

На правах рукописи

Зверев Дмитрий Сергеевич

ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОЛИЧЕСТВА ЖИВЫХ МИКРОБНЫХ КЛЕТОК
В ПРОТИВОБРУЦЕЛЛЕЗНЫХ ВАКЦИНАХ
БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНЫМ МЕТОДОМ

16.00.03 - ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология,
микология с микотоксинологией и иммунология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой
степени кандидата биологических наук



МОСКВА 2008

Работа выполнена в лаборатории качества и стандартизации лекарственных средств против хронических болезней животных Федерального государственного учреждения «Всероссийский государственный Центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов» (ФГУ «ВГНКИ») и на кафедре химической энзимологии химического факультета МГУ им. М. В. Ломоносова.

Научный руководитель: доктор ветеринарных наук, доцент
Скляр О.Д.

Научный консультант: кандидат химических наук, доцент
Фрунджан В. Г.

Официальные оппоненты: доктор биологических наук
Телишевская Л.Я.

доктор биологических наук
Бедоева З.М.

Ведущая организация: Федеральный центр токсикологической и радиационной безопасности животных - Всероссийский научно-исследовательский ветеринарный институт (ФГУ «ФЦТРБ - ВНИВИ»), г. Казань

Защита состоится «19» марта 2009 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») по адресу: 123022, г. Москва, Звенигородское шоссе, д. 5, тел/факс 253-14-91.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГУ «ВГНКИ».

Автореферат разослан «04» декабря 2008 г.

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


Ю.А. Козырев

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. В России для борьбы с бруцеллезом животных проводится комплекс организационно-хозяйственных и ветеринарно-санитарных мероприятий, успех которых во многом определяется применением средств специфической профилактики, преимущественно живых сухих вакцин (Иванов М.М., 1977).

Количество жизнеспособных микробных клеток определяет количество иммунизирующих доз в конкретном объеме вакцины, а их количество в дозе, наряду со свойствами штаммов - ее иммуногенность. В связи с этим, контроль выживаемости бруцелл в живых бруцеллезных вакцинах осуществляют на предприятии-производителе при их выпуске, а также в ФГУ «ВГНКИ» в порядке проведения контроля за сертифицированной продукцией в процессе хранения (Апсите А.Ф., 1968; Опарин Ю.Г. и др., 1996; Пучков Е.О., Говорухов И.Г., 1983; Antheunise J. et al., 1981; Bousfield I.J., Mackensie A.R., 1976). В настоящее время это делают с помощью культурального (чашечного) метода, определяя количество живых бруцелл - колониеобразующих единиц (КОЕ) по числу колоний бруцелл, выросших на плотной питательной среде, и биохимического метода, оценивая дегидрогеназную активность живых бруцелл с использованием метиленового синего. Культуральный метод является трудоемким, и позволяет получить результат через 4 - 5 суток, а с учетом предварительной проверки ростовых свойств питательной среды этот срок увеличивается еще в 2,5 раза. Биохимический метод проще по воспроизведению, время анализа занимает до 5-6 часов. Однако результаты исследований, полученные с помощью указанных методов, не всегда коррелируют (Баландин Г.А., Сазыкин С.П., 1963), что обусловлено, в первую очередь, визуальной оценкой результатов биохимического теста.

В связи с этим, в биотехнологических производствах все шире используют ускоренные (косвенные) методы определения титра жизнеспособных клеток. По данным литературы среди большого разнообразия методов, используемых для этих целей, весьма перспективными являются методы, осно-

ванные на определении содержания различных внутриклеточных или внеклеточных метаболитов, в первую очередь, внутриклеточного аденозинтрифосфата (АТФ). АТФ - универсальный внутриклеточный метаболит, который содержится в относительно высоких концентрациях в любых живых микро- и макроорганизмах. Его количество с большой точностью можно определить при помощи биолюминесцентного метода даже при ультра малом содержании в образце - до 10^{-14} - 10^{-15} моль/кювета люменометра (Дементьева В.И. и др., 1999; Cousins С.М. et al., 1981). После гибели клеток содержание АТФ, в отличие от других внутриклеточных метаболитов, резко снижается в течение нескольких секунд (Gibson D.M., 1987). Таким образом, по содержанию внутриклеточного АТФ в анализируемом образце можно судить о наличии в нем, в количественном выражении, живых клеток, что представляет практический интерес при проведении контроля живых вакцин при выпуске организацией-производителем или в процессе их хранения, а также при оценке качества бактериальной массы, подвергшейся стрессовым воздействиям (замораживание-оттаивание, лиофилизация и др.).

С учетом вышеизложенного разработка методики экспресс определения количества жизнеспособных микробных клеток в бруцеллезных вакцинах, основанной на применении биолюминесцентного метода, представляется актуальной.

Цель работы. Разработать методику определения количества живых бактерий в бруцеллезных вакцинах, основанную на использовании биолюминесцентного метода.

Основные задачи исследования:

1. Оптимизировать порядок подготовки образцов нативных и лиофилизированных культур бруцелл для измерения концентрации внутриклеточного АТФ.

2. Установить оптимальные параметры определения количества живых микробных клеток в суспензиях нативных и лифилизированных культур бруцелл биолюминесцентным методом.

3. Провести сравнительное исследование методик определения живых

бруцелл на основе биолюминесцентного и культурального методов с использованием коммерческих серий бруцеллезных вакцин.

4. Разработать методические рекомендации по определению количества живых бактерий в бруцеллезных вакцинах с использованием биолюминесцентного метода.

Научная новизна. Впервые изучены и определены оптимальные параметры пробоподготовки, установлены возможность и порядок определения количества живых бруцелл разных видов в составе бруцеллезных вакцин или бактериальных суспензий биолюминесцентным методом.

Практическая значимость. Применение биолюминесцентного метода для определения количества живых бруцелл позволяет:

- сократить время контроля выживаемости бруцеллезных вакцин в 5-10 раз, в сравнении с культуральным методом, исключив применение при этом использование питательных сред;

- значительно уменьшить контакт технического персонала биоприятий с вакциной, предохранив его тем самым от сенсibilизации и аллергии.

Апробация полученных результатов. Основные материалы диссертации доложены и получили положительную оценку на 5-ой Межрегиональной научно-практической конференции «Актуальные проблемы ветеринарной медицины продуктивных и непродуктивных животных» (Омск, 2006г.), конференциях молодых ученых ФГУ «ВГНКИ» «Лекарственные средства для животных и корма. Современное состояние и перспективы» (Москва, 2006, 2007г.), заседаниях ученого совета ФГУ «ВГНКИ» (Москва, 2004, 2005, 2006, 2007 гг.).

Положения, выносимые на защиту:

- оптимизация подготовки образцов нативных и лиофилизированных культур бруцелл для измерения концентрации внутриклеточного АТФ;

- разработка порядка определения количества жизнеспособных клеток в бруцеллезных вакцинах биолюминесцентным методом;

- анализ результатов сравнительного изучения выживаемости микробных клеток в бруцеллезных вакцинах биолюминесцентным и культуральным методами.

Публикация результатов исследований. По теме диссертационной работы опубликовано 4 научные статьи, в том числе 2 - в изданиях, рецензируемых ВАК РФ.

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 92 страницах машинописного текста и включает введение, обзор литературы, собственные исследования, результаты собственных исследований, обсуждение результатов, выводы, практические предложения, список литературы и приложения. Работа иллюстрирована 14 таблицами, 4 схемами.

2. СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

2. 1. Материалы и методы

Бруцеллезные препараты. В работе использованы 454 образца 36 серий четырех вакцин:

- против бруцеллеза сельскохозяйственных животных из штамма № 19 живая сухая; выпускается по 4 см³ в стерильных ампулах или по 4-6 см³ во флаконах вместимостью 20 см³, погрешность фасовки ± 3 %;

- против бруцеллеза из слабоагглютиногенного штамма *B.abortus* № 82 живая сухая; выпускается по 2-8 см³ во флаконах вместимостью 20 см³, погрешность фасовки ± 3 %;

- против бруцеллеза крупного рогатого скота из штамма *B.abortus* 75/79 - АВ живая сухая, изготовленные ФГУП «Щелковский биокомбинат»; выпускается по 4-8 см³ во флаконах вместимостью 20 см³, погрешность фасовки ± 3 %;

- против бруцеллеза овец и коз и инфекционного эпидидимита баранов из штамма *B. melitensis* Rev-1 живая сухая, производства ООО «Агровет»; выпускается по 2 см³ или 4 см³ во флаконах, погрешность фасовки ± 3 %.

Питательные среды. Мясо-пептонный печеночный глюкозо-глицериновый агар (МПППГА); триптозный агар М 097 (основа триптозного

кроваго агара фирмы «HIMEDIA», Индия).

Растворы. Физиологический раствор хлорида натрия (NaCl - 0,85 %, pH = 6,8-7,0); разбавитель для сухих бруцеллезных вакцин; маточные растворы неонала - 10, 20 и 30 % (рабочие растворы 10, 15, 20 %).

Реактивы и реагенты. АТФ-реагент «МИКРОЛЮМ» (Химический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова), содержащий иммобилизованную люциферазу светляков, D-люциферин, MgCl₂, компоненты буферной системы, стабилизаторы; водный раствор АТФ («Мегск», Германия), приготовленный по точной навеске с концентрацией 10⁻⁶ моль/мл; свежеперегранный диметилсульфоксид ДМСО («Реахим», Россия); аминокептид («ЗМП», Россия).

Аппаратура. Люминометр «Биотокс-10М» (ОАО «НЕРА-С», Россия); центрифуга с охлаждением «Beckman» (Германия); низкотемпературный холодильник; стерильный бокс/ламинар; установка Milli-Q для получения деионизированной воды («Millipore», Франция); термостат ТС-80М-2 (Россия).

Концентрацию бруцелл в суспензиях после регидратирования вакцин определяли по оптическому стандарту мутности ГНИИСК им. Л.А. Тарасевича на 10 ЕД (1,65 млрд. микрб. кл./ мл).

Экспериментальную часть работы проводили в соответствии положениями действующих НД на бруцеллезные вакцины и с учетом рекомендаций ФАО/ВОЗ, по изучению штаммов бруцелл и бруцеллезных вакцин.

Количество живых бруцелл в суспензиях и вакцинах определяли двумя методами: культуральным (чашечным) и биолюминесцентным. Каждый образец исследовали в трех повторностях.

При определении количества живых бруцелл культуральным методом, сухую вакцину в трех флаконах ресуспендировали разбавителем или физиологическим раствором до первоначального объема, содержимое каждого из них переносили в три другие флакона, в которые предварительно было налито по 36-72 см³ (в зависимости от объема фасовки вакцины) стерильного разбавителя или физиологического раствора, получая, таким образом, разведение 1:10, и помещали в холодильник при (4-6) °С на 30 мин.

Ресуспендированную вакцину, разведенную 1:10, объединяли в равных

объемах в одном флаконе, смешивали и разводили последовательно десятикратно до 10^{-9} , используя для каждого разведения отдельную пипетку. Суспензию двух последних разведений (10^{-8} и 10^{-9}) высевали отдельными пипетками по $0,1 \text{ см}^3$ соответственно в 3 и 5 чашек Петри на МППГГА или трипозный агар М097, предварительно проверенный на ростообеспечивающие свойства и подсушенный в течение 24 часов. Посевы инкубировали при $37-38 \text{ }^\circ\text{C}$ в течение 4-5 сут, и учитывали количество выросших колоний.

Количество колоний, выросших на всех чашках каждого разведения, суммировали и делили на соответствующее количество чашек (3 или 5). К полученным числам добавляли количество нулей, равное показателю степени разведения, суммировали их, делили на 2 и умножали на 10. Полученный результат отражал количество живых бруцелл в 1 см^3 вакцины.

При измерении биолюминесценции образцов вакцины проводили стандартизацию активности АТФ-реагента по водному раствору АТФ с концентрацией 10^{-6} моль/мл.

Массу сухой вакцины определяли по разнице веса флаконов с вакциной перед регидратацией стерильной дистиллированной водой до первоначального объема и пустых сухих флаконов с пробками после извлечения вакцины. Разведенную вакцину выдерживали в холодильнике при $(4-6) \text{ }^\circ\text{C}$ в течение 20 мин., разводили так, чтобы в 1 мл суспензии содержалось 100 мкг сухой вакцины. С целью получения АТФ-экстрактов из каждого образца бактериальной суспензии отбирали аликвоты по 0,1 мл и вносили в пробирки типа «Эппендорф», содержащие по 0,9 мл ДМСО. Измерение биолюминесцентных сигналов АТФ-экстрактов проводили с использованием АТФ-реагента «МИКРОЛЮМ» на люминометре «Биотокс-10М» сразу после получения. При необходимости их замораживали и хранили в низкотемпературном холодильнике до исследования.

Для построения калибровочной кривой интенсивности свечения в зависимости от концентрации АТФ, измеряли величины ($I_{обр}$) для стандартных АТФ-растворов и рассчитывали коэффициенты a и b уравнения линейной регрессии (1).

$$\lg([\text{АТФ, моль/мл}]) = a + b \times \lg(I_{\text{обр}}) \quad (1),$$

где: $I_{\text{обр}}$ – максимум интенсивности биолюминесцентного сигнала АТФ-раствора (показания люминометра);

a и b – коэффициенты уравнения линейной регрессии, рассчитанные по массивам экспериментальных данных «концентрация АТФ стандартных АТФ-растворов, моль/мл» и « $I_{\text{обр}}$ стандартных АТФ-растворов, условные единицы» методом наименьших квадратов.

Формулу (1) использовали для расчета концентрации АТФ в анализируемых суспензиях вакцины, учитывая их разбавление дистиллированной водой и ДМСО.

Для нескольких образцов регидратированных вакцин параллельно определяли титр клеток культуральным методом и рассчитывали концентрацию внутриклеточного АТФ, используя калибровочную зависимость (1), полученную для АТФ-растворов. По экспериментальным данным «титр клеток, КОЕ/мл» и «концентрация АТФ, моль/мл» рассчитывали коэффициенты A и B корреляционной зависимости (2).

$$\lg([\text{КОЕ/мл}]) = A + B \times \lg([\text{АТФ, моль/мл}]) \quad (2)$$

Зависимость (2) использовали для расчета титра клеток в анализируемых образцах вакцин по концентрации внутриклеточного АТФ этих образцов.

Образцы каждой серии вакцины анализировали в трех повторностях.

Коэффициенты корреляции (R_s) между титром живых клеток и концентрацией АТФ в образцах, а также между титрами клеток в образцах, определенных культуральным и биолюминесцентным методами, рассчитывали с помощью программы Microcal Origin. Достоверность различий между результатами, полученными с помощью двух методов, оценивали также по критерию Стьюдента (Ашмарин И.П. и др., 1971).

2.2. Результаты исследований

2.2.1. Влияние внеклеточного АТФ в образцах вакцины на интенсивность сигнала биолюминесценции

С целью оценки баланса внеклеточного и внутриклеточного АТФ образцы вакцины из штамма *B. abortus 19* регидратировали стерильной дистиллиро-

ванной водой до исходного объема и разводили ДМСО последовательно десятикратно. Сигналы биолюминесценции измеряли:

- в нативном образце (образец вакцины из штамма *B. abortus 19*);
- в отцентрифугированном образце (супернатант);
- в нативном разведенном образце (вакцина из штамма *B. abortus 19*);
- в тех же образцах, отфильтрованных через бактериальный фильтр

(табл.1).

Таблица 1

Определение внеклеточного АТФ в образцах вакцины
из штамма *B. abortus 19*

[АТФ] нативной культуры	$(2,17 \pm 0,05) * 10^{-8}$			
[АТФ] супернатанта	$(1,27 \pm 0,05) * 10^{-10}$			
Разведение	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}
[АТФ] нативного образца	$(9,43 \pm 0,03) * 10^{-9}$	$(4,03 \pm 0,01) * 10^{-9}$	$(1,58 \pm 0,03) * 10^{-9}$	-
[АТФ] разведенного и отфильтрованного образца	-	$(1,41 \pm 0,2) * 10^{-11}$	$(2,55 \pm 0,3) * 10^{-13}$	$(2,49 \pm 0,07) * 10^{-14}$

Согласно табличным данным, концентрация внеклеточного АТФ в исследуемых образцах была на 2-4 порядка меньше, чем - внутриклеточного АТФ.

В следующем опыте две серии вакцины из штамма *B. abortus 19* регидратировали стерильной дистиллированной водой. Образцы, полученных бактериальный суспензий в объеме по 1 мл центрифугировали в течение 5 и 10 минут при 5 тыс. об/мин. Биолюминесцентный сигнал образцов супернатанта и осадка измеряли после первоначального разведения их ДМСО соответственно в 10 и в 2 раза и последовательного разведения тем же экстрагентом в 100, 1000 и 10000 раз (табл.2).

Таблица 2

Влияния режимов центрифугирования на степень экстракции АТФ из бактериальных клеток

Исследуемая проба	№ серии вакцины	Разведение	5 тыс. об/мин 5 мин.	5 тыс. об/мин 10 мин.
Супернатант	16	-	$(1,88 \pm 0,1) \cdot 10^{-10}$	$(4,89 \pm 0,2) \cdot 10^{-11}$
	18	-	$(2,32 \pm 0,02) \cdot 10^{-10}$	$(3,43 \pm 0,3) \cdot 10^{-11}$
Осадок	16	10^{-2}	$(2,47 \pm 0,1) \cdot 10^{-9}$	$(3,36 \pm 0,2) \cdot 10^{-9}$
		10^{-3}	$(3,52 \pm 0,4) \cdot 10^{-9}$	$(4,76 \pm 0,1) \cdot 10^{-9}$
		10^{-4}	$(6,00 \pm 0,4) \cdot 10^{-9}$	$(5,35 \pm 0,1) \cdot 10^{-9}$
	18	10^{-2}	$(3,09 \pm 0,02) \cdot 10^{-9}$	$(3,18 \pm 0,2) \cdot 10^{-9}$
		10^{-3}	$(4,14 \pm 0,3) \cdot 10^{-9}$	$(4,20 \pm 0,3) \cdot 10^{-9}$
		10^{-4}	$(4,58 \pm 0,6) \cdot 10^{-9}$	$(5,89 \pm 1,2) \cdot 10^{-9}$

Как видно из материалов таблицы, с увеличением продолжительности центрифугирования образцов бруцеллезных вакцин и, таким образом, с осаждением большего количества бруцелл, концентрация целевого АТФ в осадке увеличивается, а внеклеточного в супернатанте - снижается. Эти данные, как и результаты предыдущего опыта, свидетельствующие о незначительном количестве внеклеточного АТФ (0,1 - 0,6 %) в бруцеллезных вакцинах позволили пренебречь им и, при проведении дальнейших исследований, центрифугирование тестируемых образцов не проводить.

2.2.2. Калибровка АТФ-реагента при использовании АТФ-стандартов

В каждом эксперименте по измерению биолюминесценции опытных образцов противобруцеллезных вакцин АТФ-реагент калибровали при помощи стандартных АТФ-растворов. Это обусловлено тем, что активность АТФ-реагента разных партий резко отличалась, а также не исключено ее снижение в процессе длительного хранения.

Перед измерением интенсивности сигнала биолюминесценции при тестировании образцов вакцины, определили значения коэффициентов a и b уравнения калибровочной зависимости во всех проведенных опытах, измеряя $I_{обр}$ от АТФ-стандартов.

$$\lg ([\text{АТФ, моль/мл}]) = a + b \times \lg (I_{обр}), \quad (1);$$

a и b - коэффициенты уравнения линейной регрессии, рассчитанные по массивам экспериментальных данных «концентрация АТФ стандартных АТФ-растворов, моль/мл» и « $I_{обр}$ стандартных АТФ-растворов, условные единицы» методом наименьших квадратов.

При этом в зависимости от партии АТФ-реагента коэффициенты a и b калибровочной зависимости (1) варьировали в диапазоне 13,26-14,32 и 0,88-1,04 соответственно. Для зависимости (1) коэффициент корреляции R_s был равен 0,99 во всех случаях (табл. 3).

Таблица 3

Стандартизация активности АТФ-реагента при помощи стандартных АТФ-растворов

Разведение АТФ-стандарта	№ опыта			Коэффициенты a и b	R_s
	1	2	3		
	$I_{обр}$				
10^{-11}	1695	384	1466	-14,32; 1,04	0,99
10^{-12}	152,5	27	138	-13,26; 0,88	0,99
10^{-13}	20	2,5	11,5	-13,99; 0,94	0,99

2.2.3. Определение оптимальных объемов реакционной смеси (реагент-испытуемый образец)

Для определения оптимального соотношения объемов «образец - реагент» испытуемую вакцину из штамма *B.abortus 19* регидратировали стерильной дистиллированной водой до первоначального объема и выдерживали в течение 20 мин при (4-6) °С. Затем по 100 мкл суспензии вакцины переносили в пробирки типа «Эппендорф», в которые заранее, в каждую отдельно, были внесены ДМСО и 1 %-ный раствор неонала-10 в объеме по 900 мкл.

Непосредственно перед измерением билюминесцентного сигнала в стрипы вносили АТФ-реагент и экстракты вакцины в разных объемах. В одни - по 90 мкл АТФ-реагента и 10 мкл экстракта, в другие - по 50 мкл АТФ-реагента и экстракта. Результаты исследования показаны в таблице 4.

Таблица 4

Интенсивность сигналов биолюминесценции в зависимости от соотношения объемов измеряемого образца

Экстрагент	«Образец - реагент», мкл	Сигнал от образца	Сигнал АТФ - стандарта	[АТФ], моль/ мл
ДМСО	10:90	280 ± 14	233 ± 12	1,2 * 10 ⁻⁷
ДМСО	50:50	128 ± 4	115 ± 11	0,6 * 10 ⁻⁷
Неонол-10 - 1 %	10:90	2024 ± 44	2967 ± 100	6,0 * 10 ⁻⁸
Неонол-10 - 1 %	50:50	448 ± 59	809 ± 24	1,4 * 10 ⁻⁸

Как видно из материалов таблицы, максимально высокий биолюминесцентный сигнал был зарегистрирован при тестировании аликвот «испытуемый образец - АТФ-реагент» в соотношении 10:90 по объему.

В заключительных опытах перешли на следующее соотношение АТФ-реагента и исследуемого образца: 0,02 мл АТФ-экстракта образца - 0,05 мл деионизированной воды - 0,05 мл АТФ-реагента. Такое соотношение объемов было использовано с целью экономии АТФ-реагента. Коэффициент корреляции между концентрацией АТФ стандартного раствора и биолюминесцентным сигналом при соотношении объемов 10:90 и 20:50:50 составил $R_s - 0,99$.

2.2.4. Изучение экстрагирующих свойств ДМСО и неонола-10

Образцы нативной культуры штамма *B. abortus 19* разводили ДМСО и неонолом-10 в соотношении 10:90 по объему. Неонол использовали в виде 20 %, 30 % раствора, получая при этом суспензии бактериальных клеток с содержанием 10, 15 и 20 % экстрагента. Непосредственно перед измерением сигнала биолюминесценции образцы, содержащие разное количество неонола-10, разводили дистиллированной водой, таким образом, чтобы его конечная концентрация в суспензиях составила 1 %.

Тестирование проводили при соотношении объемов «образец-реагент» 10:90. При расчете концентрации АТФ учитывали степень разбавления испытуемых образцов в ДМСО и неоноле-10 (табл. 5).

Экстракция бактериального АТФ при помощи высоких концентраций неонола-10

Экстрагенты	[АТФ], 20 % раствора неонола-10, моль/мл	[АТФ], 30 % раствора неонола-10, моль/мл	[АТФ], 30 % раствора неонола-10, моль/мл
ДМСО	$(5,70 \pm 0,3) * 10^{-11}$	$(2,3 \pm 0,1) * 10^{-13}$	$(1,59 \pm 0,1) * 10^{-11}$
Неонол-10, 10 %	$(1,39 \pm 0,1) * 10^{-11}$	$(6,22 \pm 0,1) * 10^{-13}$	$(4,85 \pm 1,2) * 10^{-13}$
Неонол-10, 15 %	-	$(2,40 \pm 0,2) * 10^{-13}$	$(1,03 \pm 0,1) * 10^{-13}$
Неонол-10, 20 %	-	$(1,16 \pm 0,4) * 10^{-12}$	$(4,27 \pm 1,8) * 10^{-13}$

Согласно полученным результатам, неонол-10 при содержании в суспензии бактериальных клеток в количестве 10 % обладает более высокими экстрагирующими свойствами в сравнении с ДМСО.

Для определения влияния времени экстракции неонолом-10 на концентрацию АТФ образцы бруцеллезной вакцины из штамма *B. abortus 19* разбавляли, используя маточные растворы неонола-10 с концентрацией 30 %, и получили при этом суспензии бактериальных клеток с содержанием 10, 15 и 20 % неонола-10. Непосредственно перед измерением сигнала биолюминесценции образцы, содержащие разное количество неонола-10, разводили дистиллированной водой, таким образом, чтобы его конечная концентрация в суспензиях составила 1 %. Время экстракции образцов перед измерением сигнала биолюминесценции составляло 2, 5, 10 минут.

Таблица 6

Влияние концентрации неонола-10 и продолжительности экстракции на концентрацию АТФ

Концентрация	Время экспозиции		
	2 мин	5 мин	10 мин
Неонол-10	Концентрация АТФ в образцах, моль/мл		
(10 %)	$(7,40 \pm 0,1) * 10^{-13}$	$(2,85 \pm 0,7) * 10^{-13}$	$(1,06 \pm 0,1) * 10^{-13}$
(15 %)	$(4,81 \pm 0,4) * 10^{-11}$	$(3,93 \pm 1,1) * 10^{-11}$	$(4,26 \pm 0,5) * 10^{-12}$
(20 %)	$(7,60 \pm 1,4) * 10^{-13}$	$(2,60 \pm 0,2) * 10^{-13}$	$(0,9 \pm 0,1) * 10^{-13}$

Согласно табличным данным, показатели концентрации АТФ в образцах, полученных с использованием неонала-10 в разных количествах, статистически достоверно ($p \leq 0,05$) снижались при увеличении времени экспозиции экстрагирования и не зависели от концентрации экстрагента.

2.2.5. Определение возможности получения экстрактов лиофилизированной культуры бруцелл в ДМСО

С целью сокращения числа манипуляций при подготовке вакцины для тестирования биOLUMиНесцентным методом была предпринята попытка изучения возможности получения АТФ-экстрактов из сухой бакмассы с помощью ДМСО и определения влияния величины навесок бакмассы на растворимость в ДМСО. В навески сухой вакцины массой 50 мг, 100 мг, 150 мг, 200 мг и 250 мг внесли по 0,5 и 1,0 мл ДМСО. При визуальном учете результатов опыта оказалось, что лиофилизированная вакцина разбавляется ДМСО частично, независимо от соотношения величины навески и объема экстрагента.

2.2.6. Определение титра живых микробных клеток в бруцеллезных сухих вакцинах из штаммов *B. abortus*

Образцов бруцеллезных вакцин, регидратированных стерильной дистиллированной водой до первоначального объема, разводили ею же с таким расчетом, чтобы в 1 мл суспензии содержалось 100 мкг сухой вакцины. С целью получения АТФ-экстрактов к полученным аликвотам в объеме по 0,1 мл добавляли по 0,9 мл ДМСО. Перед измерением интенсивности сигнала биOLUMиНесценции АТФ-экстрактов, используя АТФ-стандарт, определяли значения коэффициентов a и b уравнения калибровочной зависимости (1) и устанавливали коэффициент корреляции (R_s), который был равен 0,99 во всех случаях.

Затем было проведено 3 опыта с использованием образцов разных бруцеллезных вакцин (таблицы 7, 8, 9). Перед тестированием каждый подготовленный образец вакцины разводили ДМСО в 100 раз.

Определение количества живых микробных клеток в 72 образцах 18 серий бруцеллезных вакцин проводили биOLUMиНесцентным методом с использованием корреляционной зависимости (2), а также культуральным чашечным методом (табл. 7).

Титр живых клеток в образцах лиофилизированной бруцеллезной вакцины, определенный чашечным и биолюминесцентным методами

№ п/п	[АТФ], моль/мл	Титр клеток, КОЕ/мл		№ п/п	[АТФ], моль/мл	Титр клеток, КОЕ/мл	
		Чашечный метод (контроль)	Биолюми- несцент- ный метод			Чашечный метод (контроль)	Биолюминес- центный метод
1	2	3	4	5	6	7	8
1	$7,16 \cdot 10^{-9}$	$2,34 \cdot 10^{10}$	$6,86 \cdot 10^{10}$	37	$5,15 \cdot 10^{-9}$	$1,37 \cdot 10^{10}$	$3,76 \cdot 10^{10}$
2	$7,75 \cdot 10^{-9}$	$6,99 \cdot 10^{10}$	$7,91 \cdot 10^{10}$	38	$5,41 \cdot 10^{-9}$	$5,37 \cdot 10^{10}$	$4,12 \cdot 10^{10}$
3	$5,57 \cdot 10^{-9}$	$3,77 \cdot 10^{10}$	$4,34 \cdot 10^{10}$	39	$9,06 \cdot 10^{-9}$	$7,91 \cdot 10^{10}$	$1,05 \cdot 10^{11}$
4	$6,46 \cdot 10^{-9}$	$3,10 \cdot 10^{10}$	$5,69 \cdot 10^{10}$	40	$7,88 \cdot 10^{-9}$	$7,91 \cdot 10^{10}$	$8,15 \cdot 10^{10}$
5	$5,31 \cdot 10^{-9}$	$4,00 \cdot 10^9$	$3,97 \cdot 10^{10}$	41	$6,74 \cdot 10^{-9}$	$4,14 \cdot 10^{10}$	$6,15 \cdot 10^{10}$
6	$6,85 \cdot 10^{-9}$	$2,95 \cdot 10^{10}$	$6,32 \cdot 10^{10}$	42	$7,56 \cdot 10^{-9}$	$4,14 \cdot 10^{10}$	$7,56 \cdot 10^{10}$
7	$6,62 \cdot 10^{-9}$	$2,95 \cdot 10^{10}$	$5,94 \cdot 10^{10}$	43	$6,45 \cdot 10^{-9}$	$1,14 \cdot 10^{10}$	$5,67 \cdot 10^{10}$
8	$5,48 \cdot 10^{-9}$	$1,18 \cdot 10^{10}$	$4,22 \cdot 10^{10}$	44	$7,08 \cdot 10^{-9}$	$2,14 \cdot 10^{10}$	$6,72 \cdot 10^{10}$
9	$3,11 \cdot 10^{-9}$	$2,90 \cdot 10^9$	$1,51 \cdot 10^{10}$	45	$7,17 \cdot 10^{-9}$	$4,23 \cdot 10^{10}$	$6,87 \cdot 10^{10}$
10	$4,57 \cdot 10^{-9}$	$1,25 \cdot 10^{11}$	$3,03 \cdot 10^{10}$	46	$8,49 \cdot 10^{-9}$	$5,23 \cdot 10^{10}$	$9,35 \cdot 10^{10}$
1	$5,49 \cdot 10^{-9}$	$1,68 \cdot 10^{11}$	$4,22 \cdot 10^{10}$	47	$1,18 \cdot 10^{-9}$	$1,59 \cdot 10^9$	$1,70 \cdot 10^{11}$
12	$4,64 \cdot 10^{-9}$	$3,57 \cdot 10^{10}$	$3,11 \cdot 10^{10}$	48	$9,96 \cdot 10^{-9}$	$1,09 \cdot 10^{11}$	$1,25 \cdot 10^{11}$
13	$4,28 \cdot 10^{-9}$	$3,24 \cdot 10^{10}$	$2,69 \cdot 10^{10}$	49	$9,27 \cdot 10^{-9}$	$8,79 \cdot 10^{10}$	$1,10 \cdot 10^{11}$
14	$4,66 \cdot 10^{-9}$	$5,39 \cdot 10^{10}$	$3,13 \cdot 10^{10}$	50	$7,77 \cdot 10^{-9}$	$6,79 \cdot 10^{10}$	$7,95 \cdot 10^{10}$
15	$3,39 \cdot 10^{-9}$	$1,38 \cdot 10^{11}$	$1,76 \cdot 10^{10}$	51	$8,2 \cdot 10^{-9}$	$6,29 \cdot 10^{10}$	$8,78 \cdot 10^{10}$
16	$3,14 \cdot 10^{-9}$	$1,37 \cdot 10^{10}$	$1,53 \cdot 10^{10}$	52	$6,12 \cdot 10^{-9}$	$2,00 \cdot 10^{10}$	$5,15 \cdot 10^{10}$
17	$5,32 \cdot 10^{-9}$	$1,69 \cdot 10^{11}$	$3,99 \cdot 10^{10}$	53	$6,58 \cdot 10^{-9}$	$2,90 \cdot 10^{10}$	$5,88 \cdot 10^{10}$
18	$4,45 \cdot 10^{-9}$	$1,84 \cdot 10^{10}$	$2,89 \cdot 10^{10}$	54	$6,37 \cdot 10^{-9}$	$2,29 \cdot 10^{10}$	$5,54 \cdot 10^{10}$
19	$7,08 \cdot 10^{-9}$	$2,34 \cdot 10^{10}$	$6,71 \cdot 10^{10}$	55	$8,49 \cdot 10^{-9}$	$2,15 \cdot 10^{10}$	$9,34 \cdot 10^{10}$
20	$7,86 \cdot 10^{-9}$	$6,99 \cdot 10^{10}$	$8,12 \cdot 10^{10}$	56	$9,93 \cdot 10^{-9}$	$2,15 \cdot 10^{10}$	$1,24 \cdot 10^{11}$
21	$6,88 \cdot 10^{-9}$	$3,77 \cdot 10^{10}$	$6,37 \cdot 10^{10}$	57	$8,84 \cdot 10^{-9}$	$6,89 \cdot 10^{10}$	$1,01 \cdot 10^{11}$
22	$6,88 \cdot 10^{-9}$	$3,10 \cdot 10^{10}$	$6,38 \cdot 10^{10}$	58	$7,16 \cdot 10^{-9}$	$4,19 \cdot 10^{10}$	$6,86 \cdot 10^{10}$
23	$4,45 \cdot 10^{-9}$	$4,00 \cdot 10^9$	$2,88 \cdot 10^{10}$	59	$7,24 \cdot 10^{-9}$	$6,89 \cdot 10^{10}$	$7,00 \cdot 10^{10}$
24	$5,83 \cdot 10^{-9}$	$2,95 \cdot 10^{10}$	$4,71 \cdot 10^{10}$	60	$7,37 \cdot 10^{-9}$	$5,19 \cdot 10^{10}$	$7,23 \cdot 10^{10}$
25	$6,2 \cdot 10^{-9}$	$2,92 \cdot 10^{10}$	$5,28 \cdot 10^{10}$	61	$5,31 \cdot 10^{-9}$	$2,00 \cdot 10^{10}$	$3,97 \cdot 10^{10}$
26	$7,08 \cdot 10^{-9}$	$6,18 \cdot 10^{10}$	$6,72 \cdot 10^{10}$	62	$1,59 \cdot 10^{-9}$	$3,20 \cdot 10^9$	$4,46 \cdot 10^9$
27	$4,2 \cdot 10^{-9}$	$1,98 \cdot 10^{11}$	$2,60 \cdot 10^{10}$	63	$1,69 \cdot 10^{-9}$	$3,20 \cdot 10^9$	$4,96 \cdot 10^9$
28	$3,89 \cdot 10^{-9}$	$5,29 \cdot 10^{10}$	$2,26 \cdot 10^{10}$	64	$1,94 \cdot 10^{-9}$	$2,80 \cdot 10^9$	$6,34 \cdot 10^9$
29	$4,54 \cdot 10^{-9}$	$1,25 \cdot 10^{11}$	$2,99 \cdot 10^{10}$	65	$2,01 \cdot 10^{-9}$	$2,80 \cdot 10^9$	$6,80 \cdot 10^9$

1	2	3	4	5	6	7	8
30	$5,54 \cdot 10^{-9}$	$1,68 \cdot 10^{11}$	$4,29 \cdot 10^{10}$	66	$1,61 \cdot 10^{-9}$	$2,70 \cdot 10^9$	$4,56 \cdot 10^9$
31	$3,43 \cdot 10^{-9}$	$3,57 \cdot 10^{10}$	$1,80 \cdot 10^{10}$	67	$1,57 \cdot 10^{-9}$	$2,70 \cdot 10^9$	$4,34 \cdot 10^9$
32	$5,68 \cdot 10^{-9}$	$3,24 \cdot 10^{10}$	$4,50 \cdot 10^{10}$	68	$1,92 \cdot 10^{-9}$	$2,10 \cdot 10^9$	$6,23 \cdot 10^9$
33	$4,98 \cdot 10^{-9}$	$1,39 \cdot 10^{10}$	$3,53 \cdot 10^{10}$	69	$1,99 \cdot 10^{-9}$	$2,10 \cdot 10^9$	$6,65 \cdot 10^9$
34	$7,19 \cdot 10^{-9}$	$5,97 \cdot 10^{10}$	$6,91 \cdot 10^{10}$	70	$5,15 \cdot 10^{-9}$	$1,37 \cdot 10^{10}$	$3,76 \cdot 10^{10}$
35	$6,19 \cdot 10^{-9}$	$5,97 \cdot 10^{10}$	$5,25 \cdot 10^{10}$	71	$5,41 \cdot 10^{-9}$	$5,37 \cdot 10^{10}$	$4,12 \cdot 10^{10}$
36	$8,81 \cdot 10^{-9}$	$2,84 \cdot 10^{10}$	$9,99 \cdot 10^{10}$	72	$9,06 \cdot 10^{-9}$	$7,91 \cdot 10^{10}$	$1,05 \cdot 10^{11}$

Согласно результатам программного обсчета полученных данных, коэффициент корреляции между средним количеством живых бруцелл, установленный при тестировании 72 образцов вакцин биолюминесцентным и культуральными методами, составил 0,72.

С использованием корреляционной зависимости (2) были проанализированы 12 образцов лиофилизированной противобруцеллезной вакцины 7 серий (табл.8).

Таблица 8

Титр клеток в образцах лиофилизированной вакцины, определенный чашечным и биолюминесцентным методами ($n=12$)

№ п/п	[АТФ], моль/мл	Титр клеток, КОЕ/мл	
		Чашечный метод (контроль)	Биолюминесцентный метод
1	2	3	4
1	$1,17 \cdot 10^{-8}$	$1,05 \cdot 10^{11}$	$9,80 \cdot 10^{10}$
2	$9,1 \cdot 10^{-9}$	$6,74 \cdot 10^{10}$	$5,00 \cdot 10^{10}$
3	$1,09 \cdot 10^{-8}$	$9,16 \cdot 10^{10}$	$6,10 \cdot 10^{10}$
4	$7,86 \cdot 10^{-9}$	$5,21 \cdot 10^{10}$	$5,10 \cdot 10^{10}$
5	$7,55 \cdot 10^{-9}$	$4,86 \cdot 10^{10}$	$3,10 \cdot 10^{10}$
6	$5,77 \cdot 10^{-9}$	$3,03 \cdot 10^{10}$	$2,42 \cdot 10^{10}$
7	$1,12 \cdot 10^{-8}$	$9,69 \cdot 10^{10}$	$1,00 \cdot 10^{11}$
8	$1,08 \cdot 10^{-8}$	$9,08 \cdot 10^{10}$	$1,22 \cdot 10^{11}$
9	$9,92 \cdot 10^{-9}$	$7,83 \cdot 10^{10}$	$1,02 \cdot 10^{11}$
10	$9,48 \cdot 10^{-9}$	$7,23 \cdot 10^{10}$	$6,20 \cdot 10^{10}$
11	$9,3 \cdot 10^{-9}$	$6,99 \cdot 10^{10}$	$4,84 \cdot 10^{10}$
12	$1,36 \cdot 10^{-8}$	$1,37 \cdot 10^{11}$	$7,20 \cdot 10^{10}$

Коэффициент корреляции между средним количеством живых бруцелл, установленный при тестировании 12 образцов вакцин биолюминесцентным и культуральным методами, составил 0,82.

С использованием корреляционной зависимости (2) были проанализированы 27 образцов 13 серий бруцеллезной вакцины (табл. 9).

Коэффициент корреляции между средним количеством живых бруцелл, установленный при тестировании 27 образцов вакцины биолюминесцентным и культуральным методами, составил 0,73.

Таблица 9

Титр клеток в образцах лиофилизированной противобруцеллезной вакцины, определенный культуральным и биолюминесцентным методами (n=27)

№ п/п	[АТФ], моль/мл	Титр клеток, КОЕ/мл	
		Чашечный метод (контроль)	Биолюминесцентный метод
1	2	3	4
1	$2,11 \cdot 10^{-9}$	$8,03 \cdot 10^{10}$	$6,40 \cdot 10^{10}$
2	$9,31 \cdot 10^{-10}$	$2,68 \cdot 10^{10}$	$5,00 \cdot 10^8$
3	$9,75 \cdot 10^{-10}$	$2,85 \cdot 10^{10}$	$1,30 \cdot 10^9$
4	$7,3 \cdot 10^{-10}$	$1,94 \cdot 10^{10}$	$3,60 \cdot 10^9$
5	$7,52 \cdot 10^{-10}$	$2,02 \cdot 10^{10}$	$2,85 \cdot 10^{10}$
6	$7,77 \cdot 10^{-10}$	$2,10 \cdot 10^{10}$	$9,50 \cdot 10^9$
7	$1,2 \cdot 10^{-9}$	$3,76 \cdot 10^{10}$	$1,05 \cdot 10^{10}$
8	$1,81 \cdot 10^{-9}$	$6,53 \cdot 10^{10}$	$8,72 \cdot 10^{10}$
9	$1,53 \cdot 10^{-9}$	$5,20 \cdot 10^{10}$	$4,06 \cdot 10^{10}$
10	$1,6 \cdot 10^{-9}$	$5,56 \cdot 10^{10}$	$5,30 \cdot 10^{10}$
11	$2,18 \cdot 10^{-9}$	$8,41 \cdot 10^{10}$	$5,40 \cdot 10^{10}$
12	$1,94 \cdot 10^{-9}$	$7,19 \cdot 10^{10}$	$3,60 \cdot 10^{10}$
13	$3,72 \cdot 10^{-10}$	$7,83 \cdot 10^9$	$5,70 \cdot 10^9$
14	$7,97 \cdot 10^{-10}$	$2,18 \cdot 10^{10}$	$9,50 \cdot 10^9$
15	$8,8 \cdot 10^{-10}$	$2,49 \cdot 10^{10}$	$1,10 \cdot 10^{10}$
16	$3,51 \cdot 10^{-10}$	$7,25 \cdot 10^9$	$1,60 \cdot 10^9$
17	$6,61 \cdot 10^{-10}$	$1,69 \cdot 10^{10}$	$1,80 \cdot 10^{10}$
18	$7,59 \cdot 10^{-10}$	$2,04 \cdot 10^{10}$	$9,00 \cdot 10^9$
19	$4,5 \cdot 10^{-10}$	$1,01 \cdot 10^{10}$	$1,20 \cdot 10^{10}$
20	$1,02 \cdot 10^{-9}$	$3,01 \cdot 10^{10}$	$7,20 \cdot 10^9$
21	$4,2 \cdot 10^{-10}$	$9,23 \cdot 10^9$	$1,04 \cdot 10^9$

1	2	3	4
22	$3,69 \cdot 10^{-10}$	$7,77 \cdot 10^9$	$7,40 \cdot 10^9$
23	$4,78 \cdot 10^{-10}$	$1,10 \cdot 10^{10}$	$1,67 \cdot 10^{10}$
24	$5,67 \cdot 10^{-10}$	$1,38 \cdot 10^{10}$	$7,90 \cdot 10^9$
25	$7,29 \cdot 10^{-10}$	$1,93 \cdot 10^{10}$	$1,75 \cdot 10^9$
26	$5,43 \cdot 10^{-10}$	$1,30 \cdot 10^{10}$	$1,60 \cdot 10^9$
27	$4,98 \cdot 10^{-10}$	$1,16 \cdot 10^{10}$	$1,67 \cdot 10^9$

Результаты тестирования вакцин были обработаны статистически (таблица 10). При этом коэффициент корреляции (R_s) между количеством живых бруцелл, определенным по данным тестирования биолюминесцентным методом, и их количеством, определенным культуральным (чашечным) методом, составил 0,93. Статистически значимого различия между титрами живых клеток, определенными двумя методами, не установлено ($P \leq 0,05$).

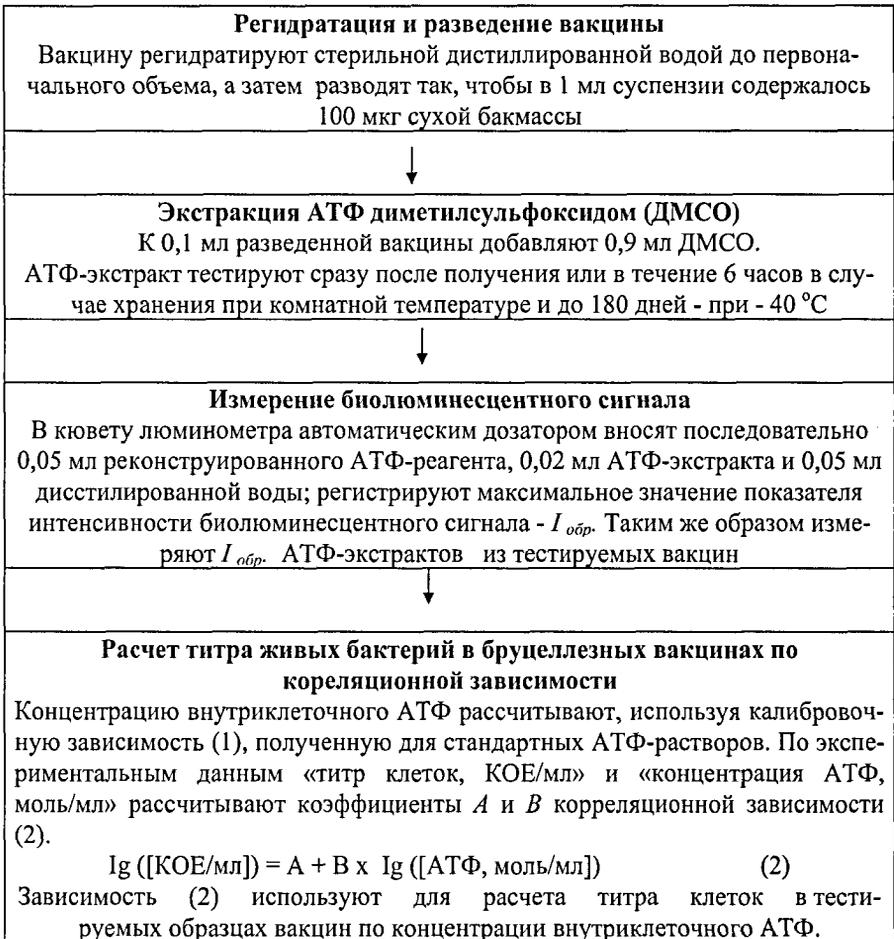
Таблица 10

Корреляционная зависимость между средними значениями трех опытов по изучению выживаемости бруцелл

№ п/п	Титр клеток, КОЕ/мл		Коэффициент корреляции R_s
	Чашечный метод (контроль)	Биолюминесцентный метод	
1	$(5,00 \pm 1,1) \cdot 10^{10}$	$(5,48 \pm 0,8) \cdot 10^{10}$	0,93
2	$(6,85 \pm 3,9) \cdot 10^{10}$	$(7,84 \pm 4,4) \cdot 10^{10}$	
3	$(1,85 \pm 0,7) \cdot 10^{10}$	$(2,92 \pm 0,8) \cdot 10^{10}$	

С учетом полученных результатов, разработана следующая схема определения количества живых микробных клеток в бруцеллезных вакцинах биолюминесцентным методом (схема 1).

Определение количества жизнеспособных клеток в сухих бруцеллезных вакцинах биолюминесцентным методом



2.2.7. Биолюминесцентное определение титра бруцелл в

лиофилизированных бруцеллезных вакцина на разных сроках хранения

Определения количества жизнеспособных клеток в промышленных образцах бруцеллезных вакцин проводили, руководствуясь представленной выше схемой. В работе использовали образцы следующих серий вакцин на разных сроках хранения при (2-8) °С:

- вакцина из штамма № 19 живая сухая - сер. 1, 2, 28, 29, 30;
- вакцина из № 82 живая сухая - сер. 2,4;
- вакцина из штамма 75/79 - АВ живая сухая - сер. 5 (табл. 11).

Таблица 11

Результаты определения выживаемости бруцелл в промышленных образцах бруцеллезных вакцин

Количество живых бруцелл		Срок хранения
Чашечный метод (контроль)	Биолюминесцентный метод	
Вакцина из штамма <i>B.abortus</i> 82 с.2 (02.06г.)		
$(3,37 \pm 0,4) * 10^{10}$	$(3,94 \pm 0,4) * 10^{10}$	9 мес.
$(3,09 \pm 0,8) * 10^{10}$	$(2,61 \pm 0,8) * 10^{10}$	10 мес.
Вакцина из штамма <i>B.abortus</i> 82 с.4 (02.06г.)		
$(1,29 \pm 0,8) * 10^{11}$	$(2,59 \pm 0,8) * 10^{10}$	10 мес.
$(3,62 \pm 0,1) * 10^{10}$	$(2,46 \pm 1,2) * 10^{10}$	11 мес.
Вакцина из штамма <i>B.abortus</i> 19 с.1 (04.06г.)		
$(4,29 \pm 1,8) * 10^{10}$	$(7,16 \pm 2,2) * 10^{10}$	6 мес.
$(6,89 \pm 0,1) * 10^{10}$	$(8,55 \pm 1,8) * 10^{10}$	7 мес.
$(3,1 \pm 0,2) * 10^{10}$	$(6,04 \pm 0,5) * 10^{10}$	9 мес.
Вакцина из штамма <i>B.abortus</i> 19 с.2 (04.06г.)		
$(7,79 \pm 0,9) * 10^{10}$	$(9,48 \pm 2,1) * 10^{10}$	6 мес.
$(4,69 \pm 0,5) * 10^{10}$	$(7,05 \pm 0,3) * 10^{10}$	7 мес.
$(3,77 \pm 0,2) * 10^{10}$	$(5,36 \pm 1,4) * 10^{10}$	9 мес.
Вакцина из штамма <i>B.abortus</i> 19 с.28 (12.05г.)		
$(1,64 \pm 0,5) * 10^{10}$	$(5,7 \pm 0,3) * 10^{10}$	10 мес.
$(2,05 \pm 0,1) * 10^{10}$	$(4,56 \pm 0,8) * 10^{10}$	11 мес.
$(0,4 \pm 0,01) * 10^{10}$	$(3,43 \pm 0,7) * 10^{10}$	12 мес.
Вакцина из штамма <i>B.abortus</i> 19 с.29 (12.05г.)		
$(4,15 \pm 0,01) * 10^{10}$	$(6,86 \pm 0,9) * 10^{10}$	10 мес.
$(2,9 \pm 0,6) * 10^{10}$	$(5,88 \pm 0,3) * 10^{10}$	11 мес.
$(2,88 \pm 0,1) * 10^{10}$	$(5,52 \pm 1,1) * 10^{10}$	12 мес.
Вакцина из штамма <i>B.abortus</i> 19 с.30 (12.05г.)		
$(7,94 \pm 0,04) * 10^{10}$	$(9,33 \pm 1,6) * 10^{10}$	10 мес.
$(2,94 \pm 0,02) * 10^{10}$	$(5,61 \pm 0,5) * 10^{10}$	12 мес.
Вакцина из штамма <i>B.abortus</i> 75/79-АВ с.5 (05.06г.)		
$(5,97 \pm 0,5) * 10^{10}$	$(6,98 \pm 1,2) * 10^{10}$	5 мес.
$(5,84 \pm 0,6) * 10^{10}$	$(6,0 \pm 0,7) * 10^{10}$	8 мес.
X $(4,51 \pm 1,2) * 10^{10}$	X $(5,76 \pm 0,9) * 10^{10}$	

При анализе результатов, представленных в таблице 11, не установлено статистически значимого различия между титрами живых бруцелл, опреде-

ленными двумя методами ($P \leq 0,05$) на разных сроках хранения вакцины. Коэффициент корреляции (R_s) между результатами, полученными каждым из методов, составил 0,93.

3. Выводы

1. Билюминесцентному исследованию с целью определения количества живых микробных клеток подвергают только водные суспензии бруцелл. Лиофилизированная культура бруцелл в экстрагенте не растворяется.

2. ДМСО является лучшим в сравнении с неололом-10 экстрагентом АТФ из водных суспензий бруцелл. В экстрактах, полученных с помощью ДМСО, концентрация АТФ снижается через 6 часов, а с использованием неолола-10 - в течение нескольких минут.

3. Концентрация внеклеточного АТФ в сухих бруцеллезных вакцинах составляет меньше 1 % по отношению к внутриклеточному АТФ и при тестировании бруцеллезных вакцин на выживаемость микробных клеток билюминесцентным методом не отражается на объективности результатов.

4. Результаты определения количества живых микробных клеток, полученные при сравнительном тестировании репрезентативной выборки сухих бруцеллезных вакцин билюминесцентным и культуральным методами, коррелируют ($R_s \geq 0,7$). При статистическом анализе, с использованием коэффициента Стьюдента, достоверных различий ($P \leq 0,05$) между этими показателями также не установлено.

5. Разработанная методика определения количества живых бруцелл в бруцеллезных вакцинах, основанная на использовании билюминесцентного метода, позволяет получить результат в течение 5-7 часов. При этом существенно ограничивается продолжительность работы технического персонала с живой культурой бруцелл, в сравнении с культуральным методом, за счет исключения многочисленных разведений и подсчета колоний бруцелл, что предохраняет его от сенсibilизации и алергизации; повышается объективность результатов за счет инструментального учета в сравнении с биохимическим методом.

4. Практические предложения

Разработанная методика определения количества живых микробных клеток в бруцеллезных вакцинах биолюминесцентным методом может быть рекомендована для использования на предприятиях биологической промышленности при производстве и контроле качества данных препаратов, как при выпуске, так и в процессе хранения.

Разработаны «Методические рекомендации по определению количества живых микробных клеток в бруцеллезных вакцинах биолюминесцентным методом». (Утв. директором ФГУ «ВГНКИ» 16 декабря 2008 года).

Порядок определения живых микробных клеток в бруцеллезных вакцинах биолюминесцентным методом внесен в проект стандарта организации на вакцину против бруцеллеза сельскохозяйственных животных из штамма № 19 живую сухую.

5. Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Зверев, Д.С. Определение выживаемости бруцелл биолюминесцентным методом / Зверев Д.С., Скляров О.Д. //Актуальные проблемы ветеринарной медицины продуктивных и непродуктивных животных: Сб. науч. тр. ВНИИБГЖ. - Омск, 2006. - С. 81-83
2. Зверев, Д.С. Оптимизация биолюминесцентного метода для определения количества живых бруцелл / Зверев Д.С., Скляров О.Д., Фрунджян В.Г. // Сб. науч. тр. ФГУ «ВГНКИ». - М., 2007. - Вып.68. - С. 118-125
3. Скляров, О.Д. Определение выживаемости бруцелл в сухих бруцеллезных вакцинах / Скляров О.Д., Зверев Д.С., Фрунджян В.Г. // Ветеринарный врач. - Сдана в печать.
4. Зверев, Д.С. Оптимизация биолюминесцентного метода для определения количества живых микробных клеток в бруцеллезных вакцинах / Зверев Д.С., Скляров О.Д., Фрунджян В.Г. // Ветеринарная медицина. - Сдана в печать.



Для заметок

Для заметок

Для заметок

Заказ № 140/12/08 Подписано в печать 13.11.2008 Тираж 100 экз. Усл. п.л. 1,5



ООО "Цифровичок", тел. (495) 797-75-76; (495) 778-22-20
www.cfr.ru; e-mail: info@cfr.ru