

СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИЗГОТОВЛЕНИЯ ПОЛИВАЛЕНТНОЙ ВАКЦИНЫ ПРОТИВ КЛОСТРИДИОЗОВ ЖИВОТНЫХ

¹Пулотов Ф.Х., ¹Девришов Д.А., ²Исмаев И.А.

¹Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии – МВА имени К.И. Скрябина, Москва, Российская Федерация; ²Институт проблем биологической безопасности (ТАСХН), Душанбе, Республика Таджикистан

Широкое применение в борьбе с клостридиозами нашли поливалентные вакцины, для изготовления которых необходимы достаточное количество бактериальной массы и токсина клостридий. Для получения значительного количества токсина и бактериальной массы целесообразно использовать питательные среды, адаптированные для глубинного культивирования в промышленных условиях. Целью данной работы было разработать рецептурный состав питательных сред и усовершенствовать промышленную технологию производства поливалентной вакцины против клостридиозов животных. Исследование включало в себя изготовление экспериментальной серии вакцины, подбор оптимального соотношения компонентов и эффективной дозы штаммов. Проводили цепочечное культивирование вакцинных штаммов клостридий во флаконах, бутылках и биореакторах на новой питательной среде на основе ливерного экстракта и казеин-пептона (г/л): ливерный экстракт – 10; казеин-пептона – 22,5; K_2HPO_4 – 2,3; KH_2PO_4 – 1,7; $MgSO_4$ – 0,6. Метод культивирования на новой питательной среде позволил получить наиболее высокий выход бактериальной массы и токсинообразования с концентрацией микробных культур в среднем $9,8-11,0 \times 10^9$ кл./см³. В опытах на лабораторных животных установлено, что экспериментальная серия поливалентной вакцины против клостридиозов животных является безвредной, ареактогенной, обеспечивает выработку гуморального иммунитета с выраженным антитоксическим действием против всех штаммов клостридий, входящих в состав препарата. Предложенное усовершенствование внесено в регламент производства поливалентной вакцины против клостридиозов животных в ООО «Агровет».

Ключевые слова: клостридиозы животных, поливалентная вакцина, культуральная среда, иммуногенность, безвредность

Проблемы биологии продуктивных животных, 2020, 1: 34-43

Введение

Клостридии широко распространены в окружающей среде и являются возбудителями различных инфекционных заболеваний человека и животных. В данный момент известно более 200 видов клостридий, но лишь некоторые из них обладают токсигенностью и патогенностью. Причем отдельные виды самостоятельно не могут вызывать заболевания, но в ассоциации с другими анаэробными бактериями осложняют инфекцию. К патогенным видам относится *C. botulinum*, *C. perfringens*, *C. chauvoei*, *C. septicum*, *C. fallax*, *C. haemolyticum*, *C. sordelli*, *C. sporogenes*, *C. tetani*, *C. histolyticum*, *C. novyi*, которые вызывают такие заболевания как ботулизм, бродячий, эмфизематозный карбункул, анаэробная энтеротоксемия, столбняк, газовая гангрена, некротический гепатит и другие (Uzal, 2009; Songer, 2010; Sunita et al., 2013; Капустин, 2019).

Клостридиозами болеют все виды животных, что является одной из причин снижения рентабельности производства (Rood, 1991; Manteca, 2004; Berghaus, 2005; Редкозубова, 2016). В зависимости от патогенного действия клостридий, они могут оказывать механическое повреждение и токсический эффект. Некоторые возбудители продуцируют высокоактивные токсины, которые приводят к поражению нервной системы, а также к некрозу тканей. Механическое действие оказывает небольшое число возбудителей, редко и незначительно.

Возбудители клостридиозов вызывает болезнь, с острым или сверхострым течением, при этом лечение животных не всегда эффективно. Вакцинопрофилактика является основным способом предотвращения клостридиозов животных (Скляр, 2016).

Эффективность вакцин зависит от многих факторов, включая количество и качества антигена, иммуностимуляторов, адьюванта, консервантов, технологию изготовления и схему применения. Также важную роль играет иммунный статус организма животного.

Изготовление бактериальных препаратов для специфической профилактики клостридиозов животных основываются на культивировании микроорганизмов. На стадии культивирования микроорганизмов, накапливаются антигены, от которых зависит иммуногенность и эффективность препаратов. Глубинное культивирование осуществляют, как правило, в реакторах большой ёмкости.

Для культивирования микроорганизмов в промышленных условиях применяют реакторы усовершенствованных конструкций, которые снабжены термостатирующими приспособлениями, воздушными фильтрами, механическими мешалками, сифонами, системой трубопроводов которые обеспечивают стерильность, подачу воды и пара (Гринь, 2008).

Качество питательных сред также относится к числу основных факторов при культивировании бактерий, которые обуславливают эффективность производства биопрепарата (Панова, 2006). В производственных условиях при промышленном культивировании вакцинных штаммов клостридий часто специалисты сталкиваются с проблемами накопления бактериальной массы и токсинообразования микробных культур. Одним из основных факторов повышения концентрации бактериальной массы при глубинном культивировании является состав и соотношение компонентов в питательной среде (Горелов, 1994).

При вакцинации против клостридиозов животных, необходимым условием является обоснование дозы компонентов, уровня интенсивности иммунитета и его длительности после проведения вакцинации и ревакцинации (Махмудов, 2016; Капустин, 2019). Поскольку разные виды клостридий являются возбудителями принципиально различных болезней, наилучший профилактический эффект даёт использование ассоциированных и поливалентных вакцин (David, 2013; Скляр и др., 2017).

Несмотря на проведенные исследования и определённые успехи в изучении природы данных заболеваний, разработке специфической профилактики и ветеринарно-санитарных мероприятий, клостридиозы животных продолжают наносить значительный ущерб животноводству и имеют большое социальное значение (Горелов, 1994; Грязнова, 1999; Kapustin et al., 2017). Проблема клостридиозов сельскохозяйственных животных до настоящего времени остается актуальной и имеет научную и практическую значимость.

Целью данного исследования было совершенствование технологии изготовления поливалентной вакцины против клостридиозов животных на основе разработки питательной среды, изготовления экспериментальной серии вакцины, подбора оптимального соотношения компонентов и эффективной дозы штаммов.

Материал и методы

Исследование было проведено на базе биотехнологического комплекса ООО «АГРОВЕТ» и на кафедре иммунологии и биотехнологии Московской государственной академии ветеринарной медицины и биотехнологии – МВА имени К.И. Скрябина». В работе использовали производственные и контрольные штаммы из коллекции ООО «АГРОВЕТ», *C. perfringens* тип А – №28, *C. perfringens* тип В – №1, *C. perfringens* тип С – №3, *C. perfringens* тип D – №91, *C. novyi* тип В (*oedematiens*) – №34, *C. septicum* – №1098, *C. tetani* – Kolle – №8 и *C. chauvoei* R₁₅. Разработана питательной среды на основе ливерного экстракта (Венгрия) и казеин-пептона (Италия), (г/л): ливерный экстракт – 10; казеин-пептона – 22,5; K₂HPO₄ – 2,3; KH₂PO₄ – 1,7; MgSO₄ – 0,6.

Для получения культур клостридий первой генерации с соблюдением асептики вскрывали ампулу и отсеивали в пробирки на МППБ под вазелиновым маслом и культивировали в течение 24-48 ч, в зависимости от роста культуры, при температуре 37⁰С.

Осуществляя вторую генерацию, штаммы пересевали во флаконы в объеме 0,5 дм³ на МППБ под вазелиновым маслом и культивировали при 37⁰С в течение 24 ч в термальной комнате, затем проводили

третью генерацию – посев в бутылках. Взвесь микроорганизмов во флаконах, тщательно перемешивали и при помощи слабого разрежения перекачивали в бутылки объемом 12 дм³ с питательной средой объемом 8,5 дм³ под вазелиновым маслом, кроме того в каждую бутылку вносили 300 см³ раствора глюкозы. Бутылки с внесённой в них культурой переносили в термальную комнату и культивировали в течение 24 ч. По окончании культивирования отбирали пробы для определения концентрации микробных клеток по оптическому стандарту мутности, чистоты роста на питательной среде и типичной морфологии в мазках, окрашенных по Граму. Концентрация анаэробных бактерий должна составлять не менее 6×10^9 кл./см³ по оптическому стандарту мутности ГИСК им. Л.А. Тарасевича. Микробные культуры, выращенные в бутылках, после получения положительных результатов контроля использовали в дальнейшем в качестве посевного материала для масштабного культивирования в биореакторе.

Промышленное культивирование осуществляли в биореакторе, оснащённом системой контроля и регулирования основных параметров (температура, pH, обороты мешалки) глубинным способом при температуре $37 \pm 1^\circ\text{C}$, подаче химически чистого азота в количестве 0,2-0,3 дм³ на 1 дм³ среды в реакторе. Культивирование прекращали в стационарной фазе роста, когда концентрация микробных культур перестаёт увеличиваться. В процессе культивирования анаэробов проводили корректировку pH среды в пределах 6,8-7,2 ед. pH с помощью 22-25%-го раствора аммиака.

Морфологию клеток и бактериологическую чистоту контролировали микроскопически. С целью определения чистоты культуры, из суспензии бактериальных клеток на предметном стекле готовили мазок, который фиксировали над пламенем горелки, а затем окрашивали по Граму и тщательно просматривали под микроскопом с использованием иммерсионного масла. Наличие посторонней микрофлоры в культурах не допускается.

Количество микробных клеток в 1 см³ взвеси устанавливали по оптическому бактериальному стандарту ГИСК. Для определения концентрации микробных культур с помощью оптического стандарта мутности, в пробирку вносили 1 см³ испытуемой культуры и небольшими порциями добавляли стерильный физиологический раствор (pH 7,2-7,4). Содержимое пробирок тщательно перемешивали и сравнивали со стандартом мутности № 10 ГИСК в потоке проходящего света.

После окончания процесса культивирования определяли общую токсичность и степень токсичности микробных культур. Смесь микробных культур вводили в дозе 0,5 см³ в разведении 1:10 двум белым мышам массой 16-18 г. Мыши должны погибнуть в течение 3-20 мин.

Для определения степени токсичности культуру разводили на 1:100, 1:500, 1:1000, 1:2000 и далее до титра. Для определения токсичности *C. perfringens*, *C. septicum* и *C. novyi* тип В (*oedematiens*) каждое разведение вводили внутривенно по 0,5 см³ двум белым мышам, а *C. tetani* вводили внутримышечно в области бедра. Через 18-24 ч проводили учёт. Минимальной смертельной дозой считали то разведение, которое при введении вызывает гибель хотя бы одной мыши. Для изготовления вакцины использовали токсино-жидкость, содержащую в 1 см³ для *C. perfringens* тип А не менее 100 Dlm/см³, *C. perfringens* тип В – 600 Dlm/см³, *C. perfringens* типов С и D – 2000 Dlm/см³, *C. novyi* тип В (*oedematiens*) – 6000 Dlm/см³, *C. tetani* – 5000 Dlm/см³ токсина для белых мышей массой 16-18 г.

Инактивацию бактериальной массы проводили с формалином. В суспензию анаэробов при включённой мешалке добавляли формалин до получения конечной концентрации формальдегида в смеси 0,3-0,4%. Температуру бактериальной суспензии при инаktivации поддерживали на уровне $37-38^\circ\text{C}$. Во время инаktivации культуру перемешивали 3 раза в сутки по 10-20 мин. Длительность инаktivации анаэробов составила от 3 до 7 суток.

Концентрирование токсинов проводили путем фильтрация в ультрафильтрационной установке АСФ – 020. Опытные серии моновакцины и поливалентных препаратов изготавливали из токсинов и бактерий штаммов клостридий, инаktivированных формалином, и адсорбировали на геле гидрата окиси алюминия.

Компоновку поливалентных вакцин осуществляли путём объединения всех компонентов в определённом соотношении, добавляли 4%-й раствор ГОА в качестве адьюванта, физиологический раствор и тиомерсал до конечной концентрации не более 0,01%, затем тщательно перемешивали. Препарат после оценки внешнего вида проверяли на стерильность путём посева на питательных средах,

определяли безвредность на лабораторных животных, расфасовали, этикетировали, затем использовали для проведения доклинических и клинических испытаний.

Безвредность, реактогенность и иммуногенность экспериментальной серии вакцины изучали на лабораторных животных: белых мышах живой массой 16-18 г, морских свинок – 350-400 г и кроликах – 2,5-3,2 кг.

Результаты и обсуждение

Посевной материал для промышленного культивирования представлял собой чистую не контаминированную культуру производственных штаммов клостридий в вегетативной и споровой форме в соотношении 10:1 с оптической концентрацией не менее $9,0 \times 10^9$ кл./см³. Засев производили в стерильную питательную среду из расчёта 1 см³ посевной культуры на 1 л питательной среды с температурой 27°C. Результаты культивирования производственных штаммов клостридий в бутылках представлены в табл. 1.

Таблица 1. Результаты культивирования производственных штаммов клостридий в бутылках

№	Штаммы	Объём питательной среды, л.	Концентрация микробных культур
1	<i>C. perfringens mun A</i>	9	6,2±0,1
2	<i>C. perfringens mun B</i>	9	4,4±0,05
3	<i>C. perfringens mun C</i>	9	8,1±0,2
4	<i>C. perfringens mun D</i>	9	11,6±0,1
5	<i>C. novyi, mun B</i>	9	4,50,1
6	<i>C. septicum</i>	9	3,8±0,07
7	<i>C. chauvoei</i>	9	4,5±0,2
8	<i>C. tetani</i>	9	6,0±0,3

Примечание: продолжительность культивирования – 18-24 ч, температура – 37-38°C.

Перед культивированием в биореактор вносили питательную среду на основе ливерного экстракта и казеин-пептона, стерилизовали при 120-122°C в течение 45-60 мин. После стерилизации среду охлаждали путём подачи холодной воды в рубашку биореактора и оставляли для равномерного снижения температуры по всему объёму до 37±1°C.

Химические показатели готовой питательной среды:

- содержание общего азота – 500±100 мг/100 мл,
- содержание амминого азота – 200±10 мг/100 мл,
- триптофана – 70-100 мг/100 мл,
- полипептиды – 2,5-3,5 мг/100 мл,
- углеводы – 1,0-2,0%;
- pH 7,4-7,6.

При засеве в реактор вносили не менее 10 л активно растущей культуры на каждые 100 л среды. Плотность посева клостридий в биореакторах поддерживали в пределах от 500 до 800×10⁶ кл./см³ питательной среды по оптическому стандарту мутности.

Через 2-4 ч культивирования в реактор дробно дополнительно вводили раствор глюкозы до конечной концентрации 1,0% в пересчете на сухую массу. Добавление глюкозы осуществляли в течение 3-4 ч порциями по 0,5% в час. Порции глюкозы вносили, учитывая активную реакцию среды, которая должна быть в пределах 6,8-7,2 ед. pH. Продолжительность культивирования анаэробов в биореакторе по интенсификации процесса накопления микробных клеток и пик токсинообразования составляли от 12 до 26 ч (табл. 2). По окончании процесса культивирования концентрация микробных тел по оптическому стандарту мутности была не ниже 6,0×10⁹ кл./см³.

Таблица 2. Результаты культивирования и концентрация микробных культур вакцинных штаммов клостридий в биореакторах

№	Штаммы	Концентрация, $\times 10^9$ кл./см ³		Время культивирования, ч	рН после окончания культивирования
		В начале культивирования	После окончания культивирования		
1	<i>C. perfringens</i> mun A	0,8	6,7 $\pm$ 0,2	16	6,81
2	<i>C. perfringens</i> mun B	0,8	11,1 $\pm$ 0,3	18	6,86
3	<i>C. perfringens</i> mun C	0,8	8,0 $\pm$ 0,05	16	6,82
4	<i>C. perfringens</i> mun D	0,8	14,6 $\pm$ 0,1	22	7,04
5	<i>C. novyi</i> , mun B	0,7	7,5 $\pm$ 0,08	24	7,01
6	<i>C. septicum</i>	0,5	6,1 $\pm$ 0,09	24	6,89
7	<i>C. chauvoei</i>	0,8	15,1 $\pm$ 0,1	28	7,11
8	<i>C. tetani</i>	0,7	9,3 $\pm$ 0,8	24	7,09

Бактериальная масса *C. perfringens* тип А, на 16-й час культивирования достигла $6,7 \times 10^9$ кл./см³, токсичность составляла 150 $\pm$ 10 Длм/см³. У *C. perfringens* тип В на 18-й час культивирования бактериальная масса – $11,1 \times 10^9$ кл./см³, токсичность – 3400 $\pm$ 150 Длм/см³ и у *C. perfringens* тип С на 16-й час культивирования бактериальная масса – $8,3 \times 10^9$ кл./см³, токсичность – 6500 $\pm$ 200 Длм/см³.

Рост и токсинообразование *C. perfringens* тип D длился 22 ч в условиях биореактора, при этом бактериальная масса составляла $14,6 \times 10^9$ кл./см³. Активацию протоксина проводили без удаления микробных культур. Для получения токсина *C. perfringens* тип D процесс активирования проводили с раствором трипсина с активностью 200 ед. из расчета 1:10. После перемешивания выдерживали в течение 3-4 ч при 38⁰С. Токсичность *C. perfringens* тип D составляла 4700 $\pm$ 100 Длм/см³. Бактериальная масса производственных штамма *C. novyi* тип В к 24 ч культивирования составляла $7,5 \times 10^9$ кл./см³, токсичность – 5400 $\pm$ 10 Длм/см³.

Продолжительность культивирования штамма *C. septicum* составляла 24 ч, при этом выход бактериальной массы достигал $6,1 \times 10^9$ кл./см³. Бактериальная масса у вакцинных штаммов *C. chauvoei* R₁₅ составляла $9,3 \times 10^9$ кл./см³ и время культивирования – 28 ч. При культивировании штамма *C. tetani* в биореакторе количество вносимого посевного материала выросло от 0,8 до $15,1 \times 10^9$ кл./см³ в течение 24 ч, при этом токсичность составляла 8450 $\pm$ 200 Длм/см³.

Таким образом, проведенное культивирование вакцинных штаммов клостридий на питательной среде на основе ливерного экстракта и казеин-пептона, при глубинно-суспензионном способе в реакторе из расчета 0,5-0,8 $\times 10^9$ кл./см³, способствовало повышению роста и увеличению бактериальной массы от 6,1 до $15,1 \times 10^9$ кл./см³.

По окончании культивирования бактериальные суспензии, выращенные на всех питательных средах, имели типичную морфологию, чистый рост на МППБ (газообразование, помутнение), при отсутствии роста на МПБ, МПА, агаре и бульоне Сабура.

Инактивацию бактериальной суспензии проводили путём добавления 0,3-0,5% формалина с содержанием формальдегида не ниже 36%. Длительность инактивации связана с количеством токсинов и микробных культур в жидкости.

После проверки на полноту инактивации и стерильность, бактериальную массу и анатоксины адсорбировали на гель гидрооксида алюминия до концентрации 15-20%.

Изготовление экспериментальной серии вакцины, подбор оптимального соотношения компонентов и эффективной дозы штаммов проводили согласно действующему в настоящее время регламенту производства и инструкции по контролю поливалентной вакцины против клостридиозов животных, ООО «Агровет».

Для изготовления анатоксина, использовали токсины, полученные из культуральной жидкости с токсичностью от 3000 до 6000 Длм/см³, только у *C. perfringens* тип А токсичность составляла 150 Длм/см³. Из каждого штамма изготавливали моно-препарат в виде анатоксина и проверяли путем иммунизации кроликов, затем получили сыворотки и использовали для постановки реакции

нейтрализации на белых мышах. Все анатоксины показали иммуногенную активность у животных в объеме 0,2-0,3 см³.

Для компоновки штаммов *C. septicum*, *C. chauvoei* R₁₅ использовали анакультуры в концентрации не менее 6×10⁹ кл./см³. Для оценки иммуногенности анакультур *C. septicum*, *C. chauvoei* R₁₅ использовали морских свинок и белых мышей, которых после двукратной иммунизации заражали вирулентными дозами возбудителей. В результате анакультуры в объеме 0,3-0,4 см³ обеспечивали 100%-ную защиту вакцинированных животных.

При конструировании поливалентной вакцины подобрали оптимальные и сбалансированные соотношения антигенов и антитоксинов, входящих в её состав: анатоксин *C. perfringens* тип А – 10 МЕ/мл, *C. perfringens* тип В – 15 МЕ/мл, *C. perfringens* тип С – 20 МЕ/мл, *C. perfringens* тип D – 30 МЕ/мл, *C. novyi* тип В – 20 МЕ/мл, *C. tetani* – 10 МЕ/мл, а также инаktivированные культуры *C. septicum* – 2,0×10⁹ кл./мл, *C. chauvoei* R₁₅ – 2,5×10⁹ кл./мл., обеспечивающие 100%-ную защиту вакцинированных животных.

Расфасовку поливалентной вакцины осуществляли при постоянно работающей мешалки в стерильные флаконы по 100 см³ с погрешностью ±3%. Флаконы с вакциной закрывали резиновыми пробками и металлическими колпачками в фасовочном аппарате.

Каждый флакон с вакциной взбалтывали и просматривали в проходящем свете. Также определяли цвет вакцины, наличие посторонней примеси и микрофлоры, не разбивающихся хлопьев, внешний вид и трещины флаконов.

На каждый флакон с вакциной наклеивали этикетку, на которой указывали: наименование вакцины, количество вакцины во флаконе в см³, номер серии, дату изготовления, срок годности, условия хранения, дозу и способ применения. Поливалентная вакцина против клостридиозов животных представляет собой суспензию серовато-желтого цвета с быстро выпадающим осадком, и легко суспендирующуюся при взбалтывании.

Для определения стерильности использовали по 5 флаконов вакцин из каждой серии. Из каждого флакона вакцины взяли пробы и подсеяли по 0,2-0,3 см³ в МПБ, МПА, агар и бульон Сабуро по две пробирки с каждой средой. Также сделали посев по 0,5-1,0 см³ на МППБ.

За посевами вели наблюдение в течение 10 суток. В течение срока наблюдения все образцы высевов вакцины остались стерильными.

Для определения безвредности экспериментальной серии вакцины использовали смесь пяти флаконов (по 10 см³ из каждого). Вакцину вводили подкожно, белым мышам в объеме 0,5 см³, морским свинкам в области холки в объеме 2,0 см³. В течение 10 суток устанавливали наблюдение за вакцинированными животными. Все животные оставались живыми и клинически здоровыми. В течение всего срока наблюдения не отмечали отклонений общеклинических показателей от физиологической нормы, что свидетельствует о безвредности испытуемых вакцин и отсутствии поствакцинальных реакций на месте введения.

Для определения иммуногенной активности в отношении штаммов: *C. perfringens* типов А, В, С, D, *C. novyi* тип В, *C. tetani*, вакцину вводили 6 кроликам живой массой 2,5-3,0 кг, внутримышечно в дозе 1,5 см³ с интервалом 20-25 дней.

Через 14-15 суток после повторной вакцинации у кроликов брали кровь для получения сыворотки. Сыворотку объединяли в равных объемах от каждого животного и перемешивали. Полученную пробу использовали для оценки напряженности антитоксического иммунитета в реакции нейтрализации токсинов на белых мышах.

Для постановки реакции нейтрализации использовали токсины *C. perfringens* типов А, В, С, D, *C. novyi* тип В с установленной активностью 20 Длм/см³ и токсин *C. tetani* с установленной активностью 100 Длм/см³ для белых мышей массой 16-18 г.

Общую пробу сыворотки разливали в 6 пробирок по 1,5 см³, после чего в них вносили рабочие растворы токсинов клостридий в объеме 1,5 см³:

- в 1 -ю – *C. tetani*;
- во 2 -ю – *C. novyi* тип В;
- в 3 -ю – *C. perfringens* тип С;
- в 4 -ю – *C. perfringens* тип D;

- в 5 -ю – *C. perfringens* тип В;
- в 6 -ю – *C. perfringens* тип А.

Смесь токсинов с сывороткой перемешивали и помещали в термостат на 45 мин при температуре 37°C для нейтрализации токсинов клостридий имеющимся антителами в сыворотке крови. Затем каждую пробу смеси токсин+сыворотка вводили 5 белым мышам внутривенно в объёме 0,5 см³ по 5 мышей на каждую пробу. Пробу с *C. tetani* вводили внутримышечно в области корня хвоста.

После проведения инъекций за животными наблюдали в течение 72 ч. Вакцину считали иммуногенно активной, если после введения белым мышам смеси токсина с сывороткой живыми оставались не менее 4 из 5 использованных животных при гибели не менее 4 контрольных белых мышей

Для определения активности вакцина по отношению *C. septicum* белых мышей заражали контрольным штаммом *C. septicum* № 1098, после ревакцинации. Вакцинировали 10 мышей массой 16-18 г двукратно подкожно с интервалом 15 дней в области холки в дозе 0,5 см³. После ревакцинации 10 иммунизированных и 10 контрольных мышей заражали в объёме 0,5 см³ внутрибрюшинно контрольный споровой культуры штамма *C. septicum* №1098 в дозе 3 LD₅₀. Учёт результатов проводили через 72 ч.

Определение иммуногенной активности вакцина по отношению штамма *C. chauvoei* проводили на морских свинках массой 400-450 г. Вакцины вводили 5 свинкам подкожно двукратно в области холки с интервалом 20 суток в дозе 0,5 см³. Через 20 суток после вакцинации всех животных заражали внутримышечно сухой споровой культурой в дозе 20 LD₅₀ для морских свинок (споровую культуру вводили в смеси с 0,2 см³ 10%-ного раствора хлористого кальция, предназначенного для внутривенных введений). Учёт результатов проводили через 10 суток после заражения.

Таблица 3. Результаты контроля иммуногенной активности компонентов вакцины

№	Контролируемый компонент	Доза вакцина, см ³ , двукратное введение	Количество заражённых животных	Количество выживших животных	% выживших животных
1	<i>C. perfringens</i> тип А	0,5-0,5	5	4	80
2	<i>C. perfringens</i> тип В	0,5-0,5	5	5	100
3	<i>C. perfringens</i> тип С	0,5-0,5	5	5	100
4	<i>C. perfringens</i> тип D	0,5-0,5	5	5	100
5	<i>C. novyi</i> тип В	0,5-0,5	5	5	100
6	<i>C. septicum</i>	0,5-0,5	10	10	100
7	<i>C. chauvoei</i>	0,5-0,5	5	5	100
8	<i>C. tetani</i>	0,5-0,5	5	5	100
9	Контрольные животные	физраствор 0,5-0,5	20	0	0

Результаты исследований показывают, что все штаммы, кроме *C. perfringens* тип А, вызывают 100%-ной иммунитет у иммунизированных лабораторных животных (табл. 3). Только *C. perfringens* тип А вырабатывал иммунитет в 80% случаев. В результате проведенного исследования было установлено, что экспериментальные серии поливалентной вакцины против клостридиозов животных являются стерильными, безвредными и иммуногенными в отношении всех компонентов, входящих в её состав.

Заключение

Исследования, проведенные для усовершенствования технологии изготовления поливалентной вакцины против клостридиозов животных, показали, что культивирование вакцинных штаммов клостридий на питательной среде на основе ливерного экстракта и казеин-пептона (г/л): ливерный экстракт – 10; казеин-пептона – 22,5; K₂HPO₄ – 2,3; KH₂PO₄ – 1,7; MgSO₄ – 0,6, позволяет получить наиболее высокий выход бактериальной массы и токсинообразования с концентрацией микробных культур в среднем 9,8-11,0×10⁹ кл./см³. В опытах на лабораторных животных установлено, что

разработанная поливалентная вакцина против клостридиозов животных является безвредной, ареактогенной, обеспечивает выработку гуморального иммунитета с выраженным антитоксическим действием против всех штаммов клостридий, входящих в состав препарата. Предложенное усовершенствование внесено в регламент производства поливалентной вакцины против клостридиозов животных в ООО «Агровет».

ЛИТЕРАТУРА

1. Горелов Ю.М. Биологическое и технологическое основы совершенствования средств и методов специфической профилактики сибирской язвы и клостридиозов животных: автореф. дисс... д.б.н. – Алматы, 1994 – 54 с.
2. Гринь С.А. Современные биотехнологические процессы и иммунологические методы при промышленном производстве ветеринарных препаратов: автореф. дисс... д.б.н. – Щелково, 2008 – 51 с.
3. Грязнова Д.В. Разработка комплексных препаратов для профилактики и диагностики газовой гангрены: автореф. дисс... к.б.н. – Пермь, 1999. – 19 с.
4. Капустин А.В. Этиологическая структура и специфическая профилактика клостридиозов крупного рогатого скота и овец: автореф. дисс... д.б.н. – Москва, 2019. – 49 с.
5. Махмудов К.Б. Изучение комплексного способа иммунизации против сальмонеллёза и пастереллёза, браздота и инфекционной энтеротоксемии на лабораторных животных // Доклады ТАСХН. – №2(12), 2016. – С 26-29.
6. Панова Н.В. Разработка нового стимулятора роста микроорганизмов и изучение его влияния на их биологические свойства на примере некоторых вакцинных штаммов бактерий: автореф. дисс... к.б.н. – Ставрополь, 2006. – 20 с.
7. Редкозубова Л.И. Контроль клостридий – систематическая вакцинация // Ветеринария. – 2016. – № 1. – С. 9-12.
8. Скляр О.Д. Изучение иммуногенной активности столбнячного компонента в составе ассоциированной вакцины против клостридиозов крупного рогатого скота // Ветеринария Кубани. – 2016. – № 4. – С. 15-17.
9. Скляр О.Д., Капустин А.В., Лаишевцев А.И., Гулюкин А.М. Интерференция компонентов в поливалентной вакцине против клостридиозов крупного и мелкого рогатого скота // Российский ветеринарный журнал. – 2017. – № 1. – С. 20-23.
10. Berghaus R.D., Mccluskey B.J., Callan R.J. Risk factors associated with hemorrhagic bowel syndrome in dairy cattle // J. Amer. Vet. Med. Assoc. – 2005. – Vol. 226. – P. 1700-1706.
11. David M. Clostridium novyi, sordellii, and tetani: Mechanisms of disease // Anaerobe. – 2013. – Vol. 24. – P. 98-101.
12. Kapustin A.V., Laishevtsev A.I., Sklyarov O.D., Abrosimova N.S. Development of a method for monitoring the immunogenic activity of an associated vaccine against clostridiosis in cattle [Разработка метода контроля иммуногенной активности ассоциированной вакцины против клостридиозов крупного рогатого скота]. // Russian Journal of Agricultural and Socio-Economic Sciences (RJOAS). – 2017. – Vol. 63. – No. 3. – P.170-175.
13. Lewis C. J. Control of important clostridial diseases of sheep // Veterinary Clinics of North America. – 2011. – Vol. 27. – Issue 1. – P. 121-126.
14. Manteca C. Etude de l'enterotoxémie bovine en Belgique. III. Comparaison de différents protocoles d'immunisation contre la toxine de Clostridium perfringens // Ann. Med. Veter. – 2004. – Vol. 148. – P. 147-152.
15. Rood J.I., Cole T. Molecular genetics and pathogenesis of Clostridium perfringens // Microb. Rev. – 1991. – Vol. 55. – P. 621-648.
16. Sunita S.C., Chaturvedi V.K., Gupta P.K., Sumithra T. G. Improved humoral immune response in sheep against epsilon toxoid following co-adjuvantation with gel and water in oil formulation // Small Ruminant Research, – 2013. – Vol. 114. – P. 188-194.
17. Songer J.G. Clostridia as agents of zoonotic disease // Veterinary Microbiology. – 2010. – Vol. 140. – P. 399-404.
18. Uzal, F.A. Development and application of new mouse models to study the pathogenesis of Clostridium perfringens type C enterotoxemias // Infection and Immunity. – 2009. – 77(12). – P. 5291-5299.

REFERENCES

1. Berghaus R.D., Mccluskey B.J., Callan R.J. Risk factors associated with hemorrhagic bowel syndrome in dairy cattle. *J. Amer. Vet. Med. Assoc.* 2005, 226 : 1700-1706.
2. David M. Clostridium novyi, sordellii, and tetani: Mechanisms of disease. *Anaerobe*. 2013, 24: 98-101.
3. Gorelov Yu. M. *Biologicheskoe i tekhnologicheskoe osnovy sovershenstvovaniya sredstv i metodov spetsificheskoi profilaktiki sibirskoi yazy i klostridiozov zhivotnykh* (Biological and technological basis for improving the means and methods of specific prophylaxis of anthrax and animal clostridia). Extended Abstract of Diss. Dr. Sci. Biol., Almaty, 1994, 54 p.

4. Grin S.A. *Sovremennyye biotekhnologicheskiye protsessy i immunologicheskiye metody pri promyshlennom proizvodstve veterinarnykh preparatov* (Modern biotechnological processes and immunological methods in the industrial production of veterinary drugs) Extended Abstract of Diss. Dr. Sci. Biol., Schelkovo, 2008, 51 p.
5. Gryaznova D.V. *Razrabotka kompleksnykh preparatov dlya profilaktiki i diagnostiki gazovoi gangreny* (Development of complex preparations for the prevention and diagnosis of gas gangrene). Extended Abstract of Diss. Cand. Sci. Biol., 1999, Perm', 19 p. (In Russian)
6. Kapustin A.V. *Etiologicheskaya struktura i spetsificheskaya profilaktika klostridiozov krupnogo rogatogo skota i ovets* (Etiological structure and specific prophylaxis of clostridiosis in cattle and sheep). Extended Abstract of Diss. Dr. Sci. Biol. Moskov, 2019, 49 p. (In Russian)
7. Kapustin A.V. , Laishevtsev A.I., Sklyarov O.D., Abrosimova N.S. Development of a method for monitoring the immunogenic activity of an associated vaccine against clostridiosis in cattle [Разработка метода контроля иммуногенной активности ассоциированной вакцины против клостридиозов крупного рогатого скота]. *Russian Journal of Agricultural and Socio-Economic Sciences (RJOAS)*, 2017, 63(3): 170-175.
8. Lewis C. J. Control of important clostridial diseases of sheep. *Veterinary Clinics of North America*. 2011, 27(1): 121-126.
9. Manteca C. Etude de l'enterotoxemie bovine en Belgique. III. Comparaison de differents protocoles d'immunisation contre la toxine ade *Clostridium perfringens*. *Ann. Med. Veter.* 2004, 148 : 147-152.
10. Makhmudov K. B. *Izucheniye kompleksnogo sposoba immunizatsii protiv sal'monelloza i pasterelloza, bradzota i infektsionnoy enterotoksemii na laboratornykh zhivotnykh* (The study of a complex method of immunization against salmonellosis and pasteurellosis, bradzet and infectious enterotoxemia in laboratory animals). *Dokl. TSKhA – Reports of Timiryazev Agricultural Academy*. 2016, 12(2): 26-29. (In Russian)
11. Panova N.V. *Razrabotka novogo stimulyatora rosta mikroorganizmov i izucheniye ego vliyaniya na ikh biologicheskie svoystva na primere nekotorykh vaksinnnykh shtammov bakterii* (Development of a new stimulator of the growth of microorganisms and the study of its effect on their biological properties by the example of some vaccine strains of bacteria). Extended Abstract of Diss. Cand. Sci. Biol., Stavropol', 2006, 20 p. (In Russian)
12. Redkozubova L.I. [Clostridium control - systematic vaccination]. *Veterinariya - Veterinary Medicine*. 2016, 1: 9-12. (In Russian)
13. Rood J.I., Cole T. Molecular genetics and pathogenesis of *Clostridium perfringens*. *Microb. Rev.* 1991, 55: 621-648.
14. Sklyarov O.D., Kapustin A.V., Laishevtsev A.I., Gulyukin A.M. [Component interference in a multivalent vaccine against clostridiosis in cattle and small cattle]. *Rossiiskii veterinarnyi zhurnal - Russian Veterinary Journal*. 2017, 1: 20-23. (In Russian)
15. Sklyarov O.D. *Izucheniye immunogennoy aktivnosti stolbnyachnogo komponenta v sostave assotsiirovannoy vaksiny protiv klostridiozov krupnogo rogatogo skota* (The study of the immunogenic activity of the tetanus component in the composition of the associated vaccine against clostridiosis in cattle). *Veterinary Medicine of the Kuban*. 2016, 4: 15-17.
16. Songer J. G. Clostridia as agents of zoonotic disease. *Veterinary Microbiology*. 2010, 140: 399-404.
17. Sunita S.C., Chaturvedi V.K., Gupta P.K., Sumithra T. G. Improved humoral immune response in sheep against epsilon toxoid following co-adjuvantation with gel and water in oil formulation // *Small Ruminant Research*, – 2013. – Vol. 114. – P. 188-194.
18. Uzal, F.A. Development and application of new mouse models to study the pathogenesis of *Clostridium perfringens* type C enterotoxemias. *Infection and Immunity*. 2009, 77(12): 5291-5299.

Improving production technology of polyvalent vaccine against clostridiosis of animals

¹Pulotov F.Kh., ¹Devrishov D.A. ²Ismatov I.A.

¹*Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology –
MVA named after K.I. Scriabin, Moscow, Russian Federation;*

²*Institute for Biological Safety, Dushanbe, Republic of Tajikistan*

ABSTRACT. Polyvalent vaccines are widely used in the fight against clostridiosis, for the manufacture of which a sufficient amount of bacterial mass and toxins of clostridia are necessary. To obtain a significant amount of toxin and bacterial mass, it is advisable to use nutrient media adapted for deep cultivation in an industrial environment. The aim of this work was to develop a prescription composition of nutrient media and improve the industrial technology for the production of polyvalent vaccine against animal clostridiosis. The study included the manufacture of an experimental vaccine series, the selection of the optimal ratio of components and the effective dose of the strains. Conducted chain cultivation of vaccine strains of clostridia in bottles, bottles and bioreactors on a developed nutrient medium based on liver extract and casein peptone (g/l): liver extract – 10; casein peptone – 22.5; K₂NPO₄ – 2.3; KH₂PO₄ – 1.7; MgSO₄ – 0.6. The method of cultivation on a new nutrient medium allowed to obtain the highest yield of bacterial mass and toxin formation with a concentration of microbial cultures of an average of $9.8-11.0 \times 10^9$ cells/cm³. In experiments on laboratory animals, it was found that the experimental series of a multivalent vaccine against animal clostridiosis is harmless, areactogenic, provides the production of humoral immunity with a pronounced antitoxic effect against all strains of clostridia that are part of the drug. The proposed improvement is included in the regulation for the production of a multivalent vaccine against animal clostridiosis at Agrovet LLC.

Keywords: animal clostridiosis, polyvalent vaccine, cultivation medium, immunogenicity, harmlessness

Problemy biologii productivnykh zhivotnykh - Problems of Productive Animal Biology, 2020, 1: 34-43

Поступило в редакцию: 30.12.2019

Получено после доработки: 13.01.2020

Пулотов Фаридун Хайталиевич – асп., тел. 8(926)738-86-894; fariddun.pulotov@mail.ru;

Девришов Давуд Абдулсемедович – д.б.н., член-корр. РАН;

Исмаев Илхом Асадуллоевич – асп.