

Актуальность. Листерия является широко распространенной инфекционной болезнью, наносящей значительный ущерб животноводству, и представляет серьезную угрозу здоровью людей. Сложность борьбы с этой инфекцией обусловлена особенностями биологии ее возбудителя, наличием большого числа как патогенных, так и непатогенных штаммов. Основным источником распространения листериоза являются сельскохозяйственные животные овцы, свиньи и крупный рогатый скот. Длительное бактерионосительство среди животных приводит к высокому уровню обсеменения листериями пищевого сырья и продуктов его переработки. Экономический ущерб от листериоза связан с большой летальностью, снижением продуктивности животных, абортными, а также затратами на ветеринарно-санитарные ограничительные мероприятия. Листерия появляется спорадически, реже эпизодически. Летальность при нервных формах может достигать 98 – 100 %, а при септических – 50 %. Листерия животных зарегистрирована в 82 странах мира, Россия входит в их число [1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10]. В настоящее время в РФ используется в основном вакцина сухая живая против листериоза сельскохозяйственных животных из штамма «АУФ» выпускаемая Ставропольской биофабрикой (СТО 00482861-0079-2012). Вакцина предназначена для профилактической иммунизации крупного рогатого скота, овец, свиней и кроликов. Применяется вакцина внутримышечно. В угрожающих пунктах (хозяйствах) вакцину применяют однократно, а в неблагополучных - двукратно с интервалом 10 дней. Коммерческой прививочной дозой считается 7,5 млрд. живых листерий. Иммунитет наступает через 10 - 14 дней и длится до 12 месяцев. Вакцина выпускается во флаконах по 10 мл, упакованных в коробки с указанием количества доз. Аппаратурно-технологическая схема промышленного производства сухой живой вакцины против листериоза представлена на рисунок 1. Получение качественных биопродуктов сопряжено с согласованием всех стадий технологического процесса, которое не всегда отвечает соответствующим требованиям. В частности, в производстве вакцин против листериоза имеются недостатки: питательные среды, используемые для культивирования листерий, не стандартны, не оптимальны по своему составу и имеют высокую стоимость, не оптимизирован процесс культивирования, от которых возможно освободиться, моделируя стадии технологического процесса. [11, 12, 13, 14, 15, 16, 17]. Цель и задачи исследований - оптимизация технологии производства вакцин против листериоза. При этом решались следующие задачи: - оптимизация состава питательной среды для глубинного управляемого процесса культивирования листерий; - оптимизация культивирования листерий; - оптимизация защитной среды высушивания, используемой при изготовлении сухой живой вакцины против листериоза; - промышленное освоение технологии; - испытание вакцины, произведенной по разработанной модели, в хозяйствах. Оптимизация питательных сред. При

исследовании основных технологических процессов промышленного производства сухой живой вакцины против листериоза использовали авирулентные штаммы *Listeria monocitogenis*: АУФ, УСХИ-19 и УСХИ-52, отобран по культурально - морфологическим, биологическим и серологическим характеристикам задепонированные в коллекции ВГНКИ ветпрепаратов. Штаммы используют при создании вакцины против листериоза сельскохозяйственных животных. [18, 19]. В соответствии с «Инструкцией по изготовлению и контролю вакцины сухой живой против листериоза сельскохозяйственных животных» (1988) в условиях производства используют питательную среду на основе перевара Хоттингера, гидролизата казеина или лактоальбумина. Помимо указанных основ в состав сред входят пептон (1,0 - 1,5 %), декстран кислотного автолизата печени крупного рогатого скота (5 - 10 %), натрий фосфорнокислый двузамещенный, калий фосфорнокислый однозамещенный, натрий лимоннокислый трехзамещенный, магний сернокислый, аммоний сернокислый, железо лимоннокислое. Кроме того, перед засевом вакцинного штамма к средам добавляют смесь витаминов В1 и В2. Рис. 1 - Аппаратурно-технологическая схема промышленного производства сухой живой вакцины против листериоза, сальмонеллеза или симбиотического препарата: 1 - реактор-гидролизатор; 2 реактор для хранения осветленного гидролизата; 3 - реактор для приготовления питательной среды; 4 - мембранный фильтр; 5 - реактор для стерилизации питательной среды; 6 - биореактор (ферментер) для культивирования; 7 - ультрацентрифуга; 8 - установка для ультрафильтрации; 9 - ампула с лиофильно высушенным штаммом; 10 - штамм выращенный на скошенном агаре; 11 - штамм выращенный в жидкой питательной среде; 12 - штамм засеянный во флаконы 450мл; 13 - выращивание штамма во флаконах 450 мл на шуттель-аппарате в термостатируемом помещении; 14 - лабораторный ферментер для инокулята; 15 - емкость для смешивания биомассы с защитной средой высушивания; 16 - емкость для приготовления защитной среды высушивания; 17 - установка для фасовки и предварительной укупорки флаконов; 18 - низкотемпературный холодильник; 19 - сублимационная установка; 20 - полуавтоматическая линия укупорки, закатки флаконов, этикетировки; 21 - упаковочная линия в коробки и этикетировки коробок; 22 упаковочная линия в гофротару. Для оптимизации состава питательных сред использовали методы математического планирования эксперимента, в частности план ДФЭ 23-1 [20, 21, 22]. Параметром оптимизации (Y) служило накопление жизнеспособных листерий в культуральной жидкости. В качестве основных факторов по оптимизации питательных сред исследовали следующие компоненты: X1 - концентрация пептона; X2 - концентрация фосфорнокислого двузамещенного натрия; X3 - концентрация дрожжевого экстракта. В таблице 1 представлен план ДФЭ 23-1. Для культивирования листерий использовали следующий состав питательной среды: перевар

Хоттингера, пептон, натрий фосфорнокислый двузамещенный, дрожжевой экстракт (источник витаминов группы В), глюкоза и дистиллированная вода. После реализации экспериментов по ДФЭ и статистической обработки данных получили уравнение (1), связывающее накопление жизнеспособных листерий в культуральной жидкости и концентрацию основных компонентов питательной среды, которое адекватно описывает экспериментальные данные ($F_{рас.} = 3,27$ $F_{теор.} = 5,90$): $Y = 0,68 + 0,7X_1 + 0,1X_2 + 0,5X_3$. (1) Таблица 1 - План ДФЭ в кодированной и натуральной размерностях № п/п Кодированная размерность факторов Натуральная размерность факторов Накопление листерий, Y , млрд/см³

X1	X2	X3	Концентрация пептона, %	Концентрация натрия фосфорнокислого двузамещенного, %	Концентрация дрожжевого экстракта, %	Y
1	+	+	0,7	0,7	0,4	1,0
2	-	+	0,5	0,5	0,4	0,6
3	-	+	0,5	0,7	0,4	0,4
4	+	-	0,7	0,5	0,4	0,7
5	+	+	0,7	0,7	0,4	0,6
6	+	+	0,7	0,7	0,4	0,3
7	+	+	0,7	0,7	0,4	0,3
8	+	+	0,7	0,7	0,4	0,3
9	+	+	0,7	0,7	0,4	0,3
10	+	+	0,7	0,7	0,4	0,3
11	+	+	0,7	0,7	0,4	0,3
12	+	+	0,7	0,7	0,4	0,3
13	+	+	0,7	0,7	0,4	0,3
14	+	+	0,7	0,7	0,4	0,3
15	+	+	0,7	0,7	0,4	0,3
16	+	+	0,7	0,7	0,4	0,3
17	+	+	0,7	0,7	0,4	0,3
18	+	+	0,7	0,7	0,4	0,3
19	+	+	0,7	0,7	0,4	0,3
20	+	+	0,7	0,7	0,4	0,3
21	+	+	0,7	0,7	0,4	0,3
22	+	+	0,7	0,7	0,4	0,3
23	+	+	0,7	0,7	0,4	0,3
24	+	+	0,7	0,7	0,4	0,3
25	+	+	0,7	0,7	0,4	0,3
26	+	+	0,7	0,7	0,4	0,3
27	+	+	0,7	0,7	0,4	0,3
28	+	+	0,7	0,7	0,4	0,3
29	+	+	0,7	0,7	0,4	0,3
30	+	+	0,7	0,7	0,4	0,3
31	+	+	0,7	0,7	0,4	0,3
32	+	+	0,7	0,7	0,4	0,3
33	+	+	0,7	0,7	0,4	0,3
34	+	+	0,7	0,7	0,4	0,3
35	+	+	0,7	0,7	0,4	0,3
36	+	+	0,7	0,7	0,4	0,3
37	+	+	0,7	0,7	0,4	0,3
38	+	+	0,7	0,7	0,4	0,3
39	+	+	0,7	0,7	0,4	0,3
40	+	+	0,7	0,7	0,4	0,3
41	+	+	0,7	0,7	0,4	0,3
42	+	+	0,7	0,7	0,4	0,3
43	+	+	0,7	0,7	0,4	0,3
44	+	+	0,7	0,7	0,4	0,3
45	+	+	0,7	0,7	0,4	0,3
46	+	+	0,7	0,7	0,4	0,3
47	+	+	0,7	0,7	0,4	0,3
48	+	+	0,7	0,7	0,4	0,3
49	+	+	0,7	0,7	0,4	0,3
50	+	+	0,7	0,7	0,4	0,3
51	+	+	0,7	0,7	0,4	0,3
52	+	+	0,7	0,7	0,4	0,3
53	+	+	0,7	0,7	0,4	0,3
54	+	+	0,7	0,7	0,4	0,3
55	+	+	0,7	0,7	0,4	0,3
56	+	+	0,7	0,7	0,4	0,3
57	+	+	0,7	0,7	0,4	0,3
58	+	+	0,7	0,7	0,4	0,3
59	+	+	0,7	0,7	0,4	0,3
60	+	+	0,7	0,7	0,4	0,3
61	+	+	0,7	0,7	0,4	0,3
62	+	+	0,7	0,7	0,4	0,3
63	+	+	0,7	0,7	0,4	0,3
64	+	+	0,7	0,7	0,4	0,3
65	+	+	0,7	0,7	0,4	0,3
66	+	+	0,7	0,7	0,4	0,3
67	+	+	0,7	0,7	0,4	0,3
68	+	+	0,7	0,7	0,4	0,3
69	+	+	0,7	0,7	0,4	0,3
70	+	+	0,7	0,7	0,4	0,3
71	+	+	0,7	0,7	0,4	0,3
72	+	+	0,7	0,7	0,4	0,3
73	+	+	0,7	0,7	0,4	0,3
74	+	+	0,7	0,7	0,4	0,3
75	+	+	0,7	0,7	0,4	0,3
76	+	+	0,7	0,7	0,4	0,3
77	+	+	0,7	0,7	0,4	0,3
78	+	+	0,7	0,7	0,4	0,3
79	+	+	0,7	0,7	0,4	0,3
80	+	+	0,7	0,7	0,4	0,3
81	+	+	0,7	0,7	0,4	0,3
82	+	+	0,7	0,7	0,4	0,3
83	+	+	0,7	0,7	0,4	0,3
84	+	+	0,7	0,7	0,4	0,3
85	+	+	0,7	0,7	0,4	0,3
86	+	+	0,7	0,7	0,4	0,3
87	+	+	0,7	0,7	0,4	0,3
88	+	+	0,7	0,7	0,4	0,3
89	+	+	0,7	0,7	0,4	0,3
90	+	+	0,7	0,7	0,4	0,3
91	+	+	0,7	0,7	0,4	0,3
92	+	+	0,7	0,7	0,4	0,3
93	+	+	0,7	0,7	0,4	0,3
94	+	+	0,7	0,7	0,4	0,3
95	+	+	0,7	0,7	0,4	0,3
96	+	+	0,7	0,7	0,4	0,3
97	+	+	0,7	0,7	0,4	0,3
98	+	+	0,7	0,7	0,4	0,3
99	+	+	0,7	0,7	0,4	0,3
100	+	+	0,7	0,7	0,4	0,3

На основании уравнения (15) с вероятностью $q = 0,9$ можно сделать вывод, что в указанных интервалах варьирования факторов накопление листерий повышается как при увеличении концентрации пептона, так и при повышении концентраций фосфорнокислого двузамещенного натрия и дрожжевого экстракта, потому что X_1 , X_2 и X_3 в уравнении (1) имеют положительные коэффициенты. Для дальнейшего поиска оптимального состава питательной среды использовали метод «крутого» восхождения. По результатам опытов крутого восхождения движение по градиенту эффективно, так как достигнутое в накопление жизнеспособных листерий 1,4 млрд/см³ больше накопления в опыте лучшего результата в матрице ДФЭ (1,0 млрд/см³). По результатам ДФЭ и крутого восхождения принято решение об окончании поиска оптимальных концентраций компонентов питательной среды. Разработанная питательная среда для культивирования листерий на основе перевара Хоттингера, имеет следующий состав, мас, %: - перевар Хоттингера - 20,0; - пептон - 1,0; - натрий фосфорнокислый двузамещенный - 0,8; - дрожжевой экстракт - 0,5; - глюкоза - 0,24 вода дистиллированная до 100. Во всех образцах листерий, полученных на оптимизированной питательной среде, морфология, культуральные и биохимические свойства были типичными для этого штамма, выращенного как во флаконах, так и ферментерах - лабораторных и промышленных. Оптимизация условий культивирования. На первом этапе разработки провели анализ традиционного способа культивирования бактерий, заложенного в инструкцию по изготовлению этого препарата. Культивирование листерий по традиционному способу выращивания в питательной среде на основе перевара Хоттингера согласно инструкции осуществляли в лабораторной установке АНКУМ - 2М при температуре 36,0 - 37,0 °С, pH среды 7,4 - 7,5, без перемешивания и аэрации в течение двух часов после засева. Засевная доза 16-18 часовой культуры листерий составляла 8 - 10 % к объёму питательной среды. Перед засевом в питательную среду добавляли 0,2 % глюкозы в пересчете на сухое вещество в виде 40 % раствора. Затем культивирование проводили в

течение 16 - 18 часов при постоянной аэрации при расходе воздуха 2 - 3 об/об. в минуту. Через 6-, 10-, 14- часов роста определяли pH, концентрацию бактерий в культуральной жидкости и добавляли 0,2 % глюкозы. Динамика основных параметров (pO_2 , pH, eH, температура и концентрация листерий) при культивировании в лабораторной установке АНКУМ - 2М по традиционной технологии представлена на рисунке 2 А. Как показали результаты экспериментов, продолжительность фазы приспособления составила 3,9 часа; лог-фаза - 2,3 часа. Максимальная удельная скорость роста популяции листерий составила 1,24 час⁻¹, а время удвоения - 0,56 часа. Анализ традиционного процесса выращивания листерий позволил сделать заключение о том, что он неуправляем, продолжительность цикла большая (16 часов), а накопление бактериальной массы низко (5,5 млрд/см³), что говорит о необходимости разработки управляемого процесса периодического культивирования листерий по основным параметрам их роста. Исходя из анализа результатов, полученных традиционным способом культивирования, определили факторы, влияющие на накопление жизнеспособных листерий: pH, pO_2 , eH и концентрация глюкозы в питательной среде. После постановки экспериментов по определению оптимальных значений основных параметров выращивания листерий получили следующий алгоритм управляемого культивирования: питательную среду в установке АНКУМ - 2М засеивали 16 - 18 часовой культурой листерий, выращенной в жидкой питательной среде аналогичного состава. Засевная доза составляла 8 - 10 % к объёму питательной среды. Листерии культивировали при 36,5 - 37,5 °С в течение 8 часов. После засева eH снижали до минус 150 - минус 200 мВ путём выдерживания культуры без подачи воздуха на аэрацию и включения мешалки (от 0,5 до 1,5 часов), после чего до конца процесса культивирования с помощью изменения расхода воздуха и скорости вращения мешалки поддерживали pO_2 на уровне 10 - 20 % от насыщения кислородом воздуха. pH культуральной жидкости регулировали 10 % раствором NaOH. Дробную подачу глюкозы осуществляли дозами до концентрации 0,15 - 0,25 % при лимитировании роста листерий глюкозой, характеризующемся резким повышением pO_2 при неизменном расходе воздуха и оборотах мешалки и прекращении снижения pH культуральной жидкости. Динамика основных параметров управляемого культивирования листерий в экспериментальном режиме приведена на рис. 2 Б. Как показали результаты исследований, накопление жизнеспособных листерий составило 11,0 млрд/см³ через 9 часов культивирования. При этом фаза приспособления продолжалась 0,7 часа, а лог-фаза - 4,1 часа. Максимальная удельная скорость роста популяции листерий составила - 0,89 час⁻¹, а время удвоения - 0,78 часа. Разработанный управляемый режим культивирования листерий позволил увеличить максимальное накопление бактерий с 5,5 млрд/см³ до 11,0 млрд/см³ и сократить время культивирования с 16 - 18 часов до 7 - 9 часов. Оптимизация защитной среды высушивания, используемой при

изготовлении сухой живой вакцины против листериоза. Эффективность защитной среды при высушивании бактериальных препаратов зависит не только от состава среды, но и от соотношения концентраций стабилизаторов [23]. Одной из задач исследований была разработка и оптимизация защитной среды высушивания с целью сохранения максимального количества живых микроорганизмов после лиофильного высушивания в процессе хранения. А Б Рис. 2 - Динамика основных параметров культивирования листерий в режиме: А - инструктивном; Б - экспериментальном; pO_2 - парциальное давление растворенного кислорода; pH - концентрация водородных ионов; eH - окислительно - восстановительный потенциал; o/p - оптическая плотность; τ - продолжительность культивирования; $\downarrow$ - подача глюкозы. Параметром оптимизации « U_i » выбрали концентрацию живых микроорганизмов при длительном хранении относительно концентрации листерий после сушки, принятой за 100 % микроорганизмов, где i - месяц хранения. По результатам предварительных исследований выбраны следующие факторы защитной среды для сублимационной сушки листерий: X_1 - концентрация желатина; X_2 - концентрация сахарозы; X_3 - концентрация декстрана; X_4 - вода или калий-фосфатный буфер (КФБ). Для решения поставленной задачи использовали план ПФЭ типа 24. В таблице 2 представлен ПФЭ в кодированной и натуральной размерностях. По результатам экспериментов, представленным в таблице 2, получили уравнения регрессий, которые описывают зависимость выживаемости листерий в вакцине от концентраций компонентов защитной среды после 1, 2, 3 и 10 месяцев хранения. Таблица 2 - План ПФЭ 24 в кодированной и натуральной размерностях № опыта Кодированная размерность факторов Натуральная размерность факторов X_1 X_2 X_3 X_4 Желатин, % Сахароза, % Декстран, % Вода или КФБ

1	-	-	-	-	0,5	5	0	Вода
2	-	+	-	-	0,5	10	0	Вода
3	+	-	-	-	1,5	5	0	Вода
4	+	+	-	-	1,5	10	0	Вода
5	-	-	+	-	0,5	5	3	Вода
6	-	+	+	-	0,5	10	3	Вода
7	+	-	+	-	1,5	5	3	Вода
8	+	+	+	-	1,5	10	3	Вода
9	-	-	-	+	0,5	5	0	КФБ
10	-	+	-	+	0,5	10	0	КФБ
11	+	-	-	+	1,5	5	0	КФБ
12	+	+	-	+	1,5	10	0	КФБ
13	-	-	+	+	0,5	5	3	КФБ
14	-	+	+	+	0,5	10	3	КФБ
15	+	-	+	+	1,5	5	3	КФБ
16	+	+	+	+	1,5	10	3	КФБ

$X_0 i$ 1,0 7,5 1,5 КФБ DX_i 0,5 2,5 1,5 Вода/КФБ После реализации экспериментов по плану ПФЭ и статистической обработке данных получили уравнение регрессии (2 - 5), по которому рассчитывается количество жизнеспособных листерий в вакцине через 10 месяцев хранения.

$$Y_1 = 80,39 + 8,68X_1 - 3,44X_2 + 8,77X_3 + 3,03X_4 + 4,11X_1X_4 + 7,41X_2X_4 - 3,26X_1X_2X_4 - 4,58X_1X_3X_4 \quad (2)$$

$$Y_2 = 80,86 + 3,51X_1 - 7,53X_2 + 5,22X_3 + 7,67X_4 - 6,01X_1X_2 - 3,56X_1X_3 + 6,19X_2X_4 \quad (3)$$

$$Y_3 = 81,59 + 4,91X_1 - 7,01X_2 + 6,58X_3 + 3,96X_4 + 4,91X_2X_4 + 5,02X_1X_2X_3 - 5,08X_1X_2X_3X_4 \quad (4)$$

$$Y_{10} = 74,93 + 2,97X_1 - 11,12X_2 + 9,50X_3 + 6,31X_4 - 3,14X_1X_2 + 2,95X_2X_3 + 6,62X_2X_4 + 4,56X_3X_4 - 6,30X_1X_2X_4 + 2,50X_1X_3X_4 - 3,30X_2X_3X_4 - 10,10X_1X_2X_3X_4 \quad (5)$$

На основании полученных данных с вероятностью $q = 0,9$ можно сделать вывод, что уравнение (2 - 5) адекватно

описывает экспериментальные данные ($F_{рас.} = 1,33$ $F_{теор.} = 2,35$). При «крутом» восхождении улучшить результаты лучшего опыта по накоплению листерий плана ПФЭ не удалось. Процесс оптимизации защитной среды высушивания на этом закончен. На рисунке 3 показана зависимость выживаемости листерий в процессе длительного хранения вакцины (срок наблюдения 10 месяцев). Данные графика представлены в относительных единицах для того, чтобы результаты не зависели от начальной концентрации листерий в вакцине после сублимационной сушки, поэтому начальные координаты (0 – месяц хранения) находятся в одной точке. Рис. 3 - Выживаемость листерий при длительном хранении вакцины, изготовленной с использованием разработанной питательной среды и управляемого культивирования. Наилучшей является среда с концентрацией компонентов: - желатин - 1,5 %; - сахара - 5,0 %; - декстран - 3,0 %; - калий фосфатный буфер - 100 %. Разработанная защитная среда высушивания позволила увеличить жизнеспособность микроорганизмов в вакцине при длительном хранении на 20 – 40 %, по сравнению с традиционной защитной средой высушивания. Промышленное освоение технологии. Разработанная оптимальная технология производства вакцины против листериоза пригодна, как при производстве живой вакцины штамма АУФ, так и для бивалентной вакцины из штаммов УСХИ-19 и УСХИ-52, что было показано при выпуске опытно-промышленных партий вакцины на оборудовании Ставропольской биофабрики. Разработанная питательная среда и управляемый режим культивирования листерий вошли в патент РФ № 2053790 от 10.02.96 г. «Способ изготовления вакцины против листериоза сельскохозяйственных животных». Испытание вакцины, произведенной по разработанной модели, в хозяйствах. На Ставропольской биофабрике, используя разработанную технологию производства сухой живой бивалентной вакцины против листериоза сельскохозяйственных животных, выпущены опытно-промышленные партии препарата, которые прошли успешные испытания в хозяйствах. В хозяйствах Ставропольского края и Ульяновской области ранее неблагополучных по листериозу: ААП «Ярославское», АО «Псебай», ПКЗ «Ставропольское», ООО «Садовое», СПК колхоз им. Войтика, СПХ «Калиновское», СПК колхоз «Колос», ЗАО МТС «Александровское», колхоз «Ирек» была проведена вакцинация овцеголовья в количестве 16034 голов вакциной против листериоза животных. Поствакцинальных осложнений не наблюдалось. Случаев заболевания овец листериозом иммунизированных данной вакциной не наблюдалось. Выводы. Оптимизирована технология производства сухой живой бивалентной вакцины против листериоза сельскохозяйственных животных. Выпущены опытно-промышленные партии препарата, которые прошли успешные испытания в хозяйствах.