

ОПТИМИЗАЦИЯ ЗАЩИТНОЙ СРЕДЫ ВЫСУШИВАНИЯ ИСПОЛЬЗУЕМОЙ ПРИ ИЗГОТОВЛЕНИИ ЖИВОЙ СУХОЙ ВАКЦИНЫ ПРОТИВ ЛИСТЕРИОЗА СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ ЖИВОТНЫХ

©2011 И.В. Павленко, А.А. Раевский, А.А. Нежута, А.Я. Дадасян

ГНУ «Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт биологической промышленности Россельхозакадемии», г. Щёлково

Поступила 13.07.2011

Оптимизированная защитная среда высушивания повысила стабильность жизнеспособных микроорганизмов в вакцине в процессе длительного хранения.

Ключевые слова: вакцина, листериоз, защитная среда, математическая модель.

Листериоз 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. Экономический ущерб от листериоза связан с большой летальностью, снижением продуктивности животных, абортными, а также затратами на ветеринарно-санитарные ограничительные мероприятия. Листериоз животных зарегистрирован в 82 странах, Россия входит в их число.

Промышленное производство биопрепаратов представляет собой сложный комплекс взаимосвязанных технологических процессов. При производстве биопрепаратов можно выделить следующие технологические процессы: очистка и стерилизация газов, приготовление посевного материала, приготовление питательных сред, культивирование микроорганизмов, концентрирование и ресуспендирование бактериальной массы, инактивация микробной массы, стандартизация вакцины, расфасовка вакцины, лиофильное высушивание биопрепаратов, укупорка и закатка флаконов или запайка ампул, этикетировка и упаковка готовой продукции.

Сублимационное высушивание является конечной стадией производства сухих биопрепаратов, при этом важное значение отводится защитным средам, которые влияют не только на процесс высушивания бактериальной массы, но и на сохранность её свойств, особенно при длительном хранении. Поэтому, разработка оптимальных защитных сред, которые могут обеспечить высокую эффективность биологических препаратов по окончании сублимационной сушки и при последующем хранении, является насущной проблемой.

Особое значение для ветеринарной практики имеет высушивание живых микробных вакцин, позволяющее длительно сохранять иммуногенные свойства этих препаратов.

В качестве защитной среды высушивания применяются среды с различными компонентами. Широкое применение в биологической промышленности нашли сахарозо-желатиновые защитные среды.

Эффективность защитной среды при высушивании противобактериальных препаратов зависит не только от состава среды, но и от соотношения концентраций стабилизаторов. Если раньше подбор защитной среды являлся полностью эмпирическим, то в настоящее время для подобных целей широко используют математические методы планирования эксперимента. Обычно к исследованию принимают не более 4-5 факторов. Если необходимо исследовать большее число разнородных факторов, то проводят 2 или более экспериментов, группируя для каждого из них по возможности однородные факторы.

В связи с вышеизложенным, весьма актуальной задачей при производстве вакцин против листериоза сельскохозяйственных животных является оптимизация защитных сред высушивания.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Исследования проводились в отделе противобактериальных препаратов ВНИТИБП. Для работы использовались вакцинные штаммы листерий. Культивирования листерий проводились в лабораторных ферментерах АНКУМ-2М, оснащенных системами контроля и регулирования основных параметров выращивания – температура, pH, окислительно-восстановительный потенциал (eH), парциальное давление растворенного кислорода (pO₂).

Образцы культуры исследовали в динамике роста по следующим показателям: морфология, оптическая плотность, концентрация жизнеспособных клеток, культурально-биохимические свойства бактерий, а также определяли длительность фаз роста, максимальную удельную скорость роста листерий и время генерации.

Морфологию культуры листерий анализировали путем микроскопирования мазков, окрашенных по Граму. Культуральные свойства определяли путем высева культуры на мясопептонный агар (МПА) и мясопептонный бульон (МПБ). Жизнеспособность

Павленко И.В., канд. биол. наук; *Раевский А.А.*, канд. биол. наук; *Нежута А.А.*, докт. биол. наук; *Дадасян А.Я.*, докт. техн. наук, e-mail: vnitibp@mail.ru

листерий определяли методом последовательного титрования на чашках Петри с МПА.

Для определения длительности фаз роста листерий, максимальной удельной скорости, минимального времени удвоения (генерации) использовали графический метод.

Концентрирование бакмассы листерий осуществляли с помощью лабораторных центрифуг К-70Д и S-60, суперцентрифуги СГО-100. Замораживание вакцины производили в холодильных установках ЛСП-28, а потом высушивали в предварительно подготовленном сублиматоре ТГ-50.

Для оптимизации защитной среды высушивания использовали план полного факторного эксперимента (ПФЭ) типа²⁴.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Изучение влияния концентраций компонентов защитной среды высушивания проводилось на вакцине изготовленной из биомассы, полученной по

управляемому режиму культивирования и питательной среде на основе перевара Хоттингера.

Согласно плану ПФЭ критерием оптимизации «У_i» выбрали концентрацию живых микроорганизмов при длительном хранении относительно концентрации листерий после сушки, принятой за 100 %, где i - месяц хранения.

Критерий оптимизации выбрали в относительных единицах для того, чтобы результаты не зависели от начальной концентрации листерий в вакцине после сублимационной сушки.

По литературным данным и результатам предварительных опытов выбрали следующие факторы защитной среды для сублимационной сушки листерий: X₁ - концентрация желатина; X₂ - концентрация сахарозы; X₃ - концентрация декстрана; X₄ - вода или калий-фосфатный буфер (КФБ).

В таблице 1 представлен план ПФЭ²⁴ в кодированной и натуральной размерностях.

Таблица 1. План ПФЭ в кодированной и натуральной размерностях

№ опы-та	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
0 _i					1,0	7,5	1,5	КФБ
ΔX _i					0,5	2,5	1,5	Вода/КФБ

Выбор координат центра эксперимента X_{0i} и интервалов варьирования ΔX_i во многом определяет эффективность эксперимента. Координаты центра эксперимента должны соответствовать наилучшим из всех рекомендованных ранее условий протекания исследуемого процесса.

Результаты экспериментов при использовании плана ПФЭ в абсолютных и относительных единицах для каждого срока хранения представлены в таблице 1.

После реализации экспериментов по плану ПФЭ и статистической обработки данных получили уравнения регрессии (1-4), показывающие зависимость сохраняемости листерий от концентрации основных компонентов защитной среды после 1, 2, 3, 10 мес хранения.

По формулам рассчитывали для указанных сроков хранения построчные оценки дисперсии, дис-

персию воспроизводимости единичного результата, дисперсию воспроизводимости среднего результата в каждой строке, дисперсию среднего для каждого коэффициента регрессии и доверительную ошибку коэффициентов. Если |b_i| > ε (b_i), то оценка коэффициента b_i значительно отличалась от нуля. В противном случае оценку коэффициента считали значимо не отличающейся от нуля, и ее приравнивали к нулю.

Удаляем незначимые коэффициенты уравнений. Уравнения регрессий принимают вид:

$$Y_1 = 80.39 + 8.68 X_1 - 3.44 X_2 + 8.77 X_3 + 3.03 X_4 + 4.11 X_1 X_4 + 7.41 X_2 X_4 - 3.26 X_1 X_2 X_4 - 4.58 X_1 X_3 X_4 \quad (1)$$

$$\begin{aligned}
 Y_2 &= 80.86 + 3.51X_1 - 7.53X_2 + 5.22X_3 + 7.67X_4 - 6.01X_1X_2 - 3.56X_1X_3 + 6.19X_2X_4 \\
 Y_{10} &= 74.93 + 2.97X_1 - 11.21X_2 + 9.50X_3 + 6.31X_4 - 3.14X_1X_2 + 2.95X_2X_3 + 6.62X_2X_4 + 4.56X_3X_4 + 6.30X_1X_2X_4 + 2.5X_1X_3X_4 - 3.30X_2X_3X_4 - 10.10X_1X_2X_3X_4 \\
 Y_3 &= 81.59 + 2.97X_1 - 7.01X_2 + 6.58X_3 + 3.96X_4 + 4.91X_2X_4 + 5.02X_1X_2X_3 - 5.08X_1X_2X_3X_4
 \end{aligned}$$

Таблица 2. Результаты эксперимента в абсолютных и относительных единицах

№ опыта	Концентрация ж/с листерий после сушки, млрд/см ³	Концентрация ж/с листерий в сухой вакцине по срокам хранения, млрд/см ³ / %.			
		1 мес	2 мес	3 мес	10 мес
1	9,35	7,50 / 80,21	7,00 / 74,87	6,17 / 65,95	8,50 / 90,91
2	14,47	8,17 / 56,44	7,00 / 48,38	10,20 / 70,49	2,90 / 20,04
3	16,03	12,33 / 76,94	15,50 / 96,69	15,67 / 97,73	13,53 / 84,43
4	<u>16,38</u>	<u>8,67 / 52,91</u>	<u>9,80 / 59,83</u>	<u>8,75 / 53,42</u>	<u>9,72 / 59,32</u>
5	9,22	8,83 / 95,81	7,03 / 76,28	8,83 / 95,81	7,15 / 77,55
6	11,65	6,83 / 58,66	8,17 / 70,10	6,07 / 52,07	7,55 / 64,81
7	8,86	8,67 / 99,85	8,67 / 99,85	8,57 / 98,69	8,03 / 92,55
8	13,43	13,17 / 98,04	8,00 / 59,57	11,67 / 86,67	7,97 / 59,32
9	9,37	5,17 / 55,14	6,17 / 65,81	7,50 / 80,04	4,82 / 51,41
10	19,48	13,0 / 66,74	16,60 / 85,22	14,50 / 74,44	16,72 / 85,81
11	18,87	16,67 / 88,32	18,00 / 95,39	16,67 / 88,34	17,22 / 91,24
12	15,07	14,50 / 96,22	11,90 / 78,96	10,50 / 69,67	6,07 / 40,26
13	12,18	9,00 / 73,89	12,00 / 98,52	10,0 / 82,10	12,17 / 99,89
14	14,22	12,33 / 86,73	14,17 / 99,62	13,17 / 92,59	12,12 / 85,21
15	<u>12,78</u>	<u>12,83 / 100,43</u>	<u>12,75 / 99,77</u>	<u>12,80 / 100,16</u>	<u>12,83 / 100,42</u>
16	9,18	9,17 / 99,85	7,80 / 84,97	8,92 / 97,13	8,78 / 95,68

Прим.: в опыте № 4 использована традиционная защитная среда высушивания; № 15 – защитная среда, показавшая наилучший результат

Таблица 3. Исходные данные и результаты опытов по определению зависимости сохраняемости листерий от концентрации компонентов защитной среды

Наименование	Факторы			Сохраняемость, (%)	
	X ₁ , %	X ₂ , %	X ₃ , %		
Нулевой уровень X ₁₀	1,0	7,5	1,5		
Верхний уровень	1,5	10,0	3,0		
Нижний уровень	0,5	5,0	0,0		
Интервал варьирования ΔX _i	0,5	2,5	1,5		
Коэффициенты B _i	Расчет				
	4,91	- 7,01	6,58		
Произведение B _i X _i	2,46	- 17,53	9,87		
Шаг при изменении базового фактора X ₂ на 1	0,14	- 1	0,57		
Округление шага варьирования	0,1	- 1	0,6	$\hat{Y}_{рас.}$	\bar{y}
Опыты	Крутое восхождение				
17	1,1	6,5	2,1	88,03	86,07
18	1,2	5,5	2,7	96,15	93,14
19	1,3	4,5	3,3	100,86	<u>98,06</u>
20	1,4	3,5	3,9	107,27	87,34

Уравнения регрессии (1-4) описывают сохраняемость листерий в вакцине через 1, 2, 3, 10 мес хранения, соответственно.

На основании полученных данных с вероятностью q=0,9 можно сделать вывод, что уравнения (1-

4) адекватно описывают экспериментальные данные ($F_{рас.} = 1,33 < F_{теор.} = 2,35$).

Это значит, что в указанных интервалах варьирования выживаемость листерий в процессе хране-

ния зависит от концентрации основных компонентов защитной среды в течение каждого месяца хранения: X_1 - концентрация желатина; X_2 - концентрация сахарозы; X_3 - концентрация декстрана; X_4 - КФБ. Выживаемость листерий повышается как при увеличении концентрации желатина, так и при увеличении концентрации декстрана, и при использовании в качестве растворителя КФБ вместо воды, так как X_1 , X_3 и X_4 в уравнениях (1-4) имеют положительные коэффициенты. При увеличении концентрации сахарозы выживаемость листерий уменьшается, потому что X_2 в уравнении имеет знак «-».

В уравнениях (1-4) наряду с линейными значимыми являются эффекты межфакторного взаимодействия. Это означает, что опыты ПФЭ были поставлены в области факторного пространства с высокой кривизной поверхности отклика, т.е. вблизи оптимума. Несмотря на это, было решено попытаться улучшить значение параметров оптимизации, воспользовавшись методом «крутого» восхождения.

Для поиска области оптимума провели несколько серий экспериментов. В таблице 3 представлены исходные данные и результаты опытов. Каждое среднее значение \bar{Y} получено из 6 повторностей, которые были переведены в относительные единицы.

Проведенные исследования подтвердили предположение о том, что план ПФЭ находится в оптимальной области, так как после проведения экспериментов и «мысленных» опытов получили достаточно высокие значения параметра оптимизации. При «крутом» восхождении улучшить результаты опыта № 15 таблиц 1, 2 по сохраняемости листерий не удалось, хотя движение по градиенту эффективно (опыт 17-20 табл. 3).

Окончанием эксперимента по оптимизации состава защитной среды можем считать лучший опыт плана ПФЭ 2⁴ (№ 15, табл. 1, 2).

Процесс оптимизации защитной среды высушивания на этом закончен. Наилучшей является среда, в которой концентрация основных компонентов имеет следующие значения: желатин – 1,5%; саха-

роза – 5,0%; декстран – 3,0%. В качестве растворителя лучшие результаты получены с калийфосфатным буфером. Разработанная защитная среда высушивания позволила увеличить сохраняемость жизнеспособных микроорганизмов в вакцине при длительном хранении после сушки на 20-40%, чем при использовании защитной среды, которая использовалась в промышленности.

По результату лучшего опыта эксперимента изготовлена опытно-промышленная серия вакцины, которая испытана в хозяйствах. Случаев заболевания животных листериозом при иммунизации их экспериментальной вакциной не зарегистрировано.

По результатам плана ПФЭ были определены оптимальные концентрации компонентов защитной среды высушивания для изготовления сухой живой вакцины против листериоза.

Разработанная оптимальная защитная среда высушивания увеличивает сохраняемость жизнеспособных микроорганизмов в вакцине в процессе хранения на 20% больше по сравнению с промышленной.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бакулов И.А. Основные вехи истории изучения листериоза животных и людей // Листериоз на рубеже тысячелетий: Материалы междунар. симп. Покров, 1999. С. 43-47.
2. Бирюков В.В., Кантере В.М. Оптимизация периодических процессов микробиологического синтеза. М.: Наука, 1985. 293 с.
3. Грачев Ю.П. Математические методы планирования экспериментов. М.: Пищевая промышленность, 1979. 200 с.
4. Кантере В.М. Теоретические основы технологии микробиологических производств. М.: Агропромиздат, 1991. 272 с.
5. Нежута А.А., Токарик Э.Ф., Самуйленко А.Я. и др. Теоретические и практические основы технологии сублимационного высушивания биопрепаратов. Курск: Изд. Курской ГСХА, 2002. 240 с.
6. Самуйленко А.Я., Рубан Е.А. Основы биотехнологии производства биологических препаратов. (Теоретические основы, оборудование, технологические линии). М., 2000. 782 с.

OPTIMIZATION OF PROTECTIVE ENVIRONMENT USED IN THE MANUFACTURE OF QUICK DRYING DRY VACCINE AGAINST LISTERIOZA OF AGRICULTURAL ANIMALS

©2011 I.V. Pavlenko, A.A. Raevsky, A.A. Nezhuta, A.Ya. Dadasan

All-Russian Research and Technological Institute of Biological Sciences Industry of RAAS, Shchelkovo

Optimized protection environment drying increased stability of viable micro-organisms in vaccine during prolonged storage.

Key words: *Listeria vaccine, protective environment mathematical model.*