

УДК 636.09:616.98:615.371:[57.063.8:579.852.1]

А. М. ГОЛОВКО¹, доктор ветеринарних наук

В. О. УШКАЛОВ¹, доктор ветеринарних наук

М. В. БАБКІН¹, кандидат ветеринарних наук

О. В. МАЧУСЬКИЙ¹

В. Г. СКРИПНИК¹, доктор ветеринарних наук

І. О. РУБЛЕНКО², кандидат ветеринарних наук

¹ Державний науково-контрольний інститут біотехнології і штамів мікроорганізмів, м. Київ

² Білоцерківський національний аграрний університет

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА АПРОБАЦІЯ ПОКАЗНИКІВ КОНТРОЛЮ ЯКОСТІ СПОРОВИХ ВАКЦИН ПРОТИ СИБІРКИ ЗГІДНО МІЖНАРОДНИХ РЕКОМЕНДАЦІЙ

У статті наведено результати апробації удосконалених вимог до процедури контролю якості спорових вакцин проти сибірки тварин. Встановлено, що запропонований перелік показників контролю якості вакцин проти сибірки є відтворюваним та більш вимогливим за такими показниками як: нешкідливість, залишкова вірулентність та імуногенність. Визначено стабільність препаратів, залишкову вірулентність, іму-ногенність та розраховано ІмД₅₀ для препаратів, що підлягають перевірці.

Ключові слова: контроль якості, сибірка, вакцина, імунопрофілактика, імуногенність.

Вакцинопрофілактика – є науково обґрунтованим засобом зниження захворюваності на інфекційні хвороби. У відповідь на введення препарату, до складу якого входять генетично чужорідні антигени, відбувається активація каскаду імунних реакцій, які схематично можна представити так: фіксація антигенів макрофагами та їх процесінг; → презентація специфічної інформації про антигени макрофагами Т-лімфоцитам; → проліферація й диференціація Т-лімфоцитів у клітини з досить специфічними функціями: регуляторними (Т - хелпери, Т - супресори), цитотоксичними (Т - ефектори); → активація В-лімфоцитів та їх диференціація в антитілоутворюючі плазматичні клітини; → формування клітин пам'яті; → продукція специфічних антитіл [2].

Як на сьогодні ідеальною вакциною вважається препарат, який при одноразовому введенні непарентеральним шляхом індукував би на весь час імунітет до більшості актуальних інфекційних захворювань та не викликала би ніяких ускладнень [1, 2]. Дотепер такі препарати ще не створені. Не є ідеальними і вакцини проти сибірки, хоча їх розробкою займалися дослідники багатьох країн впродовж декількох століть.

Проблема захисту від інфекційних хвороб стояла на порядку денному перед людством доволі давно, але її втілення стало можливим лише у XVIII ст. після створення вакцини проти віспи [3].

Toussaint встановив, що вівці не хворіють сибіркою, якщо їм попередньо підшкірно ввести дефібриновану кров, яка містить бацили та була прогріта протягом 10 хвилин за температури 55^oC [4]. Луї Пастер надав перевагу іншому шляху отримання протисибіркових вакцин, який він вже застосовував для послаблення збудника холери курей, але стало зрозумілим, що мікроби антраксу не слабнуть від дії атмосферного повітря, а перетворюються в спори [5]. У 1881 році Пастер повідомив, про розробку іншого методу отримання вакцини: вірулентну культуру, виділену з трупу тварини, що загинула від сибірки, засівають до курячого бульйону та культивують у термостаті за температури 42-43^oC для аттенуації [5]. Використання препаратів, виготовлених таким шляхом передбачало почергове підшкірне введення I-ї та II-ї вакцини. Далі є так зване комбінаційне, або симультанне, щеплення, коли вводять разом II-у вакцину та гіперімунну сироватку. Безредьком А. із співавторами було розроблено метод внутрішньошкірного введення вакцин, при цьому автори вказували на більш високу ефективність даного методу [3].

З моменту появи препаратів для профілактики сибірки постало питання їх стандартизації та контролю якості. Дослідження у даному напрямку постійно проводяться як закордонними, так і вітчизняними науковцями.

Коллективом науковців Державного науково-контрольного інституту біотехнології і штамів мікроорганізмів було розроблено перелік показників, які є гармонізованими з міжнародними нормативно-правовими актами в галузі виробництва та контролю якості препаратів для профілактики антраксу [7].

Наразі, питання підвищення рівня ефективності засобів імунно-профілактики сибірки та контролю їх якості є досить актуальними, зважаючи на глобальні виклики стосовно біобезпеки, біозахисту та продовольчої безпеки України.

Метою роботи була експериментальна апробація гармонізованих до міжнародних рекомендацій показників контролю якості спорових вакцин проти сибірки.

Матеріали і методи: Дослідження проводили за наказом директора Державного науково-контрольного інституту біотехнології і штамів мікроорганізмів № 21 від 08.05.2012 р., на базі Херсонського державного підприємства-біологічна фабрика у період з 15 травня по 15 червня 2012 року. Робота проводилася відповідно до затвердженої «Методики порівняльних комісійних досліджень вакцин проти сибірки тварин». Випробуванню підлягали лабораторні та експериментальні серії препаратів для профілактики сибірки відповідно до таблиці 1.

Таблиця 1

Характеристика препаратів (згідно НД) для профілактики сибірки, що були досліджені

№ зразку	Назва	Кількість спор в 1 см ³
1.	«Вакцина проти сибірки тварин із штаму <i>Sterne 34F2</i> »	12±4 млн.
2.	«Вакцина проти сибірки тварин «АНТРАВАК»	16±4 млн.
3.	Вакцина жива спорова проти сибірки тварин із штаму «СБ» (рідка)	20-25 млн.
4.	Вакцина жива проти сибірки тварин із штаму «К-79Z»	20-25 млн.

Визначення показників якості проводили з урахуванням вимог Європейської фармакопеї 5.0. (European Pharmacopoeia 5.0), Керівництва з діагностичних тестів та вакцин для наземних тварин 2010 року (Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2010), Керівництва з виробництва вакцини проти сибірки тварин та вакцини проти емфізематозного карбункулу (*Manual for the production of anthrax and blackleg vaccines*//FAO animal production and health paper. – Rome : Food and Agriculture Organization of the United Nations. – 1991. – Vol. 87. – 123 p) і «Государственного стандарта Союза ССР «Вакцина СТИ живая против сибирской язвы животных» ГОСТ 15991-86» за наступними показниками:

- *Контамінація сторонньою бактеріальною та грибною мікрофлорою* (визначали відповідно до однойменного ДСТУ 4483:2005, метод № 4. При цьому дослідні зразки висівали в тїогліколеве середовище і в бульйон Сабуро та інкубували за двох температурних режимів (20-25°C та 30-35°C) протягом 21 доби з проведенням пересівів).

- *Кількість життєздатних спор* (визначали відповідно до «Manual for the production of anthrax and blackleg vaccines».

- *Залишкова вірулентність* (визначали відповідно до «Manual for the production of anthrax and blackleg vaccines», при цьому на кожен препарат використовували по 4 мурчаки: першим двом вводили по 0,2 см³ вакцини внутрішньочеревинно, іншим двом – по 1,0 см³ вакцини підшкірно).

- *Імуногенність* (визначали відповідно до «Государственного стандарта Союза ССР «Вакцина СТИ живая против сибирской язвы животных» ГОСТ 15991-86» на мурчаках масою 350-400 гр.) Метод базується на визначенні 50 %-ї імунізуючої дози (ІмД₅₀) дослідних препаратів.

З вакцин готували розведення в стерильному ізотонічному розчині натрію хлориду у співвідношеннях 1:2, 1:10, 1:50 та 1:250.

Виготовлені суспензії спор вводили підшкірно мурчакам в області черева по 0,5 см³. На кожне розведення використовували по 7 голів дослідних тварин. Контрольним тваринам вводили стерильний фізіологічний розчин шляхом і в дозах, що й дослідним тваринам.

Через 21 добу дослідним тваринам підшкірно вводили 100 МЛД контрольного штаму *Bac. anthracis M-71*, а контрольним – 10 МЛД дослідного штаму.

За тваринами вели спостереження протягом 10 діб. Протягом періоду спостереження усі контрольні тварини мали загинути. Кількість дослідних

тварин, що вижили та загинули реєстрували. ImD_{50} дослідних препаратів розраховували за формулою:

$$\lg ImD_{50} = K - 0,699 \left(\sum_{i=1}^n Li - 0,5 \right),$$

де K – логарифм максимальної імунізуючої дози (залежить від препарату);

0,699 – логарифм кроку розведення препаратів, що дорівнює 5;

Li – відношення числа тварин, що вижили після зараження, до загальної кількості мупчаків, яким було введено дози дослідного препарату;

i – індекс, що відповідає номеру дози;

0,5 – постійний коефіцієнт.

Під час проведення досліджень зразки препаратів шифрували, а тварин дослідних та контрольних груп маркували кольоровими хомутами. При цьому ключі до зашифрованих зразків та маркованих тварин було розміщено у різних конвертах, які були опечатані членами комісії та зберігалися до завершення дослідів в опечатаному сейфі.

Результати досліджень:

Контамінація сторонньою бактеріальною та грибною мікрофлорою.

«Вакцина проти сибірки тварин «АНТРАВАК», «Вакцина проти сибірки тварин із штаму *Sterne 34F2*» та Вакцина жива проти сибірки тварин із штаму «К-79Z» були вільні від контамінації сторонньою бактеріальною та грибною мікрофлорою. Вакцина жива спорова проти сибірки тварин із штаму «СБ» (рідка) – контамінована грамнегативною паличкоподібною мікрофлорою.

Результати визначення кількості життєздатних спор наведено в таблиці 2.

Таблиця 2

Результати визначення кількості життєздатних спор в 1 см³ дослідних зразків препаратів, млн. в 1 см³

Препарат	Кількість КУО в 1 см ³ препарату, млн.	Кількість КУО в 1 см ³ препарату, млн., згідно НД
Експериментальна Вакцина проти сибірки тварин «Антравак»	27,87	16±4
Вакцина проти сибірки тварин із штаму <i>Sterne 34F2</i> , ДНКІБШМ	13,32	12±4
Вакцина жива спорова проти сибірки тварин із штаму «СБ» рідка, серія 16	13,62	22,5±2,5
Вакцина жива проти сибірки тварин із штаму «К-79Z», серія 4	20,6	22,5±2,5

Дані таблиці 2 вказують на коливання рівня стабільності досліджуваних зразків вакцин, виготовлених з різних штамів *Bac. anthracis* та за різних технологічних процесів.

Таблиця 3

Розрахунок середньої імунізуючої дози відповідно до вимог нормативної документації

Препарат	Кількість життєздатних спор в 1 см ³ препарату, млн.		Об'єм препарату, що використовувався для дослідження, см ³	
	результат	згідно НД	результат	згідно НД
Експериментальна Вакцина проти сибірки тварин «Антравак»	27,87	16±4	0,6	1,0
Вакцина проти сибірки тварин із штаму Sterne 34F2, ДНКІБШМ	13,32	12±4	0,9	1,0
Вакцина жива спорова проти сибірки тварин із штаму «СБ» рідка, серія 16	13,62	22,5±2,5	1,7	1,0
Вакцина жива проти сибірки тварин із штаму «К-79Z», серія 4	20,6	22,5±2,5	1,1	1,0

Визначення залишкової вірулентності та імуногенності.

По закінченню терміну спостереження усі дослідні тварини з усіх груп залишилися живими. Усі дослідні препарати були авірулентними.

Визначення імуногенної активності (ІмД₅₀).

За результатами визначення кількості життєздатних спор в дослідних препаратах, для дослідження за показником «імуногенність» було відібрано зразки відповідно до таблиці 3. Для подальшої роботи брали об'єм препарату, який було визначено раніше: вакцина проти сибірки тварин «Антравак» – 0,6 см³, вакцина проти сибірки тварин із штаму Sterne 34F2 – 0,9 см³, вакцина жива спорова проти сибірки тварин із штаму «СБ» рідка – 1,7 см³, вакцина жива проти сибірки тварин із штаму «К-79Z» – 1,1 см³.

З кожного препарату було виготовлено в стерильному ізотонічному розчині хлориду натрію наступні розведення: 1:2, 1:10, 1:50 та 1:250.

За скорегованими розрахунками кінцевому розрахунку, дослідним групам тварин було уведено дози відповідно до таблиці 4 в об'ємі 0,5 см³.

Через 21 добу після щеплення, дослідним тваринам вводили 100 МЛД (мінімальних летальних доз) контрольного штаму *Bac. anthracis M-71*, а контрольним – 10 МЛД вище зазначеного штаму. 1 МЛД *Bac. anthracis M-71* складала 17 тис. спор.

Період спостереження за зараженими тваринами був 10 діб. Усі контрольні тварини загинули. Облік результатів відображено в таблиці 5.

ІмД₅₀ досліджуваних препаратів склала (рис.1):

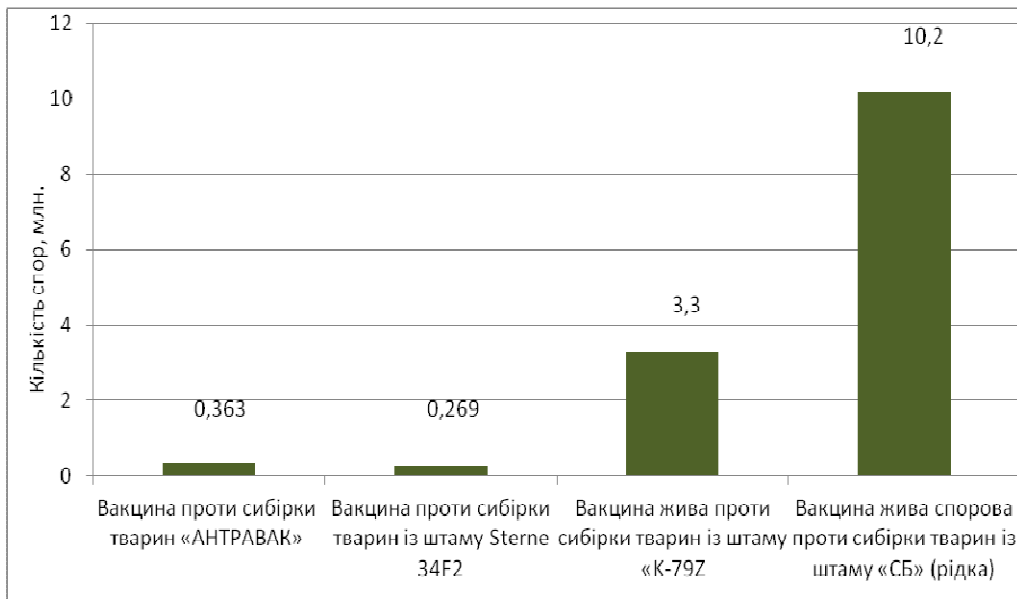


Рис. 1. ІмД₅₀ досліджуваних препаратів

- Вакцина проти сибірки тварин із штаму Sterne 34F2, ДНКІБШМ – 269 тис. спор;
- Вакцина проти сибірки тварин «Антравак», ДНКІБШМ – 363 тис. спор;

Таблиця 4

Кількість спор, що вводилася різним групам тварин

Препарат	Розведення			
	1:2	1:10	1:50	1:250
	Кількість спор, млн.			
Експериментальна Вакцина проти сибірки тварин «Антравак»	4	0,8	0,16	0,032
Вакцина проти сибірки тварин із штаму Sterne 34F2, Херсон	3	0,6	0,12	0,024
Вакцина жива спорова проти сибірки тварин із штаму «СБ» рідка, серія 16	5,6	1,1	0,225	0,045
Вакцина жива проти сибірки тварин із штаму «К-79Z», серія 4	5,6	1,1	0,225	0,045

- Вакцина жива проти сибірки тварин із штаму «К-79Z», серія 4 – 3,3 млн. спор;
- Вакцина жива спорова проти сибірки тварин із штаму «СБ» рідка, серія 16 – 10,2 млн. спор.

Таблиця 5

Результати визначення $ІмД_{50}$ шляхом контрольного зараження

№ п/п	Препарат	Розведення							
		1:2		1:10		1:50		1:250	
		Вакциновано	Вижило	Вакциновано	Вижило	Вакциновано	Вижило	Вакциновано	Вижило
1	Вакцина проти сибірки тварин із штаму Sterne 34F2, ДНКІБШМ	7	7	7	6	7	1	7	0
2	Експериментальна Вакцина проти сибірки тварин «Антравак»	7	7	7	6	7	1	7	0
3	Вакцина жива проти сибірки тварин із штаму «К-79Z», серія 4	7	6	7	5	7	1	7	0
4	Вакцина жива спорова проти сибірки тварин із штаму «СБ» рідка, серія 16	7	5	7	2	7	0	7	0

Висновки та перспективи подальших досліджень:

За результатами проведених досліджень встановлено, що:

- Приведений у відповідність до міжнародних рекомендацій і вимог перелік показників якості вакцин проти сибірки є відтворюваним та більш вибагливим до таких показників як: нешкідливість, залишкова вірулентність та імуногенність.

- $ІмД_{50}$ «Вакцини проти сибірки тварин із штаму *Sterne 34F2*» складає 269 тис. спор і є найменшою серед досліджених препаратів, що демонструє високу імуногенність штаму *Sterne 34F2*; $ІмД_{50}$ Вакцини «Антравак» складає 363 тис. спор;

- Усі досліджені вакцини відповідали вимогам НД за показником імуногенність.

- Отримані результати лягли в основу пропозицій щодо перегляду показників контролю якості вакцин проти сибірки тварин, які були розглянуті на засіданні Державної фармакологічної комісії ветеринарної медицини, протокол № 3 від 02.11.2012 року.

Список використаної літератури

1. Vaccines / Eds S. Plotkin et al. 2nd ed. – Philadelphia: W.B. Saunders, 1994 – 468 p.
2. Медуницын Н. В. Вакцинология. М., «Триада-Х», 1999, 272 с.
3. Сибирская язва / Ред. С. Г. Колесов – М. : Колос., 1976. – 228 с.
4. Сибирская язва [Текст] / Н. Г. Ипатенко, В. А. Гаврилов, В. С. Зелепукин и др. ; ред. Н. Г. Ипатенко. – 2-е изд., перераб. и доп. – М. : Колос, 1996. – 336 с.
5. Ипатенко Н. Г. Сибирская язва свиней / Н. Г. Ипатенко, В. Н. Гущин, В. А. Седов. – М. : Колос, 1992. – 31 с.

6. Бакулов И. А. Сибирская язва (антракс). Новые страницы в изучении «старой» болезни / И. А. Бакулов, В. А. Гаврилов, В. В. Сели-вестров. – Владимир : Посад, 2001. – 278 с.

7. Мачуський О. В. Удосконалення вакцин проти сибірки тварин та методів контролю їх якості: дис...канд. вет. наук 16.00.03/ О. В. Мачуський; Державний науково-контрольний інститут біотехнології і штамів мікроорганізмів. – К., 2013. – 174 с.

8. Спосіб виготовлення засобу профілактики сибірки тварин із штаму *Bacillus anthracis* Sterne 34F2 / Патент на корисну модель № 60603 U А61К 39/00 С12N 1/20, опубл. 25.06.2011, бюл. № 12.

9. Спосіб виготовлення засобу профілактики сибірки тварин із штаму *Bacillus anthracis* Sterne 34F2 / Патент на корисну модель № 60602 U А61К 39/00, опубл. 25.06.2011, бюл. № 12.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ АПРОБАЦИЯ ПОКАЗАТЕЛЕЙ КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА СПОРОВЫХ ВАКЦИН ПРОТИВ СИБИРСКОЙ ЯЗВЫ СОГЛАСНО МЕЖДУНАРОДНЫХ РЕКОМЕНДАЦИЙ/ А. Н. Головко, В. А. Ушкалов, М. В. Бабкин, В. О. Мачуський, В. Г. Скрипник, И. О. Рубленко

В статье приведены результаты апробации усовершенствованных требований к контролю качества споровых вакцин против сибирской язвы животных. Установлено, что предложенный перечень показателей контроля качества вакцин против сибирской язвы является воспроизводимым и более требовательным к таким показателям как: безвредность, остаточная вирулентность и иммуногенность. Определена стабильность препаратов, остаточную вирулентность, иммуногенность и рассчитано ИМД₅₀ для исследуемых препаратов.

Ключевые слова: контроль качества, сибирская язва, вакцина, иммунопрофилактика, иммуногенность.

EXPERIMENTAL APPROBATION OF QUALITY CONTROL PARAMETERS FOR ANTHRAX SPORE VACCINE ACCORDING TO THE INTERNATIONAL RECOMMENDATIONS/ A. Golovko, V. Uchka-lov, M. Babkin, V. Machuskiy, I. Rublenko

The article presents the results of testing changes to the quality control procedures spore animal vaccine against anthrax. Determined that the proposed list of indicators of quality control of vaccines against anthrax is reproducible and more demanding to such indicators as harmless, residual virulence and immunogenicity. Determined the stability

of drugs, residual virulence, immunogenicity and ImD_{50} intended for investigational drugs.

Key words: quality control, anthrax vaccine, immunization, immunogenicity.

Рецензент – доктор сільськогосподарських наук **В. О. Постоєнко**.

Рукопис надійшов 17. 07. 2013р