

Л.В.Ляпустина, П.А.Омельянчук, Г.И.Лямкин, С.В.Вилинская, С.И.Головнева, О.И.Коготкова,
Д.А.Будыка, Д.В.Русанова, А.Н.Куличенко

СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ПРОИЗВОДСТВА БРУЦЕЛЛЕЗНЫХ ДИАГНОСТИЧЕСКИХ БАКТЕРИОФАГОВ

ФГУЗ «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт»

На основе определения оптимальных условий репродукции бактериофагов, разработаны и представлены технологии производства бруцеллезных диагностических бактериофагов. Проведена оценка стабильности получаемого готового продукта с использованием контрольных карт Шухарта.

Ключевые слова: бруцеллезные бактериофаги, репродукция, статистические карты.

Лабораторная диагностика бруцеллеза у людей в Российской Федерации проводится согласно методическим указаниям «Профилактика и лабораторная диагностика бруцеллеза людей» (МУ 3.1.7.1189-03) [3], регламентирующим бактериологический, иммуносерологический, молекулярно-генетический и алергический методы исследования. Осуществляемая в ходе бактериологического анализа межвидовая дифференциация штаммов бруцеллезного микроба, предусматривает использование в комплексной оценке штаммов-изолятов тест на чувствительность к лизирующему действию бруцеллезного диагностического бактериофага Тб (Тбилиси).

В соответствии с рекомендациями объединенного комитета экспертов ФАО/ВОЗ по бруцеллезу [7] в числе комплексных тестов дифференциации выделяемых штаммов бруцелл применяется определение их чувствительности к литическому действию набора бруцеллезных диагностических бактериофагов Тб, Fi (Firenze), Wb (Weybridge), Bk2 (Berkley).

В настоящее время в Российской Федерации отсутствуют зарегистрированные препараты бактериофагов бруцеллезных диагностических, что затрудняет выполнение всего комплекса тестов межвидовой дифференциации штаммов возбудителя бруцеллеза и стандартизации результатов бактериологических исследований на бруцеллез.

Целью исследования явилось совершенствование технологии производства бруцеллезных диагностических бактериофагов для обеспечения выпуска готовой продукции со стандартизованными качественными показателями.

Материалы и методы

В качестве маточных в работе были использованы четыре бруцеллезных бактериофага, находящиеся в коллекции ФГУЗ СтавНИПЧИ Роспотребнадзора. Отработку технологии производства бактериофагов бруцеллезных диагностических и оценку их качества проводили с использованием референтных штаммов бруцелл и штаммов-изолятов из коллекции ФГУЗ СтавНИПЧИ Роспотребнадзора, в числе которых: *Brucella (B.) melitensis* – 31 штамм; *B. abortus* – 26 штаммов; *B. suis* – 29 штаммов. При выполнении бактериологических исследований были использованы: мясо-пептонный печеночный бульон (МППБ), pH 7,2±0,1; мясо-пептонный печеночный агар, pH 7,2±0,1; агар Альбими, pH 7,2±0,1; бульон Альбими, pH 7,2±0,1; эритроцит-агар, pH 7,2±0,1; агар «Д», pH 7,2±0,1; бульон «Д», pH 7,2±0,1. Питательные среды перед использованием проходили качественную оценку согласно методическим указаниям «Профилактика и лабораторная диагностика бруцеллеза людей» [3].

Размножение бактериофагов проводили в бульоне, в слое полужидкого агара, на агаровой культуре с использованием стандартных штаммов размножения по методикам, описанным M.J.Corbet, E.L.Thomas [5]. Концентрацию (количество фаговых частиц) бактериофагов определяли по методу A.Gratia [6] с соответствующими индикаторными штаммами подсчетом числа негативных колоний на газоне индикаторного штамма, вычисляя среднюю величину по 4 вариантам по формуле:

$$K = (a_1 + a_2 + a_3 + a_4) \times 10^n, \text{ где:}$$

K – концентрация бактериофага

$a_{1...4}$ – количество негативных колоний на чашке при посеве фага, разведенного в n раз.

За диагностический титр разведения (ДТР) принимали наибольшее разведение бактериофага, одна капля которого способна образовать литическое пятно с определенным видом бруцелл и не образовывать – с другими видами. Для определения ДТР бактериофагов использовали по пять штаммов каждого вида бруцелл: *B. abortus*, *B. suis*, *B. melitensis*.

Для построения кривой одиночного цикла размножения бруцеллезных бактериофагов использовали базовую методику, описанную М.Адамс [1]. Оценку стабильности технологического процесса производства бруцеллезных бактериофагов проводили с использованием контрольных карт Шухарта [2] в системе STATISTICA 6.0.

Результаты и обсуждение

В последнее время значительно расширилась номенклатура питательных сред, используемых в ми-

кробиологической практике, и одним из направлений перспективных разработок в этой области является изыскание новых источников непищевого сырья, что актуально с экономических позиций.

Для подбора оптимальных условий репродукции бруцеллезных бактериофагов было проведено сравнительное изучение использования для этих целей сред различного состава: на основе мясных гидролизатов (МППБ, бульон Мартена), на основе дрожжевого (бульон Альбими) и рыбного гидролизатов (бульон Д). При этом учитывалось, что факторы, которые влияют на эффективность размножения бруцеллезных фагов, включают: рН репродуктивной среды; питательное соответствие среды штамму-размножения; наличие двухвалентных и поливалентных катионов и анионов, а также амфотерных соединений – аминокислот.

Установлено, что для воспроизводства бруцеллезных бактериофагов с успехом можно применять среды немясного происхождения (бульон Альбими), при этом средняя концентрация получаемых фаговых препаратов с использованием данной питательной среды составляла $(7,1 \pm 0,2) \cdot 10^{11}$ фаговых частиц (ф.ч./мл), что было сопоставимо с концентрацией бактериофагов, получаемых на средах на основе мясного сырья (МППБ, бульон Мартена) $((6,5 \pm 0,15) \cdot 10^{11}$ ф.ч./мл), но являлось экономически более выгодным.

При сравнительной оценке используемых для размножения бактериофагов способов их воспроизводства (на бульонной культуре, в слое агаровой культуры, на агаровой культуре) было показано, что наилучший выход конечного продукта давала методика репродукции фагов в слое агаровой культуры. Однако, учитывая трудоемкость осуществления данного способа размножения в технологическом цикле производства бактериофагов, было определено, что ее применение возможно только для репродукции бруцеллезного бактериофага Bk2, размножение которого в достаточной конечной концентрации ($1 \cdot 10^7$ ф.ч./мл и более) не удалось осуществить двумя другими способами.

Согласно описанным методикам [5], воспроизводство бруцеллезных фагов Wb и Bk2 осуществляется на вирулентных представителях рода *Brucella* (*B. suis* 1330, *B. melitensis* Isfahan или *B. melitensis* Ispania соответственно), для воспроизводства бактериофагов Tб и Fi используется вакцинный штамм *B. abortus* 19.

Технологический цикл получения фаговых препаратов предусматривает применение ряда процессов (центрифугирование, фильтрация), которые при определенных условиях могут создавать угрозу биологической безопасности производства. В связи с чем была изучена возможность репродукции бактериофагов Wb и Bk2 на вакцинных аналогах (*B. suis* 61 и *B. melitensis* Rev1) вместо рекомендуемых вирулентных штаммов. В качестве определяющего использован критерий сравнительного изучения циклов оди-

ночного размножения бактериофагов на типичных штаммах-кормилках и на предлагаемых вакцинных аналогах [1].

В качестве наиболее существенных сравниваемых показателей рассматривались длительность латентного периода размножения бактериофага и выход фагового потомства на одну инфицированную микробную клетку.

Проведенные исследования показали, что процесс воспроизводства бруцеллезных бактериофагов на вакцинных штаммах характеризовался некоторым удлинением латентного периода размножения (до 2,5–3 ч) по сравнению с репродукцией на вирулентных культурах (2–2,5 ч) при достоверном ($p \leq 0,5$), хотя и незначительном увеличении (4–8 %) выхода фагового потомства.

Предложенные (*B. suis* 61, *B. melitensis* Rev1) и регламентированный (*B. abortus* 19) штаммы были апробированы для размножения бруцеллезных бактериофагов на отобранных нами средах (агар и бульон Альбими) с применением соответствующих методических приемов репродукции: для фагов Tб, Wb, Fi воспроизводство осуществляли на бульонных культурах, для бактериофага Bk2 – в слое агаровой культуры. В результате были получены серии фаговых препаратов с конечной концентрацией, удовлетворяющей нормативным требованиям ($1 \cdot 10^{9-11}$ ф.ч./мл).

Готовые препараты бактериофагов были стандартизованы по ряду показателей: количественных (концентрация и ДТР) и качественных (специфичность и специфическая активность). Установлено, что средние значения концентраций фаговых препаратов составляли для бактериофага Tб – $(2,7 \pm 0,7) \cdot 10^{12}$, Fi – $(5,2 \pm 0,4) \cdot 10^{12}$, Wb – $(1,3 \pm 0,8) \cdot 10^{11}$, Bk2 – $(1,9 \pm 0,8) \cdot 10^{11}$ ф.ч./мл. ДТР для бактериофагов Tб, Wb, Bk2 составлял 10^{-4} , для фага Fi – 10^{-5} .

Специфичность и специфическая активность экспериментальных серий бруцеллезных бактерио-

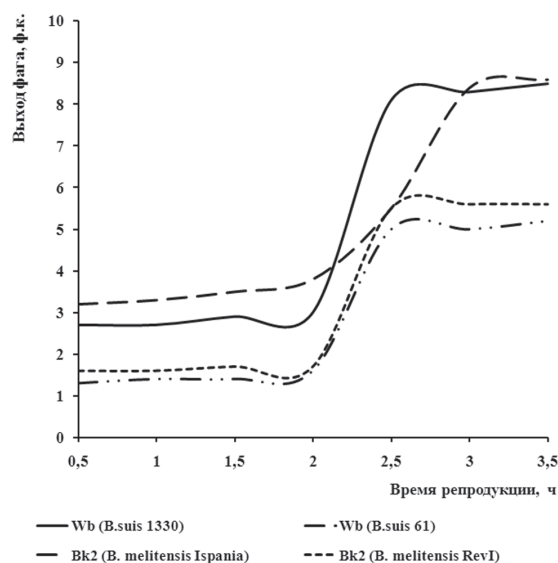


Рис. 1. Кривые одиночного цикла размножения бруцеллезных бактериофагов на соответствующих штаммах размножения

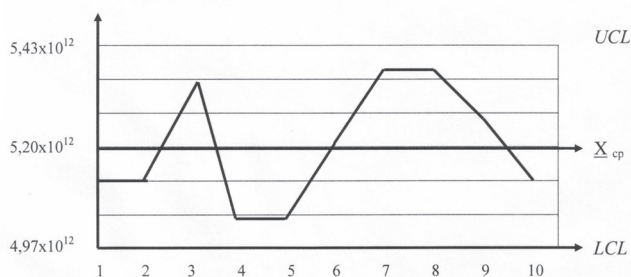


Рис. 2. Карты средних значений \bar{X}_{cp} (Шухарта) концентрации бруцеллезного диагностического бактериофага Fi

фагов оценивалась по диапазону литических свойств в отношении штаммов бруцелл 3 видов (*B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis*) в стабильной S-форме, показавшая полное соответствие изученных свойств фагов с таковыми у их исходных маточных образцов.

Для оценки стабильности показателей готового продукта бактериофагов бруцеллезных диагностических, полученного по разработанным технологическим схемам производства были использованы контрольные карты Шухарта [2]. В качестве количественного критерия, контролируемого согласно ФСП 42-8969-07 [7], анализировалась концентрация бруцеллезных диагностических бактериофагов Tб, Fi, Wб, Bk2.

На примере бактериофага Fi представлена карта средних значений \bar{X}_{cp} . Карта Шухарта имеет центральную линию (CL – Control Limit), соответствующую эталонному значению характеристики (концентрации бактериофага Fi – \bar{X}_{cp}), и две статистические определяемые контрольные границы верхнюю (UCL – Upper Control Limit) и нижнюю (LCL – Lower Control Limit).

При анализе контрольных карт Шухарта показано, что ни одно значение концентрации изученных серий бактериофага бруцеллезного диагностического Fi не вышло за верхний и нижний пределы карты, поэтому можно констатировать стабильность протекания процесса производства препарата с использованием предлагаемых технологических схем, с погрешностью $\pm 3\sigma$. Контрольные границы на картах Шухарта находятся на расстоянии 3σ от центральной линии, где σ – генеральное стандартное отклонение статистики. Границы $\pm 3\sigma$ указывают, что 99,7 % значений характеристики показателей концентрации бактериофагов бруцеллезных диагностических попадут в эти пределы при условии, что процесс находится в статистически управляемом состоянии.

На основе полученных результатов предложены биотехнологические схемы репродукции бактериофагов бруцеллезных диагностических (Tб, Wб, Fi, Bk2). При этом основополагающими технологическими моментами производства являются: репродукция бактериофагов Tб, Wб, Fi (рис. 3) осуществляется на бульонных культурах соответствующих вакцинных штаммов размножения с использованием питательных сред на основе дрожжевого гидролизата (бульон Альбими); размножение бруцеллезного

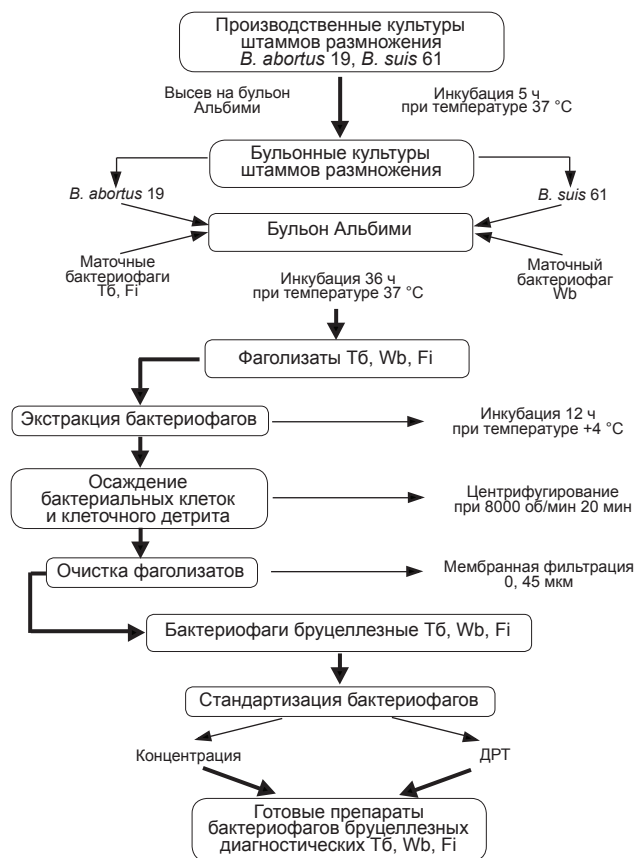


Рис. 3. Биотехнологическая схема получения бруцеллезных диагностических бактериофагов Tб, Wб, Fi

бактериофага Bk2 в технологической схеме производства предусматривает его репродукцию на вакцинном штамме в слое агаровой культуры с использованием агара Альбими.

Применение описанной технологии обеспечивает снижение риска биологической опасности производства за счет использования вакцинных штаммов бруцеллезного микроба в качестве штаммов размножения бактериофагов и снижение себестоимости готового препарата за счет использования в технологии производства сред немясного происхождения.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Адамс М. Бактериофаги. М.: Иностранная литература; 1961. 528 с.
2. ГОСТ Р 50779.42-99. Статистические методы. Контрольные карты Шухарта. М.: ИПК Издательство стандартов, 1999. 32 с.
3. Профилактика и лабораторная диагностика бруцеллеза людей: Методические указания (МУ 3.1.7.1189-03). М.; 2003. 59 с.
4. ФСП 42-8969-07. Бактериофаги бруцеллезные диагностические жидкие, раствор для диагностических целей. 11 с.
5. Corbel M.J., Thomas E.L. The Brucella-phage: their properties, characterization and applications. New Haw, Weybridge; 1980. 106 p.
6. Gratia A. Des relations numeriques entre bacteries lysogenes, et particules de bacteriophage. Ann. Inst. Pasteur. 1936; 57:652–67.
7. Report. Joint FAO/WHO Expert Committee on Brucellosis. Fifth Report. Wld. Hlth. Org. Techn. Rept. Ser. 1986. N 464. 65 p.

Об авторах:

Ляпустина Л.В., Омелянчук П.А., Лямкин Г.И., Вилинская С.В., Головнева С.И., Коготкова О.И., Будыка Д.А., Русанова Д.В., Куличенко А.Н. Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт. 355035, Ставрополь, ул. Советская, 13–15. E-mail: admnip@mail.stv.ru

L.V.Lyapustina, P.A.Omelyanchuk, G.I.Lyamkin, S.V.Vilinskaya,
S.I.Golovneva, O.I.Kogotkova, D.A.Budyka, D.V.Rusanova,
A.N.Kulichenko

**Mastering of Technology of Production
of Brucellosis Diagnostic Bacteriophages**

Stavropol Anti-Plague Research Institute

Presented are technologies of production of brucellosis diagnostic bacteriophages developed on the basis of determination of optimal conditions of the phages reproduction. Stability of the finished product was evaluated using

Shuhard control charts.

Key words: brucellosis bacteriophages, reproduction, statistical charts.

Authors:

Lyapustina L.V., Omelyanchuk P.A., Lyamkin G.I., Vilinskaya S.V., Golovneva S.I., Kogotkova O.I., Budyka D.A., Rusanova D.V., Kulichenko A.N. Stavropol Anti-Plague Research Institute. 355035, Stavropol, Sovetskaya St., 13–15. E-mail: admnip@mail.stv.ru

Поступила 18.06.09.