

Кожамкулов Е.М., Табынов К.К., Рыскельдинова Ш.Ж., Бейшеналиева С.Т.

**ПОДБОР ОПТИМАЛЬНЫХ СТАБИЛИЗИРУЮЩИХ СРЕД ДЛЯ
ЛИОФИЛИЗАЦИИ И ХРАНЕНИЯ ВИРУСА ГРИППА
ХОЛОДОАДАПТИРОВАННОГО ШТАММА А/НК/ОТАР/6:2/2010(Н3N8)**

Kozhamkulov E.M., Tabynov K.K., Ryskeldinova Sh.Zh., Beishenalieva S.T.

**SELECTION OF THE OPTIMAL STABILIZING MEDIUM FOR LYOPHILIZATION AND
STORAGE OF INFLUENZA VIRUS STRAIN COLD-A/NK/OTAR/6: 2/2010(N3N8)**

УДК: 619:615.576.856.4

В данной статье приведены результаты по выбору стабилизирующих сред для хранения лиофилизации и контроля реассортантного холодоадаптированного штамма А/НК/Отар/6:2/2010(Н3N8) вируса гриппа представлены защитные свойства выбранных стабилизаторов. Установлено, что наилучшие стабилизирующие свойства обладают комплексом сред пептона (6%) и лактозы (3%) в соотношении 1:1.

In given article results on selection of stabilising mediums for lyophilization and storage resistance control cold allergy strain A/NK/Otar/6:2/2010 (H3N8) a flu virus are presented. It is established, that the best stabilising properties possess a complex of mediums with peptone (6 %) and lactose (3 %) in the ratio 1:1.

Введение. Для длительного сохранения биологических препаратов широко используют метод лиофилизации в вакууме. Сохранение биологических свойств вирусов при лиофилизации во многом зависит от состава защитной среды, которая добавляется к вирусосодержащему материалу [1]. Залогом надежной стабильности сухих биопрепаратов является применение в технологии их приготовления эффективных защитных сред-стабилизаторов, предотвращающих повреждения микроорганизмов в процессе замораживания, обезвоживания и длительного хранения в высушенном состоянии при различных температурах [2,3,5].

В разных научно-производственных центрах мира для приготовления живой вакцины проводят стабилизацию вируса разными средствами, оказывающими протективное действие при лиофилизации и при различных температурных условиях хранения. Основной принцип стабилизации – сохранение биологической активности вируса [4,6,7,8,9].

В оптимальном варианте защитная среда должна обеспечивать защиту против любых факторов, обуславливающих отмирание микроорганизмов при их замораживании, высушивании и хранении в сухом состоянии.

Актуальными в теоретическом и в практическом плане являются вопросы стабилизации вирусов в составе сложных биодисперсных систем для совершенствования технологии этого универсального метода консервирования вакцинных препаратов.

С учетом литературных данных на начальном этапе в исследованиях определяли защитное действие однокомпонентных и комплексных защитных

сред в процессе лиофилизации вирусосодержащих материалов.

Цель данных исследований – был подбор оптимальной стабилизирующей среды, и изучение сохраняемости вируса экспресс методом при экстремальной температуре после лиофилизации вируса гриппа реассортантного холодо адаптированного штамма А/НК/Отар/6:2/2010 (Н3N8).

Материалы и методы. В работе использовался реассортантный холодо адаптированный штамм А/НК/Отар/6:2/2010 (Н3N8) вируса гриппа выращенный на 10 сут куриных эмбрионах (АО «Бент-Анак», Казахстан) с инфекционной активностью $8,87 \pm 0,14$ lg ЭИД₅₀/см³ и гемагглютинирующим титром 1:512. В качестве стабилизаторов использовались водные растворы конечной концентрации пептона - 3%, 6%, 10%, лактозы - 3%, 6%, сахарозы - 3%, 6%, желатина - 3%, 6%, трегалозы 0,4%, сорбита 2%, глутамата натрия 2%, а также обезжиренное молоко 50%. Соотношение вирусосодержащего материала и стабилизатора составляло 1:1. Перемешивали вирусосодержащую смесь с помощью магнитной мешалки в течение 10-15 мин при температуре 10-15⁰C [4].

Вирусосодержащие смеси препарата разливали в стеклянные ампулы по 1,0 см³, для высушивания использовали сублимационную камеру модели «Uzifrua» (Франция). Общая продолжительность технологического процесса (замораживание, сублимация и досушивание) варьировала от 40 до 60 ч в зависимости от состава среды высушивания и применяемого технологического режима. Технологический процесс контролировали термометрическим измерением электрического сопротивления биоматериала.

Качество высушенных образцов оценивали по содержанию массовой доли влаги, растворимости таблетки, рН, стерильности, снижению инфекционной активности вируса в процессе сушки и стандартности макроструктуры (поверхностной и на изломе). Ампулы проверяли визуально в проходящем свете на отсутствие трещин и на наличие вакуума при помощи аппарата Д'Арсонваль согласно ГОСТ 28083-89. Массовую долю влажности в высушенном материале определяли согласно ГОСТ 24061-89 [2].

Сохраняемость лиофилизированных образцов устанавливали по результатам изменения инфекционной активности вируса, а также применяли

экстремальный метод хранения при $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$ в течение 20 сут.

Инфекционную активность вируса контролировали титрованием на 10-сут. куриных эмбрионах (КЭ). Активность определяли в реакции гемагглютинации (РГА). Титр вирусарассчитывали по методу Кербера и Ашмарина и выражали в $\lg \text{ЭИД}_{50}/\text{см}^3$.

Результаты и обсуждения. В результате опытов установлено, что препарат стерилен, рН составило 7,35, остаточная влажность - 2,87, растворяется в течение 1,5 мин биологическая активность - $8,62 \pm 0,08 \lg \text{ЭИД}_{50}/\text{см}^3$.

В следующей серии исследований провели сравнительную оценку наиболее распространенных комплексных защитных сред по их влиянию на качество лиофилизированных образцов реассортантного холодоадаптированного штамма вируса гриппа.

По разнице показателей инфекционной активности исходных и лиофилизированных материалов судили о защитном эффекте испытанных сред. Результаты проведенных исследований представлены в таблице 1.

Таблица 1

Протективный эффект однокомпонентных стабилизирующих сред на сохраняемость штамма А/НК/Отар/6:2/2010 (H3N8) вируса гриппа в процессе лиофилизации

Стабилизирующие среды	Исходная инфекционная активность, $\lg \text{ЭИД}_{50}/\text{см}^3$ ($X \pm m$, $n=3$)	Инфекционная активность лиофилизированных образцов, $\lg \text{ЭИД}_{50}/\text{см}^3$ ($X \pm m$, $n=3$)	Снижение инфекционной активности, $\lg \text{ЭИД}_{50}/\text{см}^3$ ($X \pm m$, $n=3$)
Пептон (3%)	$8,70 \pm 0,14$	$8,20 \pm 0,14$	- 0,50
Пептон (6%)	$8,70 \pm 0,14$	$8,20 \pm 0,14$	- 0,50
Пептон (10%)	$8,70 \pm 0,14$	$8,20 \pm 0,22$	- 0,50
Лактоза (3%)	$8,70 \pm 0,14$	$8,45 \pm 0,14$	- 0,25
Лактоза (6%)	$8,70 \pm 0,14$	$8,20 \pm 0,14$	- 0,50
Сахароза (3%)	$8,70 \pm 0,14$	$8,03 \pm 0,08$	- 0,67
Сахароза (6%)	$8,70 \pm 0,14$	$8,12 \pm 0,08$	- 0,58
Желатин (0,5%)	$8,70 \pm 0,14$	$7,70 \pm 0,14$	- 1,00
Желатин (1%)	$8,70 \pm 0,14$	$7,95 \pm 0,22$	- 0,75
Обезжиренное молоко (50% в полуфабрикате)	$8,70 \pm 0,14$	$8,03 \pm 0,30$	- 0,67
Без защитной среды (контроль)	$8,70 \pm 0,14$	$7,45 \pm 0,00$	- 1,25

Данные таблицы 1 свидетельствуют, что все испытанные среды в существенной степени оказывают протективное влияние на вирус при лиофилизации. Протективные возможности пептона (3%, 6%, 10%) и лактозы (6%) примерно одинаковые, при этом снижение инфекционной активности в результате замораживания и лиофилизации составляло в пределах $0,50 \lg \text{ЭИД}_{50}/\text{см}^3$.

Защитный эффект 3% раствора лактозы несколько выше. При использовании желатина (1% и 0,5%) титр вируса снижался до 0,75 и 1,0 $\lg \text{ЭИД}_{50}/\text{см}^3$, тогда как образцы без стабилизирующей среды (контроль) на $1,25 \lg \text{ЭИД}_{50}/\text{см}^3$. Все испытанные среды обеспечивали хорошей товарный вид препаратов при лиофилизации.

В последующих опытах определяли устойчивость лиофилизированных образцов с однокомпонентными стабилизирующими средами при воздействии экстремальной температуры ($37 \pm 0,5^\circ\text{C}$). Для этого пробы выдерживали в термостате при указанной температуре в течение 10 и 20 сут. после чего по степени инактивации вируса судили об эффективности использованных протективных сред. Результаты проведенных опытов представлены в таблице 2.

Таблица 2

Сохраняемость штамма А/НК/Отар/6:2/2010 (H3N8) вируса гриппа с однокомпонентными защитными средами при температуре $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$

Стабилизирующие среды	Инфекционная активность, $\lg \text{ЭИД}_{50}/\text{см}^3$ ($X \pm m$, $n=3$)				
	Исходная	Через 10 сут	Снижение титра	Через 20 сут	Снижение титра
Пептон (3%)	$8,20 \pm 0,08$	$6,95 \pm 0,14$	- 1,25	$5,78 \pm 0,08$	- 2,42
Пептон (6%)	$8,20 \pm 0,08$	$6,95 \pm 0,00$	- 1,25	$5,95 \pm 0,30$	- 2,25
Пептон (10%)	$8,20 \pm 0,14$	$7,20 \pm 0,14$	- 1,00	$5,87 \pm 0,22$	- 2,33
Лактоза (3%)	$8,45 \pm 0,14$	$4,67 \pm 0,22$	- 3,83	$4,12 \pm 0,22$	- 4,33
Лактоза (6%)	$8,20 \pm 0,14$	$4,37 \pm 0,22$	- 3,83	$3,28 \pm 0,30$	- 4,92
Сахароза (3%)	$8,03 \pm 0,08$	$3,87 \pm 0,22$	- 4,16	$3,03 \pm 0,08$	- 5,00
Сахароза (6%)	$8,12 \pm 0,08$	$4,20 \pm 0,14$	- 3,92	$3,78 \pm 0,30$	- 4,42
Желатин (0,5%)	$7,70 \pm 0,14$	$2,28 \pm 0,08$	- 5,42	$1,78 \pm 0,22$	- 5,92
Желатин (1%)	$7,95 \pm 0,22$	$3,78 \pm 0,22$	- 4,17	$3,45 \pm 0,22$	- 4,50
Обезжиренное молоко	$8,03 \pm 0,30$	$4,03 \pm 0,08$	- 4,00	$3,53 \pm 0,08$	- 4,50
Без защитной среды (контроль)	$7,45 \pm 0,00$	$2,12 \pm 0,08$	- 5,33	- 0,00	- 0,00

Данные таблицы 2 свидетельствуют, что при температуре хранения ($37 \pm 0,5^\circ\text{C}$) в течение 20 сут. лучшая сохраняемость штамма А/НК/Отар/6:2/2010

(H3N8) вируса гриппа наблюдалась в образцах вакцин лиофилизированных с пептоном (3%, 6%, 10%) и лактозой (3%), при этом снижение инфекционной активности составило от 2,25 до 2,42 lg ЭИД₅₀/см³ и 4,33 lg ЭИД₅₀/см³ соответственно. При указанной температуре хранения потеря инфекционной активности вируса с обезжиренным молоком, желатином, сахарозой и лактозой составили от 4,33 до 5,92 lg ЭИД₅₀/см³. На 20 сут. образцы вируса без защитной среды (контроль) полностью инактивировались.

С учетом полученных результатов изучения сохраняемости лиофилизированного вируса и литературных данных были выбраны защитные среды с максимальными протективными свойствами (пептон, лактоза, сахароза) для последующего использования их при составлении многокомпонентных стабилизирующих сред.

Для окончательного подбора оптимальной стабилизирующей среды, обеспечивающей наибольшую сохраняемость вируса гриппа в процессе лиофилизации и последующего хранения, нами приготовлены микросерии вакцины с разными вариантами защитных сред. В качестве стабилизаторов использовали растворы следующих сред в конечной концентрации: пептон (6%); пептон (6%) с лактозой (3%); пептон (6%) с сахарозой (6%); пептон (6%) с лактозой (3%) и сорбитом (2%); пептон (6%) с лактозой (3%) и глутаматом натрия (2%). Результаты представлены в таблице 3.

Таблица 3

Протективный эффект разных защитных сред на сохраняемость штамма А/НК/Отар/6:2/2010 (H3N8) вируса гриппа в процессе лиофилизации

Стабилизирующие среды	Инфекционная активность, lg ЭИД ₅₀ /см ³ (X±m, n=3)		
	Исходная	После лиофилизации	Снижение титра
1	2	3	4
Пептон (6%)	8,87±0,14	8,45±0,22	- 0,42
Пептон (6%) с лактозой (3%)	8,87±0,14	8,62±0,22	- 0,25
Пептон (6%) с сахарозой (6%)	8,87±0,14	8,53±0,22	- 0,34
Пептон (6%) с лактозой (3%) и глутаматом натрия (2%)	8,87±0,14	8,12±0,08	- 0,75
Без защитной среды (контроль)	8,87±0,14	7,53±0,14	- 1,34

Из данных таблицы 3 видно, что все испытанные стабилизирующие среды в существенной степени обладают протективным действием по

отношению к штамму А/НК/Отар/6:2/2010 (H3N8) вируса гриппа. При лиофилизации вируса пептон (6%), пептон (6%) с лактозой (3%), пептон (6%) с сахарозой (6%) оказали значительный защитный эффект. Так, потеря вируса с защитной средой пептон (6%) после лиофилизации составила 0,42 lg ЭИД₅₀/см³, пептоном (6%) с лактозой (3%) - 0,25 lg ЭИД₅₀/см³, пептоном (6%) с сахарозой (6%) - 0,34 lg ЭИД₅₀/см³. Наименьшими протективными возможностями обладал пептон (6%) с лактозой (3%) и глутаматом натрия (2%), потеря вируса составила 0,75 lg ЭИД₅₀/см³. Наибольшее снижение инфекционной активности отмечалось в образцах вакцины без защитной среды (1,34 lg ЭИД₅₀/см³).

Протективные свойства комплексных защитных сред а также изучены при хранении образцов вакцины в условиях высокой температуры (37±0,5°C). Исследования показали, что протективные свойства разных комплексных сред отличаются между собой и большинство их обеспечивали сохранение вируса на достаточно высоком уровне. В отличие от однокомпонентной защитной среды, комплексные защитные среды обеспечили сохраняемость вируса и после 20-сут хранения при температуре (37±0,5°C). Обобщенные результаты показаны в таблице 4.

Таблица 4

Влияние разных защитных сред на сохраняемость штамма А/НК/Отар/6:2/2010 (H3N8) вируса гриппа при температуре хранения 37±0,5°C

Стабилизирующие среды	Инфекционная активность, lg ЭИД ₅₀ /см ³ (X±m, n=3)				
	Исходная	Через 10 сут	Снижение титра	Через 20 сут	Снижение титра
Пептон (6%)	8,45±0,22	7,28±0,08	-1,17	6,53±0,30	-1,92
Пептон (6%) с лактозой (3%)	8,62±0,22	7,53±0,14	-1,09	7,03±0,22	-1,59
Пептон (6%) с сахарозой (6%)	8,53±0,22	7,28±0,22	-1,25	6,78±0,14	-1,75
Пептон (6%) с лактозой (3%) и сорбитом (2%)	8,28±0,22	7,03±0,14	-1,25	5,95±0,14	-2,33
Пептон (6%) с лактозой (3%) и глутаматом натрия (2%)	8,12±0,08	6,78±0,22	-1,34	6,28±0,22	-1,84
Без защитной среды (контроль)	7,53±0,14	2,03±0,22	-5,50	0,00	-7,53

Данные таблицы 4 показывают, что наилучшая сохраняемость вируса при (37±0,5°C) хранения в течение 20 сут наблюдается в образцах вакцины с защитной средой пептон (6%) с лактозой (3%), при этом снижение инфекционной активности вируса составила 1,59 lg ЭИД₅₀/см³. Стабилизирующий

эффект пептона, пептона с сахарозой, пептона с лактозой и глутаматом натрия тоже значителен, снижение инфекционной активности вируса в образцах вакцины с этими стабилизирующими средами при хранении в экстремальной температуре составило от 1,75 до 1,95 lg ЭИД₅₀/см³.

Комплексная стабилизирующая среда - пептон с лактозой и сорбитом обладала наименьшими протективными свойствами, потеря инфекционной активности вируса составила 2,33 lg ЭИД₅₀/см³.

Учитывая обширность территории Республики Казахстан, наличие отгонного животноводства и связанные с этим проблемы транспортировки вакцины в экстремальных температурных условиях, при приготовлении живой вакцины против гриппа лошадей из рекомбинантного штамма целесообразно использовать в качестве оптимальной стабилизирующей среды смесь пептона с лактозой, обеспечивающей наилучшую сохраняемость вируса при вышеуказанных условиях хранения.

Таким образом, по результатам исследований для лиофилизации рекомбинантного штамма вируса выбрана комплексная защитная среда - пептон (6%) с лактозой (3%), обеспечивающая наименьшие потери инфекционной активности вируса.

Выводы. В качестве стабилизирующей среды для штамма А/НК/Отар/6:2/2010 (H3N8) вируса гриппа подобрана комплексная среда - смесь пептона (6%) с лактозой (3%) в соотношении 1:1.

Список использованных литератур

1. Мазурина М.Г. Защитная среда для лиофилизации вируса инфекционного бронхита кур. // Ж. Ветеринария. -1980. -№5. -С. 40.
2. Никитин Е.Е., Звягин И.В. Замораживание и высушивание биологических препаратов. /Москва. Колос. - 1971.-343 с.
3. Главацкий В.Н., Кравченко В.М., Накопов В.Н. и др. Стабилизация эффективных веществ при замораживании и высушивании очищенных биопрепаратов. // Акт.пробл. вет. вирусол. - Владимир, 1977.-С.103-107.
4. Phillips G.O., Harrop R., Wedloch D.I. et al. Study of water binding in lyophilized viral vaccine systems// Cryobiology. - 1981. - V. 18.-P. 414-419.
5. Токарик Э.Ф., Ковальская Л.А., Скотникова Т.А., Константинов В.М. Методические подходы к конструированию защитных сред для живых вирусных вакцин. Научные основы производства ветеринарных препаратов.- М.1989. - С.17-21.
6. Suzuki M. Protectants in the freeze-drying and the preservation of vaccinia virus // Cryobiology. - 1973. - V. 10. - P. 435-439.
7. Опарин Ю.Г. и др. Поиск оптимальных методов лиофилизации// Биотехнологии. - 1996. - № 7. - С. 3-13.
8. Литвяков С.А. и др.Отработка оптимальной защитной среды для лиофилизации и хранения вирусвакцины против инфекционной бурсальной болезни птиц// Вирусные болезни сельскохозяйственных животных. Тезисы докладов Всероссийской научно-практической конференции. Владимир. -1995. - С. 11-14.
9. Хрипунов Е.М.,Савукова В.Я. и др. Комплексные защитные среды при лиофилизации вакцины против чумы плотоядных // Ветеринария - 2009- №1 -С.52-55.

Рецензент: к.б.н. Чалданбаева А.К.