

Актуальность. Одним из путей решения задач развития АПК поставленных перед наукой является разработка, производство и применение новых экологически безопасных эффективных препаратов, так как у животных, как и у человека, идет привыкание применявшимся препаратам, что снижает их иммунитет, способных обеспечить нормальное развитие животных, что способствует получения от них качественной продукции. В связи с этим исследования по разработке и обеспечению продовольствием и биологической защиты людей и животных в стране является основной задачей АПК на современном этапе, что делает актуальными научные изыскания, направленные на решение этих проблем. Сальмонеллез молодняка встречается во всех странах мира. Сальмонеллезы имеют большое эпидемиологическое и эпизоотологическое значение, и к настоящему времени науке и практике известны более 150 их представителей, различных по антигенной структуре. Возбудителями у них в основном являются *S. choleraesuis*, *S. enteritidis*, *S. typhimurium*, *S. typhisuis*, значительно реже обнаруживают *S. gleser*, *S. dublin*, *S. voldagsen*. Экономические потери особенно ощутимы в животноводческих хозяйствах с промышленной технологией [1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8]. Для специфической профилактики сальмонеллезов у животных используют инаktivированные формолквасцовые вакцины против сальмонеллеза (паратифа) телят, а также живые вакцины из аттенуированных штаммов (против сальмонеллеза телят, свиней, поросят, овец и др.), зарегистрированные в РФ [2, 3, 4]. Животных вакцинируют против сальмонеллеза: при выявлении клинически больных животных, при наличии абортс сальмонеллезной этиологии; при выявлении сальмонеллоносителей, при постановке молодняка на откорм [9, 10, 11, 12]. Производство вакцины против сальмонеллеза должны удовлетворять требованиям ГОСТ Р 54064 – 2010 «Вакцины против сальмонеллеза животных живые. Общие технические условия». В России изготавливаются следующие вакцины против сальмонеллеза телят: 1. Вакцина формолквасцовая против сальмонеллеза телят – ТУ 46-21-166-75 – Армавирская биофабрика. 2. Вакцина против сальмонеллеза телят из аттенуированного штамма сальмонеллы Дублин-6 СТО 00482861-0048-2008 – Ставропольская биофабрика. 3. Вакцина против молодняка КРС ТУ- 10-19-565-87 – Ставропольская биофабрика. 4. Вакцина против сальмонеллеза телят из аттенуированного штамма сальмонеллы Дублин-6 – ООО НПФ «Диавак» Оболенск. 5. Вакцина против молодняка КРС - ООО НПФ «Диавак» Оболенск. Указанные выше вакцины применяются для профилактики сальмонеллеза телят в неблагополучных хозяйствах. Иммунитет наступает на 10 - 12 день и продолжается 6 месяцев. Следует отметить, что существующая технология изготовления вакцины против сальмонеллеза телят из штамма *Salmonella dublin* № 160 малопродуктивна и неэффективна. Для решения этих проблем необходимо совершенствовании таких процессов, как приготовление питательной среды для культивирования, оптимизация условий

культивировании, разработка защитных сред высушивания и стабилизации препарата в процессе длительного хранения [9, 10, 11, 13, 14, 15, 16]. Целью представленной работы – совершенствование технологии производства сухой живой вакцины против сальмонеллеза телят. Для достижения данной цели решались следующие задачи: - выбор эффективного для производства вакцины штамма *Salmonella*; - разработка состава питательной среды для культивирования сальмонелл с лучшими ростовыми качествами; - оптимизация условий культивирования; - разработка защитных сред высушивания и стабилизации препарата в процессе длительного хранения. Выбор эффективного штамма *Salmonella* для производства вакцины. В России в основном применяют вакцины против сальмонеллеза телят из штаммов, выделенных в полевых условиях или полученных селекционным путем из полевых штаммов научно-исследовательскими институтами РФ. Импортные вакцины для данной болезни не прижились из-за того, что они получены в других полевых условиях. В таблице 1 представлены результаты, показывающие накопление жизнеспособных сальмонелл различных штаммов в питательной среде на основе перевара Хоттингера при культивировании в ферментере АНКУМ- 2М. Из представленных результатов видно, что наиболее эффективное накопление биомассы происходит у сальмонеллы штамм *Salmonella dublin* № 160.

Таблица 1 - Накопление жизнеспособных сальмонелл различных штаммов в питательной среде на основе перевара Хоттингера

штамм	0	0,25	0,08	0,02	0,15	2	0,5	0,25	0,06	0,8	4	1,6	1,55	1,1	1,3	6	2,7	2,75	2,0	1,4	8	3,5	4,77	2,4	1,6	10	3,8	4,8
<i>S. dublin</i> № 160																												
<i>S. choleraesuis</i> штамм 370																												
<i>S. typhi-murium</i>																												
<i>S. abortus ovis</i> -17NS																												

Учитывая это, при совершенствовании технологии производства сухой живой вакцины против сальмонеллеза телят использовали штамм *Salmonella dublin* № 160. Штамм бактерий *Salmonella dublin* получен путем обработки исходного штамма С-96 мутагеном. Штамм депонирован в коллекции ГНИИСК им. Л.А. Тарасевича под N 160 и характеризуется следующими признаками. Культурально - морфологические признаки. Грамотрицательная палочка на плотных средах: МПА, минимальная среда с глюкозой, агар Хоттингера, колонии в S-форме, средних размеров правильной округлой формы с ровными краями через 18 ч роста при 37 °С. На жидкой среде (МПБ) равномерное помутнение через 4 - 6 ч. На полужидком агаре диффузный рост через 18 ч. Физиолого-биохимические признаки. Оптимум температуры роста и pH типичный для сальмонелл. Не образует индол. Продуцирует сероводород, не дезаминирует фенилаланин, декарбоксилирует орнитин и лизин, не декарбоксилирует аргинин. Не утилизирует лактозу, сахарозу, раффинозу, адонит, инозит. Сбраживает с образованием кислоты и газа глюкозу, сорбит, мальтозу. Замедленно (на 24 ч позже родительского штамма) сбраживает рамнозу, маннозу, утилизирует агар на среде Симменса, глицерин на бульоне Штерна.

Ауксотрофность никотиновая кислота, 50 мкг/мл. Серологические свойства. Агглютинируется "0" сыворотками 1, 9, 12; "H" сыворотками gP, P. Отношение к фагу P22 чувствителен, образует ясные бляшки. Остаточная вирулентность для белых мышей массой 12 - 14 г; ЛД₅₀ $3,2 \cdot 10^7$ клеток при внутрибрюшинном введении. Энтеротоксигенная активность отсутствует. Иммуногенность. ЕД₁₀₀ 1022 клеток при внутрибрюшинном введении и ЕД₅₀ 107 клеток при пероральном введении защищают белых мышей массой 12 - 14 г от инфекции, вызванной 10ДС исходного вирулентного штамма. Приживаемость в организме. Присутствует в организме мышей в течение 40 дней. Стабильность. В результате 5 - кратных последовательных пассажей штамма *S. dublin* 160 через организм мышей его вирулентность не повышается. Генетически показано, что мутант *S. dublin* 160 обладает супрессированной мутацией суа (п-АМФ - дефицитностью, восстанавливаемой экзогенным ц-АМФ), которая котрансдуцируется с частотой 2 % совместно с локусом *ilv*. Супрессия выражается в способности замедленно утилизировать рамнозу, цитрат, глицерин, маннозу, которая восстанавливается добавлением экзогенного ц-ГМФ и повышенной чувствительности к экзогенному ц-АМФ [17, 18]. Разработка состава питательной среды. Известны различные питательные среды для культивирования сальмонелл (на основе БХ, ФГМС или аминокислоты) [11, 18]. Предварительно исследованная по оптимизации питательной среды для выращивания сальмонелл показали, что рост сальмонелл в питательной среде на основе перевара Хоттингера выше, чем на других средах. Полученные результаты взяты за основу при оптимизации состава питательной среды для глубинного культивирования сальмонелл. Для оптимизации состава питательной среды использовали методы математического планирования эксперимента, типа ПФЭ 2³. На начальном этапе разработки состава питательной среды для сальмонелл выбрана инструктивная среда для промышленного культивирования сальмонелл на основе перевара Хоттингера. Жидкую питательную среду (математическая модель) на основе перевара Хоттингера, приготовили по следующей прописи, масс. %: - перевар Хоттингера - 20,0; - пептон - 1,0; - натрий фосфорнокислый двузамещенный - 0,8; - хлористый натрий - 0,8; - вода дистиллированная до 100. Критерием оптимизации (Y) служило накопление жизнеспособных сальмонелл в культуральной жидкости. В качестве факторов оптимизации питательной среды приняты следующие [19, 20]: X₁ - концентрация пептона; X₂ - концентрация фосфорнокислого двузамещенного натрия; X₃ - концентрация дрожжевого экстракта. После реализации экспериментов по плану ПФЭ и статистической обработке данных по формулам получили уравнение регрессии (1), связывающее накопление жизнеспособных сальмонелл в культуральной жидкости и концентрацию основных компонентов питательной среды, которое адекватно описывает экспериментальные данные ($F_{рас.} = 3,73$ $F_{теор.} = 4,10$).

$$Y = 27,49 + 3,02X_1 + 2,81X_2 + 4,33X_3 + 0,6X_1X_2 + 0,32X_1X_3 + 1,05X_2X_3 \quad (1)$$
 Факторы X₁,

X2 и X3 в уравнении (1) имеют положительные коэффициенты. На этом основании с вероятностью $q = 0,9$ можно сделать вывод, что в указанных интервалах варьирования факторов накопление сальмонелл повышается как при увеличении концентрации пептона, так и при повышении концентраций натрия фосфорнокислого двузамещенного и концентрации дрожжевого экстракта. Для дальнейшего поиска оптимального состава питательной среды использовали метод «крутого» восхождения. На рисунке 1 представлены данные зависимости накопления сальмонелл от состава компонентов питательной среды по плану ПФЭ и крутого восхождения. По опытам 9 - 11 рисунка 1 видно, что дальнейшее движение по градиенту малоэффективно, так как достигнутое в опытах 9 - 11 накопление жизнеспособных сальмонелл (39,6 - 40,3 млрд/см³) равно или незначительно больше. По результатам ПФЭ и крутого восхождения принято решение об окончании поиска оптимальных концентраций основных компонентов питательной среды для культивирования сальмонелл. Рис. 1 - Зависимость накопления сальмонелл от состава компонентов питательной среды по плану ПФЭ и крутого восхождения

Исследования питательной среды для культивирования сальмонелл по накоплению бактериальной массы и концентрации жизнеспособных клеток показали, что разработанная питательная среда имеет высокие ростовые свойства: накопление жизнеспособных сальмонелл на разработанной питательной среде составило 32,6 - 39,6 млрд/см³ по сравнению с контрольной, в которой накопление сальмонелл - не более 5,2 млрд/см³. Разработанная с помощью математических методов планирования эксперимента питательная среда для культивирования сальмонелл на основе перевара Хоттингера, имеет следующий состав, мас, %: - перевар Хоттингера - 18,0 - 22,0; - пептон - 0,4 - 0,6; - натрий фосфорнокислый двузамещенный - 0,3 - 0,6; - хлористый натрий - 0,7 - 0,9; - дрожжевого экстракта - 3,5 - 5,0; - вода дистиллированная до 100,0. Готовая стерильная питательная среда должна содержать 160 - 180 мг % аминного азота и иметь pH 7,6 - 8,0. Во всех исследованных образцах сальмонелл 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. Культивирование сальмонелл из вакцинного штамма *Salmonella dublin* № 160 проводили в лабораторном ферментере АНКУМ-2М, оснащенном системами автоматического контроля и регулирования основных параметров культивирования (температура, pH, eH, pO₂). Показатели периодического роста микроорганизмов (длительность фаз роста, максимальная удельная скорость роста) определяли графическим методом [10, 21]. По результатам предварительных исследований разработан лабораторный регламент, согласно которого глубинное периодическое культивирование бактерий проводили следующим образом. Предварительно выращивают 18 - 24

часовую матриксную культуру сальмонелл в жидкой питательной среде по составу аналогичному со средой культивирования в промышленных условиях. Затем матриксную культуру сальмонелл засевают в стерильную питательную среду в соотношении 5 - 10 % от ее объема в ферментере и культивируют при $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течение 8 - 10 часов. После засева ферментера окислительно-восстановительный потенциал (еН) культуральной жидкости снижают до $(-140) - (-120)$ мВ путем выдержки культуры без подачи воздуха на аэрацию и выключенной мешалке. Далее до окончания культивирования с помощью изменения расхода воздуха на аэрацию (от 0 до 4,1 л/мин) и числом оборотов мешалки (от 50 до 380 об/мин.) поддерживают парциальное давление растворенного кислорода ($p\text{O}_2$) в культуральной жидкости на уровне $(15 \pm 5) \%$ от насыщения кислородом воздуха. Подачей 10 % раствора NaOH регулируют pH культуральной жидкости на уровне 7,6 - 7,8. Резкое повышение $p\text{O}_2$ (концентрация растворенного кислорода стремится к 100) при неизменных расходе воздуха и оборотах мешалки и прекращение снижения pH культуральной жидкости (pH повышается до 7,9 - 8,0) указывают на лимитирование питательной средой роста сальмонелл по глюкозе. По разработанной технологии культивирования бактерии практически полностью ассимилируют доступную глюкозу от 5 до 10 раз в течение культивирования. Ограничения по глюкозе снимают ее дробной подачей в виде 40 % раствора дозами до концентрации $(0,1 - 0,2) \%$ в питательной среде. Для сравнения проводили культивирование бактерий по ранее принятой технологии. Согласно инструкции культивирование сальмонелл осуществляли также на лабораторной установке АНКУМ - 2М на питательной среде, приготовленной на основе перевара Хоттингера, при температуре $36,0 - 37,0^\circ\text{C}$, pH 7,4 - 7,5, без перемешивания и аэрации в течение двух часов после засева. Засевная доза 16 - 18 часовой культуры сальмонелл 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 18 - 24 часов при постоянной аэрации при расходе воздуха 2 - 3 об./мин. Через 2, 4, 6, 10, 12 часов роста определяли pH, концентрацию бактерий в культуральной жидкости и через 5 часов роста добавляли 0,2 % глюкозы. Разработка защитных сред для высушивания вакцины и стабилизации препарата в процессе длительного хранения. Исследования выживаемости лиофилизированных культур, их зависимость от физико-химических свойств и концентрации ингредиентов защитной среды показало следующее: - присутствие моно- и низкомолекулярных олигосахаров (сахароза, лактоза, глюкоза, сорбитол) является обязательным для создания щадящих условий замораживания - высушивания бактериальных суспензий. Эти вещества эффективны при расходе к массе бактерий от 3 до 15 %; - повышению стабильности препаратов после сушки и в процессе хранения способствуют

природные и синтетические высокомолекулярные соединения - полисахариды (декстран, декстрин, агароза), соли альгиновой кислоты, желатин и поливинилпирролидон. Эти вещества создают защитные барьеры для клеток после высушивания и эффективны при расходе к массе бактерий от 1 - 2 %. При более высоких расходах (исключая полисахариды) они ухудшают условия удаления влаги при высушивании. Тиомочевина и натриевые соли глутаминовой, лимонной и аскорбиновой кислот, легко окисляясь, блокируют свободнорадикальные и аммоно-карбонильные реакции в сухой биомассе (расход этих веществ достаточен от 1 - 3 %). Сильные неорганические редуторы - сульфиты и тиосульфит, нитрит натрия так же отнесены к стабилизаторам для защитных сред. Для решения задачи по оптимизации защитной среды высушивания для сальмонелл использовали план полного факторного эксперимента ПФЭ типа 24. Критерием оптимизации «У_i» для нахождения оптимальной ЗС в процессе сублимационного высушивания выбрали концентрацию живых микроорганизмов до сушки относительно концентрации сальмонелл после сушки. По данным предварительных опытов выбраны следующие факторы защитной среды для сублимационной сушки сальмонелл: X₁ - концентрация желатина; X₂ концентрация сахарозы; X₃ - концентрация тиомочевины; X₄ - вода или калий-фосфатный буфер (КФБ). После реализации экспериментов по плану ПФЭ и статистической обработки данных, по формулам, получили уравнения регрессии (2), показывающие зависимость сохраняемости сальмонелл от концентрации основных компонентов защитной среды в процессе сушки.
$$Y = 66,87 + 7,16X_1 + 9,47X_2 + 7,69X_3 - 4,07X_4 + 5,89X_1X_2 - 5,37X_1X_4 - 2,81X_2X_3 - 2,01X_2X_4 - 3,66X_3X_4 - 5,07X_1X_2X_3 + 4,24X_1X_2X_4 - 2,74X_1X_3X_4 - 5,86X_2X_3X_4 \quad (2)$$
 Уравнения регрессии (2) описывают выживаемость жизнеспособных сальмонелл при их сушке. На основании полученных данных с вероятностью q = 0,9 можно сделать вывод, что уравнения (2) адекватно описывают экспериментальные данные (F_{рас.} = 2,11 F_{теор.} = 2,18). Это означает, что в указанных интервалах варьирования выживаемость сальмонелл при сушке зависит от концентрации основных компонентов ЗС: X₁ - концентрация желатина; X₂ - концентрация сахарозы; X₃ - концентрация тиомочевины; X₄ - дистиллированная вода. При этом, выживаемость сальмонелл повышается при увеличении концентрации желатина, сахарозы и тиомочевины, а также при использовании в качестве растворителя воды вместо КФБ, так как X₁, X₂ и X₃ в уравнение (2) имеют положительные коэффициенты. При использовании в качестве растворителя КФБ, вместо воды, выживаемость сальмонелл уменьшается, потому что X₄ в уравнении имеет знак «-». При разработке технологии препарата выбрана сахарозо-желатиновая защитная среда, состав которой оптимизирован выше представленным математическим методом планирования эксперимента. Концентрация основных компонентов в дистиллированной воде составила: желатин - 0,6 %; сахароза - 12,0 %; тиомочевина - 0,6 %. Сахарозо - желатиновая

защитная среда смешивается с концентрированной на центрифугах биомассой бактерий в соотношении 1 : 0,5 от объема культуральной жидкости поступившего на центрифугирование. Получение сухой живой вакцины. После тщательного перемешивания бактериальную суспензию расфасовывают с соблюдением условий асептики в стерильные флаконы по 2 мл в 20 см³. Нативный материал замораживают в холодильной установке типа NZ – 280/75. При достижении в материале температуры - 52 °С его выдерживают в течение четырех часов и затем проводят сублимацию. Замороженный материал перегружают в сублиматор типа ТГ-50.5. Непосредственно этап сублимации проводят при температуре материала в диапазоне от - 36 до - 30 °С в течение 12 час. Этап досушивания проводят при температуре материала +(26 ± 1) °С в течение 5 часов. По окончании сублимационного высушивания камеру сублиматора заполняют стерильным, сухим воздухом. Флаконы закрывают пробками типа АБ, накрывают алюминиевыми колпачками и закатывают [15].

Контроль качества сухой живой вакцины. Образцы сухой живой вакцины против сальмонеллеза испытывали на безвредность и иммуногенность на морских свинках и кроликах. Вакцина не вызывала гибель животных и некротические процессы на месте введения её в течение 10 суток наблюдения. Обсуждение результатов. Культивирование культивирования *S. dublin* шт. № 160 на оптимизированной по составу питательной среде и по оптимизированным параметрам, показало перспективность разработанной технологии накопления сальмонелл (таблица 2). При производстве вакцин важными технологическими и экономическими факторами являются накопление жизнеспособных бактерий и продолжительность культивирования. Повышение выхода биомассы сальмонелл и сокращение продолжительности культивирования позволяет сократить продолжительность цикла работы оборудования для получения единицы вакцины, увеличить число циклов работы оборудования при производстве вакцины, снизить трудовые и энергетические затраты на производство единицы продукции. Биологические свойства и морфология выращенных сальмонелл при глубинном культивировании, как для индуктивного, так и для экспериментального режима культивирования были типичными для *S. dublin*. Разработанная защитная среда высушивания позволяет сохранять жизнеспособность *S. dublin* шт. № 160 и получать высококачественную вакцину.

Таблица 2 - Сравнение технологий культивирования *S. dublin* шт. № 160

Технология получения вакцины	Параметры технологического процесса
По принятой инструкции	По разработанной технологии
Продолжительность культивирования, ч	18 - 24
8 - 10	Продолжительность фазы приспособления, ч
0,5	0,45
Продолжительность логарифмической фазы, ч	1,4
3,8	Максимальная удельная скорость роста, ч ⁻¹
0,65	0,63
Накопление сальмонелл, млрд/см ³	3,5 - 5,6
40 - 60	Разработанный управляемый режим культивирования сальмонелл

защищен патентом [22]. Усовершенствованная технология производства сухой

живой вакцины против сальмонеллеза телят прошла успешную апробацию в экспериментальной лаборатории опытно-промышленного культивирования ГНУ ВНИТИБП РАСХН и Ставропольской биофабрики. Выводы Оптимизированы питательная среда и параметры периодического глубинного культивирования штамма *Salmonella dublin* № 160, способствующие накоплению микробных клеток в культуральной среде. Разработана защитная среда для высушивания биомассы сальмонелл. Результаты исследований использованы при разработке технологии производства сухой живой вакцины против сальмонеллеза телят.