

УДК 639.3

## РЕКОМЕНДАЦІЇ ЩОДО ВИРОБНИЦТВА ЛІОФІЛІЗОВАНИХ ВІРУСНИХ І БАКТЕРІАЛЬНИХ БІОПРЕПАРАТІВ

*Беспалова Л.Є. – к.в.н., доцент,  
Рачковський А.В. – асистент, Херсонський ДАУ;  
Черевко Є.В. – ст. викладач, Одеський НЕУ*

**Постановка проблеми.** Найважливішим завданням, яке стоїть перед спеціалістами-біологами взагалі, а перед лікарями ветеринарної медицини зокрема, є профілактика різних захворювань тварин як наземних, так і водних.

Причиною цьому слугує те, що в наш час усе частіше й масштабніше з'являються і розповсюджуються явища різноманітних захворювань більшості живих об'єктів на Землі. Чинників цього процесу дуже багато, але головний з них – розширення людської діяльності.

**Стан вивчення проблеми.** Забруднення оточуючого середовища токсичними речовинами в теперішній час торкнулося всього живого, але поряд із цим кількість вірусних, бактеріальних, грибкових і паразитарних захворювань різної етіології з кожним роком стає все більшою і по ареалу розповсюдження, і по тяжкості їх перебігу у кожному хворому живому об'єкті. На щастя, людство знайшло засоби попередження більшості з цих захворювань. Але ця робота з причини широкої варіабельності в світі живого, різних умов виробництва профілактичних препаратів, різноманітності техніки і за її конструкцією, і за часом випуску не можуть бути до кінця удосконаленими.

З цієї причини будь-який діагностичний і вакцинний препарат, розроблений в умовах науково-дослідної лабораторії, на підприємстві при його розширеному виробництві потребує певної доробки. Особливо це стосується ліофілізованих препаратів.

Необхідно відмітити, що сучасна медицина, у тому числі і ветеринарна, потребує саме виробництва ліофілізованих препаратів, які, на відміну від рідких, не потребують особливих температурних умов зберігання. Як показали безліч наукових досліджень, вони залишаються активними навіть після їх вибракування за часом (1-2 роки) до десяти років і більше.

**Завдання і методика досліджень.** З огляду на вищевикладене, ми рекомендуємо наступний порядок дій при виробництві ліофілізованих препаратів. У тому випадку, коли в перших 3-х серіях виготовленого в умовах виробництва точно за інструкцією препарату відмічається зниження титрів або втрата його товарного виду у вигляді несформованої пігулки, пропонуємо такий план дій:

1. Додаткове ознайомлення з ТУ й інструкцією по виготовленню вірусного або бактеріального препарату.
2. Порівняння на всіх етапах виробництва рекомендованого в інструкції процесу з тим процесом, який здійснювався в трьох серіях виробництва, що дали негативний результат (значне падіння титрів і несформованість пігулки).

Якщо встановлено, що всі умови виробництва співпадають з умовами, рекомендованими в інструкції, ми пропонуємо провести заходи, які мають такий порядок виконання:

1. Виготовити безвірусну або безбактеріальну серію рідкого препарату.
2. Поділити виготовлену серію на декілька частин:
  - а) одну з частин заморозити і висушити за режимом, запропонованим ТУ та інструкцією;
  - б) другу частину – за режимом, запропонованим дослідниками, який, на їх думку, відповідає умовам, що є оптимальними для обладнання і техніки, наявних на виробництві.

Якщо при цьому обидві частини матимуть гарний товарний вигляд, тобто сформовану пігулку, то в подальшому для заморожування-висушування буде запропонований режим, рекомендований ТУ і інструкцією.

Якщо з двох дослідних режимів тільки один дозволить одержати в сухому вигляді сформовану пігулку, то для подальшої роботи буде обраний саме цей режим.

Після того, як буде виконана робота по визначенню оптимального режиму заморожування-висушування, готується серія активного біопрепарату, який містить віруси або бактерії. Ця серія підлягає ліофілізації по запропонованому в попередніх дослідженнях режиму.

Якщо режим підібраний так, як слід, то товарний вигляд сухого препарату повинен бути бездоганим.

Наступний етап – це перевірка біологічної активності вихідного рідкого препарату і готового сухого продукту. Якщо в процесі титрування виявлено, що заморожування і висушування не знизило біологічної активності препарату, то робота по засвоєнню його у виробництві вважається закінченою. І навпаки, якщо встановлено втрату препаратом його біологічної активності в процесі виробництва, то пропонується продовжити роботу з підбором стабілізаторів. Як правило, рекомендується складний стабілізатор з двох стабілізуючих речовин у різних співвідношеннях. Ці речовини не повинні мати антигенних властивостей, а температура їх заморожування повинна бути відносно високою. Крім того, вони не повинні спінюватися у вакуумі. Дуже важливою для цих речовин є здатність зберігати необхідну кількість вологи наприкінці процесу ліофілізації, бо надмірне висушування веде до інактивації будь-якого препарату.

За нашим переконанням, такі властивості мають пептон, желатин, знежирене молоко, моноглутамат натрію та ін. Рекомендуємо обрати стабілізатор з цих речовин у співвідношенні, вказаному в різних наукових джерелах [1].

Далі готується мікросерія (з кількістю ампул, достатніх для трьохразового титрування) активного біопрепарату зі стабілізатором, яка заморожується і висушується за режимом, обраним у результаті попередніх досліджень.

Якщо активність одержаного сухого препарату не поступається активності рідкого вихідного, то біопрепарат можна впроваджувати у виробництво.

Якщо все ж таки в процесі ліофілізації рідкий препарат втрачає активність більш, ніж передбачено інструкцією, то робота по вдосконаленню виробництва продовжується, але вже в іншому напрямі.

**Результати досліджень.** Для більш повного збереження біологічної активності, тобто найменшого падіння титрів препарату, що піддається ліофілізації, ми пропонуємо провести роботи по підбору найбільш ефективного стабілізатору з використанням методу математичного планування експерименту за допомогою двофакторного дисперсійного аналізу [2]. При цьому вивчається вплив на результативні показники двох одночасно діючих факторів мінливості. У нашому випадку це стабілізуючі речовини: речовина А і речовина В з трьома рівнями вмісту у біопрепараті, який підлягає ліофілізації, тобто процесу заморожування і висушування із замороженого стану.

Нехай ми маємо  $n$  спостережень у кожній з  $pq$  клітин схеми двофакторного експерименту з  $N = npq$  спостережень (табл. 1).

**Таблиця 1 – Дані для двофакторного дисперсійного аналізу з повторенням у клітинці**

	A <sub>1</sub>	A <sub>2</sub>	A <sub>3</sub>	...	A <sub>p</sub>	Суми
B <sub>1</sub>	Y <sub>111</sub> , Y <sub>112</sub> ... Y <sub>11n</sub>	Y <sub>211</sub> , Y <sub>212</sub> ... Y <sub>21n</sub>	Y <sub>311</sub> , Y <sub>312</sub> ... Y <sub>31n</sub>		Y <sub>p11</sub> , Y <sub>p12</sub> ... Y <sub>p1n</sub>	$pn\bar{y}_{1.}$
B <sub>2</sub>	Y <sub>111</sub> , Y <sub>112</sub> ... Y <sub>11n</sub>	Y <sub>211</sub> , Y <sub>212</sub> ... Y <sub>21n</sub>	Y <sub>321</sub> , Y <sub>322</sub> ... Y <sub>32n</sub>		Y <sub>p21</sub> , Y <sub>p22</sub> ... Y <sub>p2n</sub>	$pn\bar{y}_{2.}$
B <sub>3</sub>	Y <sub>111</sub> , Y <sub>112</sub> ... Y <sub>11n</sub>	Y <sub>231</sub> , Y <sub>232</sub> ... Y <sub>23n</sub>	Y <sub>331</sub> , Y <sub>332</sub> ... Y <sub>33n</sub>		Y <sub>p31</sub> , Y <sub>p32</sub> ... Y <sub>p3n</sub>	$pn\bar{y}_{3.}$
....				...		...
B <sub>q</sub>	Y <sub>111</sub> , Y <sub>112</sub> ... Y <sub>11n</sub>	Y <sub>2q1</sub> , Y <sub>2q2</sub> ... Y <sub>2qn</sub>	Y <sub>3q1</sub> , Y <sub>3q2</sub> ... Y <sub>3qn</sub>	...	Y <sub>pq1</sub> , Y <sub>pq2</sub> ... Y <sub>pqn</sub>	$pn\bar{y}_{q.}$
Суми	$qn\bar{y}_{1.}$	$qn\bar{y}_{2.}$	$qn\bar{y}_{3.}$	...	$qn\bar{y}_{p.}$	$pqn\bar{y}_{..}$

Результати двофакторного експерименту з повною рандомізацією умов подають такою моделлю:

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \gamma_{ij} + \varepsilon_{ijk}, \text{ де}$$

$\mu$  - загальне середнє;

$\alpha_i$  - ефект  $i$ -го рівня першого фактору;

$\beta_j$  - ефект  $j$ -го рівня другого фактору;

$\gamma_{ij}$  - ефект взаємодії, який являє собою відхилення середнього за спостереженнями;

$\varepsilon_{ijk}$  - помилка у середині окремої клітинки з розподілом  $N(0, \sigma_\varepsilon^2)$ .

фактор А – стабілізуюча речовина у процентному відношенні до 100 г біопродукту;

фактор В – стабілізуюча речовина у процентному відношенні до 100г біопродукту;

$y$  – активність біопрепарату після ліофілізації;

$N$  – загальна кількість дослідів;

$n$  – кількість дослідів по кожному сполученню.

Основне рівняння дисперсійного аналізу для сум квадратів двох факторів має вигляд:

$$\sum_{i,j,k} (y_{i,j,k} - \bar{y}_{...})^2 = nq \sum_{i=1}^p (y_{i.} - \bar{y}_{...})^2 + np \sum_{j=1}^q (y_{.j} - \bar{y}_{...})^2 + n \sum_{i,j} (y_{ij.} - y_{i.} - y_{.j} + \bar{y}_{...})^2 + \sum_{i,j,k} (y_{ijk} - y_{ij.})^2$$

або  $SS = SS_A + SS_B + SS_{AB} + SS_O$ , де

$$SS_A = nq \sum_{i=1}^p (y_{i..} - y_{...})^2 = \frac{\sum_i T_i^2}{pn} - \frac{T_{..}^2}{N}$$

має  $(p-1)$  ступенів свободи;

$$SS_B = np \sum_j (y_{.j.} - y_{...})^2 = \frac{\sum_j T_j^2}{qn} - \frac{T_{..}^2}{N}$$

має  $(q-1)$  ступенів свободи;

$$SS_{AB} = n \sum_{ij} (y_{ij.} - y_{i..} - y_{.j.} + y_{...})^2 + \sum_{ij} T_{ij}^2 - SS_A - SS_B - \frac{T_{..}^2}{N}$$

має  $(p-1)(q-1)$  ступенів свободи;

$$SS_O = \sum_{i,j,k} (y_{ijk} - y_{ij.})^2 = \sum_{i,j,k} y_{ijk}^2 - \sum_{i,j} \frac{T_{ij}^2}{n}$$

має  $N-pq$  ступенів свободи;

$$SS = \sum_{i,j,k} (y_{ijk} - y_{...})^2 = \sum_{ijk} y_{ijk}^2 - \frac{T_{..}^2}{N}$$

має  $N-1$  ступенів свободи.

Результати обчислень наводять у таблиці дисперсійного аналізу (табл. 2).

**Таблиця 2 – Результати дисперсійного аналізу**

Джерело мінливості	Сума квадратів	Ступені свободи	Середні MS
Вплив фактора А	$SS_A$	$p-1$	$MS_A = \frac{SS_A}{p-1}$
Вплив фактора В	$SS_B$	$q-1$	$MS_B = \frac{SS_B}{q-1}$
Сумісний вплив А?В	$SS_{AB}$	$(p-1)(q-1)$	$MS_{AB} = \frac{SS_{AB}}{(p-1)(q-1)}$
Різниця в середині клітин	$SS_O$	$N-pq$	$MS_O = \frac{SS_O}{N-pq}$
Сума	$SS$	$N-1$	

Величини:

$$F_A = \frac{MS_A}{MS_O}; F_B = \frac{MS_B}{MS_O}; F_{AB} = \frac{MS_{AB}}{MS_O}$$

мають розподіл Фішера зі ступенями свободи  $n_1$  та  $n_2$ .

Для них,  $n_1$  та  $n_2$  відповідно дорівнюють:

$$n_1 = p - 1, n_2 = N - pq,$$

$$n_2 = q - 1, n_2 = N - pq,$$

$$n_1 = (p - 1)(q - 1), n_2 = N - pq.$$

Далі знаходимо табличні значення  $F(\alpha; n_1, n_2)$ . Літерою  $\alpha$  тут позначено так званий рівень значущості, тобто ймовірність прийняття нами невірної гіпотези. Рекомендується прийняти  $\alpha = 0,05$ . Якщо, наприклад:

$$F_A > F(\alpha; p - 1, N - pq),$$

$$F_B < F(\alpha; q - 1, N - pq),$$

$$F_{AB} > F(\alpha; (p - 1)(q - 1), N - pq),$$

то це означає, що речовина В, на відміну від речовини А, не має суттєвого впливу на досліджувану величину  $Y$ , і її треба замінити іншою. У випадку, коли:

$$F_A > F(\alpha; p - 1, N - pq);$$

$$F_B > F(\alpha; q - 1, N - pq); +$$

$$F_{AB} > F(\alpha; (p - 1)(q - 1), N - pq),$$

ми робимо висновок про істотний вплив обох речовин. Нам залишається вибрати комірку, в якій середнє значення величини  $Y$  найбільше. Тобто, нехай ця комірка лежить на перетині рядка з номером  $k$  та стовпчика з номером  $m$ , і відповідно, середнє по комірці значення:

$$y_{mk} = \frac{\sum_{i=1}^n y_{mki}}{n}$$

– найбільше у таблиці. Тоді речовину А варто використовувати у кількості  $A_m$ , речовину В – використовувати у кількості  $B_k$ . Зрозуміло, якщо така комірка буде знаходитись у першому стовпчику (рядку), то це означатиме негативний вплив речовини А (В), отже, таку речовину варто виключити. Локалізація «максимальної» комірки в останньому рядку або стовпчику вимагатиме, навпаки розширення поля експерименту у відповідному напрямі.

Висушування з замороженого стану для визначення оптимального стабілізатора можна здійснити, сформувавши 3 серії біопрепарату, які складаються з 9-ти частин з різними співвідношеннями стабілізуючих речовин і займають кожна серія одну полицю сублімаційної установки. Кожна частина серії готового сухого продукту підлягає триразовому титруванню. Отже, у нашому випадку  $p = 3$  (кількість рівнів речовини А),  $q = 3$  (кількість рівнів речовини В),  $n = 3$  (кількість серій – полиць сублімаційної установки). Загальна кількість дослідів  $N = prq = 27$ . Обробка даних за наведеними формулами допомагає дослідникам визначити оптимальну відсоткову кількість стабілізуючих речовин на 100 г біопродукту до його ліофілізації.

**Висновки та пропозиції.** Оптимальний режим ліофілізації і найефективніший склад стабілізаторів може бути завершений у першому етапі дослідження. Втрата активності біопрепаратом, хоч і не набагато більше, ніж передбачено в інструкції, потребує переходу досліджень на другий етап з використанням математичного планування двохфакторного експерименту.

Виходячи з вищезазначеного, вважаємо за доцільне ознайомлення розробників ТУ та інструкцій з результатами досліджень при освоєнні біопрепаратів на виробництві для можливого внесення поправок та доповнень.

**СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ:**

1. Никитин Е.Е., Звягин И.В. Замораживание и высушивание биологических препаратов. – М.: Колос, 1971. – 342 с.
2. Лисенков А.Н. Математические методы планирования многофакторных медико-биологических экспериментов. – М.: Медицина, 1979. – 342 с.
3. Четыркин Е.М., Калихман И.Л. Вероятность и статистика. - М.:1982 – С. 308.
4. Применение замораживания – высушивания в биологии. Под ред. Р. Харриса М.: Ин. лит,1956. – 533 с.
5. Бланков Б.И., Клебанов Д.Л. Применение лиофилизации в микробиологии. - М., 1961. – 263с.

УДК 639.371.5(477)

**РИБНИЦЬКО-БИОЛОГІЧНІ ОСОБЛИВОСТІ ВИРОЩУВАННЯ  
ПОСАДКОВОГО МАТЕРІАЛУ КОРОПОВИХ РИБ**

*Лянзберг О.В. – доцент, Херсонський ДАУ*  
*Пентиліук Р.С. – доцент, Одеський ДЕКУ*

**Постановка проблеми.** Проблема вирощування життєстійкого рибосадкового матеріалу залишається однією з актуальних протягом усієї історії рибництва. Збільшення ставових площ, підвищення щільностей посадки при інтенсифікації ставового рибництва, розвиток індустріального рибництва, інтродукція у малі водосховища різного цільового призначення, середні і великі рівнинні водосховища потребують постійного нарощування обсягів виробництва рибосадкового матеріалу. При цьому простежується тенденція розширення вимог споживачів до якості садкового матеріалу, що є обґрунтованим. Поряд із забезпеченням стандартної маси тіла особин очевидна потреба у певному видовому співвідношенні компонентів полікультури, а в ряді випадків для специфічних умов потрібний садковий матеріал, маса тіла якого значно перевищує діючі нормативні параметри.

Для пасовищної аквакультури, яка орієнтована на промислових акваторіях великих водосховищ, озер, річкових систем, розроблена технологія вирощування садкового матеріалу, яка базується на дволітньому обороті з отриманням дволіток рослиноїдних риб з середньою масою 100-150 г. Проте, враховуючи специфіку кліматичних умов півдня України та існуючих досліджень, на нашу думку, перспективним варіантом може стати вирощування садкового матеріалу за однолітнім оборотом, маса якого буде суттєво перевищувати загальноприйнятий стандарт. Наявність різних думок з приводу ефективності вирощування якісного садкового матеріалу, який у період адаптації до нових умов та відпрацювання комплексу поведінкових реакцій не потрапить під «прес» хижаків, а також забезпечить отримання високої середньої маси при культивуванні у ставах, обумовила необхідність наукового обґрунтування виробництва життєстійкого садкового матеріалу корошових риб в умовах