

**НАЦІОНАЛЬНИЙ ТЕХНІЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ УКРАЇНИ
“КИЇВСЬКИЙ ПОЛІТЕХНІЧНИЙ ІНСТИТУТ”**

Факультет біотехнології і біотехніки

(повна назва інституту/факультету)

Кафедра промислової біотехнології

(повна назва кафедри)

Дипломний проект

на здобуття ступеня бакалавра

зі спеціальності 6.051401 Біотехнологія
(код та назва напрямку підготовки або спеціальності)

на тему: Технологія виробництва живої вакцини проти рожі свиней.

Дільниця підготовки посівного матеріалу

Виконала: студентка 4 курсу, групи БТ-11
(шифр групи)

Мохнач Юлія Сергіївна

(прізвище, ім'я, по батькові)

Керівник ст. викл. Дзигун Лариса Петрівна
(посада, науковий ступінь, вчене звання, прізвище та ініціали)

Консультанти Розділ 5 доц., к.т.н. Ружинська Л.І.
(назва розділу) (посада, вчене звання, науковий ступінь, прізвище, ініціали)

Розділ 6 доц., к.т.н. Орленко А.Т.
(назва розділу) (посада, вчене звання, науковий ступінь, прізвище, ініціали)

Рецензент ст. викл., к.т.н. Щурська К.О.
(посада, вчене звання, науковий ступінь, прізвище та ініціали)

Київ – 2015 року

Рожа є однією з найбільш поширених хвороб свиней, а її збудник *Erysipelothrix rhusiopathiae* здатний викликати і захворювання людини. При виникненні в господарствах рожа свиней спричиняє значні економічні збитки, що обумовлені загибеллю тварин, вимушеним забоєм, втратами продуктивності і витратами на лікування. За офіційними даними Державного департаменту ветеринарної медицини Міністерства сільського господарства і продовольства України кожного року реєструється від 5 до 28 неблагополучних пунктів щодо рожі.

Даний стан проблеми пояснюється убіквітарністю збудника рожі. Він невимогливий до поживного середовища, а також здатний як до аеробного, так і анаеробного дихання. Саме тому специфічна профілактика у вигляді вакцинації є основним надійним заходом проти поширення збудника і виникнення його мінливих форм. Наразі як на українському ринку, так і за кордоном присутні препарати живої та інактивованої вакцини проти рожі свиней. Їх ефективність, тобто вироблення у тварин достатньо напруженого проективного імунітету, багато в чому залежить від імуногенних і антигенних властивостей штамів, що використовуються.

Класична технологія виробництва живої вакцини проти рожі свиней має ряд недоліків, серед яких варто виділити: культивування продуценту на поживному середовищі, що не забезпечує необхідного накопичення біомаси; стерилізація поживного середовища проводиться термічним способом, що знижує його ростові властивості внаслідок денатурації білків і амінокислот; застосування методів центрифугування, гомогенізації і фільтрації призводить до зниження якості кінцевого продукту, можливості контакту обслуговуючого персоналу зі збудником рожі і контамінації продукту сторонньою мікрофлорою.

Саме тому метою даного проекту було обрано вдосконалення технології виробництва живої вакцини проти рожі свиней. Для її досягнення були поставлені наступні завдання:

- 1) Провести пошук високоімуногенного штаму *Erysipelothrix rhusiopathiae*, запропонувати схему його отримання.

- 2) Розробити технологічну та апаратурну схеми виробництва живої вакцини проти рожі свиней.
- 3) Вдосконалити інокулятор для ділянки підготовки посівного матеріалу.
- 4) Передбачити вимоги щодо охорони праці та пожежної безпеки на виробництві.

У першому розділі «Характеристика біологічного агента» описано морфолого-цитологічні, культуральні, фізіолого-біохімічні та серологічні ознаки збудника, його поширення в природі. *E. rhusiopathiae* – поліморфна, коротка паличка, розташовується поодинокі і ланцюжками, нерухома, спор і капсул не утворює, грампозитивна. На МПА збудник рожі свиней росте у вигляді дрібних росяних колоній, що просвічуються. Хемоорганотроф, росте в аеробних і анаеробних умовах. Культивується на МПБ, МПА, МПЖ, ПЖА (0,05-0,15% агару), бульйоні Хоттингера, селективному середовищі Сент-Івані (агарове середовище з 0,1% кристалвіолету і 1% азиду натрію). Оптимальні умови для росту: температура 36-37°C, рН 7,2-7,6. Рожа свиней – це септичне антропозоозне інфекційне захворювання, що характеризується геморагічним гастроентеритом, нефритом, крововиливами на серозних і слизових оболонках, збільшенням селезінки. За несвоєчасної запізнілої діагностики і прийнятті мір багато тварин гинуть.

Штам *E. rhusiopathiae*, що використовується при виробництві вакцини, залежить від виду вакцини, умов її виготовлення та поживного середовища, в якому культивується продуцент. В даному дипломному проекті пропонується технологія виробництва живої сухої вакцини проти рожі свиней на основі *Erysipelothrix rhusiopathiae* штаму WR2В.

У другому розділі «Біохімічні основи виробництва» наведено характеристику кінцевого продукту і механізм його впливу на імунну систему. Живі атенуйовані вакцини успішно індукують ефекторну відповідь як клітинного (CD4+ і CD8+ Т-лімфоцити), так і антитіло-опосередкованого (В-лімфоцити) імунітету, а також формують імунологічну пам'ять. Живі вакцини ефективно запускають активацію імунної системи, оскільки імунна відповідь на

них подібна до відповіді на природну інфекцію. Після введення живої вакцини та її дисемінації в організмі відбувається активація великої кількості дендритних клітин, що мігрують у відповідні лімфатичні вузли та запускають активацію Т- і В-клітинної відповіді. Це пояснює більш високу імуногенність живих вакцин порівняно з інактивованими вакцинами.

У третьому розділі «Методи отримання промислових продуцентів» наведені дані щодо генетичної вивченості біологічного об'єкту, загальні методи створення вакцинного штаму.

В роботі запропоновано схему отримання *Erysipelothrix rhusiopathiae* WR2B шляхом штучного добору. При отриманні промислового штаму за даною схемою, вихідна культура проходить декілька етапів. На першому етапі проводиться відбір штаму музейної культури з високою імуногенністю та зниженою вірулентністю. На другому етапі відбувається пересівання музейної культури, вивчення і відбір штамів з найкращими показниками необхідних властивостей. На наступному етапі відбувається стабілізація і перевірка на збереження необхідних показників штаму шляхом множинних пересівів і масштабування.

У четвертому розділі «Технологічна частина» охарактеризовано кінцеву продукцію виробництва, сировину, матеріали та напівпродукти, що використовуються на виробництві. Кінцевий продукт являє собою живу суху вакцину проти бешихи свиней. Форма випуску – ліофілізат. Одна доза вакцини містить вакцинний штам WR2B *E. rhusiopathiae* $\geq 4,0 \times 10^6$ живих бактерій. Препарат випускається у скляних флаконах об'ємом 20 мл, герметично закупорених гумовими пробками, обкатаними алюмінієвими ковпачками з вмістом 10 доз препарату в одному флаконі і упакованих по 10 штук в картонну коробку. Препарат застосовується для профілактичної імунізації свиней проти бешихи.

Наведено опис технологічного процесу, що складається з: допоміжних робіт (санітарна підготовка виробництва, підготовка стерильного повітря, одержання води очищеної, підготовка первинної упаковки, підготовка ПС для виробничого біосинтезу); стадій основного технологічного процесу (підготовка

посівного матеріалу, виробниче культивування, підготовка культуральної рідини до ліофільного висушування, розлив і попередня закупорка флаконів, ліофільна сушка, обкатка флаконів); стадії пакування, маркування, відвантаження готового продукту; стадії знезараження відходів та промислових викидів.

Для процесу ферментації готують поживне середовище на основі перевару Хоттінгера. Концентрацію пептону в пропонованому середовищі збільшено до 5%, що дозволило забезпечити бактерії бешихи джерелом азоту. До складу середовища, в якості джерела вуглецю, введено 0,2% глюкози, яка використовується мікроорганізмами як джерело енергії. Окрім того, для покращення ростових властивостей поживного середовища до нього введено амінокислоту L-аргінін та нормальну сироватку крові ВРХ. Для збереження ростових властивостей поживного середовища використовується метод холодної стерилізуючої фільтрації.

Підготовка посівного матеріалу відбувається шляхом поступового пересівання музейної культури. Одночасно проводять контрольні висіви на чистоту. При вирощуванні посівного матеріалу в інокуляторі температуру підтримують на рівні 36-37°C. Мішалку включають для підтримання однорідності інокулюму кожні 4 год протягом 10 хв з частотою перемішування 70-80 об/хв. Культивування триває 24 год.

Виробниче культивування відбувається при температурі 36-37°C протягом 20-22 год при постійному перемішуванні інтенсивністю 100-150 об/хв, що забезпечує підтримку парціального тиску розчиненого кисню на рівні 40-50% від насичення.

Середовище висушування готують на основі фосфатно-буферного розчину з вмістом: желатину – 4%; пептону – 15%; сахарози – 20%. Суміш середовища висушування з культуральною рідиною перемішують при 200-300 об/хв протягом 15 хвилин.

Розфасовку проводять з дотриманням правил асептики в стерильні флакони по 20 мл. Після розфасовки флакони попередньо закупорюють гумовими пробками.

На стадії ліофільного висушування препарату розфасовану вакцину поміщають у попередньо охолоджену холодильну камеру, після чого касети із замороженим до $-50\dots-45^{\circ}\text{C}$ матеріалом швидко перевантажують в попередньо підготовлений субліматор. Загальний час сушіння складає 72-96 годин.

Флакони з сухою вакциною виймають з касет субліматора і передають на лінію для накладання стерильних алюмінієвих ковпачків та їх обкатки.

Для реалізації технологічної схеми обрано апаратурну схему.

Розраховано матеріальний баланс виробництва, а також наведено перелік контрольних точок.

У п'ятому розділі «Розрахунок обладнання для проведення технологічного процесу» на основі проаналізованих даних обрано інокулятор об'ємом 10 л з еліптичним днищем і плоскою знімною кришкою, оснащений сорочкою і відкритою турбінною мішалкою. Проведено його розрахунок. Наведено креслення загального виду апарату.

У шостому розділі «Охорона праці» на основі даних вивчення і аналізу шкідливих виробничих факторів передбачено заходи з охорони праці, пожежної та екологічної безпеки виробництва.

ВИСНОВКИ

- 1) Наведено характеристику збудника захворювання; в якості продуцента обрано штам *Erysipelothrix rhusiopathiae* WR2B, що характеризується високою імуногенністю та безпечністю застосування.
- 2) Розглянуто характеристику кінцевого продукту та механізм його впливу на імунну систему.
- 3) Наведено дані, щодо геному продуцента; запропоновано схему отримання промислового вакцинного штаму шляхом штучного добору.
- 4) Для підвищення виходу біомаси *Erysipelothrix rhusiopathiae* WR2B у складі поживного середовища для виробничого культивування запропоновано збільшити концентрацію пептону до 5%, що дозволить забезпечити культуру джерелом азоту.

- 5) Запропоновано технологічну схему виробництва, в якій з метою збереження ростових властивостей поживного середовища термічну стерилізацію замінено стерилізуючою фільтрацією. На стадії висушування готового продукту для підвищення якості і терміну зберігання продукції запропоновано метод ліофільної сушки та підібрано середовище висушування.
- 6) Складено матеріальний баланс виробництва. Описано основні параметри контролю, виконання яких забезпечує належну якість продукції.
- 7) У відповідності до технологічної схеми обрано апаратурну схему виробництва.
- 8) Відповідно до каталогу підібрано конструкцію інокулятора для ділянки підготовки посівного матеріалу об'ємом 10 л; проведено розрахунок апарату, що підтверджує надійність обраної конструкції та стабільність технологічних параметрів роботи. Наведено креслення загального виду розрахованого апарату.
- 9) На основі даних вивчення і аналізу шкідливих виробничих факторів проектом передбачено вимоги охорони праці, пожежної та екологічної безпеки виробництва.