

ОСТАННІ НАДХОДЖЕННЯ

УДК: 619:616.981.51:615.37:636

ДОСЛІДЖЕННЯ СТАБІЛЬНОСТІ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ ЖИВОЇ ВАКЦИНИ ПРОТИ СИБІРКИ ТВАРИН ІЗ ШТАМУ *Bacillus anthracis* UA-07 «АНТРАВАК» (ЗБЕРІГАННЯ ПРОГЯГОМ 36 МІС ІЗ ДНЯ ВИГОТОВЛЕННЯ)

І. О. Рубленко, к.вет.н., Білоцерківський національний аграрний університет

В. Г. Скрипник, к.вет.н., Українська асоціація виробників і дистриб'юторів ветеринарних препаратів та кормових добавок

У статті наведені результати дослідження визначення стабільності показників якості експериментальної живої вакцини проти сибірки тварин із штаму *Bacillus anthracis* UA-07 «Антравак», протягом 24, 30 та 36 міс. з моменту виготовлення. Встановлено стабільність досліджуваних показників вакцини впродовж періоду спостереження. При дослідженні показників через 36 міс з моменту виготовлення було виявлено відсутність сторонніх домішок, відсутність бактеріальної та грибною мікрофлори, масова частка гліцерину становила 28%, рН 7,0, 14,23 млн. живих спор у 1 см³, масова доля спор – 83%, типовість росту на щільних середовищах, однорідність клітин, відповідність показників при вивченні морфологічних, тинкторіальних властивостей, рухливості (не рухомі), вакцина імуногенна, не шкідлива, не викликала некрозу, набряку, тощо.

Ключові слова: сибірка, *Bacillus anthracis*, вакцина, Антравак, нешкідливість, спори, імуногенність, температура, сталість.

Одним із аспектів забезпечення здоров'я тварин та людей є профілактика інфекційних хвороб. Одним із бактеріальних патогенних мікроорганізмів, який поширений у світі є *Bacillus anthracis* [1]. Збудник викликає захворювання людей і тварин на сибірку (сибирская язва, anthrax), призводить до значних економічних збитків для багатьох країн [2]. У чутливих до сибірки травоядних тварин захворювання перебігає переважно у септичній формі. В Україні сибірку реєструють у великої рогатої худоби, зрідка – у свиней [3]. Небезпечне захворювання і для людей, особливо легенева форма [8,9].

Актуальність проблеми зумовлена, тим, що, перспективним напрямком у боротьбі з сибіркою на сьогодні є використання вакцин. Вчені всього світу перебувають у постійному пошуку розвитку ефективніших вакцин. Дослідники пропонують різні варіанти вакцин: живі, інактивовані, з окремими фрагментами. За кордоном використовують ліцензовану вакцину AVA (Anthrax Vaccine Adsorbed, США), вакцину з авірулентного штаму Langzhou A16R (Китай), AVP, BioThrax та інші. Є вакцини які використовують лише для тварин, а є які і для людей [4].

На території України в результаті проведення регулярних щеплень тварин сибірка періодично виникає, але спорадично [7]. За даними Департаменту безпечності харчових продуктів та ветеринарії Держпродспоживслужби України, з початку 2017 року було проведено 2,8 млн. головообробок сприйнятливих тварин. Згідно досліджень українських дослідників [6] найбільше хворих тварин за рік спостерігається у Волинській (1994р), Луганській (1994р) та Херсонській (1999р) областях [5].

Тому, актуальним питанням фармації і ветеринарної медицини України є розробка вакцини

для попередження сибірки. На нашу думку, перспективним напрямком для створення вакцини проти сибірки тварин є використання живих збудників. При використанні живих збудників існує ряд труднощів при стандартизації вакцин: визначення консервантів, їх концентрації, забезпечення ефективності, безпечності, визначення умов та термінів зберігання запропонованих, внаслідок чого виникає необхідність вивчення стабільності розробленої вакцини.

Мета роботи. Вивчити стабільність експериментальної живої вакцини серії 1 проти сибірки тварин із штаму UA-07 «Антравак» із штаму UA-07 протягом 36 міс з моменту зберігання.

Матеріали і методи. У роботі використали експериментальну серію 1 вакцини проти сибірки тварин із штаму *Bacillus anthracis* UA-07 «Антравак». Для визначення зовнішнього вигляду флаконів із вакциною струшували та продивлялися в пронизуючому світлі. Одночасно флакони перевіряли на щільність закупорювання і відповідність етикетки.

Визначали масову частку гліцерину: два флакони з вакциною попередньо витримували у термостаті за температури 23 °С 30 протягом хв. Флакон із вакциною розкривали, вакцину із флакона швидко переносили у водяний циліндр і занурювали у нього денсиметр, що розрахований на вимірювання густини рідини від 1,0597 до 1,0860 г/см³. Потім циліндр із вакциною і денсиметром поміщали у термостат, витримували за температури 23 °С протягом 15 хв.

Концентрацію водневих іонів (рН) визначали електрометричним методом, використовуючи потенціометр ЛПУ-01, в відповідності до правил, що додаються до приладу.

Визначення числа живих спор визначали методом посіву зразків вакцини на щільні живи-

льні середовища. Із двох послідовних розведень вакцини 10^{-5} , 10^{-6} , мікропіпеткою робили посіви в бактеріологічні чашки з МПА. Кожним розведенням вакцини засівали по 3 чашки, вносячи в кожену по $0,1\text{ см}^3$ зависі спор. Культивували за температури $36\text{ }^\circ\text{C}$ протягом 24 годин.

Масову долю живих спор у вакцині (із розведення вакцин 10^{-1}) визначали шляхом приготування на предметних скельцях препаратів «роздавленої» краплі, потім проводили мікроскопію. У полях зору окремо підраховували спори і палички. Загальна кількість підрахованих клітин (спор і паличок) – 200. Контамінацію бактеріальною і грибною мікрофлорою визначали згідно ДСТУ 4483.

Типовість росту культури проводили шляхом посіву середньої проби досліджуваних серій вакцини по $0,2\text{ см}^3$ у 2 пробірки з поживним середовищем МПБ і по $0,5\text{ см}^3$ в 2 флакони об'ємом 50 і 100 см^3 (також із МПБ).

Для одержання ізольованих колоній – $0,1\text{ см}^3$ суспензії переносили у 2 чашки з кров'яним МПА (4% дефібринованої крові барана). Культивували за температури $36\text{ }^\circ\text{C}$. Посіви на поживному середовищі витримували добу.

Результати досліджень. Визначення стабільності експериментальної живої вакцини серії 1 проти сибірки тварин із штаму UA-07 «Антравак» при зберіганні протягом 24, 30 та 36 міс. представлені в таблиці 1.

Таблиця 1 – Результати досліджень стабільності «Вакцини живої проти сибірки тварин із штаму UA-07 «Антравак» експериментальної серії № 1

п/п	Показники дослідження	Вимоги за Інструкцією	Через 2 роки	Через 2,5 роки	Через 3 роки
1	Зовнішній вигляд	рідина від солом'яно-жовтого до темно-коричневого кольору, при зберіганні утворює осад сіруватого кольору, який легко розбивається при струшуванні	однорідна рідина світло-коричневого кольору	однорідна рідина світло-коричневого кольору	однорідна рідина світло-коричневого кольору
2	Наявність сторонніх домішок, плісняви, нерозбитих пластівців.	не допускається	не має	не має	не має
3	Масова частка гліцерину, %	30 ± 3	28	28	28
4	Концентрація водневих іонів, pH	6,8–7,8	7,18	7,1	7,0
5	Кількість живих спор в 1 см^3 , млн., не менше	16 ± 4	14, 82	15,36	14,23
6	Масова доля спор, %	90 ± 10	85%	83%	83%
7	Контамінація бактеріальною і грибною мікрофлорою	не допускається	неконтамінована	неконтамінована	неконтамінована
8	Типовість росту	однорідні колонії R-форми	сірувато-білі колонії R-форми	сірувато-білі колонії R-форми	сірувато-білі колонії R-форми
9	Однорідність	типові палички для <i>Bac. anthracis</i>	типові грам позитивні палички без інволюційних форм	типові грам позитивні палички без інволюційних форм	типові грам позитивні палички без інволюційних форм
10	Морфологія культури штаму «UA-07»	грам позитивні палички і поодинокі ланцюжки	грам позитивні палички і поодинокі ланцюжки	грам позитивні палички і поодинокі ланцюжки	грам позитивні палички і поодинокі ланцюжки
11	Рухливість	нерухомі палички	нерухомі палички	нерухомі палички	нерухомі палички
12	Капсулоутворення	безкапсульні палички	безкапсульні палички	безкапсульні палички	безкапсульні палички
13	Нешкідливість	повинна бути нешкідливою	нешкідлива	нешкідлива	нешкідлива
14	Залишкова вірулентність	може спричиняти незначний набряк	не викликає набряку, некрозу шкіри. Немає загибелі тварин	не викликає набряку, некрозу шкіри. Немає загибелі тварин	не викликає набряку, некрозу шкіри. Немає загибелі тварин
15	Імуногенна активність	повинна бути імуногенною	80%	80%	80%
16	Температура зберігання	від $4\text{ }^\circ\text{C}$ до $15\text{ }^\circ\text{C}$	$10\text{ }^\circ\text{C}$	$6\text{ }^\circ\text{C}$	$6\text{ }^\circ\text{C}$

Результати досліджень свідчать, що експериментальна вакцина «Антравак», виготовлена з штаму *Bacillus anthracis* UA-07 відповідає показникам якості, передбаченим у технологічному

регламенті на вакцину а саме: зовнішній вигляд, наявність сторонніх домішок, масова частка гліцерину, pH, кількість живих спор, масова доля спор, контамінація, типовість росту, однорідність,

морфологія вакцинного штаму, рухливість, капсулоутворення, нешкідливість, залишкова вірулентність, імуногенна активність.

Встановлено стабільність досліджуваних показників вакцини серії 1 протягом досліджуваного періоду (через 24, 30 та 36 міс з моменту виготовлення) за температури зберігання 6 та 10 °С. При дослідженні масової частки гліцерину виявлено 28%, рН в межах 7,0–7,18, кількість живих спор в 1 см³ було виявлено в межах 14,23–15,36 млн., не викликала набряку, некрозу шкіри; відсутність загибель тварин, імуногенна.

Висновки. При дослідженні показників якості вакцини живої проти сибірки тварин із штаму UA–07 «Антравак» експериментальної серії було виявлено відсутність сторонніх домішок, відсутність бактеріальної та грибною мікрофлори, масова частка гліцерину становила 28 %, рН – 7,0–7,18, 14,23–15,36 млн. живих спор у 1 см³, масова доля спор – 83–85%, типовість росту на щільних середовищах, однорідність клітин, відповід-

ність показників при вивченні морфологічних, тинкторіальних властивостей, рухливості (не рухомі), вакцина імуногенна, не шкідлива, не викликала некрозу, набряку, тощо.

При дослідженні показників вакцини живої проти сибірки тварин із штаму UA–07 «Антравак» експериментальної серії 1 через 36 міс з моменту виготовлення було виявлено відсутність сторонніх домішок, відсутність бактеріальної та грибною мікрофлори, масова частка гліцерину становила 28%, рН 7,0, 14,23 млн. живих спор у 1 см³, масова доля спор – 83%, типовість росту на щільних середовищах, однорідність клітин, відповідність показників при вивченні морфологічних, тинкторіальних властивостей, рухливості (не рухомі), вакцина імуногенна, не шкідлива, не викликала некрозу, набряку, тощо.

Перспектива подальших досліджень.

Подальше дослідження показників якості вакцини за більшого терміну зберігання зберігання 12, 13, 15 та 17 °С.

Список використаної літератури:

1. Liman O.Y. Molecular technologies anthrax detection by PCR of different formats / O.Y. Liman, L.A. Murtazayeva, S.Klee, A.P. Liman //Journal of Biotechnology. – 2013. – №3. – P. 86–96.
2. Zwick M.E. Genomic characterization of *Bacillus cereus sensu lato* species: backdrop to the evolution of *Bacillus anthracis* / M.E. Zwick, S.J. Joseph, X. Didelot //The Genome Res. – 2012.–№29(3). – P.1512–1524.
3. Toby I.T. Divergence of protein-coding capacity and regulation in the *Bacillus cereus sensu lato* group / I.T. Toby, J.Widmer, D.W. Dyer //The BMC Bioinformatics. – 2014. – №15 (11). <http://www.biomedcentral.com/1471-2105/15/S11/S8>. DOI: 10.1186/1471-2105-15-S11-S8
4. Berger T. Kassirer M., Aran A.A. Injectional anthrax – new presentation of an old disease. *European communicable disease bulletin*, 2014, vol. 19, no. 32. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25139073>
5. Centers for Disease Control and Prevention. Human anthrax associated with an epizootic among livestock – North Dakota, 2000. *Morb Mortal Wkly Rep.*, 2001, no. 50, pp. 677–680. <https://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm5032a1.htm>
6. Bahl I.M. High bun dance and diversity of *Bacillus anthracis* plasmid pXO1-like replicon sin municipal waste water / I.M. Bahl, K.Rosenberg //Journal of Microbiol Ecol. – 2010. – №74.– P. 241–247.
7. Рубленко І.О. Аналіз даних епізоотичних спалахів сибірки на території України (період 1994 – 2016 рр.) / І.О. Рубленко, В.Г. Скрипник // Наук. вісник вет. мед. Збірник наукових праць. – Вип.1 (127). – Біла Церква. – 2016. – №1 (127). – С. 87–95.
8. Державна служба України з питань безпечності харчових продуктів та захисту споживачів України. Ситуація із туберкульозом тварин є контрольованою. http://www.consumer.gov.ua/News/2702/V_Ukraini_situatsiya_iz_tuberkulozom_e_kontrolovanoyu_%E2%80%93Artem_Saenko
9. Woods C.W. Risk factors for human anthrax among contacts of anthrax – infected livestock in Kazakhstan / C.W. Woods, K.Ospanov, A.Myrzabekov //Journal the American society of tropical medicine and hygiene. – 2004.– №1 (71). –P. 48–52.

Рубленко І.А., Скрипник В.Г. ИССЛЕДОВАНИЕ СТАБИЛЬНОСТИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ЖИВОЙ ВАКЦИНЫ ПРОТИВ СИБИРСКОЙ ЯЗВЫ ЖИВОТНЫХ ИЗ ШТАММА UA–07 «АНТРАВАК» (ПРИ ХРАНЕНИИ 36 МЕС. СО ДНЯ ИЗГОТОВЛЕНИЯ)

В статье приведены результаты исследования определения стабильности показателей качества экспериментальной живой вакцины против сибирской язвы животных из штамма *Bacillus anthracis* UA–07 «Антравак», в течение 24, 30 и 36 мес. с момента изготовления. Установлено стабильность исследуемых показателей вакцины в течение периода наблюдения. При исследовании показателей через 36 мес. с момента изготовления было обнаружено отсутствие посторонних примесей, отсутствие бактериальной и грибовой микрофлоры, массовая доля глицерина составляла 28%, рН 7,0, 14230000. Живых спор в 1 см³, массовая доля спор – 83%, типичность роста на плотных средах, однородность клеток, соответствие показателей при изучении морфологических, тинкториальных свойств, подвижности (не подвижны), вакцина иммуногенна, не вредна, не

вызывала некроза, отека и тому подобное.

Ключевые слова: сибирская язва, *Bacillus anthracis*, вакцина, Антравак, безвредность, споры, иммуногенность, температура, постоянство

Rublenko I., Skrypnyk V. STUDY OF STABILITY OF EXPERIMENTAL LIVING VACCINE AGAINST SILK OF ANIMAL ANIMALS UA-07 "ANTRAVAK" (STORAGE OVER 36 MONTHS FROM THE DAY OF MANUFACTURE)

*The article presents the results of the study of determining the stability of the quality of the experimental live vaccine against anthrax from animals of the genus *Bacillus anthracis* UA-07 "Antravak" for 24, 30 and 36 months since fabrication. Stability of the studied parameters of the vaccine during the observation period was established. In the study of indicators after 36 months from the time of manufacture, the absence of foreign impurities, the absence of bacterial and fungal flora, the mass fraction of glycerin was 28%, pH 7,0, 14,23 million live spores in 1 cm³, the mass fraction of spores – 83%, the typicality of growth on dense environments, the homogeneity of cells, the correspondence of indicators in the study of morphological, coloration properties, mobility (not moving), immunogenic vaccine, not harmful, did not cause necrosis, edema, and the like.*

Key words: anthrax, *Bacillus anthracis*, Anthracite, harmless, spores, immunogenicity, temperature, constancy

Дата надходження до редакції: 20.10.2017 р.

Рецензент: д.вет.н., професор Фотіна Т.І.