептонный бульон, а также питательные среды № 1, 2 и 3. Посевы инкубировали при температуре ($32^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$) в течение 4-5 суток. Концентрацию жизнеспособных спор культур смывых с различных питательных сред определяли путем приготовления последовательных десятикратных разведений.

Результаты и обсуждение. Нами на Алматинском биокомбинате проведены работы по изысканию оптимальной питательной среды для культивирования сибиреязвенного вакцинного штамма. Для изготовления вакцины использовали бескапсульный сибиреязвенный вакцинный штамм 55-ВНИИВВиМ. В качестве - контрольных штаммов использовали штаммы 71/12 и М-71 (штамм второй вакцины Ценковского).

Для выращивания штамма были использованы три варианта питательных сред:

Вариант №1:

Агар-агар-4,2%, бульон Хоттингера 45-50% с аминным азотом 500-600мг/ %, соль х/ч (химически чистая)- 0,3%, деминерализованная вода - 50%, готовая питательная среда имела аминный азот 200 мг/%, рН=7,2-7,4

Вариант №2:

Агар-агар-4,2%, бульон Хоттингера 35-40% с аминным азотом 500-600мг/ %, соль х/ч (химически чистая)-0,3%, Деминерализованная вода - 50%, готовая питательная среда имела аминный азот 155-165 мг/%, рН=7,2-7,4

Вариант №3:

Агар-агар-4,2%, бульон Хоттингера 20-25% с аминным азотом 500-600 мг/%, мясная вода 1:1-40%, соль х/ч (химически чистая)-0,3%, деминерализованная вода - 50%, готовая питательная среда имела аминный азот 119-125 мг/%, рН=7,0-7,2

Работа проводилась в стеклянных бутылках емкостью три и пять литров.

Все варианты питательных сред разливали по 350 см³ в бутылки, стерилизовали, и плотная питательная среда на специальных аппаратах распределялась по внутренней поверхности бутылей.

Бутылки засеивали заранее приготовленной культурой производственного штамма, посевы инкубировали при температуре ($32^{\circ}\text{C} + 1^{\circ}\text{C}$) в течение 4-5 суток. На среде №1 в культуре спорообразование составило 87%, на среде №2-90%, а на среде №3-97%. Культуры смывали с плотных питательных сред буферным раствором с рН=7,2-7,4. Культуры на всех трех питательных средах были типичными, однородными (круглые, приподнятые над поверхностью агара желтовато- белые, матовые) 2-3 мм в диаметре.

При микроскопии в мазках, приготовленных из культуры и окрашенных по Граму - культура была чистая в виде палочек и коротких цепочек, темно-синего цвета, измененные формы отсутствовали.

Концентрацию жизнеспособных спор культуры смывой с различных питательных сред определяли путем приготовления последовательных 10-кратных разведений. Подсчет проводили по истечении 24 часов инкубирования чашек Петри с засеянной на питательную среду культурой.

В 1 куб. см культуры, выращенной на питательных средах, содержалось жизнеспособных спор: в среде №1 - 87%, в среде №2 -90%, в среде №3 -97%.

Проведенные исследования показали, что питательная среда №3 является наиболее оптимальной для культивирования сибиреязвенного вакцинного штамма 55 ВНИИВВиМ. Отсюда для приготовления опытно - промышленной серии вакцины брали бактериальную массу, смывую с питательной среды №3, где получена большая концентрация живых спор.

Чистую типичную однородную бактериальную массу с содержанием спор 97% вносили в реактор-ферментер, где находилось расчетное количество дистиллированного глицерина, марки ПК-94 с рН=7,2-+0,2 с фосфатнобуферным раствором, с таким расчетом, чтобы концентрация живых спор в готовой вакцине была в пределах 20-25 млн. микробных клеток в 1 см³. Концентрация живых спор в бактериальной массе и готовой вакцине определялась с использованием ПАВ «твин-80». Использование этого препарата позволяет равномерно растворить кусочки бактериальной массы и получить однородную суспензию.

Массовая доля глицерина в изготовленной серии была в пределах 30%, концентрация жизнеспособных спор -25 млн. микробных клеток в 1см³. Готовая вакцина была расфасована в 100 см³ в стеклянные флаконы. Иммуногенность вакцины, изготовленной по нашей технологии, проверена на морских свинках и овцах. Результаты опытов показали, что по своим качествам она не уступает вакцине, изготовленной на жидкой питательной среде.

Заключение. Проведенные исследования показали, что наиболее приемлемой средой для культивирования сибиреязвенного вакцинного штамма 55 ВНИИВиМ является питательная среда №3. Данная среда способствовала наибольшему накоплению жизнеспособных спор. Изготовленные опытно -промышленные серии вакцины на основе применения данной среды обладали большей иммуногенной активностью в эксперименте на морских свинках, овцах и соответствовали требованиям технических условий ТУ-640РК00482536-РГП-06-99. Подготовлена нормативно-техническая документация, технические условия, инструкция по изготовлению и контролю и наставления по применению. Вышеназванные документы одобрены департаментом ветеринарного надзора МСХ РК, зарегистрировано и получено регистрационное удостоверение МСХ РК, зарегистрировано и получено регистрационное удостоверение (№1-БВС-я-1-2000). Вакцины изготовленные по предложенной нами технологии, использованы на животноводческих объектах страны. На качества вакцины никаких рекламаций не было.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Шушаев Б.Х. Проблемы борьбы и профилактики сибирской язвы животных в Казахстане // Актуальные вопросы диагностики болезней животных. Исследования и результаты (КазНАУ). -2005. -№ 2. - С.52-57.
2. Овчаренко Н.Д., Кучина Е.А., Лютаева Т.О. Мониторинг инфекционных заболеваний на территории Красногорского района Алтайского края в период с 2011 по 2016 гг. // Сб. матер. XIII междунар. науч.-практ. конф. – Барнаул: РИО Алтайского ГАУ, 2018. - С. 415-417.
3. Тихонова Г.П., Тихонов В.К., Леонтьева И.Л. Анализ эпизоотической ситуации территории Чувашской Республики // / Сб. матер. XIII междунар. науч.-практ. конф. – Барнаул: РИО Алтайского ГАУ, 2018. - С. 434-436.
4. Панкратов Л.Д. Опыт изготовления сухой ассоциированной вакцины против сибирской язвы и инфекционной энтеротоксемии овец // Инфекционные и незаразные болезни сельскохозяйственных животных в Казахстане. – Алматы, 1979.- С. 85-89.
5. Самуйленко А.Я. Перспективы научных исследований в технологии производства ветеринарных биопрепаратов. – М., 1989.- С. 3-8.
6. Ипатенко Н.Г. Опыт внедрения вакцины против сибазирской язвы из штамма 55. - М., 1990. – С.2
8. Колесов С.Г. Методы получения вакцин против сибирской язвы // Научные труды ГНКИ. - 1957. - С.177-179.
9. А.с. 13778. Способ получения вакцины против сибирской язвы животных/ Б.Д. Айтжанов; опубл. 30.09.2002, Бюл. № 3. – 2 с.

ТҮЙІН

Жүргізілген зерттеу жұмыстары арқылы ауылшаруашылық жануарларының топалаңына қарсы қолданылатын 55 ВНИИВВиМ штаммын өсіруге ең ыңғайлысы №3 қоректік орта екені анықталды. Аталған қоректің ортада вакцина әзірлеу үшін қолданылатын негізгі компонент споралардың түзілуі ең жоғарғы деңгейде болады. Топалаң қоздырғышының зардаптылық қасиеті капсулалық формаларына тән келеді. Споралы формасы топалаң қоздырушысының

қорғаныш реакциясы болып табылады. Штаммның споралы формалары қолайсыз ортада дамиды. Сол себепті біз жасанды қоректі ортаға микроорганизмдердің өсіп-өнуі үшін Хоттингер сорпасын әртүрлі пайыздық деңгейде қостық. Хоттингер сорпасының пайыздық деңгейі көп болған жағдайда вакцина штаммның споралары вегетативтік формаға тез ауысып кететіні байқалды. Ал, Хоттингер сорпасының пайыздық мөлшері аз болған жағдайда, микроорганизмдер үшін қолайсыз жағдай туып, оған қорғаныш реакциясы ретінде споралы түрлері көп түзіледі. Ұсынылып отырған қоректің ортада әзірленген вакцинаның тәжірбиелік сериясының иммуногендік қасиеті теңіз тышқандары мен қойларда жүргізілген зерттеулерде жоғары деңгейде болып ТШ-640РК00482536-РГП-06-99 Техникалық шартына сәйкес болды. Әзірленген вакцинаға нормативті құжаттар атап айтқанда, техникалық шарты, вакцинаны дайындау және тағайындау жөнінде нұсқау және қолдану жөніндегі ереже әзірленді. Жоғарыда аталған құжаттар ҚР АШМ тіркеліп, тіркеу жөніндегі куәлік алынды (№1-БВС-я-1-2000). Біз ұсынған технология бойынша жасалған вакциналар еліміздің мал шаруашылығы объектілерінде қолданылған. Вакцина сапасына ешқандай наразылық болған жоқ.

RESUME

Studies have shown that the most suitable culture medium for cultivation of the anthrax vaccine strain 55 VNIIVViM is the nutrient medium №3. This environment contributed to the greatest accumulation of viable spores. The effects of the anthrax pathogen are typical for capsule forms. The spore-like form is a protective reaction of the pathogen. Spore-like forms of strains develop in an unfavorable environment. Therefore, for the growth of microorganisms, Hottinger broth was added to the artificial nutrient medium in different percentages. It has been observed that with a high percentage of Hottinger broth the spores of the vaccine strain quickly turn into a vegetative state. With low percentage of Hottinger broth creates an unfavorable environment for organisms and protective reaction starts in the form of spore formation. Manufactured experimental-industrial series of vaccines based on the use of this medium had greater immunogenic activity in the experiment on Guinea pigs, sheep and met the requirements of technical conditions TU-640RK00482536-RGP-06-99. The following documents were prepared for this vaccine: regulatory and technical documentation, technical conditions, instructions for designation and control, instructions for use. The above documents are registered in the Ministry of agriculture of the Republic of Kazakhstan and a certificate of registration is received (№ 1-BVS-I-1-2000). According to our proposed technology, vaccines were used in the country's livestock facilities. There were no complaints about the quality of the vaccine.

УДК 619: 616. 981. 51

Айтжанов Б.Д., доктор ветеринарных наук, профессор
Кульдеев А.И., кандидат ветеринарных наук, профессор
Сиябеков С.Т., кандидат ветеринарных наук, профессор
Сырым Н.С., кандидат ветеринарных наук, старший преподаватель
НАО «Казахский национальный аграрный университет», г. Алматы, Республики Казахстан

РАЗРАБОТКА ВАКЦИНЫ «АНТРАКСВАКС» ПРОТИВ СИБИРСКОЙ ЯЗВЫ ЖИВОТНЫХ

Аннотация

Известна вакцина против сибирской язвы животных содержащей штамм 55-ВНИИВВиМ. Основные недостатки этой вакцины заключаются в недостаточной защитной силе вакцины при возникновении заболевания

Разработанная противосибирезвенная вакцина «Антраксвакс» отличается высокой иммуногенностью, а также низкой вирулентностью и реактогенностью для прививаемых животных. Выращивание вакцинного штамма на плотной казеиново-дрожжевой среде немного снижает себестоимость изготавливаемого препарата.