

Н.С.Червякова, Т.В.Валова, А.В.Осин

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ЛИОФИЛЬНЫХ АППАРАТОВ КАМЕРНОГО ТИПА В КОЛЛЕКЦИЯХ ПАТОГЕННЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ

ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов, Российская Федерация

На примере установки Martin Christ Epsilon 2-6D проведена оценка возможности применения лиофильных установок камерного типа для консервации коллекционных штаммов патогенных микроорганизмов. Разработан алгоритм лиофилизации штаммов бактерий III–IV групп патогенности, включающий условия лиофилизации и обеспечение биологической безопасности при осуществлении этого процесса. Определены показатели жизнеспособности и выживаемости лиофилизированных клеток штаммов патогенных бактерий. С помощью теста термостабильности рассчитаны прогнозируемые сроки хранения препаратов коллекционных штаммов, сублимированных во флаконах на установке Martin Christ Epsilon 2-6D. Установлено, что наиболее перспективно лиофилизаторы камерного типа могут использоваться в коллекциях патогенных микроорганизмов для консервации бактерий III–IV групп патогенности, требующих массового воспроизводства и не подлежащих длительному хранению. В то же время их применение в лиофилизации штаммов I–II групп патогенности, закладываемых на долгосрочное хранение, требует дальнейшей адаптации этих аппаратов по направлениям обеспечения биологической безопасности и увеличения сроков хранения образцов.

Ключевые слова: коллекционные штаммы, лиофилизация, выживаемость клеток, прогнозируемый срок хранения.

N.S.Chervyakova, T.V.Valova, A.V.Osin

Application of Freeze-Dryers of Chamber Type in the Collections of Pathogenic Microorganisms

Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov, Russian Federation

By the example of Martin Christ Epsilon 2-6D device carried out was assessment of the possibility to use freeze-dryers of the chamber type for conservation of pathogenic microorganisms collection strains. Elaborated was algorithm of lyophilisation of the III–IV pathogenicity groups bacteria, which incorporated conditions of freeze-drying and biological safety provision of this process. Indices of viability and survivability were defined for freeze-dried cells of pathogenic bacteria strains. Using thermostability test calculated were predicted timelines of storage of collection strains preparations freeze-dried in the flasks in Martin Christ Epsilon 2-6D. It was determined that in the collections of pathogenic microorganisms freeze-dryers of the chamber type could be used most prospectively for the III–IV pathogenicity groups bacteria conservation requiring mass reproduction and not intended for long storage. At the same time their application for freeze-drying of the strains of the I–II pathogenicity groups bacteria intended for a long storage, requires further adaptation of these devices as regards biological safety provision and prolongation of the shelf life.

Key words: collection strains, freeze-drying, survivability of cells, predicted shelf life.

Одной из важных задач, решаемых в коллекциях микроорганизмов, является поддержание сохраняемых культур в жизнеспособном, неизменном состоянии в течение максимально возможного времени. Для реализации этого направления деятельности существует широкий выбор методов, одним из которых является лиофилизация [2, 4]. Лيوфилизированные культуры микроорганизмов хранятся длительное время при температуре 4 °С, кроме того они способны выдерживать без особых последствий и более высокие температуры, что позволяет транспортировать законсервированные этим способом штаммы на большие расстояния без потери жизнеспособности и заявленных свойств с минимальными затратами [1, 4, 7].

Лيوфилизация патогенных микроорганизмов обычно осуществляется в ампулах на лиофильных аппаратах коллекторного типа. К настоящему времени единственным документом, регламентирующим лиофилизацию микроорганизмов I–IV групп патогенности на федеральном уровне, является «Инструкция по лиофильному высушиванию возбудителей инфек-

ционных заболеваний I–IV групп на коллекторном аппарате системы К.Е.Долинова». Данная установка, по сравнению с современными аппаратами, по своим рабочим характеристикам морально и физически устарела, однако с точки зрения обеспечения биологической безопасности превосходит их, поскольку может тотально обрабатываться любыми дезинфекционными средствами, а также подвергаться процедуре автоклавирования. Тем не менее, аппарат К.Е.Долинова необходимо модернизировать или заменить на более современные, производительные установки. Примером такого решения может являться лиофильная сушка камерного типа Martin Christ Epsilon 2-6D, процесс лиофилизации на которой происходит в изолированной камере во флаконах.

Таким образом, целью нашего исследования явилась оценка возможности применения лиофильной сушки камерного типа для консервации коллекционных штаммов патогенных микроорганизмов, разработка алгоритма их лиофилизации, обеспечение биологической безопасности этого процесса, опреде-

ление жизнеспособности и оценка длительности хранения полученных бактериальных препаратов.

Материалы и методы

В работе использовано восемь тест-штаммов микроорганизмов III–IV групп патогенности: *Escherichia coli* 18 и 675, *Shigella flexneri* 17, 58573, 8516, *Shigella sonnei* «S-форма», *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 (209-P), *Enterococcus faecalis* ATCC 29212.

Выращивание микроорганизмов проводили на агаре Хоттингера с соблюдением необходимых условий, требующихся для нормального роста вышеуказанных видов бактерий. Лиофилизацию культур осуществляли на сублимационной установке камерного типа фирмы Martin Christ Epsilon 2-6D согласно ее правилам эксплуатации.

Жизнеспособность микробов определяли путем посева их на питательные среды с последующим подсчетом к первоначальному числу жизнеспособных клеток (до начала хранения), принятому за 100 %. Для определения возможного времени хранения при 4 °C использовали ускоренный тест прогнозирования выживаемости лиофилизированных культур бактерий (тест термостабильности) [5, 9]. Статистическая обработка данных осуществлялась с помощью методов вариационной статистики. Определяли среднюю арифметическую (M), стандартную ошибку (m) [3].

Результаты и обсуждение

Определение условий лиофилизации. Штаммы выращивали до ранней стационарной фазы, а затем их клетки ресуспендировали в среде высушивания в объеме 2–2,5 мл до конечной концентрации $n \cdot 10^{10}$ КОЕ/мл. В качестве среды высушивания использовали сахарозо-желатиновую среду (среда Файбича), состоящую из 10 % сахарозы, 1,5 % желатинины и 0,1 % агара (рН 7,1–7,2). Суспензии клеток в среде высушивания разливали в стерильные флаконы для лиофилизации стандарта 2R по 0,5 мл и помещали их в лиофильную камеру, где осуществлялся весь цикл высушивания препарата.

В ряде экспериментов нами была определена оптимальная программа сублимации, которая включает пять этапов: охлаждение препарата до температуры –45 °C при давлении (1000 мбар) в течение 1 ч; начальная лиофилизация при температуре –45 °C и давлении 0,18 мбар в течение 1 ч; последующая лиофилизация при давлении 0,18 мбар с постепенным повышением (шаг в 3 °C) температуры до 20 °C в течение 1 ч; заключительная лиофилизация при давлении 0,18 мбар и температуре 20 °C в течение 1 ч; досушивание при температуре 20 °C и давлении 0,001 мбар в течение 1 ч и при температуре 30 °C и давлении 0,001 мбар в течение 2 ч соответственно. Полный цикл лиофилизации составил 7 ч. Полученный препарат имел вид таблетки кремового цвета, хорошо отстающей от стенок флакона.

Обеспечение биологической безопасности процесса лиофилизации. Одной из важнейших составляющих лиофилизации штаммов возбудителей инфекционных заболеваний является обеспечение биологической безопасности этого процесса. Поскольку при лиофилизации в камере пробки флаконов находятся в приоткрытом состоянии, необходимым для обеспечения сублимации воды, существует вероятность попадания клеток высушиваемых образцов в пространство лиофильной камеры. Чтобы проверить такую возможность, сразу после окончания лиофилизации были сделаны смывы с поверхностей камеры, выявившие наличие клеток высушиваемого образца, что может повлечь за собой создание аварийной ситуации с ПБА. В связи с этим нами был выработан комплекс необходимых мер для ее предотвращения.

Все этапы работы с ПБА III–IV групп патогенности проводили согласно СП 1.3.2322-08. Воздух, откачиваемый из сушильной камеры, во избежание проскока клеток лиофилизируемых микроорганизмов через НЕРА-фильтр, располагающийся внутри камеры, проводили через приемник с дезраствором. По окончании лиофилизации все внутренние поверхности лиофильной камеры, полки и поддоны, а также внутренний фильтр воздухозабора обрабатывали 70 % этиловым спиртом, помещение бокса лиофилизации облучали ультрафиолетом. Флаконы с высушенным ПБА перед завальцовкой двукратно обрабатывали снаружи 70 % этиловым спиртом с интервалом в 3–5 мин. В смывах, сделанных после проведения указанных процедур, живых микроорганизмов не выявлено. Наличие жизнеспособных клеток лиофилизируемых микроорганизмов на рабочих поверхностях лиофильной камеры указывает на возможность их попадания в помещение бактериологического бокса при открытии дверцы по окончании процесса сушки, что, в случае работы с возбудителями I–II групп патогенности, недопустимо. В связи с этим для лиофилизации штаммов возбудителей особо опасных инфекций необходима доработка лиофилизатора либо системой стерилизации камеры газообразным дезинфектантом до момента открытия дверцы, либо совмещения ее с боксом биологической безопасности III класса, в котором и будут проводиться все манипуляции по загрузке, выемке и обработке лиофильной камеры.

Жизнеспособность лиофилизированных препаратов. В процессе лиофилизации клетки микроорганизмов попадают в экстремальные условия, часть их погибает, что делает необходимым контролировать жизнеспособность высушиваемых образцов. В результате проведенных исследований было установлено, что полученные препараты ПБА содержали значительное количество живых клеток коллекционных штаммов (табл. 1).

Количество жизнеспособных клеток после лиофилизации у большинства микроорганизмов снизилось в среднем в 1,3–2 раза. Рассчитанный показатель выживаемости клеток соответствует средним

Таблица 1

Показатели жизнеспособности лиофилизированных препаратов коллекционных штаммов патогенных бактерий

Штамм	Количество жизнеспособных бактерий (м.к./мл)		Показатель выживаемости клеток %
	Перед лиофилизацией	После лиофилизации	
<i>S. flexneri</i> 17	$(1,2 \pm 0,1) \cdot 10^{10}$	$(8,6 \pm 0,04) \cdot 10^9$	(71,7±8,5)
<i>S. flexneri</i> 58573	$(1,1 \pm 0,1) \cdot 10^{10}$	$(8,0 \pm 0,04) \cdot 10^9$	(72,7±9,3)
<i>S. flexneri</i> 8516	$(1,2 \pm 0,1) \cdot 10^{10}$	$(8,2 \pm 0,02) \cdot 10^9$	(68,3±8,4)
<i>S. sonnei</i> «S-форма»	$(1,2 \pm 0,1) \cdot 10^{10}$	$(9,0 \pm 0,04) \cdot 10^9$	(75,0±8,3)
<i>E. coli</i> 18	$(4,0 \pm 0,2) \cdot 10^{10}$	$(2,6 \pm 0,1) \cdot 10^{10}$	(65,0±5,4)
<i>E. coli</i> 675	$(2,0 \pm 0,1) \cdot 10^{10}$	$(1,3 \pm 0,04) \cdot 10^{10}$	(65,0±5,0)
<i>S. aureus</i> ATCC 6538 (209-P)	$(9,3 \pm 0,7) \cdot 10^{10}$	$(6,8 \pm 0,1) \cdot 10^{10}$	(73,1±7,7)
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	$(1,1 \pm 0,04) \cdot 10^{10}$	$(5,5 \pm 0,01) \cdot 10^9$	(50,0±9,0)

значениям, характерным для каждого из указанных микроорганизмов при их консервации методом лиофильного высушивания, и колеблется в пределах 50–75 % (табл. 1). Полученные результаты могут указывать на правильно подобранные условия лиофилизации, пригодные для консервации коллекционных штаммов микроорганизмов.

Определение времени хранения лиофилизированных микроорганизмов. Достоверность результатов определения численности живых бактерий в лиофилизированных препаратах подтверждали путем посева микроорганизмов на плотные питательные среды через выбранные промежутки времени их хранения при различных температурах, составлявшие при 4 °С – 12 мес., 25 °С – 14 дней и 37 °С – 14 дней. Было установлено, что выживаемость клеток лиофилизированных микроорганизмов изученных нами штаммов резко падает с увеличением температуры их хранения (табл. 2).

При этом лиофилизированные препараты *S. aureus* ATCC 6538 (209-P) и *E. faecalis* ATCC 29212 проявляли в десятки раз большую устойчивость к действию повышенных температур, чем штаммы шигелл и кишечной палочки. Также следует отметить, что инкубация препаратов коллекционных штаммов, лиофилизированных во флаконах при 25 °С в течение двух недель, не приводит к существенной гибели клеток. Потеря жизнеспособных клеток у изучаемых штаммов составила от 4,5 до 24,5 %. Полученный результат указывает на то, что данная форма упаковки подходит для транспортировки коллекцион-

ных штаммов почтовыми отправлениями, согласно Санитарным правилам СП 1.2.036-95, без необходимости сохранения холодной цепи.

На основании теста термостабильности был сделан прогноз времени хранения лиофилизированных культур. Рассчитанное нами время 50 % снижения количества жизнеспособных бактерий в высушенных образцах при хранении их в температурных условиях 4 °С (t_{50}) сильно варьировало от штамма к штамму в зависимости от их видовой принадлежности (табл. 3). Так, для штаммов шигелл показатель t_{50} в среднем равнялся 2 годам, в то время как количество жизнеспособных клеток *S. aureus* ATCC 6538 (209-P) будет сокращаться до 50 % порога на протяжении почти 12 лет (табл. 3). В среднем штаммы, лиофилизированные во флаконах, могут храниться 4–6 лет до полной утраты жизнеспособных клеток [6].

Достоверность сделанного прогноза была подтверждена экспериментальным путем, на основе сравнения количества сохранившихся жизнеспособных клеток в лиофилизированных препаратах в течение 1 года хранения, рассчитанного в тесте термостабильности (37 °С – 14 дней), с таковым при поддержании штаммов в температурных условиях 4 °С – 12 мес. (табл. 3). Расхождения между рассчитанными прогнозируемыми величинами количества живых клеток и экспериментально полученными оказались весьма незначительными и колебались в пределах от 1,02 до 1,10, что может свидетельствовать о справедливой оценке времени хранения полученных препаратов коллекционных штаммов.

Таблица 2

Показатели выживаемости лиофилизированных клеток коллекционных штаммов патогенных бактерий после хранения их при разных температурах

Штамм	Количество клеток жизнеспособных бактерий					
	Хранение при 4 °С 1 год		Хранение при 25 °С 14 сут		Хранение при 37 °С 14 сут	
	м.к./мл	%	м.к./мл	%	м.к./мл	%
<i>S. flexneri</i> 17	$(5,4 \pm 0,04) \cdot 10^9$	(62,8±5,9)	$(6,7 \pm 0,03) \cdot 10^9$	(77,9±9,7)	$(2,0 \pm 0,1) \cdot 10^8$	(2,3±10)
<i>S. flexneri</i> 58573	$(5,0 \pm 0,04) \cdot 10^9$	(62,5±7,4)	$(6,2 \pm 0,04) \cdot 10^9$	(77,5±4,4)	$(1,9 \pm 0,2) \cdot 10^8$	(2,3±10)
<i>S. flexneri</i> 8516	$(5,1 \pm 0,04) \cdot 10^9$	(62,2±4,9)	$(6,5 \pm 0,04) \cdot 10^9$	(79,3±8,8)	$(1,7 \pm 0,1) \cdot 10^8$	(2,0±10,4)
<i>S. sonnei</i> «S-форма»	$(5,6 \pm 0,06) \cdot 10^9$	(62,2±7,8)	$(6,8 \pm 0,04) \cdot 10^9$	(75,5±6,5)	$(1,9 \pm 0,09) \cdot 10^8$	(2,1±10,4)
<i>E. coli</i> 18	$(1,9 \pm 0,1) \cdot 10^{10}$	(73,0±5,4)	$(2,2 \pm 0,1) \cdot 10^{10}$	(84,6±4,9)	$(1,6 \pm 0,7) \cdot 10^9$	(6,1±10,1)
<i>E. coli</i> 675	$(9,4 \pm 0,01) \cdot 10^9$	(72,3±3,1)	$(1,1 \pm 0,04) \cdot 10^{10}$	(84,6±7,5)	$(8,0 \pm 0,2) \cdot 10^8$	(6,1±10,2)
<i>S. aureus</i> ATCC 6538 (209-P)	$(6,3 \pm 0,1) \cdot 10^{10}$	(92,6±2,0)	$(6,5 \pm 0,02) \cdot 10^{10}$	(95,5±8,4)	$(3,8 \pm 0,2) \cdot 10^{10}$	(55,8±6,3)
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	$(4,5 \pm 0,01) \cdot 10^9$	(81,8±1,8)	$(4,8 \pm 0,01) \cdot 10^9$	(87,2±8,0)	$(1,1 \pm 0,1) \cdot 10^9$	(20,0±10,1)

Прогнозируемые и экспериментальные показатели выживаемости лиофилизированных культур при 4 °С хранения в течение 12 мес.

Штамм	Прогнозируемые данные ¹		Экспериментальные данные ²	
	м.к./мл	t ₅₀ ³ , сут	м.к./мл	t ₅₀ , сут
<i>S. flexneri</i> 17	5,9·10 ⁹	674	(5,4±0,04)·10 ⁹	542
<i>S. flexneri</i> 58573	5,5·10 ⁹	678	(5,0±0,04)·10 ⁹	536
<i>S. flexneri</i> 8516	5,6·10 ⁹	654	(5,1±0,04)·10 ⁹	531
<i>S. sonnei</i> «S-форма»	6,1·10 ⁹	658	(5,6±0,06)·10 ⁹	531
<i>E. coli</i> 18	2,0·10 ¹⁰	910	(1,9±0,1)·10 ¹⁰	804
<i>E. coli</i> 675	9,9·10 ⁹	910	(9,4±0,01)·10 ⁹	777
<i>S. aureus</i> ATCC 6538 (209-P)	6,4·10 ¹⁰	4359	(6,3±0,1)·10 ¹⁰	3300
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	4,7·10 ⁹	1576	(4,5±0,01)·10 ⁹	1256

Примечания. ¹Результаты ускоренного теста прогнозирования выживаемости лиофилизированных культур в пересчете на хранение при 4 °С в течение 12 мес. ²Результаты, полученные после хранения лиофилизированных препаратов при 4 °С в течение 12 мес. ³Время, за которое при хранении лиофилизированных культур при 4 °С в препаратах останется не менее 5 % жизнеспособных клеток.

Полученные данные по времени хранения штаммов, лиофилизированных при помощи камерной сушки во флаконах, указывают на высокую вариабельность этого показателя. Так, например, согласно прогнозу, штаммы шигелл во флаконах будут храниться не более 4 лет, кишечной палочки – 5 лет, а золотистого стафилококка – почти 24 года, тогда как гарантированный срок хранения клеток микроорганизмов, высушенных в ампуле, составляет 50 и более лет, вне зависимости от видовой принадлежности [8].

Таким образом, лиофильная сушка Martin Christ Epsilon 2-6D, обладая вместительной камерой, позволяет получать за один цикл лиофилизации большое количество готовых препаратов и обеспечивать необходимый уровень биологической безопасности при консервации штаммов микроорганизмов III–IV групп патогенности. Кроме того, серия тест-штаммов, как правило, полностью распространяется между учреждениями-потребителями в течение 1–1,5 лет с момента их лиофилизации, что также хорошо соотносится с полученными нами результатами. Все это указывает на возможность использования лиофильных установок камерного типа в коллекциях патогенных бактерий для сублимации тест-штаммов, относящихся к III–IV группам патогенности.

Вместе с тем для применения этих аппаратов при лиофилизации штаммов микроорганизмов I–II групп патогенности в качестве основного инструмента формирования коллекционного фонда необходимо проведение дальнейших работ по их адаптации в направлении обеспечения необходимого уровня биологической безопасности и увеличения сроков хранения получаемых препаратов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Беккер М.Е., Рапопорт А.И., Калакуцкий Л.В. Торможение жизнедеятельности клеток. Рига: Зинатне; 1987. 240 с.
2. Матвеева Е.В. Сохранение генофонда фитопатогенных бактерий методом лиофилизации. *АГРО XXI*. 2007; 10–12:28–30.
3. Плохинский Н.А. Биометрия. 2-е издание. 1970. 367 с.

4. Похиленко В.Д., Баранов А.М., Детушев К.В. Методы длительного хранения коллекционных культур микроорганизмов и тенденции развития. *Известия высших учебных заведений. Поволжский регион. Медицинские науки*. 2009; 4(12):99–121.

5. Филатова С.Н., Муравьева С.А., Фишман В.М. Прогнозирование выживаемости лиофилизированных спор *Acnomyces parvullus*, основанное на методе ускоренного хранения. *Микробиология*. 1977; 46(2):318–23.

6. American type culture collection methods: 1. Laboratory manual on preservation. Freezing and freeze-drying as applied to algae, bacteria, fungi and protozoa. Rockville (Maryland): ATCC; 1980. 51 p.

7. Donev T. Methods for Conservation of Industrial Microorganisms. Sofia; 2001. 93 p.

8. NCTC Freeze-Drying Services [Электронный ресурс]: <http://www.phe-culturecollections.org.uk/services/freeze-drying/> Freeze-Drying.aspx (дата обращения 02.08.2013 г.).

9. Portner D.C., Leuschner R.G.K., Murray B.S. Optimising the viability during storage of freeze-dried cell preparations of *Campylobacter jejuni*. *Cryobiology*. 2007; 54:265–70.

References

1. Bekker M.E., Rapoport A.I., Kalakutsky L.V. [Suppression of Vital Activity of the Cells]. Riga: Zinatne; 1987. 240 p.
2. Matveeva E.V. [Preservation of phytopathogenic bacteria genefond by means of freeze-drying]. *AGRO XXI*. 2007; 10–12:28–30.
3. Plokhinsky N.A. [Biometry]. 2-nd Edition. 1970. 367 p.
4. Pokhilenko V.D., Baranov A.M., Detushev K.V. [Methods of long storage of microorganisms collection cultures and tendencies of development]. *Izvestiya Vysshikh Uchebnykh Zavedenii. Povolzhsky Region. Meditsinskie Nauki*. 2009; 4 (12):99–121.
5. Filatova S.N., Murav'eva S.A., Fishman V.M. [Prognostication of survivability of freeze-dried spores of *Acnomyces parvullus*, based upon accelerated storage method]. *Mikrobiologiya*. 1977; 46 (2):318–323.
6. American type culture collection methods: 1. Laboratory manual on preservation. Freezing and freeze-drying as applied to algae, bacteria, fungi and protozoa. Rockville (Maryland): ATCC; 1980. 51 p.
7. Donev T. Methods for Conservation of Industrial Microorganisms. Sofia; 2001. 93 p.
8. NCTC Freeze-Drying Services [Электронный ресурс]: <http://www.phe-culturecollections.org.uk/services/freeze-drying/> Freeze-Drying.aspx (дата обращения 02.08.2013 г.).
9. Portner D.C., Leuschner R.G.K., Murray B.S. Optimising the viability during storage of freeze-dried cell preparations of *Campylobacter jejuni*. *Cryobiology*. 2007; 54:265–70.

Authors:

Chervyakova N.S., Valova T.V., Osin A.V. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russian Federation. E-mail: rusrapi@microbe.ru

Об авторах:

Червякова Н.С., Валова Т.В., Осин А.В. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». Российская Федерация, 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrapi@microbe.ru

Поступила 12.09.13.