

В. О. ПОСТОЄНКО, доктор сільськогосподарських наук

О. С. ВОЙТА, аспірант

Державний науково-контрольний інститут біотехнології та штамів мікроорганізмів, м. Київ

ТЕХНОЛОГІЯ ВИГОТОВЛЕННЯ МОДЕЛЬНИХ ЗРАЗКІВ ВАКЦИН З РІЗНИМ ВМІСТОМ ФОРМАЛЬДЕГІДУ ТА ТІОМЕРСАЛУ

Обґрунтовано необхідність створення модельного ряду вакцин з різним вмістом формальдегіду та тіомерсалу, які в наступних дослідженнях буде використано для побудови експериментальної моделі з вивчення впливу даних хімічних сполук у складі імунобіологічних препаратів на організм тварин. Розроблено технологію отримання серії експериментальних вакцин проти пастерельозу кролів з різним вмістом формальдегіду та тіомерсалу.

Ключові слова: модельний ряд вакцин, формальдегід, тіомерсал, біологічні моделі.

Нині щеплення посідає одне з провідних місць у боротьбі з інфекційними хворобами як у ветеринарній, так і в гуманній медицині. Метод надійно увійшов в арсенал заходів з профілактики та боротьби з інфекційними хворобами [1].

Перед застосуванням імунобіологічні препарати обов'язково контролюються за рядом показників, таких як нешкідливість, імуногенність тощо. Проте мало дослідженим є питання впливу окремих компонентів, зокрема, формальдегіду, тіомерсалу (органічна сіль ртуті) та інших хімічних компонентів, у складі інактивованих вакцин на організм тварин та людини. Шкодочинність зазначених хімічних сполук у живому організмі широковідома та експериментально вивчалася багатьма вченими [2-17]. Але дослідження проводилися при безпосередньому впливі зазначених хімічних сполук на організми, а не у складі імунобіологічних препаратів. Тому обґрунтування порогових значень нешкідливості формальдегіду і тіомерсалу у складі імунобіологічних препаратів потребує детальних досліджень на біологічних моделях.

Отже **метою** роботи було створення біологічних моделей з визначення впливу формальдегіду і тіомерсалу у складі інактивованих вакцин на організм тварин. У зв'язку з цим на першій стадії необхідно було розробити технологію та виготовити серію вакцин з різним вмістом формальдегіду та тіомерсалу.

Матеріали та методи досліджень. В якості модельного мікроорганізму було обрано *Pasteurella multocida*. До складу модельних препаратів вносили антигени 7 штамів *Pasteurella multocida*, а саме 2, 5, 15, 16, 17, 550 та Смол.

Модельні зразки вакцин отримували згідно відомих біотехнологічних процесів [18] з нашими модифікаціями на стадіях нарощування бактеріальної маси та її інактивації. Живильним середовищем для матриксного розплоду та отримання бактеріальної маси були ГРМ-бульйон та ГРМ-агар збагачені 10%-м вмістом інактивованої сироватки крові коня та 1%-м – 40 %-ї глюкози. Вміст (ліофілізовану культуру)

однієї ампули кожного штаму розчиняли у 2-3 мл ГРМ-бульйону і засівали у дві пробірки з ГРМ-бульйоном та чашки Петрі з ГРМ-агаром. Висіви інкубували при температурі $37\pm 1^\circ\text{C}$ протягом 24 годин. Через 24 години інкубування при появі росту, культуру перевіряли за показником «контамінація сторонньою бактеріальною і грибною мікрофлорою згідно ДСТУ 4483:2005». Потім 24-годинну культуру засівали на матраси з ГРМ-агаром із розрахунку 5 см^3 культури на один матрас з ГРМ-агаром і знову інкубували протягом 24 годин за температури $37\pm 1^\circ\text{C}$ [19]. Після 24 годин інкубування проводили змиви з матрасів фізіологічним розчином з рН 7,0-7,2.

Інактивацію штамів проводили температурним методом, на водяній бані при 60°C протягом 7 днів. Після закінчення інактивації культуру перевіряли за показниками «контамінація сторонньою бактеріальною і грибною мікрофлорою згідно ДСТУ 4483:2005», повнота інактивації та визначення концентрації мікробних клітин [19, с. 87, 164,]. Повноту інактивації перевіряли шляхом висіву на живильні середовища ГРМ-агар, ГРМ-бульйон та середовище Сабуро. Інкубування проводили за температури $37\pm 1^\circ\text{C}$ (на середовищі Сабуро (20°C - 24°C)). При цьому спостерігали відсутність росту *P. multocida* протягом 10 днів. Визначення концентрації бактеріальної маси проводили користуючись стандартами оптичними мікробіологічними виробництва ДНКІБШМ [20]. Концентрація мікробних клітин в 1 см^3 складала 30 ± 2 млрд клітин.

Інактивовані культури клітин 7-ми штамів змішували в стерильній ємності в рівних співвідношеннях. В якості ад'юванту використовували Mantanid ISA 70. Для отримання вакцини брали 30% бактеріальної маси від загального об'єму та 70% даного ад'юванту.

На основі аналізу досьє та існуючої нормативної документації на інактивовані вакцини, що зареєстровані в Україні, нами обґрунтовано досліджувані інтервали концентрацій формальдегіду та тіомерсалу у складі модельних зразків вакцин. У зв'язку з цим виготовлено наступний модельний ряд вакцин:

1. без формальдегіду та тіомерсалу;
2. 0,025% формальдегіду;
3. 0,05% формальдегіду;
4. 0,1% формальдегіду;
5. 0,3% формальдегіду;
6. 0,05% формальдегіду + 0,005% тіомерсалу;
7. 0,05% формальдегіду + 0,01% тіомерсалу;
8. 0,05% формальдегіду + 0,02% тіомерсалу.

Необхідні концентрації хімічних сполук до складу цих вакцин вносили за розробленою нами методикою. Йодометричним методом визначили, що концентрація комерційного формаліну складає 36% [21]. Для отримання концентрації формальдегіду в розчині 0,025%, 0,05 %, 0,1% та 0,3% на 36 мл рідини необхідно додати 0,025 г, 0,05 г, 0,1 г та 0,3 г 36%-го формаліну відповідно [22]. Але оскільки формальдегід має здатність зв'язуватися з компонентами вакцини, необхідно було визначити його кількість для отримання запланованої концентрації у кінцевому продукті. До 36 мл бактеріальної маси з ад'ювантом додали 0,05 г 36%-го формаліну та визначали вміст вільного формальдегіду в отриманому препараті щоденно до припинення зв'язування формальдегіду з компонентами вакцини. Результати

дослідження показали, що одразу після приготування пробного зразку вакцини, кількість вільного формальдегіду складала 0,05% , і перестала знижуватися після досягнення значення 0,03%. Аналогічний дослід провели з іншими концентраціями формальдегіду. З'ясували, що для отримання в інактивованій вакцині концентрації вільного формальдегіду 0,05%, до 36 мл бактеріальної маси з ад'ювантом необхідно додати 0,07 г 36%-го формаліну, для отримання концентрації 0,025%, 0,1% та 0,3% – додати відповідно 0,045 г, 0,12 г, 0,32 г 36%-го формаліну. Об'єм кожного зразку вакцини становив 50 мл. Нами було зроблено перерахунок кількості формальдегіду з об'єму 36 мл на 50 мл. Якщо для отримання вмісту вільного формальдегіду 0,05% до вакцини об'ємом 36 мл необхідно додати 0,07 г 36%-го формаліну, то до вакцини об'ємом 50 мл – 0,097 г. Аналогічно проводимо перерахунки для інших концентрацій.

Оскільки тіомерсал не має здатності зв'язуватися з компонентами вакцини, на відміну від формальдегіду, для отримання 0,005%-ї концентрації тіомерсалу в інактивованій вакцині, до 50 мл бактеріальної маси з ад'ювантом додаємо 0,0025 г солі тіомерсалу, 0,01%-ї концентрації – 0,0050 г, 0,02%-ї концентрації – 0,01 г солі тіомерсалу.

Всі перераховані вище дані наведені в таблиці (табл. 1) складових вакцини:

Таблиця 1

Компонентний склад модельних зразків вакцин проти пастерельозу кролів з різними концентраціями формальдегіду та тіомерсалу

№ вакцини/ компонент	<i>P. multocida</i> (см ³)	Mantanid ISA 70 (см ³)	Формальдегід (г)	Тіомерсал (г)
1. Без ф. та т.	15	35	-	-
2. 0,025% ф.	15	35	0,063	-
3. 0,05% ф.	15	35	0,097	-
4. 0,1% ф.	15	35	0,167	-
5. 0,3% ф.	15	35	0,44	-
6. 0,05% ф. + 0,005% т.	15	35	0,097	0,0025
7. 0,05% ф. + 0,01% т.	15	35	0,097	0,0050
8. 0,05% ф. + 0,02% т.	15	35	0,097	0,01

де: ф. – формалін

т. – тіомерсал

В підготовлені стерильні флакони вносили вищевказані кількості формальдегіду, тіомерсалу, бактеріальної маси та ад'юванту.

Кінцеву концентрацію вільного формальдегіду у вакцинах досліджували методом, викладеним у Єврофармакопеї п.2.4.18 [23], а тіомерсалу – методом, описаним у методичних рекомендаціях щодо визначення залишкових кількостей інактивантів і консервантів у ветеринарних імунобіологічних препаратах [24].

Запропоновані вакцини проти пастерельозу кролів аналізували за показником нешкідливості. Для цього сформовано 9 груп білих мишей, по 10 тварин в кожній групі. Через два тижні спостереження за створеними групами, провели підшкірне введення 0,5 мл вакцин підшкірно кожній тварині. В контрольній групі мишам вводили по 0,5 мл фізіологічного розчину. Спостереження за тваринами після ін'єкції вакцини тривало протягом 14 днів, та проводилося за наступними показниками: наявність місцевої реакції, активність, сприймання корму, загибель. В результаті проведення перевірки модельного ряду вакцини на білих мишах було відмічено відсутність місцевої реакції на вакцину в усіх дослідних групах. Проте, протягом перших трьох днів зафіксували зниження активності на зменшення споживання корму у тварин, яким вводили вакцину з вмістом вільного формальдегіду 0,3%.

Результати досліджень. Проведено аналіз досьє інактивованих ветеринарних препаратів зареєстрованих на території України. Встановлено, що серед хімічних сполук, що використовуються у вакцинах в якості консервантів та інактивантів, найрозповсюдженішими є формальдегід та тіомерсал. Формальдегід входить до складу 147 вакцин з проаналізованих 217, а тіомерсал – до складу 50, що складає 67,7% та 23% відповідно. Особливу увагу привертають великі межі вмісту хімічних сполук, що вказує на відсутність проведення експериментальних досліджень по визначенню їх нешкідливості. Наприклад допустимі межі вмісту формальдегіду становлять 0,025%-0,3%, а тіомерсалу 0,005%-0,02%. Також цікавим питанням є визначення об'єднаного впливу двох хімічних сполук таких як формальдегід та тіомерсал у складі інактивованих вакцин на живий організм, оскільки у 38 випадках із 217 вони обидва входять до складу вакцини.

Таблиця 2

Вміст консервантів та інактивантів у вакцинах зареєстрованих в Україні

№ п/п	Інактивант, консервант	Кількість зареєстрованих в Україні інактивованих вакцин	% до зареєстрованих інактивованих вакцин	Межі вмісту хімічних сполук згідно НТД, %
1	Формальдегід	147	67,7	0,025-0,3
2	Мертиолят (тіомерсал)	50	23	0,005-0,02
3	Фенол	4	1,8	0,5
4	Бета-пропілактон	12	5,53	-
5	Аміноетиленімін	3	1,4	0,05-0,15
6	Перекис водню	1	0,46	0,1
7	Всього	217	-	-

Проведені аналітичні дослідження слугували підставою для створення модельного ряду інактивованих вакцин проти пастерельозу кролів без формальдегіду та тіомерсалу, з вмістом формальдегіду 0,025%, 0,5%, 0,1% та 0,3%, а також з вмістом тіомерсалу 0,005%, 0,01%, 0,02% та формальдегіду 0,05%.

За основу було взято технологічний процес отримання інактивованої вакцини проти пастерельозу кролів Дніпропетровської біофабрики [18] зі змінами на деяких стадіях. Однією з модифікацій є метод інактивації бактерій *P. multocida*. Оскільки формальдегід має здатність зв'язуватися з компонентами вакцини, то при інактивації неможливо встановити точну кількість вільного формальдегіду, яка буде у кінцевому продукті. Тому було вирішено проводити інактивацію бактеріальної маси температурним методом. Встановили, що оптимальним режимом інактивації мікроорганізму *P. multocida* є дія температури 60 °C протягом 7 днів. Іншою зміною є використання ад'юванта на Mantanid ISA 70 замість агарового, що використовували раніше при виробництві вакцини проти пастерельозу кролів.

Технологічний процес отримання модельного ряду інактивованих вакцин схематично зображено на рис.1.

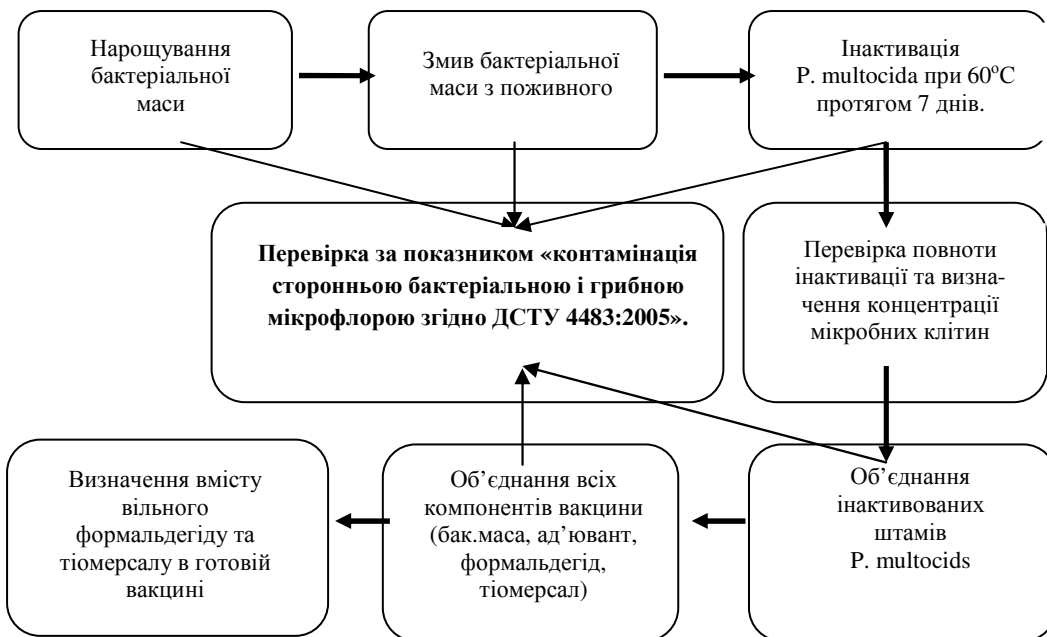


Рис.1 Технологія отримання модельного ряду інактивованої вакцини з різним вмістом формальдегіду та тіомерсалу.

Необхідно відмітити, що всяка експериментальна модель не може вичерпувати всіх складних взаємозв'язків повноти метаболічних і функціональних порушень, які викликаються, як в даному випадку, впливом хімічних компонентів у складі імунобіологічних засобів. Проте, при оптимальній побудові експериментальна модель дозволить по-перше, робити висновки про вплив хімічних компонентів вакцин на метаболічні зміни в організмі. По-друге, в умовах експериментальної моделі дослідник, використовуючи сучасні методи, має змогу вивчати молекулярні, клітинні та інші системні зміни в організмі. По-третє, експериментальна модель є важливим об'єктом для оцінки профілактично лікувальних можливостей, в даному

випадку вакцин, та негативного впливу їх складових, а саме хімічних сполук таких як формальдегід та тіомерсал, на організм тварин.

Побудова експериментальних моделей з визначення критеріїв нешкідливості формальдегіду та тіомерсалу у складі вакцин, на нашу думку, повинна складатися з декількох стадій:

1. Створення вакцин з різним вмістом досліджуваних хімічних сполук;
2. Підбору цільового виду тварин;
3. Визначення універсальних показників реакції-відповіді організму за впливу формальдегіду та тіомерсалу у складі вакцин.

Саме тому було створено модельний ряд вакцин з зазначеним вище вмістом формальдегіду та тіомерсалу. При перевірці на нешкідливість на білих лабораторних мишах було встановлено, що вакцина з вмістом вільного формальдегіду 0,3% знижує активність та зменшує споживання корму тварин в перші 3 дні після ін'єкції (при дозі введення 0,5 мл та при підшкірному методі введення). Всі інші вакцини не викликали видимих клінічних ознак та змін у поведінці. Отриманий модельний ряд вакцин надалі буде використано для створення біологічних моделей, з визначення впливу формальдегіду та тіомерсалу у складі інактивованих вакцин на тварин, а саме на універсальні біохімічні показники, які характеризують відповідь організму на вплив стрес-чинників. До таких належать насамперед процеси перекисного окиснення ліпідів, стан антиоксидантної системи захисту, серологічні та гематологічні показники організму.

Висновки та перспективи подальших досліджень. Проведено аналіз та обґрунтування необхідності створення експериментальної моделі з вивчення впливу формальдегіду та тіомерсалу на живий організм

Розроблено технологію отримання серії вакцин без формальдегіду та тіомерсалу, з різним вмістом формальдегіду (від 0,025% до 0,3%), з вмістом формальдегіду 0,05% та вмістом тіомерсалу від 0,005% до 0,02%.

Розроблені моделі будуть використані у подальших дослідженнях для встановлення порогових значень нешкідливості формальдегіду та тіомерсалу у складі імунобіологічних засобів.

1. Бакулов И. Я. Эпизоотология с микробиологией [Текст] / И. А. Бакулов, В. А. Ведерников, А. Л. Семенихин. – М. : Колос, 2000. – С. 121-122.

2. Zhong W. Formaldehyde – induced DNA adducts as biomarkers of in vitro human nasal epithelial cell exposure to formaldehyde [Text] / W. Zhong, S. Shane // Mutation Research. – 2004. – № 563. – P. 13-24.

3. Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis [Text] / F. Li, P. Liu, T. Wang [et al.] // Mutation Research. – 2010. – № 699. – P. 35-43.

4. An enrichment method to detect low concentration formaldehyde [Text] / J. Wang, L. Liu, S. Cong [et al.] // Sensors and Actuators. – 2008. – № 134. – P. 1010-1015.

5. Malek F. A. A study on the effect of inhalative formaldehyde exposure on water labyrinth test performance in rats [Text] / F. A. Malek, K. U. Moritz, J. Fanghanel // Annals Of Anatomy. – 2003. – № 185. – P. 277-285.

6. A fuel-cell-type sensor for detection of formaldehyde in aqueous solution [Text] / W. Sun, G. Sun, B. Qin [et al.] // *Sensors and Actuators*. – 2007. – № 128. – P. 193-198.
7. *Kenneth A. A Meta-Analysis of Formaldehyde Exposure and Risk of Leukemia and Nasopharyngeal Cancer* [Text] / A. Kenneth // *Comments on the National Toxicology Program Draft Background Document for Formaldehyde*. – 2009. – P. 5.
8. *Hauptmann M. Mortality from Solid Cancers among Workers in Formaldehyde Industries* [Text] / M. Hauptmann, J. H. Lubin, P. A. Stewart // *American Journal of Epidemiology*. – 2004. – № 12. – P. 1117-1130.
9. Formaldehyde-induced damage in lungs and effects of caffeic acid phenethyl ester: a light microscopic study [Text] / A. O. Türkoğlu, M. Sarsilmaz, N. Çolakoğlu [et al.] // *Eur. J. Gen. Med.* – 2008. – № 5(3). – P. 152-156.
10. Formaldehyde exposure induces histopathological and morphometric changes in the rat testis [Text] / M. J. Gholipour, R. Azarhoushi, S. Ghafari [et al.] // *Via Medica*. – 2007. – № 3. – P. 167-171.
11. Spontaneous abortions in hospital staff engaged in sterilising instruments with chemical agents [Text] / K. Hemminki, P. Mutanen, I. Saloniemi [et al.] // *Br. Med. J.* – 1982. – № 285. – P. 1461- 1463.
12. *Malek F. A. A study on specific behavioral effects of formaldehyde in the rat* [Text] / F. A. Malek, K. U. Moritz, J. Fanghanel // *Experimental Animal Science*. – 2003. – № 43. – P. 160-170.
13. Formaldehyde exposure and leukemia: A new meta-analysis and potential mechanisms [Text] / L. Zhang, C. Steinmaus, D. Eastmond [et al.] // *Mutation Research*. – 2009. – № 681. – P. 150-168.
14. Assessment of local genotoxic effects of formaldehyde in humans measured by the micronucleus test with exfoliated buccal mucosa cells [Text] / G. Speit, O. Schmid, M. Frohler-Keller [et al.] // *Mutation Research*. – 2007. – № 627. – P. 129-135.
15. Cytogenetic analysis of nasal mucosa cells and lymphocytes from high-level long-term formaldehyde exposed workers and low-level short-term exposed waiters [Text] / Y. Xiaolei, Y. Wensheng, X. Hong [et al.] // *Mutation Research*. – 2005. – № 588. – P. 22-27.
16. Zinc, copper and iron concentrations in cerebral cortex of male rats exposed to formaldehyde inhalation [Text] / O. Aslan Ozen, A. Songur, M. Sarsilmaz [et al.] // *Trace elements in medicine and biology*. – 2003. – № 17. – P. 207-209.
17. *Söğüt S. Does the subacute (4-week) exposure to formaldehyde inhalation lead to oxidant/antioxidant imbalance in rat liver?* [Text] / S. Söğüt, A. Songur, O. A. Özen // *European Journal of General Medicine*. – 2004. – № 3. – P. 26-30.
18. Инструкция по изготовлению и контролю формолвакцины против пастереллеза кроликов (взамен «Временной инструкции по изготовлению и контролю экстракт-формоловой вакцины против пастереллеза кроликов», утв. ГУВ МСХ СССР 20.07.1974) [Текст] : утв. ГУВ МСХ СССР 10.04.1985. – 13 с.
19. *Головко А. Н. Микробиологические и вирусологические методы исследований в ветеринарной медицине* [Текст] : справочное пособие / А. Н. Головко, В. А. Ушкалов, В. Г. Скрыпник и др. ; под общ. ред. А. Н. Головко. – Х. : НТМТ – 2007. – 512 с.

20. Стандарти оптичні мікробіологічні : ТУ У 24.4.19024865-660-2002 / В. Г. Скрипник, Н. А. Пархоменко, Л. А. Акименко та ін. – К., 2002. – 17 с.
21. Бабич М. А. Физико-химические методы контроля ингредиентов, питательных сред и биопрепаратов (методическое пособие для биофабрик и ветеринарных лабораторий) : [Текст] / М. А. Бабич ; под. общ. ред. С. Г. Колесова. – Изд. 2-е, доп. – М., 1970. – С. 123-125.
22. Гороновский И. Т. Краткий справочник по химии [Текст] / И. Т. Гороновский, Ю. П. Назаренко, Е. Ф. Некряч ; под. общ. ред. О. Д. Куриленко. – Изд. 4-е испр. и доп. – К. : Наукова думка, 1974. – С. 798.
23. Free formaldehyde. Ch. 2.4.18. [Text] // European Pharmacopoeia 5.0. – P.109. (Вільний формальдегід. Ч. 2.4.18. [Текст] // Європейська фармакопея 5.0. – С. 109.).
24. Постоєнко В. О. Методи визначення залишкових кількостей інактивантів і консервантів у ветеринарних імунобіологічних препаратах (методичні рекомендації) [Текст] / В. О. Постоєнко, І. М. Мандзя, В. О. Ушкалов – К. : ДНКІБШМ, 2010. – С. 17-18.

ТЕХНОЛОГИЯ ИЗГОТОВЛЕНИЯ МОДЕЛЬНОГО РЯДА ВАКЦИН С РАЗЛИЧНЫМ КОЛИЧЕСТВОМ ФОРМАЛЬДЕГИДА И ТИОМЕРСАЛА / В.О. Постоєнко, С Войта

Обосновано необходимость создания модельного ряда вакцин с различным содержанием формальдегида и тиомерсала, которые будут использованы в последующих исследованиях для построения экспериментальной модели по изучению влияния данных химических соединений в составе иммунобиологических препаратов на организм животных. Разработано технологию получения модельного ряда экспериментальных вакцин против пастереллёза кролей с различным содержанием формальдегида и тиомерсала.

Ключевые слова: модельный ряд вакцин, формальдегид, тиомерсал, биологические модели.

PRODUCTION TECHNOLOGY OF VACCINES WITH DIFFERENT CONTENT OF FORMALDEHYDE AND THIOMERSAL /V.O. Postoienko, O.S. Voita

This article gives argumentation of necessity of production of vaccines series with different content of formaldehyde and thiomersal. On the base of these vaccines we plane to make biological models for studying of influence of formaldehyde and thiomersal as a part of vaccine on live organism. We developed thehnology of vaccine producing against rabbit pasterellosis with different amount of formaldehyde and thiomersal.

Keywords: vaccine model row, formaldehyde, thiomersal, biological models.

Рецензент – кандидат ветеринарных наук Н. Г. Пінчук.