

Г. А. ЗАВІРЮХА, кандидат сільськогосподарських наук
К. В. ЯВОРСЬКА, В. В. СЛУПСЬКА, Т. І. ДАВИДЕНКО
ДНУ «Державний центр інноваційних біотехнологій», м. Київ

ОСОБЛИВОСТІ ТОКСИГЕННИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ ВАКЦИННИХ ШТАМІВ ЗБУДНИКА СИБІРКИ BACILLUS ANTHRACIS K-79Z ТА BACILLUS ANTHRACIS СБ

У статті викладені експериментальні данні вивчення особливостей токсигенних властивостей вакцинних штамів збудника сибірки *Bac. anthracis* K-79Z та *Bac. anthracis* СБ. Встановлено, що при однаковому посадковому числі на ідентичному поживному середовищі вакцинний штам *Bac. anthracis* K-79Z має кращі токсинпродукуючі властивості.

Ключові слова: сибірка, вакцинні штами збудника сибірки, екзотоксини.

Сибірка – одне з найбільш небезпечних захворювань тварин і людей, для якого характерні гострий перебіг, сепсис, інтоксикація організму, поява карбункулів та велика смертність. Хвороба поширена на всіх континентах земної кулі і завдає значних збитків економіці окремих держав [1].

Збудником захворювання є спороутворюючий мікроб родини *Bacillaceae*, роду *Bacillus*, виду *Bacillus anthracis*, який під час свого розвитку в організмі утворює капсули. В процесі свого еволюційного розвитку збудник пристосувався перебувати в ґрунті з високим відсотком гумусу, невизначено довгий час – сто і більше років [2].

Для захисту від сибірки у 1881 році Л. Пастер запропонував вакцину із живих спор мікроба. Протисибіркова вакцина була виготовлена з спор ослабленого польового, вірулентного мікроба і консервована гліцерином, володіла значною залишковою вірулентністю, а тому тварини з ослабленою резистентністю організму після щеплення захворювали і гинули [3, 8].

Вагомий внесок у вивчення сибірки, розробку засобів і методів боротьби з цією небезпечною хворобою зробили Л. С. Ценковський, С. Н. Више-леський, Н. А. Міхін, Ф. А. Терентьев, Н. Н. Гінзбург, М. Sterne, Н. Р. Smith, С. Г. Колесов, М. Г. Іпатенко, А. А. Абдулін, Г. В. Дунаєв, І. І. Белоконов, А. І. Завірюха та інші.

Ефективну боротьбу із сибіркою в Україні започаткував Л. С. Ценковський (1883), створивши перші вакцини з ослаблених польових штамів збудника сибірки. Оскільки вакцини мали ще значну залишкову вірулентність, окремі тварини після щеплення захворювали і гинули. Поява перших вакцин була великим кроком вперед у боротьбі з цією страшною хворобою.

Згодом були виявлені безкапсульні, авірулентні для сільсько-господарських тварин, штами збудника сибірки (*Bac. anthracis* 34 F2, *Bac. anthracis* 55, *Bac. anthracis* K-79Z, *Bac. anthracis* СБ), з яких виготовляють живі спорові вакцини.

Якість вакцини, подовженість та напруга поствакцинального імунітету, у щеплених тварин, залежали від здатності вакцинного штаму продукувати в організмі тварини екзотоксин, на який формується антитоксичний імунітет.

Основною відмінною рисою збудника сибірки *Bacillus anthracis* (вірулентні, вакцинні штами) від сибіркоподібних мікробів є здатність під час росту і розмноження *in vivo* та *in vitro* виробляти і виділяти за межі клітинної оболонки продукт свого метаболізму – екзотоксин, який забезпечує формування специфічного імунітету [5, 7, 8].

Продукт метаболізму вегетативної форми мікробів складається з трьох фракцій: протективна (захисна), набрякова та летальна [6].

За силою своєї токсичності та за кількістю токсину, що продукують мікроби, польові та вакцинні штами чітко відрізняються. Польові штами продукують мало екзотоксину. Екзотоксин польового штаму високо агресивний, в його складі 70 % припадає на летальний і набряковий фактори і лише 30 % – на захисний фактор. У вакцинних штамів перевагу має протективна фракція, але і вакцинні штами відрізняються між собою за інтенсивністю і кількістю продукувати екзотоксин за межі клітинної оболонки мікроба [5].

Робота виконувалась по завданню «Проведення наукових досліджень з метою розробки методів ранньої діагностики, профілактики та лікування інфекційних хвороб, спільних для людей і тварин».

Мета роботи – провести порівняльну оцінку токсигенних властивостей штамів *Bac. anthracis* K-79Z та *Bac. anthracis* СБ.

Об'єкти та методика досліджень. Матеріалом для дослідження були матриксні культури штамів *Bac. anthracis* K-79Z та *Bac. anthracis* СБ, виділені з рідких живих сибіркових вакцин виробництва Сумської та Херсонської біофабрик, що застосовуються для імунізації чутливих до сибірки тварин в Україні.

Культури вакцинних штамів збудника сибірки *Bac. anthracis* K-79Z та *Bac. anthracis* СБ, перед початком дослідження, перевіряли на чистоту, типовість росту на рідких та твердих поживних середовищах, а також вивчали токсигенні властивості.

Штами *Bac. anthracis* K-79Z та *Bac. anthracis* СБ досліджували за методикою досліджень *Bac. anthracis* [6].

Результати досліджень. Культури вакцинних штамів *Bac. anthracis* K-79Z та *Bac. anthracis* СБ засівали спочатку на тверде поживне середовище в кількості по 8 чашок для кожного штаму та вирощували в термостаті за температури 37 °C протягом 48 годин, потім змивали рідким поживним середовищем, яке складалось з поживного бульйону та середовища 199. Для вивчення продукуючих можливостей штаму *Bac. anthracis* СБ були засіяні чашки в кількості 4 та 12 штук. Перед засівом вираховували за загальноприйнятою методикою підрахунок кількості мікробних клітин *Bac. anthracis* кількість посадкового матеріалу в 1 см³.

Штам *Bac. anthracis* K-79Z засівали у перший флакон у кількості – 1,5 млн. мкт/см³, в другий – 2,0 млн. мкт/см³, в третій – 2,5 млн. мкт/см³, штам *Bac. anthracis* СБ – у перший флакон – 2,1 млн. мкт/см³, в другий – 3,2 млн. мкт/см³, в третій – 3,5 млн. мкт/см³. В якості контролю брали штам *Bac. cereus* 8035, який засівали в кількості 2,1 млн. мкт/см³. Після інкубації штамів в рівних умовах на однаковому по складу поживному середовищі в термостаті за температури 37°C впродовж 24 годин інкубування, проводили фільтрування. У отриманого екзотоксину визначали титр за реакцією диск-преципітації в модифікації Завірюха А. І., Степанюк О. П [10]. Результати дослідів наведені в таблиці 1.

**Вплив посадкового числа мікробних клітин на титр екзотоксину
штаму *Bac. anthracis* СБ в порівнянні з штамом *Bac. anthracis* К-79Z**

Культура	Посадкове число, млн. мкт/см ³	Титр екзотоксину в реакції диск-преципітації
1 група		
<i>Bac. anthracis</i> К-79Z 1 флакон	1,5	1:32
<i>Bac. anthracis</i> К-79Z 2 флакон	2,0	1:128
<i>Bac. anthracis</i> К-79Z 3 флакон	2,5	1:128
по 1 групі	2,00±0,29*	96,00±37,17*
2 група		
<i>Bac. anthracis</i> СБ1 флакон	2,1	1:4
<i>Bac. anthracis</i> СБ 2 флакон	3,2	1:16
<i>Bac. anthracis</i> СБ3 флакон	3,5	1:8
по 2 групі	2,93±0,48	9,33±3,87

* P<0,05

З наведених у таблиці даних видно, що при збільшенні кількості мікробних клітин в посадковому матеріалі вакцинного штаму *Bac. anthracis* СБ не відбулося збільшення кількості екзотоксину. При цих же умовах культивування, мікроби вакцинного штаму *Bac. anthracis* К-79Z при засіві в культуральну рідину в кількості 1,5 млн. мкт/см³ продукували екзотоксин в титрі 1:32, в кількості 2,0 млн. мкт/см³ – 1:128, кількості 2,5 млн. мкт/см³ – 1:128. У контрольного ж штаму *Bac. cereus* 8035 титр екзотоксину відсутній. У 1-й групі середнє значення посадкового числа становить 2,00±0,29 млн. мкт/см³, середнє значення титру екзотоксину в реакції диск-преципітації 96,00±37,17, у 2-й групі середнє значення посадкового числа складає 2,93±0,48 млн. мкт/см³, середнє значення титру екзотоксину в реакції диск-преципітації становить 9,33±3,87 (P<0,05) (табл. 1).

Для вивчення динаміки токсинпродукуючих властивостей штаму *Bac. anthracis* К-79Z та штаму *Bac. anthracis* СБ при однаковій кількості посадкових клітин, нами були засіяні мікроби обох штамів в ідентичне поживне середовище. В якості контролю брали штам *Bac. cereus* 8035, засіявши його в кількості 38 млн. мкт/см³. Результати представлені в таблиці 2.

Як видно з даних таблиці 2, при культивуванні вакцинних штамів збудника сибірки *Bac. anthracis* К-79Z та штаму *Bac. anthracis* СБ на поживному бульйоні рН середовища 7,4, з однаковою кількістю мікробних клітин, вакцинний штам *Bac. anthracis* К-79Z продукує більше екзотоксину, ніж вакцинний штам *Bac. anthracis* СБ. Титр у вакцинного штаму *Bac. anthracis* К-79Z становив 1:32 і 1:128, тоді як титр вакцинного штаму *Bac. anthracis* СБ становив 1:4, 1:8, 1:16, а у контрольного штаму *Bac. cereus* 8035 титр екзотоксину відсутній. У 1-й групі середнє значення посадкової кількості становить 54,67±42,59 млн. мкт/см³, середнє значення титру екзотоксину в реакції диск-преципітації 96±37,17, у 2-й групі середнє значення посадкового числа складає 33,17±3,58 млн. мкт/см³, середнє значення титру екзотоксину в реакції диск-преципітації становить 9,33±3,87 (P<0,01).

Таблиця 2

**Продуктивні властивості вакцинних штамів збудника сибірки
Bac. anthracis K-79Z та *Bac. anthracis* СБ при ідентичних умовах
культивування**

Культура	Посадкова кількість мікробних клітин в 1 см ³ , млн. мкт	рН середовища 7,2-7,4	Поживне середовище	Титр екзотоксину в РДП
1 група				
<i>Bac. anthracis</i> K-79Z 1 флакон	27,2	7,4	Поживний бульйон	1:32
<i>Bac. anthracis</i> K-79Z 2 флакон	33,5	7,4	Поживний бульйон	1:128
<i>Bac. anthracis</i> K-79Z 3 флакон	38,7	7,4	Поживний бульйон	1:4
по 1 групі	54,67±42,59			96±37,17
2 група				
<i>Bac. anthracis</i> СБ 1 флакон	27	7,4	Поживний бульйон	1:4
<i>Bac. anthracis</i> СБ 2 флакон	34	7,4	Поживний бульйон	1:16
<i>Bac. anthracis</i> СБ 3 флакон	38,5	7,4	Поживний бульйон	1:8
по 2 групі	33,17±3,58*			9,33±3,87*

* P≤0,01

Для вивчення залежності токсинпродукуючих властивостей від терміну інкубації вакцинні штами збудника сибірки були засіяні на ідентичні середовища, при однаковій температурі за різного часу. Результати досліджень наведені в таблиці 3.

Таблиця 3

**Вплив терміну інкубації на продукцію екзотоксину вакцинними
штамами *Bac. anthracis* K-79Z та *Bac. anthracis* СБ**

Культура	Посадкова кількість мікробних клітин в 1 см ³ , млн. мкт	Поживне середовище	Титр екзотоксину при різних термінах інкубування		
			18 годин	24 годин	48 годин
<i>Bac. anthracis</i> K-79Z	40	Поживний бульйон + глюкоза 5%	1:32±64*	1:64 ±128*	1:64 ±128*
<i>Bac. anthracis</i> СБ	40,5	Поживний бульйон + глюкоза 5%	1:8±16*	1:16 ±32*	1:16±32*

* P≤0,05

Як видно з таблиці 3, при культивуванні вакцинних штамів збудника сибірки *Bac. anthracis* К-79Z та штаму *Bac. anthracis* СБ при різних термінах інкубації не виявлено залежності від подовженості в часі. Вакцинний штам збудника сибірки *Bac. anthracis* СБ продукує на порядок нижче екзотоксину (титр становить $1:8 \pm 16$; $1:16 \pm 32$), ніж вакцинний штам збудника сибірки *Bac. anthracis* К-79Z ($P \leq 0,05$).

Висновки:

1. Встановлено, що при однаковому посадковому числі та в ідентичному поживному середовищі вакцинний штам *Bac. anthracis* К-79Z володіє кращими продуктивними властивостями, про що свідчать високі показники титру екзотоксину в його культуральній рідині.

2. Мікроби штаму *Bac. anthracis* СБ частково втратили здатність до продукування екзотоксину, продукують екзотоксин в титрі $1:8 \pm 16$; $1:16 \pm 32$.

3. Рекомендуємо для створення протисибіркових вакцин вакцинний штам збудника сибірки *Bac. anthracis* К-79Z.

Список використаної літератури

1. *Ипатенко Н. Г.* Сибирская язва сельскохозяйственных животных / Н. Г. Ипатенко, В. А. Седов, В. С. Залепукин, В. Н. Гущин // М.: Агропромиздат, 1987. – С. 154–155.

2. *Завірюха Г. А.* Вплив екзотоксинів вакцинних штамів збудника сибірки *Bac. anthracis* К-79Z та *Bac. anthracis* 34F2 Sterne / Г. А. Завірюха, К. В. Яворська, В. В. Слупська // Вісник Житомир. нац. агроєколог. ун-ту: Наук.-теоретич. зб. – Житомир. нац. агроєколог. ун-т, 2012. – Вип. № 1 (32). – Т. 3., Ч.1. – С. 175–180.

3. *Пастер Л.* Речь профессора на заседании международного конгресса врачей в Лондоне / Л. Пастер. – 1881. – № 4. – С. 6–8.

4. *Завірюха Г. А.* Порівняльна оцінка культурально-морфологічних властивостей вакцинних штамів *Bac. anthracis* К-79Z та *Bac. anthracis* СБ, що використовуються для виготовлення живих спорових вакцин проти сибірки тварин біофабриками України / Г. А. Завірюха, Т. Б. Васильєва, М. М. Панько // Вет. Біотехнологія: Бюл. – УААН. Ін-т вет. медицини. – К.: Дорадо-Друк, 2008. – № 8. – С. 63–67.

5. *Колесов С. Г.* Иммунитет. Сибирская язва / С. Г. Колесов, Г. В. Дунаев, Г. И. Романов // Москва: Колос, 1976. – С. 177–197.

6. *Завірюха Г. А.* Відбір вакцинних штамів збудника сибірки: методичні рекомендації / Г. А. Завірюха, А. І. Завірюха, В. М. Бобильов та ін. // К.: МВЦ «Медінформ», 2011. – 12 с.

7. *Гамалея Н. Ф.* Работы по изучению сибирской язвы / Гамалея Н. Ф. // Собрание сочин. – М.: Медгиз, 1956. – Том 1. – С. 97–136.

8. *Ушкалов В. О.* Результати комісійних досліджень вакцин проти сибірки тварин із штаму *Bacillus anthracis* Sterne 34 F2 / В. О. Ушкалов, О. В. Мачуський, М. Є. Романько [та ін.] // Вісник Білоцерків. держ. аграр. ун-ту: Зб. наук. праць. – Біла Церква, 2011. – Вип. 7 (83). – 102 с.

9. *Thorne B. C.* Production of toxin in vitro by *Bac. anthracis* and its separation in to two components / B. C. Thorne, D. M. Molnar, R. E. Stro-nge // Journ. Bacteriol. – 1960. – Vol. 79. – № 3. – P. 450–455.

10. *Завірюха А. И.* Метод ускоренной диагностики сибирской язвы / А. И. Завірюха, О. П. Степанюк // Достижения и перспективы борьбы с сибирской язвой. – М. – 1978. – С. 127–130.

ОСОБЕННОСТИ ТОКСИГЕННЫХ СВОЙСТВ ВАКЦИННЫХ ШТАММОВ ВОЗБУДИТЕЛЯ СИБИРСКОЙ ЯЗВЫ *BACILLUS ANTHRACIS* K-79Z ТА *BACILLUS ANTHRACIS* СБ/ А. А. Завирюха, Е. В. Яворская, В. В. Слупская, Т. И. Давыденко

*В статье представлены экспериментальные данные исследования особенностей токсигенных свойств вакцинных штаммов возбудителя сибирской язвы *Bac. anthracis* K-79Z и *Bac. anthracis* СБ. Установлено, что при одинаковом посадочном числе на идентичной питательной среде вакцинный штамм *Bac. anthracis* K-79Z имеет лучшие токсинпродуцирующие свойства.*

Ключевые слова: сибирка, вакцинные штаммы возбудителя сибирки, экзотоксины.

THE PECULIARITIES OF TOXIGENIC PROPERTIES OF VACCINE STRAINS OF ANTHRAX CAUSATIVE AGENT *BACILLUS ANTHRACIS* K-79Z AND *BACILLUS ANTHRACIS* CB / A. Zaviriuha, K. Yavorskaya, V. Slupskaya, T. Davydenko

*The article presents the research experimental data on peculiarities of *Bac. anthracis* K-79Z and *Bac. anthracis* SB vaccine strains toxigenic properties. It was found that at the same number of planting on the identical medium the *Bac. anthracis* K-79Z vaccine strain had better toxin-producing properties.*

Key words: anthrax, anthrax vaccine strains, exotoxins

Рецензет – кандидат ветеринарных наук О. С. Айшпур