

Промышленная технология производства вакцины против сибирской язвы животных

Ахметсадыков Н.Н., Хусаинов Д.М., Казахский Национальный аграрный университет

Разработана технология получения вакцины против сибирской язвы, обогащенной протективным антигеном. Отработана промышленная технология глубинного культивирования вакцинного штамма *Bacillus anthracis* 55-ВНИИВБиМ, позволяющая изготавливать большие объемы спор и сокращать время на изготовление вакцины.

Сибирская язва — зоонозная особо опасная бактериальная инфекционная болезнь с контактным механизмом передачи возбудителя. К сибирской язве восприимчивы все виды сельскохозяйственных животных, а также пушные звери, грызуны и человек. Резервуаром возбудителя инфекции служит почва. Источником возбудителя является зараженный организм, где патогенный микроорганизм способен сохраняться, размножаться, накапливаться и выделяться во внешнюю среду [1, 2, 3, 4].

Вызываемое сибирской язвой заболевание протекает тяжело и скротечно, нередко заканчиваясь летально. По многочисленным данным, летальность при висцеральной (генерализованной) форме заболевания составляет 85—100 % [5, 6].

Несмотря на достигнутые успехи в изучении проблемы сибирской язвы, эта инфекция до сих пор имеет довольно широкое распространение во многих странах мира и на территории стран СНГ. Имеющие место эпизоотические вспышки наносят большой экономический ущерб в результате гибели сельскохозяйственных животных и необходимости проведения широкого комплекса трудоемких мероприятий по ликвидации последствий эпизоотии. В свою очередь, возникновение и распространение сибирской язвы среди животных создает реальную угрозу поражения людей этой инфекцией. При этом заболевание сибирской

язвой продолжает характеризоваться высокой летальностью даже в условиях применения современных лекарственных препаратов, достаточно эффективных при лечении других инфекций.

Возбудитель сибирской язвы *Bacillus anthracis* впервые был обнаружен Ф. Поллендером в 1849 году. К. Давэн и Райе (Франция) в 1850 году выявили нитевидные неподвижные палочки в крови овец, погибших от сибирской язвы. Ф. Брауэль в 1857 году в России нашел палочки в крови умершего человека. Ему удалось экспериментально воспроизвести болезнь у животных. Но лишь К. Давэн в 1863 году окончательно установил, что это — возбудитель сибирской язвы и дал официальную дату открытия бациллы сибирской язвы. Культтуру возбудителя болезни в 1876 году независимо друг от друга удалось получить сначала Р. Коху, а затем Л. Пастеру.

С тех пор ведутся исследования по углубленному изучению сибиреязвенной инфекции и созданию препаратов с более надежной защитой при проведении профилактической вакцинации.

С точки зрения биотехнологии, актуальным является совершенствование технологических приемов производства противосибиреязвенной вакцины.

Материалы и методы

Исследования проводили на кафедре эпизоотологии и организации ветеринарного дела Казахского национального аграрного университета и на базе ТОО Научно-производственного предприятия «Антиген».

Изготовление вакцины против сибирской язвы животных проводили по способу, на который имеется решение о выдаче инновационного патента [8], а также по общепринятому способу.

Для культивирования возбудителя сибирской язвы использовали МПБ и МПА.

Культурально-морфологические свойства штамма *Bacillus anthracis* 55-ВНИИВБиВ: на мясо-пептонном бульоне (МПБ) — характерный рост сибиреязвенных культур с образованием на дне пробирки рыхлого белого осадка. В толще бульона видны в незначительном количестве хлопья растущей культуры или нити, спускающейся ко дну, а на поверхности МПБ образовывается пристеночное кольцо. Бульон остается прозрачным или с небольшой опалесценцией.

На поверхности мясо-пептонного агара (МПА) — рост культуры из штамма *Bacillus anthracis* 55-ВНИИВБиВ в виде серовато-беловатых мелкозернистых колоний с серебристым оттенком R-, в отдельных случаях RO-формы.

При микроскопировании мазков, окрашенных по Граму, видны крупные (3—10 мкм) грамположи-



тельные палочки, которые расположены поодиночке или соединены в цепочки. В небольшом количестве наблюдаются споры, представляющие собой овальные, иногда округлые образования размером $1,2 - 1,5 \times 0,8 - 1,0$ мкм.

В раздавленной или висячей каплях наблюдаются только неподвижные палочки и цепочки, состоящие из палочек.

Споровые культуры сибираезвенных штаммов получали путем выращивания их 18—20-часовых расплодок на МПА (ГОСТ 16280-70) при температуре 37°C в течение 72—96 ч, последующего смыва и доведения до нужной концентрации стерильным физиологическим раствором (ГОСТ 4233-77, ГОСТ 6709-72).

Концентрацию микробных клеток в вегетативных сибираезвенных культурах определяли по оптическому стандарту мутности ГИСК им. Л. А. Тарасевича.

Концентрацию микробных клеток в споровых культурах определяли по методике И. П. Ашмарина и А. А. Воробьева.

Полученные споровые культуры возбудителя сибирской язвы проверяли на отсутствие контаминации посторонней бактериальной и грибковой микрофлорой, типичность морфологических, тинкториальных культуральных свойств (ГОСТ 28085-89).

Для большого накопления бактериальной массы сибираезвенного антигена использовались модифицированные питательные среды. В качестве тестируемых животных для

изучения безвредности иммунизирующих антигенов использовались морские свинки.

Для постоянного использования культуры выращивали на МПА до спорового состояния, смывали с агара физиологическим раствором и хранили в 30% растворе глицерина во флаконах при температуре 2—4°C.

Результаты исследований

Нами были проведены сравнительные исследования по эффективности накопления сибираезвенных спор в среде на основе перевара Хоттингера и разработанной споруляционно-ростовой среде.

Разработанная технология изготовления вакцины против сибирской язвы животных включала культивирование штамма бактерий *Bacillus anthracis* 55 ВНИИВВиМ в жидкой питательной среде до максимального образования спор. Концентрирование полученной культуры — отстаиванием и отделением осадка, при этом использовалась питательная среда, содержащая панкреатический гидролизат казеина, панкреатический гидролизат мяса говядины, дрожжевой экстракт сухой, пептон ферментативный сухой, калий фосфорнокислый двузамещенный, кальций хлористый, магний сернокислый, цинк сернокислый, медь сернокислую, железо сернокислое, аммоний сернокислый, пропионат Б-400, карбоксиметилцеллюлозу, воду деминерализованную (рН 7,0—7,4).

Культивирование осуществляли в реакторе в течение 23—24 часов, причем первые 17 часов — при аэрации с подачей воздуха из расчета 20—40 см³ воздуха на 1 л/литр среды в час, концентрирование осуществляли при температуре 15—20°C в течение 23—25 часов с добавлением 0,2—0,3% карбоксиметилцеллюлозы относительно общего объема споровой массы.

При этом достигалось сокращение времени на концентрирование спорового материала путем использования в качестве вспомогательного вещества натриевой соли карбоксиметилцеллюлозы (Na КМЦ) в оптимальной концентрации 0,2—0,3%. Кроме того, осаждение спор осуществляли непосредственно в реакторе при температуре 15—20°C в течение 23—25 ч.

Для осуществления получения вакцины в реакторе (160 л) приготавливали 100 л споруляционно-ростовой среды по прописи (см. выше). Реактивы растворяли в той же последовательности, в которой они написаны. Устанавливали рН среды 7,2+0,2 добавлением 25% раствора гидроокиси калия или натрия. Среду стерилизовали при 0,7—0,8 атм., 134°C в течение 30 мин. и охлаждали до 30—35°C.

В реактор с питательной средой заливали через пробоотборник посевной материал, споровую суспензию штамма 55-ВНИИВВиМ, в количестве 2—2,5×10¹² жизнеспособных спор, при этом весь посевной материал должен содержаться в объеме 8—10 л.

Устанавливали температуру инкубирования 37°C, в засеянную питательную среду подавали сжатый воздух через барботер, уровень подачи воздуха составлял 20—40 см³ на 1 л среды в 1 ч. Культивирование осуществляли 18 ч. Следующие 6 ч инкубировали без аэрации. Культура вакцинного штамма 55-ВНИИВВиМ, выращенная в этих условиях, состояла из зрелых жизнеспособных спор, количество которых в 1 см³ составляло 450—500 млн.

Далее осуществляли осаждение спор культуры вакцинного сибира-

язвенного штамма 55-ВНИИВВиМ непосредственно в реакторе. Для этого в реактор, содержащий 100 л споровой культуры штамма 55-ВНИИВВиМ с концентрацией спор 450—500 млн/см³, заливали через пробоотборник 10 л 2% раствора Na КМЦ, простилизованного при 121°C в течение 1 ч и охлажденного до 15—20°C. Содержимое реактора перемешивали и оставляли в состоянии покоя на 23—25 ч. По истечении этого времени надосадок осторожно декатировали, а осадок тщательно перемешивали и сливали в отдельный сосуд, например, 20-литровую стеклянную бутыль. Осадок в количестве 10—15 л содержал 9—11 млрд. жизнеспособных спор в 1 см³, легко реуспенсировался и его использовали для изготовления вакцины против сибирской язвы животных. В этих условиях происходило 10—15-кратное концентрирование спорового материала.

Полученную в результате жидкую концентрированную комбинированную вакцину из штамма 55-ВНИИВВиМ разводили буферным раствором до концентрации с содержанием 50 доз в объеме 1 см³, разливали в ампулы и отпаивают без вакуума. Или к концентрированному споровому материалу добавляли глицерин до конечной концентрации 30 %.

Использование предлагаемого способа изготовления вакцины из штамма 55-ВНИИВВиМ, по сравнению с существующим способом, обеспечило следующие преимущества:

- позволило изготовить в реакторе большой объем спор штамма 55-ВНИИВВиМ и концентрировать его, соблюдая условия стерильности;

- сократить время на изготовление спорового материала в 2 раза, а на концентрирование спор — в 5 раз;

- позволило проводить концентрирование спор в широком диапазоне температуры (15—20°C) и получить жидкую концентрированную вакцину.

При изучении свойств полученной вакцины было установлено, что она полностью соответствовала требованиям стандарта, в том числе и по своим защитным свойствам.

Выводы

1. Несмотря на достигнутые успехи в изучении проблемы сибирской язвы, эта инфекция до сих пор имеет довольно широкое распространение.

2. Большую актуальность имеют работы по созданию препаратов с более надежной защитой при проведении профилактической вакцинации при сибирской язве.

3. Отработана технология глубинного культивирования при производстве вакцины против сибирской язвы, позволяющая изготавливать в реакторах большие объемы спор, сократить время на изготовление вакцины.

Литература

1. Коротич А. С., Погребняк Л. И. Сибирская язва // Киев: «Урожай». — 1976. С. 17—18.
2. Бургасов П. Н., Рожков Г. И. Сибиреязвенная инфекция//Москва: «Медицина». — 1984. С. 208.
3. Колесов С. Г. Сибирская язва // Москва: «Колос». — 1976. С. 22.
4. Ипатенко Н. Г., Седов В. А., Зелепухин В. С. Сибирская язва сельскохозяйственных животных // Москва: «Агропромиздат». — 1987. С. 256.
5. Brachman P. S. Anthrax //In: Infectious Disease, Edited by Horprich P. D., New York, Harper and Row. — 1960. P. 577—582.
6. Marandian M. H., Kamali A. Meningite charbonneuse: un cas en apparence primi-tif. // La Nouvelle Presse Medicale. — 1981. V.10. X2 21. P. 1747—1748.
7. Heselson M, Guilemin J., Hugh J. et. al. Office of Technology Assessment. // United States of Congress. — 1993.
8. Предпатент 16379 РК. Способ получения вакцины против сибирской язвы животных // Ахметсадыков Н. Н., Хусаинов Д. М. и др.; опубл. 15.11.2005.

кой язвы животных // Ахметсадыков Н. Н., Хусаинов Д. М. и др.; опубл. 15.11.2005.

Түйін

Топаланға карсы корғаушы вакцина алу технологиясы жасалынды. Спораны мол молшерде дайындауга мүмкіндік беретін және вакцина жасау уақытын қысқартатын *Bacillus anthracis* 55-ВНИИВВиМ вакциналық штаммын терендегітіп өсіретін кәсіптік технологиясын істеп жығардық.

Summary

Designed technology of the reception of the vaccine against anthrax. Will Perfected industrial technology deep cultivation vaccine shtam Bacillus anthracis 55-VNIIVVIM, allowing make the greater amounts a dispute and shorten time for fabrication of the vaccine.

Авторы



Ахметсадыков Н. Н., доктор ветеринарных наук, профессор



Хусаинов Д. М., кандидат ветеринарных наук, доцент