

Т.В.Аленкина¹, Г.Г.Красичков¹, Г.М.Фомина¹, О.А.Лобовикова¹, Н.П.Миронова¹, О.С.Пуденкова¹,
А.К.Никифоров¹, Л.В.Саяпина², А.Н.Малахаева²

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА СЫВОРОТОК ДИАГНОСТИЧЕСКИХ ЧУМНЫХ АНТИФАГОВЫХ, ПОЛУЧЕННЫХ ОТ РАЗНЫХ ВИДОВ ПРОДУЦЕНТОВ

¹ФГУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов;

²ФГУН «Государственный институт стандартизации и контроля медицинских биологических препаратов им. Л.А.Тарасевича», Москва

Отработана технология получения бараньих гипериммунных сывороток к чумному бактериофагу Покровской, изучена их стабильность в процессе хранения. Полученные сыворотки были использованы в качестве сырья для изготовления трех экспериментальных серий сыворотки диагностической чумной антифаговой бараньей сухой. Сравнительная оценка физико-химических свойств, специфической активности и специфичности разработанного препарата с аналогичным коммерческим, изготовленным из лошадиной сыворотки, показала их сходство по всем испытываемым параметрам, что позволило рекомендовать сыворотку диагностическую чумную антифаговую баранью к применению.

Ключевые слова: сыворотка антифаговая чумная лошадиная и баранья, бактериофаг чумной Покровской, индикаторный штамм *Y. pestis* EV.

Сыворотка диагностическая чумная антифаговая предназначена для нейтрализации чумного бактериофага, который может находиться в исследуемом материале и препятствовать выделению чумного микроба.

Сыворотка была разработана и внедрена в практику в начале 50-х годов XX века [6], однако и в настоящее время входит в перечень обязательных препаратов, применяемых для лабораторной диагностики чумы [5]. В 2007 г. сыворотка диагностическая чумная антифаговая получила регистрацию в Федеральной службе по надзору в сфере здравоохранения и социального развития в качестве изделия медицинского назначения (Регистрационное удостоверение № ФСР 2007/00879). Препарат представляет собой сыворотку крови лошади, гипериммунизированной бактериофагом чумным Покровской (П). До 90-х годов XX века все диагностические препараты выпускались и реализовывались на основании плана Министерства здравоохранения СССР. В связи с этим объемы их производства исчислялись десятками литров, а ежегодное производство чумной антифаговой сыворотки составляло в среднем 18–22 л. В настоящее время, при отсутствии государственного планирования, сыворотка чумная антифаговая выпускается на основании заявок противоэпидемических и лечебно-профилактических учреждений Российской Федерации, поэтому годовые объемы производства и реализации резко снизились и практически не превышают 1 л. Несмотря на это препарат продолжает быть востребованным в различных регионах нашей страны, что без сомнения свидетельствует о необходимости его выпуска. В условиях мелкосерийного производства антифаговой сыворотки вполне естественно возникает вопрос об экономической нецелесообразности использования в качестве продуцентов лошадей, накопления больших запасов полученного

от них сывороточного сырья, срок хранения которого строго регламентирован. Следовательно, возникает необходимость подбора животного-продуцента более адекватного по объему получаемого сырья. По способности индуцировать антитела на антигенное раздражение и количеству отбираемой одновременно крови наиболее подходящими продуцентами являются бараны и овцы. Изготовление чумной антифаговой сыворотки на основе бараньих (овечьих) сывороток, на наш взгляд, позволит решить возникшую проблему и повысить экономическую эффективность ее производства. Получаемые небольшие объемы бараньих сывороток вполне могут обеспечить потребность производства в настоящее время и исключить необходимость уничтожения больших запасов нереализованного сырья. Помимо этого, содержание барана обходится гораздо дешевле, чем содержание лошади.

Целью нашей работы было отработать технологическую схему получения бараньей чумной антифаговой сыворотки и провести сравнительную оценку ее физико-химических и биологических свойств с коммерческим препаратом.

Материалы и методы

В качестве животных-продуцентов были использованы бараны 2-летнего возраста весом 52–54 кг, статуса К-1, закупленные в Саратовской области.

Иммунизацию баранов осуществляли бактериофагом диагностическим чумным Покровской (П) в концентрации $n \cdot 10^8$ – $n \cdot 10^9$ БОЕ/мл. Грундирование проводили однократно через 7 дней после пробного отбора крови, необходимого как для стимуляции ретикуло-эндотелиальной системы, так и для определения уровня естественных антител [7]. Основной цикл иммунизации начинали через 3 месяца после

первичного введения антигена. Схема иммунизации баранов была аналогичной схеме иммунизации лошадей, указанной в Промышленном регламенте [6]. Дозы антигена на инъекцию были уменьшены в соответствии с весовыми характеристиками продуцентов, однако в процессе иммунизации осуществлялась дополнительная корректировка дозы в зависимости от реакции организма продуцента на введение антигена (температура, общее состояние).

Динамику нарастания титров антифаговых антител в сыворотке крови животных-продуцентов, а также уровень специфической активности готовых препаратов антифаговой сыворотки (титр сыворотки) определяли в реакции нейтрализации с бактериофагом диагностическим чумным Покровской (П) сер. 013 по модифицированному методу Адамса [1, 2, 3]. Сыворотки разводили в бульоне Хоттингера (рН 7,2±0,1), начиная с 1:50 до 1:500. Разведенные сыворотки предварительно инкубировали с бактериофагом чумным Покровской (П) в рабочем разведении (смесь 1:10) в течение 15 мин при температуре (20±2) °С. Затем смесь репликатором или бактериологической петлей наносили на газон, подготовленный из 0,5 мл взвеси 24-часовой культуры индикаторного штамма с концентрацией 4·10⁹ м.к./мл в 5 мл 0,7 % агара Хоттингера. Посевы инкубировали при (28±1) °С. Учет результатов осуществляли через (19±1) ч.

При изучении свойств трех экспериментальных серий бараньей чумной антифаговой сыворотки в качестве препарата сравнения были использованы три коммерческие серии сыворотки диагностической чумной антифаговой, лиофилизата для диагностических целей – сер. 22, 30, 54.

Определение специфичности проводили методом «дорожки» [1], используя бактериофаги диагностический чумной Л-413С сер. 013 и псевдотуберкулезный сер. 014.

Серийный выпуск всех вышеперечисленных препаратов осуществляется в ФГУЗ РосНИПЧИ «Микроб». Препараты испытывались в период их срока годности.

В качестве индикаторного штамма использовали 24-часовую культуру вакцинного штамма *Yersinia pestis* EV линии НИИЭГ, выращенного при температуре 28 °С. Указанный штамм был получен в ФГУН ГИСК им. Л.А.Тарасевича. Свойства экспериментальных и коммерческих серий чумных антифаговых сывороток оценивали в соответствии с Техническими условиями [8].

Результаты и обсуждение

После первого года иммунизации уровень антифаговых антител достиг значения 1:100, после второго – 1:200. Таким образом, после двух лет иммунизации активность сывороток баранов-продуцентов достигла регламентированного уровня, и они стали пригодными для производства препарата. Через 3 года иммунизации уровень специфических антител

достиг значений 1:400. Следует отметить, что при иммунизации лошадей-продуцентов титр специфических антител 1:200 достигается через 1–1,5 года, в зависимости от индивидуальной иммунореактивности продуцента, однако антигенная стимуляция при этом характеризуется более высокими дозами. Максимальный уровень антифаговых антител у лошадей составляет обычно 1:300 и лишь у редких продуцентов достигает уровня 1:500.

Основным преимуществом гипериммунных сывороток является способность сохранять свои свойства при хранении в течение длительного периода. Изучение рН и специфической активности бараньих антифаговых сывороток, хранившихся при температуре от 2 до 8 °С, выявило стабильность указанных параметров в течение всего срока наблюдения (3 года). Свойства сывороток чумных антифаговых, полученных от лошадей-продуцентов, сохранялись в течение 18 лет наблюдения (табл. 1).

Из полученного сырья были изготовлены 3 экспериментальные серии лиофилизированных препаратов сыворотки диагностической чумной антифаговой бараньей 001, 002, 003, которые прошли комиссионные испытания с участием специалистов института «Микроб» и ФГУН ГИСК им. Л.А.Тарасевича.

При определении физико-химических свойств

Таблица 1

Стабильность свойств чумной антифаговой сыворотки (сырье) в процессе хранения

Вид продуцента	Дата получения сыворотки, даты последующего контроля	рН	Специфическая активность
Баран	08.02.2005 г.	8,48	1:100
	08.02.2006 г. (через 1 год)	8,48	1:100
	07.02.2007 г. (через 2 года)	8,47	1:100
	13.02.2008 г. (через 3 года)	8,48	1:100
	29.01.2009 г. (через 4 года)	8,47	1:100
Баран	09.11.2006 г.	8,52	1:100
	20.11.2007 г. (через 1 год)	8,53	1:100
	18.11.2008 г. (через 2 года)	8,52	1:100
Баран	25.12.2006 г.	8,45	1:200
	19.12.2007 г. (через 1 год)	8,43	1:200
	24.12.2008 г. (через 2 года)	8,44	1:200
Баран	21.05.2007 г.	8,50	1:200
	27.05.2008 г. (через 1 год)	8,51	1:200
	29.01.2009 г. (через 2 года)	8,49	1:200
Баран	02.11.2007 г.	8,51	1:200
	05.11.2008 г. (через 1 год)	8,51	1:200
Баран	24.09.2008 г.	8,60	1:400
	28.01.2009 г. (через 4 мес.)	8,60	1:400
Лошадь	22.12.1988 г.	-	1:300
	11.04.2007 г. (через 18 лет)	8,4	1:300
Лошадь	22.12.1988 г.	-	1:300
	13.12.2006 г. (через 18 лет)	8,25	1:300
Лошадь	02.02.1989 г.	-	1:300
	27.04.2007 г. (через 18 лет)	8,37	1:300

Примечание. «-» – ранее данный параметр не подлежал контролю, в связи с этим сведения отсутствуют.

Показатели физико-химических свойств и специфической активности сывороток диагностических чумных антифаговых

Наименование сыворотки (вид продуцента)	№ серии	Растворимость Норма по НД – 10 мин	pH Норма по НД – от 7,2 до 8,8	Потеря в массе при высушивании. Норма по НД – не более 2 %	Специфическая активность Норма по НД – не менее 1:100
Сыворотка диагностическая чумная антифаговая сухая (баранья)	001	3–6	7,9	0,6	1:100
Сыворотка диагностическая чумная антифаговая сухая (баранья)	002	3–6	8,15	0,8	1:300
Сыворотка диагностическая чумная антифаговая сухая (баранья)	003	3–6	8,33	0,7	1:100
Сыворотка диагностическая чумная антифаговая сухая (лошадиная)	22	6–8	8,2	0,52	1:300
Сыворотка диагностическая чумная антифаговая сухая (лошадиная)	30	6–8	8,1	1,2	1:500
Сыворотка диагностическая чумная антифаговая сухая (лошадиная)	54	6–8	7,39	1,2	1:200

установлено, что сухие препараты сыворотки диагностической чумной антифаговой бараньей сер. 001, 002, 003 представляли собой аморфную массу серовато-розового цвета, а сухие образцы препарата сравнения сер. 22, 30 и 54 – аморфную массу серовато-белого цвета.

Содержимое ампул экспериментальных сывороток полностью растворялось в 1 мл дистиллированной воды при встряхивании в течение 3–6 мин при температуре (20 ± 2) °С, в то время как сыворотка диагностическая чумная антифаговая лошадиная сер. 22, 30 и 54 растворялась при тех же условиях в течение 6–8 мин. В соответствии с нормативной документацией (НД) допустимое время растворения сухих препаратов из сыворотки лошади составляет 10 мин. После растворения экспериментальные образцы представляли собой прозрачную слегка опалесцирующую жидкость желто-коричневого цвета, препараты сравнения – желтого цвета.

Значения pH бараньей антифаговой сыворотки сер. 001, 002, 003 составляли соответственно 7,80, 8,36, 8,33, а pH сер. 22, 30, 54 препарата сравнения – 8,40, 8,30, 7,39, что соответствовало пределам значений pH по НД – от 7,2 до 8,8.

Одним из важных показателей, определяющих стабильность препаратов при хранении, является содержание остаточной влаги. В условиях минимального ее содержания снижается вероятность протекания химических реакций, которые приводят к необратимым изменениям препаратов. По мнению ряда авторов, оптимальная величина остаточной влажности (или потеря в массе при высушивании) сывороток и сывороточных препаратов не должна превышать 1 % [4]. В соответствии с НД потеря в массе при высушивании в препаратах сыворотки диагностической чумной антифаговой лошадиной – не более 2 %. При испытаниях потеря в массе при высушивании в сериях 22, 30 и 54 коммерческого препарата составила со-

ответственно 0,52, 1,2, 1,2 %, а в экспериментальных сериях 001, 002, 003 – 0,6, 0,8, 0,7 %, что свидетельствует о правильно подобранном режиме лиофилизации для бараньих сывороток.

Показатели физико-химических свойств экспериментальных сывороток и образцов препарата сравнения приведены в табл. 2.

К биологическим свойствам антифаговых сывороток относятся специфическая активность и специфичность. Определение специфической активности представленных к испытанию экспериментальных сер. 001, 002, 003 сыворотки диагностической чумной антифаговой бараньей и сер. 20, 33, 54 препарата сравнения исследовали в разведениях от 1:100 до 1:500.

Специфическая активность бараньих антифаговых сывороток сер. 001, 002, 003 составила 1:100, 1:300, 1:100, специфическая активность образцов препарата сравнения сер. 20, 33, 54 – 1:300, 1:500 и 1:200 (табл. 2).

Контроль количества бляшкообразующих единиц в рабочем разведении бактериофага чумного Покровской (П), проводимый одновременно с контролем специфической активности сывороток, свидетельствовал о правильности определения фагнейтрализующего титра сывороток: при разведении 1:100 тыс. на 2 чашках Петри с пластинами агара Хоттингера (pH 7,2) фаг образовывал 7 и 11, а при разведении 1:20 тыс. – 43 и 43 литических пятна, при норме по НД – 7–13 и 35–65 литических пятен соответственно.

При изучении специфичности экспериментальных (сер. 001, 002, 003) и контрольных (сер. 20, 33 и 54) серий чумных антифаговых сывороток у всех образцов выявлена фагнейтрализующая активность только в отношении гомологичного бактериофага чумного Покровской (П). Сыворотки не взаимодействовали с гетерологичными бактериофагами чумным Л-413С и псевдотуберкулезным, что свидетельствовало о высокой специфичности препаратов.

Таким образом, по отработанной нами технологии из стабильных гипериммунных бараньих сывороток были получены экспериментальные серии лиофилизированного препарата сыворотки диагностической чумной антифаговой. Сравнительное изучение свойств экспериментальных серий и коммерческого препарата, проведенное комиссионно, показало, что по физико-химическим и биологическим свойствам испытуемые образцы бараньих сывороток соответствовали образцам препарата сравнения – сыворотки диагностической чумной антифаговой лошадиной. Чумные антифаговые сыворотки независимо от вида продуцента характеризовались высокой специфичностью и не давали перекрестных реакций с чумным Л-413 С и псевдотуберкулезным бактериофагами. По заключению комиссии сыворотка диагностическая чумная антифаговая, изготовленная из гипериммунных сывороток баранов-продуцентов, может применяться наряду с сывороткой диагностической чумной антифаговой, изготавливаемой из лошадиной сыворотки.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Адамс М. Бактериофаги. М.: Медицина; 1961.
2. Анохина С.В., Анисимова Т.И., Голубева В.К. Усовершенствование метода титрации чумных антифаговых сывороток. В кн.: Матер. ежегодной науч. конф., посв. памяти Л.А.Тарасевича, по вопросам штаммов, новых методов контроля, стандартизации биологических препаратов, бактериофагии и антибиотиков. М.; 1964. С. 256.
3. Бессель М.М., Сидорова Н.К., Заболотняя О.С. Модификация метода определения титра чумных антифаговых сывороток. В кн.: Профилактика особо опасных инфекций. Эпизоотология, микробиология и специфическая профилактика чумы. 1976; 1:65–8.
4. Бланков Б.И., Клебанов Д.Л. Применение лиофилизации в микробиологии. М.: Медгиз; 1961.
5. Онищенко Г.Г., Кутырев В.В., редакторы. Лабораторная диагностика особо опасных инфекционных болезней. М.: ОАО «Издательство «Медицина», издательство «Шико»; 2009.
6. Промышленный регламент № 01898109-06-06 на производство «Сыворотка диагностическая чумная антифаговая, лио-

филизат для диагностических целей». Утвержден 06.02.06.

7. Смирнов В.В., Чаплинский В.Я., Андреева З.М. и др. Научные основы производства диагностических препаратов. Киев: Наукова думка; 1980.

8. Технические условия ТУ 8955-004-01898109-2007 «Сыворотка диагностическая чумная антифаговая, лиофилизат для диагностических целей». Утверждены 02.04.2007 г.

T.V.Alenkina, G.G.Krasichkov, G.M.Fomina, O.A.Lobovikova,
N.P.Mironova, O.S.Pudenkova, A.K.Nikiforov, L.V.Sayapina,
A.N.Malakhaeva

Comparative Analysis of Diagnostic Plague Antiphage Sera Received from Producers of Different Types

Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov;
L.A.Tarasevich State Institute for Standardization and Control
of Medical Biological Preparations, Moscow

Manufacturing process of ovine hyperimmune sera against Pokrovskaya plague bacteriophage was worked out. Their stability in the process of storage was studied. Sera received were used as raw material to produce three experimental series of diagnostic plague antiphage ovine dry serum. Physicochemical properties, specific activity and specificity of the developed preparation were evaluated in comparison with similar commercial preparation produced from the equine serum. Similarity of all test parameters was revealed that enabled to recommend diagnostic plague antiphage ovine serum for application.

Key words: antiphage plague equine and ovine sera, Pokrovskaya plague bacteriophage, *Y. pestis* EV indicator strain.

Об авторах:

Аленкина Т.В., Красичков Г.Г., Фомина Г.М., Лобовикова О.А., Миронова Н.П., Пуденкова О.С., Никифоров А.К. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: microbe@san.ru

Саяпина Л.В., Малахаева А.Н. Государственный институт стандартизации и контроля медицинских биологических препаратов им. Л.А.Тарасевича. 119002, Москва, ул. Сивцев Вражек, 41.

Authors:

Alenkina T.V., Krasichkov G.G., Fomina G.M., Lobovikova O.A., Mironova N.P., Pudenkova O.S., Nikiforov A.K. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". 410005, Saratov, Universitetskaya St., 46. E-mail: microbe@san.ru

Sayapina L.V., Malakhaeva A.N. L.A.Tarasevich State Institute for Standardization and Control of Medical Biological Preparations. 119002, Moscow, Sivtsev Vrazhek, 41.

Поступила 25.05.09.