

DETERMINATION OF STORAGE STABILITY OF THE PROBIOTICS

Gujvinska S.A.

National Scientific Center «Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine», Kharkiv, Ukraine

Probiotic preparations are widely used in veterinary medicine for stimulating the growth and development of young animals for prophylaxis of gastrointestinal disorders, to restore intestinal biocenosis under stress after chemotherapy. Stability of probiotics during storage is an urgent problem.

Materials and methods. For the prevention and treatment of gastrointestinal diseases in animals was made three experimental series probiotic «Bolmol» and studied the stability of the drug during storage. Lyophilized probiotic strains containing Lactobacillus plantarum № 7 and Bifidobacterium adolescentis № 17. The term use of the drug is determined by the quality, safety, contamination of bacterial and fungal microflora biochemical activity. Benchmarks determined during manufacture, after 6, 12 and 24 months.

Results of researches. These results indicate that the probiotic was kontaminovanym bacterial and fungal microflora. When the crops grown on the medium MRS lactobacilli on Wednesday Blaurock - bifidobacteria. Study of the biochemical properties showed that the probiotic was standard speed clotting milk was 48 hours. Studies have shown that probiotic «Bolmol» was harmless. It was found that after storage for 6 probiotic, 12 and 24 months, the number of microbial cells per 1 cm³ was not less than 10⁶.

Conclusions. It has been found that probiotic stably retains its biochemical properties within 24 months after manufacture.

Keywords: probiotic, bifidobacteria, stability.

УДК 619:616.961.55.635.4

**МЕТОДИЧНІ ПІДХОДИ ДО КОНСТРУЮВАННЯ БАКТЕРІАЛЬНИХ ВАКЦИН
НА ПРИКЛАДІ ІНАКТИВОВАНИХ ВАКЦИН ПРОТИ ЕМФІЗЕМАТОЗНОГО КАРБУНКУЛУ**

Мандигра М.С., Бойко П.К., Бойко О.П.

*Дослідна станція епізоотології Інституту ветеринарної медицини НААН України,
м. Рівне, Україна, e-mail: pkboyko@ukr.net*

У статті дано комплексну оцінку основних чинників, що мають визначальний вплив на антигенність та імуногенність вітчизняних вакцин проти емфізематозного карбункулу, і на основі цього сформульовано головні методологічні підходи до конструювання бактеріальних вакцин. Встановлено, що на імуногенність вакцин проти емфізематозного карбункулу найбільший вплив мають якісний стан популяції культури в момент її інактивації (мікробна маса повинна бути представлена вегетативними рухливими формами, бо джгутики є головними носіями протективності), концентрування мікробної маси, використання мінеральних олій як ад'юванта.

Ключові слова: бактеріальні вакцини, емфізематозний карбункул.

Враховуючи досвід країн з ефективним веденням тваринництва, основний акцент у проведенні протиепізоотичних заходів необхідно робити на постійному моніторингу епізоотичної ситуації, своєчасній і точній діагностиці, локалізації та ліквідації вогнищ епізоотії (Концептуальні наукові підходи щодо нової стратегії протиепізоотичних заходів в Україні) [1].

Епізоотична ситуація в Україні характеризується різноманітністю нозологічних одиниць, що мають неоднаковий прояв як у часі, так і у просторі. Так, протягом останніх десятиріч у країні діагностували понад 40 заразних хвороб, що підлягають обов'язковому обліку за списком Міжнародного епізоотичного бюро [2].

Відомо, що специфічна профілактика є основним фактором контролю епізоотичного процесу за більшості інфекційних хвороб [3].

Тому активна імунізація сприйнятливих тварин у неблагополучних пунктах і зонах є найефективнішим заходом профілактики тієї чи іншої інфекції [4].

Аналіз ринку вітчизняних імунобіологічних засобів свідчить, що в Україні їх виробництвом займаються 36 підприємств різних форм власності та підпорядкування. З них майже половина (15 підприємств) випускають вакцини для тварин [5].

При цьому у вакцинах проти однієї і тієї ж хвороби, в основі яких лежить використання одного і того ж збудника, підходи до його інактивації, адсорбування розчинних антигенних детермінант (токсинів), концентрування мікробної маси та анатоксину, вибір ад'юванта тощо нерідко значно, а інколи й діаметрально різняться між собою.

Протективна активність ветеринарних імунобіологічних засобів, спрямованих на формування надійного імунного захисту в популяціях сприйнятливих тварин, є визначальним критерієм оцінки їх якості. Вона залежить від ряду чинників, зокрема

від імуногенної активності виробничого штаму (штамів), складу живильного середовища та режиму інкубації штамів з метою накопичення проєктивного антигену (антигенів), інактиватора, адсорбенту та ад'юванта [6].

Мета роботи. Розглянути головні методологічні підходи щодо створення бактеріальних вакцин з високою імуногенністю.

Матеріали та методи. Методологічні засади створення бактеріальних вакцин розглянуто нами на прикладі конструювання вакцин проти емфізематозного карбункулу великої рогатої худоби та овець.

Результати досліджень та їх обговорення. На даний час в Україні проти емфізематозного карбункулу великої рогатої худоби та овець є три вітчизняні вакцини. Дві вакцини, зокрема, концентрована гідроксид алюмінієва (ГОА) формолвакцина та інактивована вакцина «Емкарвак» зареєстровані Державним департаментом ветеринарної медицини (виробник Сумська державна біологічна фабрика), та одна вакцина «Бовімум шово», емульсована, інактивована знаходиться на стадії лабораторно-виробничих випробувань (ТОВ «Біотестлаб»). Коротка характеристика вакцин подана у табл. 1.

Таблиця 1 – Основні показники, що характеризують технологію виготовлення та якість вітчизняних вакцин проти емфізематозного карбункулу великої рогатої худоби та овець

Показники, за якими подано характеристику вакцин	Назва вакцини та її основні параметри		
	ГОА формолвакцина	«Емкарвак»	«Бовімум шово»
Виробничі штами	<i>Cl. chauvoei</i> R-15	<i>Cl. chauvoei</i> Л-7	<i>Cl. chauvoei</i> Л-7
Середовище	Бульйон Хотінгера	СТН	СТН
Основні антигенні та імуногенні детермінанти	Спори, залишки вегетативних клітин, екзотоксин	Вегетативні клітини, екзотоксин	Вегетативні клітини, екзотоксин
Інактиватор	Формальдегід	Формальдегід	Формальдегід
Адсорбент	ГОА	ГОА	Аеросил
Концентрування	6±3 см ³ рд./см ³	10±1 см ³ рд./см ³	10±1 см ³ рд./см ³
Емульсування	–	–	+
Доза, у см ³ і кратність імунізації	2,0 / 1	2,0 / 1	2,0 / 1
Антигенність, у титрах аглютининів на 21-й добу після імунізації тварин (n=10)	1: 1664±461	1: 1472±435	1: 2816±922
Імуногенність, к-сть морських свинок, які вижили після контрольного зараження (n=10)	9/10	10/10	10/10
Тривалість імунітету	6 міс.	9 міс.	12 міс.

Примітка: ГОА – гідроксид алюмінію; СТН – середовище токсинакопичення за прописом Бойко П.К. (2003) [8]; *Cl. chauvoei* R-15 – виділений співробітниками Новочеркаського ветеринарно-бактеріологічного інституту від трупа теляти віком 6 міс, у 1931 році; *Cl. Chauvoei* Л-7 – виділений спеціалістами бактеріологічного відділу Волинської обласної ветеринарної лабораторії від трупа бугая віком 1 рік у 1980 році.

Аналізуючи дані, наведені у таблиці 1, відзначимо, що найтриваліший імунітет (12 міс.) формується у тварин, щеплених вакциною «Бовімум шово»; «Емкарвак» стимулює формування імунітету тривалістю до 9 міс., тоді як ГОА формолвакцина – лише 6 міс. Розглянемо, які фактори (чинники) мають найсуттєвіший вплив на імуногенність вакцин проти емфізематозного карбункулу.

Як свідчать дані літератури, виробничі штами є визначальними чинниками імуногенності будь-яких бактеріальних вакцин, у т.ч. й емкарних [7]. Забезпечення високих імуногенних властивостей здійснюється шляхом підтримки вірулентних властивостей обох штамів – їх щорічно пасажують через організм морських свинок і один раз у 5 років – через організм телят (6–9-місячного віку). Через це суттєвих відмінностей у вірулентних і токсигенних властивостях, а отже і в імуногенності обох виробничих штамів немає. Це дає підставу зробити висновок, що виявлена відмінність у тривалості напруженого імунітету вакцин спричинена не генетичними особливостями вакцинних штамів.

На імунну активність бактеріальних вакцин суттєвий вплив має середовище, на якому накопичують мікробну масу та екзотоксини виробничих штамів [8]. У нашому випадку для накопичення мікробної маси *Cl. chauvoei* R-15 як середовище використовують бульйон Хотінгера (ГОА формолвакцина), тоді як для *Cl. chauvoei* Л-7 – СТН (вакцини «Емкарвак» і «Бовімум шово»). Бульйон Хотінгера був запропонований Ф.І. Каган (1963), як середовище багате на аміний азот, в якому *Cl. chauvoei* добре розмножується і при цьому значна маса (до 70–80 %) вегетативних клітин утворюють спори, а вегетативні клітини, відмираючи, виділяють у середовище значну масу екзотоксинів. На той час вважали, що чим більше екзотоксину виділяється в середовище накопичення, тим імуногеннішою буде вакцина [9]. З метою більшого токсинакопичення інкубування *Cl. chauvoei* R-15 ведуть впродовж 36–48 год., унаслідок чого осад мікробної маси складається із спор і залишків клітинних стінок – інші структурні елементи вегетативної клітини під впливом ферментів руйнуються (рис. 1).

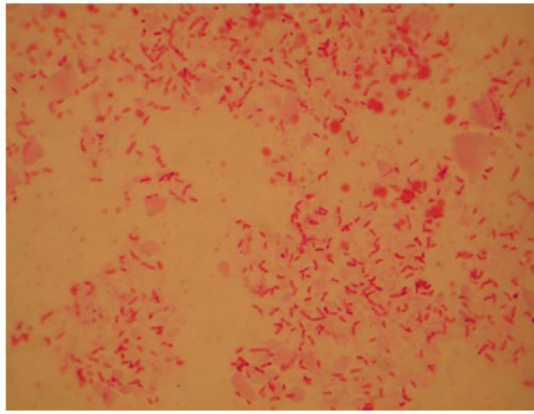


Рис. 1. Інактивована мікробна маса *Cl. chauvoei* R-15. Основну масу становлять спори і рештки вегетативних клітин, які зафарбовані грам негативно

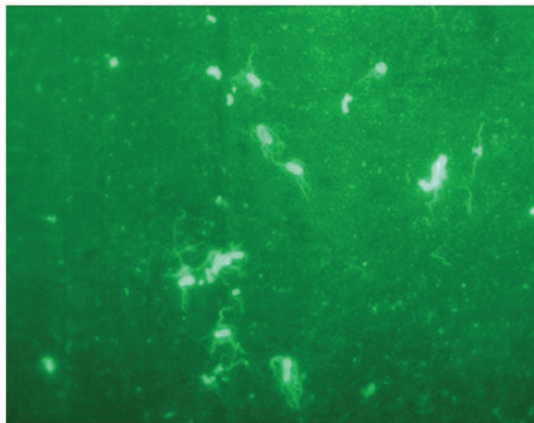


Рис. 2. Інактивовані мікробні клітини *Cl. chauvoei* Л-7. Основна маса це вегетативні клітини із джгутиками. Непрямий варіант методу флуоресціюючих антитіл

У технологічному процесі виготовлення вакцин «Емкарвак» і «Бовіmun шово» інактивування мікробної маси *Cl. chauvoei* Л-7 проводять на 12–14 год., тобто фазі активного росту культури, коли вся мікробна маса представлена вегетативними формами. За фазово-контрастної мікроскопії препаратів «роздушена або всяча крапля» із культури у цій фазі видно лише вегетативні рухливі форми, які перебувають у стані поділу, а за імунофлуоресцентної мікроскопії – вегетативні клітини із джгутиками (рис. 2).

Очевидно, вищу імунну активність вакцин на основі штаму *Cl. chauvoei* Л-7 можна пов'язувати із антигенами вегетативних клітин, зокрема джгутиковим антигеном. Підтвердження цьому висновку знаходимо в ряді робіт, автори яких відводять визначальну роль у формуванні протективної активності емкарних вакцин джгутиковому антигену, потім імуногенним детермінантам клітинної стінки вегетативних клітин і, на кінець, антигенам екзотоксину (анатоксину) [10].

Формальдегід в усіх трьох вакцинах є найбільш оптимальним інактиватором. Його дія забезпечує ефективну інактивацію, фіксацію антигенних детермінант і не руйнує ні екзотоксину, ні джгутиків [11]. Зважаючи на те, що його кількість в усіх трьох вакцинах становила 0,2 %, можна стверджувати, що виявлені відмінності в імуногенній силі вакцин не пов'язані із формальдегідом.

Як адсорбент у перших двох вакцинах використано ГОА, а у «Бовіmun шово» – діоксид кремнію або аеросил марки А-300. ГОА як адсорбент використовується у вакцинній справі давно, тоді як аеросил порівняно недавно. Треба відзначити, що аеросил за молекулярною масою є значно легшим, а за фізичними розмірами частинок значно меншим за ГОА, внаслідок чого його поверхня адсорбування є значно більшою, що може мати вплив на повноту адсорбування розчинних фракцій анатоксину і тим самим в якійсь мірі підвищувати антигенну та імуногенну активність вакцини.

Концентрування в усіх випадках виготовлення вакцин проводили шляхом декантування надосадової рідини, яка утворюється внаслідок відстоювання інактивованої культури після її адсорбування ГОА або аеросилом. При виготовленні концентрованої ГОА формолвакцина видаляють 2/3 об'єму надосадової рідини анакультури, тому кількість мікробної маси має такі значні (± 3 млрд./см³) коливання. При виготовленні вакцин «Емкарвак» і «Бовіmun шово» перед інактивацією культури визначають концентрацію мікробних клітин в ній і на основі отриманих даних вираховують ту кількість надосадової рідини, яку потрібно видалити, щоб отримати задану (10 ± 1 млрд./см³) концентрацію мікробів у вакцині. Такий підхід до концентрування є оправданим, бо дає можливість стандартизувати препарати за якісними показниками.

Порівнюючи тривалість імунітету із концентрацією мікробної маси в кожному із вакцинних препаратів, можна відзначити, що цей показник має суттєвий вплив на протективну активність вакцин. Тобто можна стверджувати, що чим більша концентрація мікробних тіл, тим вища протективна активність вакцини.

Проте, зважаючи на однакову концентрацію мікробних тіл у вакцинах «Емкарвак» і «Бовімум шово» і при цьому значно тривалішу напруженість імунітету, що формується під впливом вакцини «Бовімум шово», слід відзначити незаперечний вплив емульсування вакцини на основі мінеральної олії.

Про роль мінеральних олій як ефективних ад'ювантів свідчать розробки останніх десятиріч – більшість вірусних вакцин і значна частина бактеріальних виготовляються на олійній основі, тобто є емульсованими [12].

Такі вакцини є більш стабільними за показниками якості і найважливіше, що вони за інших рівних умов володіють вищою імуногенністю.

Висновки. 1. В Україні створені ефективні протиемкарні вакцини, розроблений біотехнологічний регламент випуску забезпечує їх високу імуногенну активність.

2. На антигенну та імуногенну активність, а також тривалість імунітету інактивованих концентрованих вакцин мають вплив:

- склад середовища, на якому культивують виробничі штами, та тривалість інкубації культури;
- морфологічні ознаки мікробів перед інактивацією;
- якість адсорбенту;
- використання мінеральних олій як ад'юванта.

Список літератури

1. Концептуальні наукові підходи щодо стратегії протиепізоотичних заходів в Україні на період до 2010 року. – Київ: МАПУ, 2002. – 12 с.
2. Горжеев В.М. Епізоотична ситуація в Україні: проблеми, загрози, рішення. – Ветеринарна практика. – 2013. – № 1. – С. 3–4.
3. Джулина С.И. Методы противозооотического исследования и теория эпизоотического процесса. - Новосибирск: наука. Сиб. отд-ние, 1991. - 142 с.
4. Бакулов И.А. Проявление эпизоотического процесса и оценка его интенсивности // Руководство по общей эпизоотологии / Под ред. И.А. Бакулова, А.Д. Третьякова. – М.: Колос, 1979. – С.137-148.
5. Ветеринарні імунобіологічні препарати: довідник / За заг. ред. П.І. Вербицького, А.М. Головка. – К.: Реферат, 2004. – 400 с.
6. Бусол В.О., Коваленко Л.В., Бойко П.К., Музика А.Є. Порівняльна характеристика антигенності та імуногенності комерційних та експериментальних вакцинних препаратів проти емфізематозного карбункула // Ветеринарна медицина (міжвідомчий тематичний науковий збірник). – Харків: ІЕКВМ, 2005.- № 85. - С.81-87.
7. Chandler H.M. An evaluation of characteristics of *Clostridium chauvoei* which possibly indicate a highly protective strain // Australian J. of Experimental Biology and Medical Science. / H.M. Chandler, J. Gulasekharan. – 1970. – Vol.48. – P.187–197.
8. Акименко Л.І. Підтримання біотехнологічних характеристик депонованих штамів – важлива складова якості імунобіологічних препаратів / Л.І. Акименко, П.К. Бойко, О.П. Бойко // Науково-технічний бюлетень. - 2007. - Вип. 8. - № 3-4. - С.221-226.
9. Каган Ф.И., Колесова А.И. Концентрированная вакцина против эмфизематозного карбункула // Биологические и химиотерапевтические ветеринарные. - М., 1963. –519 с.
10. Бойко П.К. Декларационный патент на винахід "Средовище токсинакопичення для CLOSTRIDIUM CHAUVOEI" № 60761 A // 2003021398, 15.10.2003, Бюл. № 10.
11. Tamura Y. Demonstration of protective antigen carried by flagella of *Clostridium chauvoei* Y.Tamura, N. Minamoto, S. Tanaka // Microbiol. Immunol. – 1984. - Vol.28 - P.1325-1332.
12. Ковалев И.Е. Биохимические основы иммунитета к низкомолекулярным химическим соединениям / И.Е. Ковалев, О.Ю. Полевая – М.: Наука, 1985.

THE METHODOLOGICAL APPROACHES TO THE BACTERIAL VACCINES' DESIGN ON THE EXAMPLE OF BLACKLEG INACTIVATED VACCINE

Mandygra M.S., Boiko P.K., Boiko O.P.

The Epizootology Research Station of the Institute of Veterinary Medicine of NAAS of Ukraine, Rivne, Ukraine

The article deals with the comparative assessment of the main factors that have a decisive influence on the antigenicity and immunogenicity of the Ukrainian vaccines against blackleg. Thus the methodological approaches to design bacterial vaccines are formulated.

It is founded that the antigenicity level of blackleg vaccines is determined by the quality status of bacterial-culture population in the moment of inactivation (the microbial mass must be presented by vegetative mobile forms, because flagella are the major of protectivity-forming structures), concentration of microbial mass, the type of mineral oils (as adjuvant).

Keywords: bacterial vaccines, blackleg.