

Н.М. Андреевская, В.А. Михайлова, Э.С. Каретникова, А.Г. Атлас, Л.М. Михайлов,
А.И. Калиновский, Н.Г. Gefan, Н.Л. Баранникова

ИЗУЧЕНИЕ И ИСПЫТАНИЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНО-ПРОИЗВОДСТВЕННЫХ СЕРИЙ ПОЛИВАЛЕНТНОЙ БРУЦЕЛЛЕЗНОЙ СЫВОРОТКИ

ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока»
(Иркутск)

В настоящее время коммерческая поливалентная бруцеллезная сыворотка на территории России не выпускается. Нами разработана технология производства поливалентной бруцеллезной высокоактивной и специфичной сыворотки, не требующей адсорбции. Экспериментально-производственные серии соответствуют требованиям проекта технических условий.

Ключевые слова: поливалентная бруцеллезная сыворотка, специфическая активность и специфичность сыворотки, тест-культуры

EXAMINATION AND TESTING OF EXPERIMENTAL-PRODUCTION SERIES OF POLYVALENT BRUCELLOSIS SERUM

N.M. Andreevskaya, V.A. Mikhailova, E.S. Karetnikova, A.G. Atlas, L.M. Mikhailov,
A.I. Kalinovsky, N.G. Gefan, N.L. Barannikova

Antiplague Research Institute of Siberia and Far East, Irkutsk

At present no commercial polyvalent brucellosis serum is produced in Russia. We developed a technology of polyvalent brucellosis high-effective and specific serum production without adsorption. Experimental-production series are obeyed the technical specification project.

Key words: polyvalent brucellosis serum, specific activity, serum specificity, test-culture

ВВЕДЕНИЕ

Бруцеллез — острое инфекционное заболевание человека и животных, при развитии которого формируется общий генерализованный процесс, протекающий в острой форме с высокой вероятностью перехода в хроническую. Из-за несвоевременной лабораторной диагностики бруцеллез регистрируется под другим диагнозом. В связи с этим важное значение имеют данные лабораторных исследований на бруцеллез [1].

Лабораторная диагностика бруцеллеза предусматривает индикацию возбудителя в объектах окружающей среды и патологическом материале, выделение чистой культуры, ее идентификацию и дифференциацию [3]. В этих исследованиях используют диагностические поливалентную и моноспецифические бруцеллезные сыворотки. В настоящее время для диагностики бруцеллеза применяют только экспериментальные серии сывороток, не прошедшие Государственную регистрацию. Поэтому исследования по получению диагностической поливалентной бруцеллезной сыворотки, разработка методов лабораторного контроля ее качества и испытания эффективности актуальны.

Цель работы — изучение и испытание активности и специфичности экспериментально-производственных серий поливалентной бруцеллезной сыворотки, подбор тест-культур для определения качества препарата при выпуске.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве животных-продуцентов диагностической поливалентной бруцеллезной сыворотки

использовали кроликов породы шиншилла весом 2,5 — 3 кг. Для иммунизации животных применяли корпускулярный антиген из вакцинного штамма *Brucella abortus* 19 ВА, выращенного на эритроцит агаре в течение 48 ч при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$, и инактивированного 2,5 % раствором формалина или прогреванием при температуре $(90 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течение 20 минут.

В работе использовали разработанную нами оптимальную схему иммунизации животных для получения высокоактивной поливалентной бруцеллезной сыворотки с применением полного адьюванта Фрейнда [5].

Активность и специфичность поливалентной бруцеллезной сыворотки определяли в пробирочной реакции агглютинации (РА) и реакции агглютинации на стекле в соответствии с МУК 3.1.7.1189-03 [3]. Для определения активности препаратов при их выпуске использовали тест-культуры вирулентных и авирулентных видов бруцелл в S-форме: *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis*, *B. rangiferi*, *B. canis*, а специфичности: *B. ovis* (R-форма), *B. abortus* (L-форма), *Francisella tularensis* 15 НИИЭГ, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Yersinia pestis* EV НИИЭГ, *Yersinia enterocolitica* 03 628/1.

Физико-химические свойства сыворотки проверяли по МУК 4.1/4.2.588-96 [2].

Для изучения стабильности сывороток применяли изотермический тест на ускоренное разрушение антител [6].

Статистическую обработку результатов проводили по В. Монцевичюте-Эрингене [4].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При разработке технологии производства сыворотки приготовлено 18 лабораторных серий и 3 экспериментально-производственные серии, необходимые для проведения медицинских и технических испытаний с целью Государственной регистрации препарата в Росздравнадзоре. Изучена возможность повышения стабильности препарата и улучшения его растворимости путем использования в качестве стабилизаторов сорбита в конечной концентрации 2,5 %, сахарозы — 3 %, натрия тиосульфата — 1 %, поливинилпирролидона — 1 %, а также смесь сахарозы и натрия тиосульфата в различных соотношениях. Стабилизаторы вносили в сыворотку до стерилизующей фильтрации, после чего ее разливали в ампулы и лиофилизировали.

Установлено, что в тесте ускоренного разрушения антител все испытанные вещества обладали стабилизирующим действием при хранении в условиях повышенных температур, хотя степень его выраженности значительно варьирует. Наиболее заметный стабилизирующий эффект наблюдался при внесении в сыворотку смеси сахарозы (3 %) и натрия тиосульфата (1 %), при этом значительно улучшалась растворимость сыворотки.

Используя результаты изотермического теста, мы выбрали экспоненциальную регрессию и определили в готовом препарате срок годности, путем хранения сывороток при температуре 70 °С в течение 30 суток [6]. Показатели стабильности сыворотки представлены в таблице 1.

В таблице 1 показано, что все серии кроличьей бруцеллезной сыворотки проявили исключительную стабильность в течение 30 суток, титр

антител оставался на уровне исходного. По экспоненциальной регрессии определили, что срок годности сыворотки диагностической поливалентной бруцеллезной сухой 5 и более лет. Титр специфических антител у экспериментальных бруцеллезных сывороток в РА на стекле составлял не менее 1 : 25, в пробирочной РА колебался от 1 : 800 до 1 : 3200.

При контроле качества вышеуказанных серий изучали физико-химические свойства и определяли набор тест-культур для определения активности и специфичности. Данные физико-химических показателей по проекту ТУ и результаты наших испытаний представлены в таблице 2.

В результате исследований установлено, что по физико-химическим показателям изученные серии сыворотки соответствуют требованиям, заложенным в проекте ТУ на сыворотку диагностическую поливалентную бруцеллезную сухую для РА.

При определении специфической активности и специфичности сыворотки диагностической поливалентной бруцеллезной сухой выявлено, что титры антител сыворотки с вирулентными и авирулентными штаммами бруцелл не отличаются. Поэтому в производстве бруцеллезной сыворотки считаем возможным использовать биологически безопасные авирулентные штаммы. Сыворотки, получаемые от кроликов, иммунизированных антигеном из вакцинного штамма, высокоспецифичны и не нуждаются в адсорбции групповых антител.

За период с 2005 по 2010 гг. изучено 185 культур подозрительных на бруцеллез, изолированных от больных людей и животных (северные

Таблица 1
Термостабильность сыворотки диагностической поливалентной бруцеллезной сухой в тесте ускоренного разрушения антител при температуре 70 °С

№ п/п	№ серии	Исходный титр	Обратные значения средне-арифметических титров антител в РА через интервалы времени в сутках						Титры сыворотки при температуре хранения 8 °С в течение 30 суток (контроль)
			5	10	15	20	25	30	
1	33	1 : 3200	3800 ± 980	3600 ± 720	3200 ± 811	3255 ± 700	3782 ± 603	3636 ± 724	1 : 3200
2	36	1 : 800	1600 ± 651	1705 ± 327	1435 ± 200	1411 ± 327	1512 ± 655	1408 ± 524	1 : 800
3	39	1 : 3200	3650 ± 620	3555 ± 534	3300 ± 811	3712 ± 500	3560 ± 288	3380 ± 381	1 : 3200

Таблица 2
Физико-химические показатели бруцеллезной сыворотки

№ п/п	Наименование показателя	Характеристика показателей по проекту ТУ	Результаты испытаний серий 33, 36, 39
1	Внешний вид	Аморфная масса белого цвета с розоватым или желтоватым оттенком	Аморфная масса белого цвета с розоватым или желтоватым оттенком
2	Растворимость	В течение 3 мин в 1 мл стерильной дистиллированной воды. После растворения – прозрачная или слегка опалесцирующая жидкость от светловато-кремового до розовато-желтого цвета	В течение 1 мин в 1 мл стерильной дистиллированной воды. После растворения – слегка опалесцирующая жидкость от светловато-кремового до розовато-желтого цвета
3	pH	7,5–8,5	с. 33 – 8,1, с. 36 – 7,76, с. 39 – 8,1
4	Герметизация	Ампулы с препаратом должны быть герметичны	Ампулы с препаратом герметичны
5	Потеря в массе при высушивании	Не более 2 %	с. 33 – 1,8 %, с. 36 – 1,7 %, с. 39 – 1,9 %
6	Микробиологическая чистота	Допускается рост не более 20 любых колоний на одной чашке Петри	Сыворотки стерильны

олени, крупный рогатый скот, собаки). Среди них идентифицировано 58 бруцеллезных штаммов, выделенных от животных в S-форме, с использованием поливалентной бруцеллезной сыворотки и таксономических тестов, рекомендованных ФАО/ВОЗ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основании вышеизложенного констатируем, что сыворотка поливалентная бруцеллезная сухая производства Иркутского научно-исследовательского противочумного института может успешно применяться для идентификации штаммов бруцелл в санитарной, клинической и ветеринарной микробиологии, при эпизоотолого-эпидемиологическом мониторинге бруцеллеза.

Сыворотка прошла медицинские и технические испытания в Волгоградском и Ставропольском научно-исследовательских противочумных институтах, ГОУ ДПО «РМАПО Росздрава», ФГБУ «ВНИИИМТ» Росздравнадзора, дана положительная оценка.

ЛИТЕРАТУРА

1. Желудков М.М. Бруцеллез в России: Современная эпидемиология и лабораторная диа-

гностика : автореф. дисс. ... док. мед. наук. — М., 2009. — 50 с.

2. Методические указания «Методы контроля медицинских иммунобиологических препаратов, вводимых людям». МУК 4.1/4.2.588-96. — М., 1996. — 127 с.

3. Методические указания «Профилактика инфекционных болезней. Инфекции общие для человека и животных. Профилактика и лабораторная диагностика бруцеллеза». МУ 3.1.7. 1189-03. — М., 2003. — 38 с.

4. Монцевичюте-Эрингене В. Статистическая обработка результатов // Патология, физиология и экспериментальная терапия. — 1965. — № 4. — С. 71 — 78.

5. Получение бруцеллезных поливалентной и монорецепторных сывороток / Н.М. Андреевская [и др.] // Диагностика, лечение и профилактика опасных и особо опасных заболеваний. Биотехнология : матер. Всероссийской научной конф. — Киров, 2008. — С. 284 — 288.

6. Thermal stability of freeze-dried mammalian interferons: analysis of freeze-drying conditions and accelerated storage test for murine interferon / P. Jameson [et al.] // J. Criobiology. — 1979. — N 16. — P. 301 — 314.

Сведения об авторах

Андреевская Нина Михайловна — кандидат биологических наук, старший научный сотрудник ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока» (664047, г. Иркутск, улица Трилиссера, 78; тел. 22-01-38)

Михайлова Вера Александровна — кандидат биологических наук, старший научный сотрудник ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока» (664047, г. Иркутск, улица Трилиссера, 78)

Каретникова Эльвира Семеновна — кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока» (664047, г. Иркутск, улица Трилиссера, 78)

Атлас Александр Гилельевич — заведующий научно-производственным отделом ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока» (664047, г. Иркутск, улица Трилиссера, 78)

Михайлов Леонид Михайлович — кандидат медицинских наук, ведущий научный сотрудник ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока» (664047, г. Иркутск, улица Трилиссера, 78)

Калиновский Александр Иннокентьевич — доктор медицинских наук, заведующий отделом зоонозных инфекций ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока» (664047, г. Иркутск, улица Трилиссера, 78)

Гефан Наталья Геннадьевна — кандидат медицинских наук, заведующая отделом биологического и технологического контроля ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока» (664047, г. Иркутск, улица Трилиссера, 78)

Баранникова Наталья Леонидовна — врач бактериолог ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока» (664047, г. Иркутск, улица Трилиссера, 78)