

Т.В.Аленкина, О.С.Зинина, М.В.Антонычева, Н.И.Вахрушина, А.К.Никифоров

ОПТИМИЗАЦИЯ СТАДИИ РЕПРОДУКЦИИ В ТЕХНОЛОГИИ ПРОИЗВОДСТВА БАКТЕРИОФАГА ДИАГНОСТИЧЕСКОГО ЧУМНОГО Л-413С

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

Впервые для изготовления диагностического препарата чумного бактериофага Л-413С были использованы новые питательные среды на основе автолизата пекарских дрожжей. Экспериментальные среды обеспечивали высокую концентрацию фаговых частиц на этапе размножения и хорошую выживаемость при лиофилизации. Большую эффективность показали среды, в которых дрожжевой автолизат являлся питательной белковой основой, а не стимулирующей добавкой. Такие препараты сохраняли стабильность свойств в процессе хранения при температуре 4–8 °С, а также при повышенной температуре в «тесте ускоренного старения». Внедрение дрожжевых питательных сред в технологию изготовления бактериофага диагностического чумного Л-413С открывает хорошие перспективы для повышения эффективности производства и снижения себестоимости препарата.

Ключевые слова: диагностические бактериофаги, чумной бактериофаг Л-413С, автолизат пекарских дрожжей, репродукция фагов.

T.V.Alenkina, O.S.Zinina, M.V.Antonycheva, N.I.Vakhrushina, A.K.Nikiforov

Optimization of Reproduction Stage in Technology of Production of Plague Diagnostic Bacteriophage L-413C

Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov

New nutrient media based on baker yeast autolizate were used for the first time for manufacturing of diagnostic preparation of plague bacteriophage L-413C. Experimental media provide high concentration of phage particles at the stage of propagation, and good survivability in lyophilization. Media in which yeast autolizate was a nutrient protein basis appeared to be more effective than those in which it was a stimulating additive. Phage preparations preserved stability of properties during storage at 4–8 °C, and at a higher temperature in the test of "accelerated aging". Introduction of yeast nutrient media in technology of plague diagnostic bacteriophage L-413C manufacturing opens good prospects for increasing of production efficiency and decreasing of cost value of the preparation

Key words: diagnostic bacteriophages, plague bacteriophage L-413C, baker yeasts autolizate, propagation of phages.

В сфере производства диагностических бактериофагов актуальной задачей совершенствования технологического процесса является разработка эффективных питательных сред для культивирования штаммов-продуцентов и репродукции бактериофагов. Репродукция бактериофага целиком зависит от химического состава питательной среды, так как фаговая частица не способна синтезировать аминокислоты и нуклеотиды [2]. Процесс культивирования бактериофагов предполагает создание с помощью питательных сред благоприятных условий для размножения фаговых частиц. От качества среды зависит стабильность свойств (прежде всего жизнеспособность) маточных культур производственных фагов, а также жидких препаратов бактериофагов в течение всего срока годности.

Наиболее распространенными питательными средами в производстве как диагностических, так и лечебных бактериофагов, являются дорогостоящие и недостаточно стандартные среды на основе животного сырья. Вместе с тем в микробиологии давно применяются альтернативные основы питательных сред, в том числе экстракты и гидролизаты пивных, пекарских и кормовых дрожжей, являющиеся источниками витаминов группы В и азотистых оснований [3, 5]. Кроме

сохранности основных свойств микроорганизмов, при культивировании на дрожжевых средах обеспечивается высокий выход микробной массы. Помимо этого, добавление дрожжевых компонентов в мясные среды с низким содержанием аминного азота способствует улучшению их ростовых качеств. Дешевизна дрожжевых сред позволяет снижать себестоимость медицинских иммунобиологических препаратов.

В технологии изготовления чумного диагностического бактериофага Л-413С (РосНИПЧИ «Микроб», Рег. уд. № ФСР 2008/03207), предназначенного для идентификации чумного микроба и дифференциации его от возбудителя псевдотуберкулеза, производство маточных культур и наработка производственных объемов бактериофага осуществляется на бульоне Хоттингера, основой которого является гидролизат мясной панкреатический. Дрожжевые среды в производстве чумных бактериофагов не менялись.

Целью работы было изучение эффективности применения дрожжевых сред в технологии изготовления бактериофага диагностического чумного Л-413С и оценка возможности замены питательных сред, изготавливаемых на мясном сырье, на среды из автолизата пекарских дрожжей.

Материалы и методы

В качестве основы питательных сред для культивирования штамма-продуцента и воспроизводства бактериофага был использован сухой автолизат пекарских дрожжей *Saccharomyces cerevisia*, технология изготовления которого разработана в ФГУЗ РосНИПЧИ «Микроб» [1]. Дрожжевой автолизат являлся полноценной по аминокислотному составу белковой основой и соответствовал требованиям МУК 4.2.2316-08 «Методы контроля бактериологических питательных сред», предъявляемым к бактериологическим питательным средам и их основам.

Испытано 5 вариантов дрожжевой среды. В трех вариантах ДС-1, ДС-2 и ДС-3 дрожжевой автолизат являлся белковой моноосновой, обеспечивающей содержание аминного азота в питательной среде – 0,25, 0,30 и 0,35 г/л соответственно. В вариантах ДС-4 и ДС-5 дрожжевой автолизат разных серий был использован в качестве стимулирующей добавки (3 %) к питательной среде, приготовленной на основе гидролизата Хоттингера. При этом добавление 1 части дрожжевого автолизата к 2 частям гидролизата Хоттингера обеспечивало содержание аминного азота 1,4 г/л. В состав всех дрожжевых сред входили $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (х.ч., Россия) – 1 г/л, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ – 0,5 г/л (Fluka, Германия), NaCl (х.ч., Россия) – 1,5 г/л.

В качестве контрольной среды использовали 2 серии бульона Хоттингера (КС-1, КС-2) с содержанием аминного азота 100 г/л и аналогичными солевыми добавками. Значения рН всех сред находились в пределах $7,2 \pm 0,1$.

Штаммом-продуцентом для бактериофага Л-413С является вакцинный штамм *Y. pestis* EV линии НИИЭГ «Государственной коллекции патогенных микроорганизмов III–IV групп ФГБУ ГИСК им. Л.А.Тарасевича» Минздравсоцразвития России.

Размножение бактериофага чумного Л-413С осуществляли при температуре $(28 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течение 24 ч. Фаголизат контролировали на полноту лизиса визуально. О завершении стадии репродукции фага Л-413С свидетельствовала прозрачная или слегка опалесцировавшая среда культивирования. Стерилизующую фильтрацию проводили через мембранные фильтры с размером пор 0,2 мкм с последующей постановкой бактериологического контроля на специфическую стерильность препаратов.

Определение концентрации фаговых частиц в 1 мл среды проводили методом агаровых слоев по Грациа, спектр литической активности – методом «стерильного пятна» [2]. Согласно нормативной документации (ТУ 9386-020-01898109-2008 и ПР № 01898109-19-08) жидкий бактериофаг чумной Л-413С должен содержать не менее $1 \cdot 10^6$, сухой – $1 \cdot 10^5$ частиц/мл. При определении спектра литической активности бактериофаг Л-413С должен лизировать штаммы *Y. pestis* и не должен лизировать штаммы *Y. pseudotuberculosis* I–VI сероваров.

Полученные на экспериментальных и контрольных средах серии бактериофага Л-413С разливали по 1 мл в ампулы ШП-5 и лиофилизировали в 24-часовом (серии ДС-1, ДС-4 и КС-1) и 30-часовом (серии ДС-2, ДС-3, ДС-5 и КС-2) режимах со стабилизатором, состоящим из 10 % пептона и 1,5 % желатина.

Результаты и обсуждение

Процесс репродукции бактериофага Л-413С на всех экспериментальных средах характеризовался более выраженной опалесценцией по сравнению с контрольными. Скорость фильтрации через бактериальные фильтры у всех фаголизатов была одинаковой. Бактериофаги после стерилизующей фильтрации представляли собой прозрачную жидкость светло-желтого цвета, независимо от среды размножения. Концентрация фаговых частиц зависела от использованной среды и составляла для сред с белковой моноосновой из дрожжевого автолизата – $2,0 \cdot 10^8$, $4,65 \cdot 10^7$, $4,6 \cdot 10^7$ частиц/мл, а для сред с автолизатом в виде стимулирующей добавки – $4,0 \cdot 10^7$ и $2,59 \cdot 10^7$ частиц/мл соответственно. Урожайность фага на контрольной среде КС-1, КС-2 соответственно составляла $8,4 \cdot 10^7$ и $5,0 \cdot 10^7$ частиц/мл. Таким образом, все изученные питательные среды обеспечивали на этапе репродукции бактериофага чумного Л-413С концентрацию фаговых частиц на 1–2 порядка выше минимально допустимой по нормативной документации (НД). рН жидких препаратов бактериофага, выращенных на средах ДС-1 и ДС-4, составлял 6,55, на остальных экспериментальных средах – 7,2, на контрольных – 7,1. Все препараты были специфически активны в отношении чумного микроба и не лизировали штаммы возбудителя псевдотуберкулеза.

Ллиофилизированные препараты бактериофага чумного Л-413С были изучены по физико-химическим (растворимость, рН, потеря в массе при высушивании) и биологическим (специфическая активность, спектр литической активности) свойствам. Результаты представлены в табл. 1.

Сухие препараты представляли собой аморфную массу светло-коричневого цвета, полностью растворялись в течение 1 мин, после растворения имели вид прозрачной жидкости светло-желтого цвета, что соответствовало требованиям НД. Потеря в массе при высушивании у препаратов, лиофилизированных в течение 24 ч (серии ДС-1, ДС-4 и КС-1), составила 1,75, 1,73, 1,3, а у препаратов, высушенных в течение 30 ч (серии ДС-2, ДС-3, ДС-5 и КС-2), – 0,6, 0,5, 0,4 и 0,4 % соответственно, что также не противоречило требованиям НД – не более 3 %. Количество фаговых частиц в 1 мл при 24-часовом режиме высушивания составляло $8,0 \cdot 10^6$, $1,9 \cdot 10^6$, $3,8 \cdot 10^6$, а во втором случае – $1,6 \cdot 10^6$, $1,0 \cdot 10^6$, $1,0 \cdot 10^6$ и $1,1 \cdot 10^6$ соответственно.

Таким образом, оба режима лиофилизации обеспечивали хорошую выживаемость частиц бактериофага Л-413С как на экспериментальных, так и контрольных сериях питательных сред, что позволяло

Таблица 1

Показатели физико-химических и биологических свойств препаратов бактериофага диагностического чумного Л-413С, изготовленных на различных питательных средах

Серии препарата	Характер питательной среды	Растворимость, мин. Норма по НД: в течение 3 мин	рН. Норма по НД: от 6,5 до 7,5	Потеря в массе при высушивании, %. Норма по НД: не более 3 %	Специфическая активность, частиц/мл		Спектр литической активности. Норма по НД: бактериофаг лизирует штаммы <i>Y. pestis</i> и не лизирует штаммы <i>Y. pseudotuberculosis</i>
					до лиофилизации. Норма по НД: не менее 1-10 ⁶	после лиофилизации. Норма по НД: не менее 1-10 ⁵	
ДС-1	Дрожжевой автолизат – белковая монооснова	1	6,96	1,75	2,0·10 ⁸	8,0·10 ⁶	Лизирует штаммы <i>Y. pestis</i> и не лизирует штаммы <i>Y. pseudotuberculosis</i>
ДС-2		1	7,0	0,6	4,65·10 ⁷	1,6·10 ⁶	«
ДС-3		1	7,1	0,5	4,6·10 ⁷	1,0·10 ⁶	«
ДС-4	Дрожжевой автолизат – стимулирующая добавка	1	6,43	1,73	4,0·10 ⁷	1,9·10 ⁷	«
ДС-5		1	7,1	0,4	2,59·10 ⁷	1,0·10 ⁶	«
КС-1	Бульон Хотингера	1	6,45	1,3	8,4·10 ⁷	3,8·10 ⁶	«
КС-2		1	6,91	0,4	5,0·10 ⁷	1,1·10 ⁶	«

получить препараты со специфической активностью на порядок выше минимально допустимой по НД. В отношении выживаемости исключение составлял бактериофаг, выращенный на среде ДС-1, активность которого в результате лиофилизации снизилась на 2 порядка, хотя и осталась на порядок выше минимально допустимой. рН сухих образцов бактериофага ДС-3 и ДС-5 составлял 7,1, на средах ДС-1, ДС-2, ДС-4 – 6,96, 7,0, 6,43, на контрольных – 6,45 и 6,91 соответственно. Согласно требованиям НД значения рН бактериофага чумного Л-413С должны находиться в пределах 6,5–7,5. Это значит, что данному параметру не соответствовали серии бактериофага, полученные на средах ДС-4 и КС-1. Изменение рН в кислую сторону у данных препаратов отмечалось еще на этапе фильтрации, что могло свидетельствовать о недостаточной буферной емкости указанных сред культивирования. Ранее при работе со средами на основе автолизата пекарских дрожжей была выявлена тенденция к закислению реакции среды при ее термообработке [3]. Однако этот недостаток может быть устранен введением буферных добавок или коррекцией рН перед лиофилизацией.

Специфическая активность всех полученных образцов бактериофага соответствовала требованиям НД и была на порядок выше минимальной регламентированной – 1·10⁵ частиц/мл. Спектр литической активности образцов бактериофага чумного Л-413С, выращенных на экспериментальных и контрольных питательных средах, соответствовал аналогичным параметрам жидких препаратов.

С целью изучения стабильности свойств серии ДС-1, ДС-4 и КС-1 были заложены на хранение при температуре 4–8 °С в соответствии с [4]. Контроль основных свойств препаратов проводили через 1 год 2 мес., 3 и 4 года. Результаты изучения свойств бактериофага в процессе хранения, представленные в табл. 2, свидетельствовали о стабильности таких показателей, как растворимость и потеря в массе при высушивании в течение регламентированного срока годности (3 года), а также через 1 год после его истечения, в то время как количество фаговых частиц в 1 мл, характеризующее специфическую активность препаратов, имело тенденцию к снижению. Однако и после 4 лет хранения активность изучаемых бактериофагов оставалась на порядок выше минимально

Таблица 2

Показатели стабильности свойств препаратов бактериофага диагностического чумного Л-413С в процессе хранения при температуре 4–8 °С

Серии препарата	Данные контроля при выпуске, через	Растворимость, мин. Норма по НД: в течение 3 мин	Потеря в массе при высушивании, %. Норма по НД: не более 3 %	рН. Норма по НД: от 6,5 до 7,5	Специфическая активность, частиц/мл. Норма по НД: не менее 1·10 ⁵
ДС-1		1	1,75	6,96	8,0·10 ⁶
	1 год 2 мес.	1	1,75	6,5	5,0·10 ⁶
	3 года	1	1,7	6,5	3,0·10 ⁶
	4 года	1	1,5	6,54	3,0·10 ⁶
ДС-4		1	1,73	6,43	1,9·10 ⁶
	1 год 2 мес.	1	1,73	6,4	1,4·10 ⁶
	3 года	1	1,73	6,4	1,4·10 ⁶
	4 года	1	1,6	6,4	1,4·10 ⁶
КС-1		1	1,3	6,45	3,8·10 ⁶
	1 год 2 мес.	1	1,3	6,4	3,1·10 ⁶
	3 года	1	1,2	6,4	3,0·10 ⁶
	4 года	2	1,065	6,4	1,5·10 ⁶

Показатели стабильности свойств препаратов бактериофага диагностического чумного Л-413С в «тесте ускоренного старения» (хранение при температуре (37±1) °С)

Серии препарата	Данные контроля при выпуске, через	Растворимость, мин. Норма по НД: в течение 3 мин	pH. Норма по НД: от 6,5 до 7,5	Специфическая активность, частиц/мл. Норма по НД: не менее 1·10 ⁵
ДС-2		1	7,0	1,6·10 ⁶
	3 мес.	1	7,0	1,5·10 ⁶
	4 мес.	1	7,0	1,5·10 ⁶
ДС-3		1	7,1	1,0·10 ⁶
	3 мес.	1	7,1	0,9·10 ⁶
	4 мес.	1	7,1	0,9·10 ⁶
ДС-5		1	7,1	1,0·10 ⁶
	3 мес.	2	6,9	0,7·10 ⁶
	4 мес.	2	6,9	0,7·10 ⁶
КС-2		1	6,91	1,1·10 ⁶
	3 мес.	2	6,5	0,7·10 ⁶
	4 мес.	2	6,5	1,0·10 ⁵

допустимой по НД. Наибольшей стабильностью при температуре 4–8 °С характеризовался бактериофаг Л-413С, репродуцированный на среде ДС-4, у которого через 4 года сохранилось 73,7 % жизнеспособных фаговых частиц, в то время как на средах ДС-1 и КС-1 – соответственно 37,5 и 39,5 %.

Препараты бактериофагов, изготовленные на средах ДС-2, ДС-3, ДС-4 были подвергнуты хранению при температуре (37±1) °С – «тест ускоренного старения». Оценку стабильности их свойств проводили через 3 и 4 мес. (срок наблюдения) по показателям: растворимость, pH, специфическая активность (табл. 3). Препараты бактериофага, изготовленные на средах ДС-2 и ДС-3, оказались более устойчивы к хранению в условиях повышенной температуры, по сравнению с препаратами на средах ДС-5 и КС-2, у которых, помимо снижения активности, отмечалось увеличение времени растворения в 2 раза, а также сдвиг pH в кислую сторону.

Таким образом, результаты исследований свидетельствуют о том, что все питательные среды, приготовленные на основе автолизата пекарских дрожжей, обеспечивали на этапе репродукции бактериофага чумного Л-413С концентрацию фаговых частиц, сравнимую с концентрацией бактериофага воспроизведенного на традиционной «мясной» питательной среде. Экспериментальные серии препарата, приготовленные на дрожжевых средах, демонстрировали хорошую выживаемость фаговых частиц после лиофилизации, а также стабильность свойств в процессе хранения. Однако более перспективными следует признать среды, в которых дрожжевой автолизат являлся белковой моноосновой. Эффективность таких сред обусловлена наличием в них продуктов средней степени расщепления, полноценным аминокислотным составом и физиологическим соотношением незаменимых и заменимых аминокислот. В отличие от сред, в которых дрожжевой автолизат является стимулирующей добавкой, моноосновные среды по-

зволяют полностью исключить применение в производстве бактериофага чумного Л-413С питательных сред животного происхождения.

Внедрение дрожжевых питательных сред в технологию изготовления бактериофага диагностического чумного Л-413С открывает хорошие перспективы для повышения эффективности производства и снижения себестоимости препарата.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Авдеева Н.Г., Дятлов И.А., Ерёмин С.А. Разработка технологии производства дрожжевых аутолизатов как основы конструирования питательных сред для чумного микроба и холерного вибриона. Саратов; 2000. 17 с.
2. Адамс М. Бактериофаги. М.; 1961. 527 с.
3. Кислухина О.В., Калунянц К.А., Аленова Д.Ж. Ферментативный лизис микроорганизмов. Алма-Ата: Раун; 1990. 200 с.
4. Условия транспортирования и хранения медицинских иммунобиологических препаратов. Санитарные правила. СП 3.3.2.1248-03. М., 2003.
5. Шкляр Б.Х. Ферментативный лизис дрожжей. Минск: Наука и техника; 1977. 192 с.

References (Presented are the Russian sources in the order of citation in the original article)

1. Avdeeva N.G., Dyatlov I.A., Eremin S.A. [Development of technology of production of yeast autolizates as the basis for construction of nutrient media for plague microbe]. Saratov; 2000. 17 p.
2. Adams M. [Bacteriophages]. M.; 1961. 527 p.
3. Kislukhina O.V., Kalunians K.A., Alenova D.Zh. [Enzymatic Lysis of Microorganisms]. Alma-Ata: Raun; 1990. 200 p.
4. [Sanitary Regulations "Conditions of Transportation and Storage of Medical Immunobiological Preparations": SR 3.3.2.1248-03]. M.: Minzdrav RF; 2003.
5. Shklyar B. Kh. [Enzymatic Lysis of Yeasts]. Minsk: Nauka i Tekhnika; 1977. 192 p.

Authors:

Аленкина Т.В., Зинина О.С., Антоничева М.В., Вахрушина Н.И., Никифоров А.К. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: microbe@san.ru

Об авторах:

Аленкина Т.В., Зинина О.С., Антоничева М.В., Вахрушина Н.И., Никифоров А.К. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: microbe@san.ru

Поступила 24.03.11.