

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

І. О. Рубленко, к.вет. н., доцент

Білоцерківський національний аграрний університет

В. Г.Скрипник, д.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.*

Постановка проблеми у загальному вигляді та її зв'язок із важливими науковими чи практичними завданнями. Актуальним питанням фармації і ветеринарної медицини 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.

Аналіз останніх досліджень і публікацій, у яких започатковано розв'язання проблеми. 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 [1].

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*. 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 [4].

На території України в результаті проведення регулярних щеплень тварин сибірка періодично виникає, але спорадично. 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 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 і завдання досліджень. Метою роботи було 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 досліджень. 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 живильні 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 кожен по 0,1 см³ зависі спор. Культивували за температури 36 °С 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 см³ у 2 пробірки з поживним середовищем МПБ і по 0,5 см³ в 2 флакони об'ємом 50 і 100 см³ (також із МПБ).

Для одержання ізолюваних колоній – 0,1 см³ суспензії переносили у 2 чашки з кров'яним МПА (4% дефібринованої крові барана). Культивували за температури 36 °С. Посіви на поживному середовищі витримували добу.

Результати власних 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, рН	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 грампозитивні палички без інволюційних	типові грампозитивні палички без інволюційних	типові грампозитивні палички без

			форм	форм	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 і 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 °С до 15 °С	10 °С	6 °С	6 °С

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, рН, 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. 1. При дослідженні показників якості вакцини живої проти сибірки тварин із штаму UA–07 «Антравак» експериментальної серії було виявлено відсутність сторонніх домішок, відсутність бактеріальної та грибної 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, відповідність показників при вивченні морфологічних, тинкторіальних властивостей, рухливості (не рухомі), вакцина імуногенна, не шкідлива, не викликала некрозу, набряку, тощо.

2. 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 грибної 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.

Список використаної літератури:

1. Berger T. at all. European communicable disease bulletin. *Injectional anthrax – new presentation of an old disease*. Sweden: Saint-Maurice. Hôpital national de Saint-Maurice, 2014. Vol. 19 No. 32, available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25139073> (accessed 14 Aug. 2014).

2. Zwick M. E., Joseph J. S., J. Didelot X. Genomic characterization of *Bacillus cereus sensu lato* species: backdrop to the evolution of *Bacillus anthracis*, *Journal of The Genome Res. USA: National Institutes of Health*, 2012. Vol 3.29, pp.1512-1524.

3. Toby I. T., Widmer J., Dyer D. W. Divergence of protein-coding capacity and regulation in the *Bacillus cereus sensu lato* group, *Journal of The BMC Bioinformatics*, USA: [National Institutes of Health](https://bmcbioinformatics.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2105-15-S11-S8), 2014. Vol. 11.15. <https://bmcbioinformatics.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2105-15-S11-S8>

4. Woods C. W., Ospanov K., Myrzabekov A. Risk factors for human anthrax among contacts of anthrax – infected livestock in Kazakhstan, *Journal the American society of tropical medicine and hygiene*, United States: Baltimore, 2004. Vol. 71.1, pp. 48-52.

5. Рубленко І. О., Скрипник В. Г. Аналіз даних епізоотичних спалахів сибірки на території України (період 1994 – 2016 рр.). Науковий вісник ветеринарної медицини: збірник наукових праць. Біла Церква: БНАУ, 2016. Вип.1.127. С. 87-95.

References:

1. Berger T. at all. (2014), "Injectional anthrax – new presentation of an old disease" [Injectional anthrax – new presentation of an old disease (European bulletin)], *European communicable disease bulletin*, Sweden: Saint-Maurice. Hôpital national de Saint-Maurice, Issue. 19 No. 32, available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25139073> (accessed 14 Aug. 2014).

2. Zwick M. E., Joseph J. S. J. and Didelot X. (2012), "Genomic characterization of *Bacillus cereus* sensu lato species: backdrop to the evolution of *Bacillus anthracis*" [Genomic characterization of *Bacillus cereus* sensu lato species: backdrop to the evolution of *Bacillus anthracis*], *Journal of The Genome Res.* USA: [National Institutes of Health](http://www.nih.gov), Issue. 3.29, pp.1512-1524.

3. Toby I. T., Widmer J. and Dyer D. W. (2014), Divergence of protein-coding capacity and regulation in the *Bacillus cereus* sensu lato group [Divergence of protein-coding capacity and regulation in the *Bacillus cereus* sensu lato group], *Journal of The BMC Bioinformatics*, USA: [National Institutes of Health](http://www.nih.gov), Issue. 11.15. <https://bmcbioinformatics.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2105-15-S11-S8>

4. Woods C. W., Ospanov K. and Myrzabekov A. (2004) Risk factors for human anthrax among contacts of anthrax – infected livestock in Kazakhstan [Risk factors for human anthrax among contacts of anthrax – infected livestock in Kazakhstan], *Journal the American society of tropical medicine and hygiene*, United States: Baltimore, Issue. 71.1, pp. 48-52.

5. Rublenko I. O. and Skripnik V. G. (2016) *Analiz danih epizootichnih spalakhiv sibirki na teritorii Ukraini (period 1994 - 2016 rr.)* [Analysis of the data of epizootic outbreaks of anthrax on the territory of Ukraine (1994 - 2016)] *Scientific herald of veterinary medicine: a collection of scientific works*. Belaya Tserkov: BNAU, 2016. Issue.1.127. S. 87-95.

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 грибной микрофлоры, массовая доля глицерина составляла 28%, pH 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. A., Skrypnyk V. G. 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*