



003063292

На правах рукописи

Шморгул Борис Игоревич

СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ МЕТОДОВ ИЗГОТОВЛЕНИЯ И КОНТРОЛЯ СИБИРЕЯЗВЕННОЙ ПРЕЦИПИТИРУЮЩЕЙ СЫВОРОТКИ И СТАНДАРТНОГО БАКТЕРИЙНОГО АНТИГЕНА

16 00.03 – ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология, микология с микотоксикологией и иммунология

АВТОРЕФЕРАТ

**диссертации на соискание ученой степени
кандидата ветеринарных наук**

7 4 МАЙ 2007

МОСКВА - 2007

Работа выполнена в лаборатории качества и стандартизации лекарственных средств против анаэробных болезней животных Федерального государственного учреждения «Всероссийский государственный Центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов (ФГУ ВГНКИ)», на Тобольской и Орловской биофабриках

Научный руководитель доктор ветеринарных наук, профессор,
Заслуженный деятель науки РФ
Кириллов Леонид Вениаминович
(ФГУ ВГНКИ)

Официальные оппоненты: доктор ветеринарных наук, профессор
Заслуженный деятель науки РФ,
Шумилов Константин Васильевич
(ФГУ ВГНКИ)

доктор ветеринарных наук, профессор
Гаврилов Владимир Андреевич
(МГАВМиБ им. Скрыбина К.И.)

Ведущее учреждение: ГНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт ветеринарной вирусологии и микробиологии» Россельхозакадемии

Защита диссертации состоится “31” мая 2007 г. в “13⁰⁰” часов на заседании диссертационного совета Д 220 011 01 в Федеральном государственном учреждении «Всероссийский государственный Центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов (ФГУ ВГНКИ)» (123022, Москва, Звенигородское шоссе, 5, ФГУ ВГНКИ)

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГУ ВГНКИ

Автореферат диссертации разослан “24” *апреля* 2007 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат ветеринарных наук,
Заслуженный ветеринарный врач РФ

Ю.А. Козырев
Ю.А. Козырев

1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

1.1 Актуальность проблемы

Сибирская язва – остро протекающая, особо опасная зоонозная болезнь, к которой наиболее чувствителен крупный рогатый скот, овцы, козы лошади, и другие виды домашних и диких животных. Среди хищников чувствительны к сибирской язве норки, соболя, лисицы клеточного содержания. Слабочувствительны к заражению в естественной среде обитания собаки, кошки, волки и другие виды диких плотоядных.

В настоящее время достигнуто стойкое благополучие поголовья животных России по сибирской язве, благодаря ежегодным плановым профилактическим мероприятиям, охватывающим все поголовье восприимчивых животных. Поэтому указанная инфекция проявляется в настоящее время только в виде спорадических случаев, число которых имеет постоянную тенденцию к сокращению. На фоне видимого благополучия, в силу биологической специфики возбудителя болезни (длительное переживание в почве и другие), сохраняется постоянная угроза встречи животных и человека с вирулентными формами *B. anthracis*. Поэтому необходимо обладать совершенными средствами и методами диагностики болезни, которые позволяют, в возможно короткие сроки и максимально достоверно, ставить диагноз и, следовательно, своевременно проводить профилактические и лечебные мероприятия по купированию очагов сибиреязвенной инфекции.

Диагноз на сибирскую язву ставят на основании анализа эпизоотологических данных, клинических признаков, и лабораторных исследований. Одним из основных способов диагностики сибирской язвы остается метод исследования материала в реакции преципитации (реакция Асколи).

На протяжении многих лет исследователи занимались вопросом получения специфичной и активной преципитирующей сыворотки, которая достоверно и в короткий срок выявляла бы кожевенно-меховое сырье и патологический материал, полученные от животных павших при подозрении на сибирскую язву. Необоснованное применение штаммов возбудителя антракса при получении сыворотки приводило к частым неудачам, так как задачу подбора штаммов, использованных при гипериммунизации продуцентов нельзя решить без детального изучения антигенной структуры возбудителя указанной болезни.

Поэтому подбор новых штаммов для получения преципитирующей сибирезвенной сыворотки и стандартного сибирезвенного бактериального антигена на основе сравнительного изучения антигенной структуры *B anthracis* является перспективным направлением, имеющим научное и практическое значение

1.2. Цель работы и задачи исследований.

Целью работы является экспериментальное доказательство возможности изготовления и применения преципитирующей сибирезвенной сыворотки с использованием одного вакцинного бескапсульного штамма *B anthracis*, вместо четырех аттенуированных штаммов, среди которых обязательно присутствие одного капсуlogenного, а также способа изготовления стандартного сибирезвенного бактериального антигена из вакцинного штамма взамен вирулентного, при этом оба препарата по активности и специфичности не должны уступать существующим коммерческим препаратам, изготовленным по стандартной методике

Для достижения указанной цели были поставлены следующие задачи

- 1 Изучить состав термостабильных преципитирующих антигенов у вирулентных и аттенуированных штаммов *B anthracis* в реакции диффузной преципитации и иммуноэлектрофорезе и на основе полученных результатов отобрать новые производственные штаммы с более широким набором специфических антигенов
- 2 Установить возможность использования вновь отобранных штаммов для изготовления преципитирующей сибирезвенной сыворотки
- 3 Предложить оптимальную схему гипериммунизации лошадей-производителей преципитирующей сибирезвенной сыворотки с использованием антигена, изготовленного из одного вакцинного бескапсульного штамма
- 4 Изучить активность и специфичность полученной преципитирующей сыворотки в сравнении с коммерческой сывороткой биофабричного производства
- 5 Установить возможность замены вирулентного производственного штамма сибирской язвы на вакцинный при промышленном изготовлении стандартного сибирезвенного бактериального антигена
- 6 Изучить активность и специфичность полученного антигена в сравнении с коммерческим препаратом биофабричного производства
- 7 Определить активность и специфичность преципитирующей сыворотки и стандартного сибирезвенного бактериального антигена в процессе хранения

Основные положения, выносимые на защиту

- результаты разработки, испытания и внедрения в биологическую промышленность новых способов изготовления преципитирующей сибирязвенной сыворотки с использованием вакцинного бескапсульного штамма 55-ВНИИВВиМ взамен ранее применяемых 4-х аттенуированных штаммов антракса,

- результаты разработки, испытания и внедрения стандартного сибирязвенного бактериального антигена с использованием вакцинного штамма 34F₂ или 55-ВНИИВВиМ взамен вирулентного штамма сибирской язвы ЗБК₂

Научная новизна

Установлено, что все изученные нами сибирязвенные штаммы (вирулентные и авирулентные) содержат идентичный термостабильный преципитирующий антиген, соответствующий стандартному сибирязвенному антигену

Впервые показана возможность получения высокоактивной и специфичной преципитирующей сибирязвенной сыворотки при использовании для гипериммунизации продуцентов одного вакцинного бескапсульного штамма 55-ВНИИВВиМ взамен четырех, используемых ранее, один из которых капсулогенный, а также для получения высокоактивного и специфичного стандартного сибирязвенного бактериального антигена из вакцинного штамма 34F₂ или 55-ВНИИВВиМ, взамен вирулентного штамма сибирской язвы ЗБК₂

Практическая значимость работы

На основании полученных результатов разработан оригинальный способ изготовления преципитирующей сибирязвенной сыворотки с измененной схемой гипериммунизации лошадей при использовании в качестве антигена одного вакцинного штамма. Указанный способ изложен в «Инструкции по изготовлению и контролю сыворотки сибирязвенной преципитирующей», утвержденной 03 11 1992 Главным управлением ветеринарии Минсельхозпрода РФ. Материалы диссертации использованы также при разработке ТУ 10-19 77-89 "Сыворотка сибирязвенная преципитирующая", утвержденных ГУВ Госагропрома СССР 05 05 1989

Предложенная схема гипериммунизации позволила уменьшить срок иммунизации лошадей на 26-30 дней, что упростило технологию производства и снизило материальные затраты. Кроме того, изъятие из производства капсулогенного сибирязвенного штамма М-71, обладающего достаточно высоким уровнем вирулентности резко снизило реактогенность применяемого антигена, исключило

возможность контаминации культурой данного капсулогенного штамма других биопрепаратов, которые изготавливают на тех же биопредприятиях, что и преципитирующую сибирезвенную сыворотку

Одновременно разработан способ изготовления стандартного сибирезвенного бактериального антигена, который изложен в «Инструкции по изготовлению и контролю антигена сибирезвенного бактериального стандартного», утвержденной ГУВ государственной комиссии Совмина СССР по продовольствию и закупкам 01 12 1989 года. Разработанный способ получения антигена исключает из производственного процесса вирулентную сибирезвенную культуру штамма ЗБК₂, заменив ее вакцинным штаммом 34F₂ или 55 ВНИИВВиМ

Материалы диссертации использованы также при разработке ТУ 10-09-26-89 "Антиген сибирезвенный бактериальный стандартный", утвержденных ГУВ Госкомиссии Совмина СССР по продовольствию и закупкам 01 12 1989

Апробация работы Основные результаты исследований доложены на

- Ученых Советах ФГУ ВГНКИ в 1989-1991 годах,
- конференциях молодых ученых ВИЭВ в 1989 г., ФГУ ВГНКИ, ВНИИВ-ВиМ в 1990 г.,
- XII Пленарном заседании Межведомственной научно-методической комиссии по борьбе с сибирской язвой при Минздраве СССР и Государственной комиссии Совмина СССР по продовольствию и закупкам в 1990 году (г. Ташкент)
- межлабораторном совещании научных сотрудников ВГНКИ в 2007 году

Публикация результатов исследований

Основные результаты исследований изложены в 8 печатных работах, опубликованных в сборниках научных трудов ФГУ ВГНКИ, Всероссийских конференций и в научных журналах. Зарегистрирован отчет по законченной теме «Разработать и внедрить промышленный способ изготовления преципитирующей сибирезвенной сыворотки с использованием вакцинных бескапсульных штаммов, усовершенствовать методы ее контроля», УДК 619 616 98 579 852 1 615 373 616 9-07, № гос регистрации 01910034968, Москва ВГНКИ, 1992 год

Объем и структура диссертации

Диссертационная работа изложена на 125 страницах машинописного текста и включает введение, обзор литературы, результаты собственных исследований, обсуждение результатов, выводы, практические предложения. Работа иллюст-

рирована 12 таблицами и 17 приложениями. Список литературы включает 165 источников, в том числе 84 работы зарубежных авторов

2. СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Материалы и методы

2.1.1 Материалы

В работе использовали 25 вирулентных и 8 вакцинных сибиреязвенных и 6 ложносибиреязвенных штаммов

При выполнении экспериментальной части работы были использованы лошади в возрасте от 3 до 6 лет массой не ниже 350 кг – 30 голов, кролики массой 2,5–3,0 кг – 106 голов

2.1.2. Методы

Изготовление антигенов для гипериммунизации лошадей-продуцентов преципитирующей сыворотки

Вегетативные культуры сибиреязвенных штаммов выращивали на гороховом агаре в термостате при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течение 20–22 ч. Смывали физиологическим раствором, доводили концентрацию микробных тел до 2,0–3,0 млрд в 1 см³ по оптическому стандарту мутности ГИСК им Л.А. Тарасевича

Полученный антиген (вегетативную культуру) проверяли на отсутствие контаминации посторонней микрофлорой, типичность морфологических, тинкториальных и культуральных свойств

После этого высевали микробные культуры в МПБ, МППБ под вазелиновым маслом, на МПА, агар Сабуро. Посевы инкубировали при температуре $37 \pm 1^\circ\text{C}$ (на агаре Сабуро – при 20–24 °C) в течение 10 суток

При наличии в мазках типичной грамтрицательной культуры, состоящей из крупных палочек и цепочек, типичного роста в МПБ в виде рыхлого белого осадка на дне пробирки без помутнения бульона, на МПА и агаре Сабуро в виде серовато-белых колоний с серебристым оттенком R и RO-форм, при отсутствии роста анаэробных культур в МППБ под вазелиновым маслом, сибиреязвенную культуру использовали для гипериммунизации лошадей

Гипериммунизация лошадей сибиреязвенным антигеном

Для создания грундинимунитета лошадей иммунизировали в/к и п/к споровой культурой штамма М-71 в нарастающих дозах от 0,3 до 20,0 см³, с концентрацией 1,0 млрд микр. клеток в см³. Интервал между первой и второй инъекциями антигена – 8 суток, между последующими – 3–4 дня

Антиген из вакцинных штаммов вводили лошадям внутривенно в нарастающих дозах от 5,0 до 70 см³, с концентрацией 2,0-3,0 млрд м клеток в см³ соответствующих вегетативных культур штаммов *B anthracis* Интервал между инъекциями – 3-4 дня

Получение сибиреязвенной преципитирующей сыворотки

Сыворотку от лошадей по окончании периода гипериммунизации (через 8-10 суток после введения последней дозы антигена) получали по следующей методике лошадей перед взятием крови, предварительно выдерживали 12 часов на голодной диете, не ограничивая водопой Затем животных термометрировали, и от имеющих нормальную температуру брали кровь из расчета 8,0 см³ на 1 кг массы продуцента в первое крововзятие и 14,0-16,0 см³ в последующие кровь собирали в градуированные стеклянные баллоны емкостью 15-20 литров Сыворотку получали цитратным методом, используя стерильный 10 % раствор лимоннокислого натрия с последующим сепарированием для отделения форменных элементов крови и дефибринацией плазмы

Из сепаратора отделившуюся плазму перекачивали в дефибринатор и для превращения фибриногена в фибрин к ней добавляли 30 %-ный раствор химически чистого хлористого кальция из расчета 1,3 см³ на 1 л плазмы

Перед окончанием дефибринации плазму подвергали консервированию раствором химически чистого фенола до конечной концентрации 0,5 % После перемешивания сыворотку вместе с фибрином оставляли в дефибринаторе на 18-20 часов, охлаждая до 12-16 °С Затем сыворотка поступала в отстойник, где она выдерживалась в течение 2-х месяцев при температуре 6-12 °С, после чего подвергалась грубой фильтрации Затем сыворотка поступала на стерилизующую фильтрацию Стерильная сыворотка накапливалась в баллоне-сборнике, из которого производилась расфасовка в стерильные флаконы Флаконы над пламенем закрывали стерильными резиновыми пробками и обкатывали алюминисевыми колпачками

Изготовление антигенов из бактериальной массы для использования в реакции преципитации Асcoli

Культуры сибиреязвенных и ложносибиреязвенных штаммов выращивали на МПА в матровых колбах в течение 18-20 ч при температуре (37±1) °С Бактериальную массу каждого штамма снимали с агара шпательем и высушивали при температуре (37±1) °С до постоянного веса

После этого высушенную бактериальную массу растирали в фарфоровой ступке в условиях стерильного бокса и полученный порошок переносили в бутылки, где заливали его физиологическим раствором из расчета 1 3000 – 1 5000 Экстрагирование проводили 24–48 ч при температуре $(40 \pm 2)^\circ\text{C}$, затем фильтровали через асбестовую вату, фасовали в ампулы по 1 см^3 , запаивали и автоклавировали в течение 30 мин при температуре 120°C

Изготовление антигенов из кожи и органов животных для реакции преципитации Асколи

Измельченные сухие кусочки кожи и органов (по 1-2 г) растирали в ступке с песком, переносили в цилиндр и заливали физиологическим раствором (с 0,3 % кристаллического фенола) в соотношении 1 10 и экстрагировали 18–24 ч при температуре $(20 \pm 2)^\circ\text{C}$

Затем проводили фильтрацию через асбестовую вату и полученные экстракты расфасовывали в ампулы по 1 см^3 , запаивали и автоклавировали в течение 30 мин при температуре 120°C

Постановка реакции преципитации по Асколи

В уленгутовскую пробирку наливали 0,2–0,3 см^3 прозрачной преципитирующей сыворотки. Если сыворотка оказывалась мутной, то ее предварительно фильтровали через асбестовую вату. Затем топкой настеровской пипеткой наслаивали (или подслаивали) равное количество исследуемого антигена (бактерийного, кожного или из органов), так, чтобы не перемешать компоненты и сохранить четко выраженную границу между ними.

Реакция считалась положительной, если на границе между компонентами в течение 2 мин появлялось тонкое беловатое кольцо преципитации, которое при покачивании пробирки хорошо видно.

Постановка реакции диффузионной преципитации (РДП) в агаровом геле

Реакцию ставили по методу Оухтерлони (1949), используя оборудование фирмы ЛКВ. В качестве геля применяли 1 %-ный агар Дифко, который готовили на физиологическом растворе. В специально подготовленные лунки закапывали (по 2-3 раза) компоненты реакции (дезинтеграты-антигены и сыворотки). Линия преципитации проявлялась достаточно четко уже через 24 часа. Линии идентичных серологических систем сливались, неидентичных – перекрещивались.

Постановка иммуноэлектрофореза (ИЭФ)

Реакцию ставили по методу Грабара и Уильямса (1953) на досках фирмы ЛКВ. Для постановки использовали 1 %-ный агар Дифко, приготовленный на фосфатном буферном растворе и ионной силой 0,1. Полосы преципитации после окраски довольно четко видны в зависимости от используемого дезинтеграта штамма

3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1 Изучение состава термостабильных преципитирующих антигенов у вирулентных и аттенуированных штаммов

При изучении состава преципитиногенов у штаммов *B. anthracis* нас интересовало также количественное их содержание у каждого штамма. Для определения состава преципитиногенов мы изучали их способность стимулировать образование антител в организме кроликов и реагировать с гомологичными антителами *in vitro* в РДП и иммуноэлектрофорезе. В качестве антигенов в РДП и иммуноэлектрофорезе использовали культуры штаммов *B. anthracis*, выращенные и обработанные для РП, дезинтеграты культур, а также коммерческий сибирезвенный бактериальный стандартный антиген.

С целью получения сывороток для РДП и иммуноэлектрофореза мы гипериммунизировали кроликов приготовленными антигенами (микробные дезинтеграты штаммов М-71, СТИ-1, 34F₂, Шуя-15, 55-ВНИИВВиМ).

Полученные антигены (дезинтеграты) вводили кроликам подкожно в нарастающих дозах 0,5, 1,0, 2,0, 3,0, 5,0 см³. Интервал между инъекциями составлял 4-6 суток. Через 7-9 суток после последнего введения антигена кроликов обескровливали и получали сыворотку.

С целью систематизации полученных данных полосы преципитации и соответствующие им антигены условно обозначали буквами А, Б, В, Г, Д, Е, Ж.

В таблице 1 отражены результаты постановки РДП и иммуноэлектрофореза.

Из данных таблицы 1 видно, что в РДП микробные дезинтеграты формировали с сыворотками от 4-х до 6-ти полос. Наиболее точно это было установлено с помощью иммуноэлектрофореза, так как в нем разделение компонентов реакции происходит в зависимости от электрофоретической подвижности, а в РДП пассивно.

С помощью иммуноэлектрофореза было установлено, что изученные сибирезвенные штаммы различаются по антигенному составу, но обладают преципитиногенами Б, В, Д, Е, Ж. Антиген А содержат все штаммы, кроме 34F₂. Антиген В

штаммы СТИ-1, Шуя-15, 34F₂ содержат в незначительном количестве Антиген Г выявлен у штаммов СТИ-1 и 55-ВНИИВВиМ У штамма 55-ВНИИВВиМ полоса преципитации Г формируется в реакции только с неразведенным дезинтегратором, т е антиген Г у штамма 55 содержится в незначительном количестве

Также было установлено, что стандартный сибирезвенный антиген соответствует полосе преципитации Б, которая идентична у всех изученных штаммов

Данные по составу преципитирующих антигенов у сибирезвенных штаммов огражены в таблице 2

После термической обработки антигенов (дезинтеграторов) путем автоклавирования при температуре 120°С в течение 1 ч, в РДП и ИЭФ было установлено, что образовывали только одну полосу преципитации Б со всеми сыворотками

Таблица 1

Результаты изучения состава преципитирующих антигенов *B anthracis* в реакции преципитации и иммуноэлектрофорезе

Сыворотки, полученные с использованием дезинтеграторов из штаммов <i>Bac anthracis</i>	Количество полос преципитации в РДП (числитель) и их идентификация в ИЭФ (знаменатель) при использовании антигенов					
	Дезинтеграторы сибирезвенных штаммов					Стандартный антиген
	М-71	СТИ-1	34F ₂	Шуя-15	55-ВНИИВВиМ	
Шт М-71	$\frac{6}{\text{АБ-ВДЕЖ}}$	$\frac{6}{\text{АБ-ВДЕЖ}}$	$\frac{5}{\text{БВДЕЖ}}$	$\frac{6}{\text{АБ-ВДЕЖ}}$	$\frac{6}{\text{АБ-ВДЕЖ}}$	$\frac{1}{\text{Б}}$
Шт СТИ-1	$\frac{6}{\text{АБ-ГДЕЖ}}$	$\frac{6}{\text{АБ-ГДЕЖ}}$	$\frac{4}{\text{БДЕЖ}}$	$\frac{5}{\text{АБ-ДЕЖ}}$	$\frac{6}{\text{АБ-ГДЕЖ}}$	$\frac{1}{\text{Б}}$
Шт 34F ₂	$\frac{4}{\text{БДЕЖ}}$	$\frac{4}{\text{БДЕЖ}}$	$\frac{4}{\text{БДЕЖ}}$	$\frac{4}{\text{БДЕЖ}}$	$\frac{4}{\text{БДЕЖ}}$	$\frac{1}{\text{Б}}$
Шт Шуя-15	$\frac{5}{\text{АБ-ДЕЖ}}$	$\frac{5}{\text{АБ-ДЕЖ}}$	$\frac{4}{\text{БДЕЖ}}$	$\frac{5}{\text{АБ-ДЕЖ}}$	$\frac{5}{\text{АБ-ДЕЖ}}$	$\frac{1}{\text{Б}}$
Шт 55-ВНИИВВиМ	$\frac{6}{\text{АБ-ВДЕЖ}}$	$\frac{6}{\text{АБ-ВДЕЖ}}$	$\frac{5}{\text{БВДЕЖ}}$	$\frac{6}{\text{АБ-ВДЕЖ}}$	$\frac{6}{\text{АБ-ВДЕЖ}}$	$\frac{1}{\text{Б}}$
Сыворотка сибирезвенная преципитирующая	$\frac{4}{\text{БДЕЖ}}$	$\frac{4}{\text{БДЕЖ}}$	$\frac{4}{\text{БДЕЖ}}$	$\frac{4}{\text{БДЕЖ}}$	$\frac{4}{\text{БДЕЖ}}$	$\frac{1}{\text{Б}}$

В дальнейшей работе были испытаны автоклавированные дезинтеграты 25 вирулентных сибирезвенных и 6 ложносибирезвенных штаммов. В результате работы наши предположения подтвердились, что все вирулентные сибирезвенные штаммы содержат идентичный термостабильный преципитирующий антиген. Б Ложносибирезвенные штаммы также содержат термостабильный преципитиноген, в РП дает положительную реакцию в течение 110-160 сек.

В результате проведенных исследований было установлено, что штаммы *B anthracis* как количественно, так и качественно различаются по антигенному составу, но обладают идентичным для всех штаммов термостабильным преципитирующим антигеном, на присутствии которого и основана реакция преципитации Асколи. Аналогичный термостабильный преципитиноген в существенно меньшем количестве имеют и ложносибирезвенные штаммы из рода *Bacillus*.

Таблица 2

Состав преципитиногенов у штаммов *B anthracis*

Штаммы	Антигены
СТИ-1	А Б В• Г Д Е Ж
55-ВНИИВВиМ	А Б В Г• Д Е Ж
Шуя-15	А Б В• - Д Е Ж
34F ₂	- Б В• - Д Е Ж
М-71	А Б В - Д Е Ж
Примечание	«•» - содержатся в незначительном количестве «-» - не содержит антигена

Из полученных данных следует, что для изготовления сибирезвенной преципитирующей сыворотки и антигена сибирезвенного бактериального стандартного могут быть использованы вакцинные бескапсульные штаммы *B anthracis*, так как в их составе всегда присутствует термостабильный преципитиноген, что в дальнейшем подтвердилось при разработке новых технологий получения сибирезвенных сывороточных препаратов.

3.2 Изучение возможности использования культуры вакцинного штамма антракса для изготовления преципитирующей сибирезвенной сыворотки

Главной задачей в настоящей работе являлось изучение возможности изготовления активной и специфичной преципитирующей сыворотки с использованием

для гипериммунизации лошадей-продуцентов одного вакцинного бескапсульного штамма *B anthracis* вместо четырех, один из которых был капсулообразующим

Работа проводилась на Тобольской биофабрике, где для получения преципитирующей сибирезвенной сыворотки были испытаны вегетативные культуры вакцинных бескапсульных штаммов

В опыт были взяты 30 лошадей, которых разделили на 3 группы, по 10 голов в каждой, 1-я и 2-я группы опытные, 3-я – контрольная. За 1 месяц до гипериммунизации всех лошадей-продуцентов иммунизировали против сибирской язвы вакциной из штамма 55-ВНИИВВиМ

Сибирезвенную преципитирующую сыворотку получали по трем различным схемам

В 1-ой и 2-ой группах было сокращено количество инъекций за счет исключения этапов гипериммунизации при создании грундинимунитета

По первой схеме (опытной) лошадей гипериммунизировали культурой одного бескапсульного вакцинного сибирезвенного штамма 55-ВНИИВВиМ (таблица 3). По второй схеме (опытной) лошадей гипериммунизировали культурами трех вакцинных бескапсульных сибирезвенных штаммов Шуя-15, № 94, № 916-1 (таблица 4)

По третьей схеме (контрольной) лошадей гипериммунизировали культурами четырех сибирезвенных штаммов М-71 (вакцинный капсульный), Шуя-15, 94, 916-1 (вакцинные бескапсульные) (таблица 5, 6)

В 3 группе (контрольной) гипериммунизация проходила в два этапа

Этап 1. Иммунизировали лошадей споровой культурой штамма М-71 для создания грундинимунитета

Таблица 3

Схема гипериммунизации лошадей культурой штамма 55-ВНИИВВиМ (схема №1)

Номер инъекции	1	2	3	4	5	6	7	8
Доза (см ³)	5	10	15	20	25	30	35	40
Номер инъекции	9	10	11	12	13	14	15	16
Доза (см ³)	45	50	55	60	60	60	70	70

Схема гипериммунизации лошадей культурами штаммов Шуя-15, 94, 916-1
(схема №2)

Номер инъекции	Доза (см ³)	Наименование антигена
1	5	Шуя-15
2	10	94
3	15	916-1
4	20	Шуя-15
5	25	94
6	30	916-1
7	35	Шуя-15
8	40	94
9	45	916-1
10	50	Шуя-15
11	55	94
12	60	916-1
13	60	Шуя-15
14	60	94
15	70	916-1
16	70	Шуя-15

Всего в каждой группе было сделано по 16 инъекций

Таблица 5

Схема гипериммунизации лошадей споровой культуры штамма М-71 (схема №3)

Номер инъекции	способ введения	Доза (см ³)
1	внутрикожно	0,3
2	внутрикожно	0,5
3	внутрикожно	1,0*
	подкожно	4,0
4	внутрикожно	1,0*
	подкожно	10,0
5	внутрикожно	2,0*
	подкожно	20,0

Примечание * - доза вводится в несколько точек

Этап 2 Продолжали гипериммунизацию лошадей внутривенно вегетативной культурой штаммов М-71, Шуя-15, 94, 916-1

Гипериммунизацию лошадей считали законченной, если положительная реакция преципитации со стандартным сибирязвенным антигеном наступала в период до 1 мин, а с экстрактами сибирязвенных кож до 2 мин

Схема гипериммунизации лошадей вегетативными культурами штаммов М-71, Шуя-15, 94, 916-1 (схема №3)

Номер инъекции	Доза (см ³)	Наименование антигена
6	5	Шуя-15
7	10	94
8	15	М-71
9	20	916-1
10	25	Шуя-15
11	30	94
12	35	М-71
13	40	916-1
14	45	Шуя-15
15	50	94
16	55	М-71
17	60	916-1
18	60	Шуя-15
19	60	94
20	70	М-71
21	70	916-1

В результате проведенной работы было установлено, что преципитины начинают появляться в крови продуцентов только после шестой инъекции антигена, а после 16-ой инъекции (схемы 1, 2) и 21-ой (схема 3) у большинства продуцентов сыворотка достигает необходимого уровня активности. Применение схем № 1 и 2 значительно сократило цикл гипериммунизации лошадей. Результаты активности и специфичности сывороток, полученных по схемам №№ 1, 2, 3 отражены в таблице 7.

Анализируя данные таблицы 7 было установлено, что сыворотка, полученная по схеме № 1 с использованием для гипериммунизации продуцентов культуры одного вакцинного бескапсульного штамма 55-ВНИИВВиМ, не уступает по активности и специфичности сывороткам, изготовленным по схемам №3 (контрольной) и № 2, а также коммерческим серийным препаратам (контрольные преципитирующие сыворотки).

В этом опыте подтвердилось, что микробы ложносибирезвенных штаммов имеют идентичный термостабильный преципитирующий антиген, так как приготовленные из них автоклавированные антигены (исключение *B subtilis*) положительно реагировали в реакции преципитации Асколи с опытными и контрольными преципитирующими сыворотками.

Однако, при этом время появления реакции в 4 – 6 раз дольше, чем при постановке реакции Асколи с сибиреязвенными антигенами, что свидетельствует о меньшем количестве гермостабильного антигена

3.3 Изучение активности и специфичности преципитирующей сибиреязвенной сыворотки в процессе хранения

Срок годности является важнейшим показателем качества биологических препаратов. Преципитирующая сибиреязвенная сыворотка считается пригодной для практического использования в течение трех лет со дня изготовления (днем изготовления считают день окончания расфасовки во флаконы). Этот срок установлен по результатам проверки активности и специфичности указанного препарата в течение данного отрезка времени.

Активность и специфичность преципитирующей сыворотки определяли после изготовления и через 1,5, 2,5, 3,5 года хранения при температуре 10-15 °С по общепринятому методу. В результате испытаний установлено, что активность и специфичность преципитирующих сывороток практически не изменилась в течение 3,5 лет хранения (время образования кольца преципитации увеличилось на 5-10 секунд).

Таким образом, было установлено, что преципитирующая сибиреязвенная сыворотка, полученная с использованием одного вакцинного бескапсульного штамма 55-ВНИИВВиМ, сохраняет свою активность и специфичность в течение 3,5 лет и не уступает по этим показателям коммерческому препарату.

Основываясь на результатах, полученных при изучении антигенной структуры *B. anthracis*, а также при разработке усовершенствованного способа изготовления сибиреязвенной преципитирующей сыворотки нами были внесены изменения в технологическую инструкцию по изготовлению и контролю этого препарата.

Таким образом, разработан новый способ изготовления сибиреязвенной преципитирующей сыворотки, позволяющей получать достаточно активный и специфичный препарат без применения капсульного штамма возбудителя сибирской язвы. Исключение из технологии капсульного штамма существенно сокращает материальные и трудовые затраты на производство преципитирующей сыворотки за счет значительного сокращения цикла гипериммунизации лошадей (в среднем на 26 дней), одновременно устраняя возможность контаминации противосибиреязвенной вакцины культурой капсульного штамма (были случаи на Орловской и Тобольской биофабриках), обладающего остаточной вирулентностью.

Активность и специфичность сибирезвенной преципитирующей сыворотки
полученной по разным схемам гипериммунизации

Схемы получения сывороток и использованные штаммы	Результаты проверки активности и специфичности сывороток в реакции преципитации Асколи (секунды) с антигенами								
	Сибирезвенный бактериальный стандартной серии			Кожные положительные от животных, павших от сибирской язвы			Положительные из органов павших от сибирской язвы		
	6	12	13	овца	коза	КРС	селезенка	почка	печень
№1 55-ВНИИВВиМ	25	30	25	45	50	50	35	40	40
№2 Шуя-15, 94, 916-1	35	25	30	55	60	50	45	45	45
№3 М-71, Шуя-15, 94, 916-1	30	30	25	50	45	55	35	40	40
Коммерческая сыворотка сер 18	25	30	25	50	50	50	40	45	40
Коммерческая сыворотка сер 20	30	25	35	50	55	55	40	45	45
Коммерческая сыворотка сер 27	25	30	30	50	55	55	40	45	45
Коммерческая сыворотка сер 32	35	30	35	60	60	55	35	40	40

Продолжение таблицы 7

	Кожные отрицательные от здоровых животных			Ложносибиреязвенные микробы (антигены изготовлены по прописи стандартного сибиреязвенного бактериального антигена)					
	Овца	Коза	КРС	B cereus	B anthracoides	B pseudoanthracis	B mesentericus	B megaterium	B subtilis
№1 55-ВНИИВВиМ	Отр	Отр	Отр	120	100	Отр	55	140	Отр
№2 Шуя-15, 94, 916-1	Отр	Отр	Отр	110	100	Отр	50	140	Отр
№3 М-71, Шуя-15, 94, 916-1	Отр	Отр	Отр	120	120	Отр	55	160	Отр
Коммерческая сы- воротка сер 18	Отр	Отр	Отр	115	115	Сомнит	60	160	Отр
Коммерческая сы- воротка сер 20	Отр	Отр	Отр	110	100	Сомнит	55	160	Отр
Коммерческая сы- воротка сер 27	Отр	Отр	Отр	120	115	Отр	50	155	Отр
Коммерческая сы- воротка сер 32	Отр	Отр	Отр	120	110	Отр	60	160	Отр

Высокое качество опытно-промышленной серии сибирезвенной преципитирующей сыворотки, полученной и использованием вакцинного бескапсульного штамма 55-ВНИИВВиМ, было установлено в результате производственных и комиссионных испытаний

Технология изготовления данного биопрепарата была внедрена в биологическое производство

3.4. Изучение возможности использования культуры вакцинного штамма антракса для изготовления стандартного сибирезвенного бактериального антигена

При изучении состава преципитирующих антигенов у вирулентных и аттенуированных штаммов возбудителя сибирской язвы было установлено, что все изученные штаммы обладают идентичным термостабильным преципитирующим антигеном, на присутствии которого и основана реакция Асколи. При подборе вакцинного сибирезвенного штамма для изготовления преципитирующего антигена мы исследовали следующие штаммы М-71 (капсульный), СТИ-1, Шуя-15, 94, 916-1, 34F₂, 55-ВНИИВВиМ (два последних после автоклавирования давали в РДП наиболее четкую полосу преципитации)

Полученные таким методом антигены проверяли на активность (с 93 сериями преципитирующей сыворотки) и специфичность. Для сравнения использовали коммерческий стандартный сибирезвенный бактериальный антиген, изготовленный по аналогичной методике из вирулентного штамма антракса ЗБК₂

В результате проверки установлено, что преципитирующие антигены, изготовленные из вакцинных бескапсульных сибирезвенных штаммов не уступают по активности и специфичности коммерческому антигену из вирулентного штамма ЗБК₂ (44,9±0,7 сек), при этом наиболее активными оказались антигены, изготовленные из штаммов 34F₂ (40,5±0,7 сек) и 55-ВНИИВВиМ (40,3±0,9 сек)

Этой работой были подтверждены данные, полученные при изучении антигенной структуры сибирезвенных штаммов о том, что все изученные нами штаммы содержат идентичный термостабильный преципитирующий антиген, количество которого незначительно варьирует у разных штаммов. Вакцинные бескапсульные штаммы 34F₂ и 55-ВНИИВВиМ были отобраны и предложены для производства стандартного сибирезвенного бактериального антигена на био-

предприятиях, так как у этих штаммов преципитирующий антиген находится в наибольшем количестве, так как в РДП антигены из этих образовывали наиболее четкие линии преципитации

3.5. Активность и специфичность опытно-промышленных серий антигена сибирезвеного бактериального стандартного, изготовленных из культур вакцинных бескапсульных штаммов 34F₂ и 55-ВНИИВВиМ.

В дальнейшем на Тобольской биофабрике были изготовлены опытно-промышленные серии сибирезвеного антигена из штаммов 34F₂ и 55-ВНИИВВиМ, которые были испытаны в производственных условиях в сравнении с коммерческим препаратом. В результате проведенных исследований установлено, что опытно-промышленные серии сибирезвеного антигена изготовленные из штаммов 34F₂ и 55-ВНИИВВиМ не уступают по активности (с 15 сериями преципитирующей сыворотки) и специфичности коммерческим биофабричным сериям данного препарата. Время образования кольца преципитации с опытными антигенами составляло 35,0±0,8 сек

В соответствии с приказом Главного управления ветеринарии Госагропрома СССР № 49 от 12.06.1989 г на базе Центральной ветлаборатории были проведены комиссионные испытания с целью определения активности и специфичности опытно-промышленных серий антигена сибирезвеного бактериального стандартного, изготовленных из культур вакцинных бескапсульных штаммов 34F₂ и 55-ВНИИВВиМ

Испытанию были подвергнуты антиген сибирезвеного бактериальный стандартный сер №1 из штамма 34F₂, а также коммерческие серии (всего 5 серии) антигена, изготовленного из вирулентного штамма ЗБК₂

Результаты комиссионных испытаний показали, что антиген, изготовленный из вакцинных бескапсульных штаммов антракса по показателям активности и специфичности не уступает коммерческому препарату, изготовленному из вирулентного капсулогенного сибирезвеного штамма ЗБК₂. Время образования кольца преципитации наступало в течение 15-20 сек

На основании полученных результатов комиссия сделала следующие выводы: опытно-промышленные серии антигенов, изготовленные из вакцинных бескапсульных штаммов 55-ВНИИВВиМ и 34F₂, не уступают по активности и специфичности коммерческим сериям антигена, изготовленного из культуры ви-

рулентного штамма ЗБК₂ Стандартный сибирезвенный бактериальный антиген может изготавливаться как из штамма 55-ВНИИВВиМ, так и из штамма 34F₂ Такая технология получения антигена внедрена в биофабричное производство, препарат применяется в ветеринарной практике для контроля активности сибирезвенной сыворотки

3.6 Изучение активности и специфичности стандартного сибирезвенного бактериального антигена в процессе хранения

Стандартный сибирезвенный бактериальный антиген, изготовленный по утвержденной методике, считается пригодным для практического использования в течение 3-х лет со дня изготовления Этот срок был установлен опытным путем по результатам проверки активности и специфичности препарата в течение различных сроков хранения

Активность и специфичность антигена определяли непосредственно после его изготовления и через 1,5, 2,5, 3,5 года хранения при температуре 10-15⁰С по общепринятому методу В результате испытаний установлено, что активность опытно-промышленных серий антигенов практически не изменилась в течение 3,5 лет хранения (время образования кольца преципитации увеличилось на 10-15 сек)

Таким образом, стандартный сибирезвенный бактериальный антиген, полученный из вакцинного бескапсульного штамма 55-ВНИИВВиМ или 34F₂ сохраняет свою активность в течение 3,5 лет и не уступает по этим показателям коммерческому препарату, изготовленному из вирулентного штамма ЗБК₂

Получение стандартного преципитирующего антигена из вакцинного бескапсульного сибирезвенного штамма взамен вирулентного позволяет исключить возможность заражения сибирской язвой людей, участвующих в производстве, контаминации окружающей среды споровой формой возбудителя болезни, а также контаминации вирулентной культурой антракса биопрепаратов, которые готовят на тех же предприятиях, и в целом существенно упрощает технологию изготовления препарата

На способ получения антигена сибирезвенного бактериального стандартного разработана и утверждена постоянная нормативная документация

- «Инструкция по изготовлению и контролю антигена сибирезверного бактериального стандартного», утверждена ГУВ Госкомиссии Совмина СССР по продовольствию и закупкам 01 12 1989 г

- «Технические условия (ТУ 10-09-26-89) «Антиген сибирезверный бактериальный стандартный», утверждены ГУВ Госкомиссии Совмина СССР по продовольствию и закупкам 01 12 1989 г

В 1989 г предложенная нами технология изготовления антигена сибирезверного бактериального стандартного внедрена на Тобольской, а с 1994 г на Орловской биофабриках, где ее и применяют по настоящее время

Исследования по разработке нового способа изготовления антигена сибирезверного бактериального стандартного выполнены в соответствии с планом НИР ВГНКИ ветпрепаратов по заданию 02 04 07 Д НТП 0 сх 68 Госагропрома СССР во ВГНКИ ветпрепаратов и на Тобольской биофабрике в период с 1988 – 1992 г г

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Работу по совершенствованию способов изготовления преципитирующей сибирезверной сыворотки и стандартного сибирезверного бактериального антигена необходимо было провести, базируясь на сравнительном изучении антигенной структуры вирулентных и аттенуированных (вакцинных) сибирезверных штаммов, преимущественно при определении наличия растворимых белковых преципитиногенов

Антигенную структуру *B anthracis* изучали в РДП и иммуноэлектрофорезе. В качестве антигенов использовали нативные и автоклавированные дезинтеграты микробов разных сибирезверных и ложносибирезверных штаммов. В результате удалось получить активные в антигенном отношении препараты. В реакциях использовали также и коммерческий стандартный сибирезверный (преципитирующий) антиген.

В перекрестных реакциях диффузионной преципитации в агаровом геле (РДП) и иммуноэлектрофорезе (ИЭФ) было установлено, что все взятые сибирезверные штаммы (34F₂, 55-ВНИИВВиМ, М-71, СТИ-1, Шуя-15) отличаются по антигенному составу и содержат от пяти до семи растворимых преципитиногенов. Методом иммуноэлектрофореза было также установлено, что антиген Б идентичен и содержится у всех изученных штаммов и соответствует стандарт-

ному сибиреязвенному антигену. При постановке РДП и ИЭФ с автоклевированными дезинтегратами 25-ти вирулентных сибиреязвенных штаммов было подтверждено, что все они имеют один идентичный термостабильный преципитирующий антиген, аналогичный коммерческому бактериному антигену (Б), который в основном участвует в реакции преципитации Асколи. Этот же преципитиноген (Б) имеют и другие представители рода *Bacillus*, кроме *B. subtilis*.

Полученные данные позволили сделать вывод, что для изготовления диагностических препаратов (преципитирующая сыворотка и стандартный бактериный антиген) могут быть использованы бескапсульные вакцинные сибиреязвенные штаммы, так как все они содержат идентичный термостабильный преципитиноген - «Б». Для реализации этой идеи на Тобольской биофабрике была получена преципитирующая сыворотка по 3-м схемам гипериммунизации с использованием в качестве антигенов одного бескапсульного вакцинного штамма (55-ВНИИВВиМ), трех бескапсульных вакцинных штаммов (Шуя-15, 94, 916-1), контрольная схема – предусматривающая использование одного капсульного (М-71) и трех бескапсульных вакцинных сибиреязвенных штаммов (Шуя-15, 94, 916-1).

Сравнительные испытания полученных препаратов показали, что преципитирующая сыворотка, изготовленная с использованием штамма 55-ВНИИВВиМ по активности и специфичности не уступает сывороткам, изготовленным по двум другим схемам гипериммунизации.

Таким образом, данные о идентичности термостабильного преципитиногена у различных вирулентных и авирулентных штаммов *B. anthracis* позволили предложить новую технологию изготовления сибиреязвенной преципитирующей сыворотки с использованием в качестве антигена для гипериммунизации продуцентов одного вакцинного штамма 55-ВНИИВВиМ. Новая технология позволила значительно сократить цикл гипериммунизации лошадей (в среднем на 26 дней) за счет исключения из схемы гипериммунизации штамма М-71, а также существенно снизить трудовые и материальные затраты при производстве препарата.

Высокая специфическая активность преципитирующей сыворотки, изготовленной по новой технологии, с использованием штамма 55-ВНИИВВиМ под-

тверждена при производственных и комиссионных испытаниях ее опытно-промышленных образцов

Для определения сроков годности преципитирующей сыворотки, изготовленной по новой технологии была испытана ее активность и специфичность в сравнении с коммерческой сывороткой непосредственно после изготовления, также через 1,5, 2,5, 3,5 года (срок наблюдения) хранения при температуре 10-15 °С. В результате испытаний было установлено, что активность и специфичность преципитирующей сыворотки практически не снизилась за 3,5 года хранения при избранном температурном режиме

Технология изготовления сибирезвеной преципитирующей сыворотки с использованием вакцинного бескапсульного штамма 55-ВНИИВВиМ внедрена в 1992 года на Тобольской биофабрике, а с 1994 года - используется Орловской биофабрикой, где и применяется по настоящее время

Для изготовления стандартного сибирезвеного бактериального антигена было использовано 7 вакцинных штаммов М-71 (капсульный), СТИ-1, Шуя-15, 94, 916-1, 34F₂ и 55-ВНИИВВиМ – бескапсульные. Из культур этих штаммов по действующей технологической инструкции были изготовлены преципитирующие антигены, которые были испытаны в сравнении с коммерческим препаратом (изготовлен из вирулентного сибирезвеного штамма ЗБК₂). Было замечено, что штаммы 34F₂ и 55-ВНИИВВиМ продуцируют термостабильный преципитиноген в существенно большем количестве и антигены из этих штаммов образуют кольцо преципитации в реакции Асколи быстрее, чем антигены из других штаммов. В дальнейшем штаммы 34F₂ и 55-ВНИИВВиМ были рекомендованы для изготовления стандартного преципитирующего антигена на биопредприятиях (Можно использовать как первый, так и второй штамм)

Для определения сроков годности опытно-промышленных серий антигенов изготовленных из вакцинных бескапсульных сибирезвеновых штаммов была испытана их активность и специфичность в сравнении с коммерческим антигеном непосредственно после изготовления и через 1,5, 2,5, и 3,5 года хранения при температуре 10-15 °С. В результате испытаний было установлено, что активность и специфичность опытно-промышленных серий антигенов практически не снизилась за 3,5 года хранения

При производственных и комиссионных испытаниях опытно-промышленные серии антигена сибиреязвенного бактериального стандартного, изготовленного из вакцинных штаммов 34F₂ и 55-ВНИИВВиМ были признаны удовлетворяющими существующим требованиям по показателям активности и специфичности. На стандартный бактериальный антиген разработана и утверждена постоянно действующая документация. Новая технология изготовления антигена внедрена в практику биологической промышленности и использовалась на Тобольской биофабрике, а с 1992 г. и по настоящее время на Орловской биофабрике.

Замена вирулентного штамма возбудителя сибирской язвы на вакцинный бескапсульный штамм при производстве стандартного бактериального антигена позволило упростить технологию изготовления препарата (исключение этапа обезвреживания сибиреязвенной бакмассы), а также полностью исключить риск заражения работников биопредприятий сибирской язвой.

Таким образом, нами разработаны и внедрены в практику биологической промышленности новые технологии изготовления преципитирующей сибиреязвенной сыворотки и стандартного сибиреязвенного бактериального антигена на основе использования бескапсульных авирулентных вакцинных штаммов, что позволило сделать производство сибиреязвенных диагностических препаратов эпидемиологически и экологически безопасным.

За истекший период изготовлено и реализовано во все регионы Российской Федерации преципитирующей сибиреязвенной сыворотки - 23 580 литров, стандартной сибиреязвенного бактериального антигена - 1 305 литров.

ВЫВОДЫ

1 Установлено, что штаммы сибиреязвенных микроорганизмов капсульные - вирулентные и бескапсульные - вакцинные обладают общим идентичным термостабильным антигеном, который вступает в реакцию преципитации (реакция Асколи) со специфической сибиреязвенной сывороткой.

2 Разработана, испытана и внедрена в практику схема гипериммунизации лошадей-продуцентов преципитирующей сибиреязвенной сыворотки с использованием в качестве антигена культуры вакцинного бескапсульного штамма 55-ВНИИВВиМ.

3 Разработана, испытана и внедрена в практику технология изготовления стандартного сибиреязвенного бактериального антигена на основе применения бескапсульного вакцинного штамма (55-ВНИИВВиМ или 34F₂)

4 Преципитирующая сибиреязвенная сыворотка и стандартный сибиреязвенный бактериальный антиген, изготовленные по новой технологии, не уступают по активности и специфичности коммерческим образцам указанных препаратов

5 Активность и специфичность преципитирующей сибиреязвенной сыворотки и стандартного бактериального антигена, изготовленных с использованием авирулентных вакцинных бескапсульных штаммов практически не изменилась в процессе их хранения в течение 3,5 лет (срок наблюдения)

6 Замена производственных вирулентных капсульных штаммов на авирулентные вакцинные полностью исключают возможность заражения людей, контаминацию окружающей среды капсульными культурами *B anthracis* и имеет важное социальное, экологическое и экономическое значение

ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ.

Предлагается применять на биопредприятиях новые способы получения преципитирующей сибиреязвенной сыворотки и стандартного сибиреязвенного бактериального антигена на основе использования авирулентных вакцинных штаммов, вместо вирулентных капсулогенных штаммов

Разработана и утверждена в установленном порядке нормативная документация

- Инструкция по изготовлению и контролю антигена сибиреязвенного бактериального стандартного, утверждена ГУВ Госкомиссии Совмина СССР по продовольствию и закупкам 01 12 1989г

- ТУ 10-09-26-89 Антиген сибиреязвенный бактериальный стандартный, утверждены ГУВ Госкомиссии Совмина СССР по продовольствию и закупкам 01 12 1989 г

- Временная инструкция по изготовлению и контролю сыворотки сибиреязвенной преципитирующей, утверждена директором ВГНКИ 30 12 1990 г

- ТУ 10 19 77-89 Сыворотка сибиреязвенная преципитирующая, утверждены ГУВ Госагропрома СССР 05 05 1989 г

- Инструкция по изготовлению и контролю сыворотки сибиреязвенной преципитирующей, утверждена ГУВ МСХ и продовольствия РФ 03 11 1992 г

- Изменения в инструкцию по изготовлению и контролю сыворотки сибирезвенной преципитирующей, утверждены директором ВГНКИ 30 12 1994 г

- Извещение №1 об изменении ТУ 10 19 77-89, утверждено директором ВГНКИ 30 12 1994 г

Список научных работ опубликованных по теме диссертации.

1 Шморгун Б И Изготовление сибирезязвенного антигена из вакцинных бескапсульных штаммов / Сб науч трудов ВИЭВ – М – 1989 – с 17-18

2 Шморгун Б И , Маничев А А Использование авирулентных сибирезязвенных штаммов для изготовления сибирезязвенного бактериального антигена / Сб науч трудов ВГНКИ - М – 1990 - с 21 – 22

3 Шморгун Б И , Маничев А А Изучение состава термостабильных преципитиногенов у возбудителя антракса / Межвед Научно-метод Комиссия по борьбе с сибирской язвой – Ташкент – 1990 с 79 – 80

4 Шморгун Б И , Маничев А А Использование вакцинных штаммов В anthracis для изготовления стандартного сибирезязвенного бактериального антигена / «Ветеринария», 1991 - №7 - с 30-32

5 Шморгун Б И , Маничев А А Усовершенствованный способ изготовления преципетирующей сибирезязвенной сыворотки / «Ветеринария», 1995 - №1 - с 30-34

6 Маничев А А , Шморгун Б И Сравнительное изучение антигенной структуры разных штаммов возбудителя штамма сибирской язвы / Сб науч трудов ВГНКИ - М – 1995 - с 147 – 157

7 Маничев А А , Ипатенко Н Г , Саленко Л С , Шморгун Б И Динамика накопления сибирезязвенного гермостабильного антигена в организме кроликов, вакцинированных против сибирской язвы и инфицированных / Сб науч трудов ВГНКИ - М – 1996 - с 82 – 86

8 Ипатенко Н Г , Шморгун Б И , Саленко Л С Компоненты для реакции преципитации при сибирской язве / «Ветеринария», 1999 - №10 - с 15 - 17

ФГУ ВНИИВСГЭ
Москва, Звенигородское ш , 5
Заказ 238/6 Тираж 100 экз