

УДК 619:616.981.55

А.Б. Алиева, Д.Н. Кайсенов, Т.С. Әділ, С.В. Пузынин, К.Б. Баракбаев

РГП «Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности»,
пгт. Гвардейский, Казахстан

РАЗРАБОТКА РЕЖИМА ЗАМОРАЖИВАНИЯ И ВЫСУШИВАНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ

Аннотация. В работе приведены данные по отработке и разработке режимов замораживания и лиофильного высушивания вакцины против болезни Ньюкасла, вакцины против нодулярного дерматита из штамма «G20-LKV» вируса оспы коз и «Тест-системы [набор] для выявления антител к вирусу нодулярного дерматита крупного рогатого скота методом иммуноферментного анализа» на сублимационной установке «Юзифруа».

Таким образом, установлены параметры сублимационной сушки вакцинных препаратов по 1 см³. Температура замораживания от минус 50-56°C; температура нагрева от 0 до +30°C; продолжительность сушки 36 часов, конечная температура досушивания плюс 22-24°C 8-10 часов.

Были определены их температуры полного затвердевания и эвтектические зоны, которые составляет для вакцины против болезни Ньюкасла и вакцины против нодулярного дерматита из штамма «G20-LKV» вируса оспы коз минус (50÷52)°C, рабочий режим нагрева плит от 0°C до плюс 30°C.

Для тест-системы к вирусу нодулярного дерматита КРС составляет минус (54÷56)°C, с рабочим нагревом плит от 0°C до плюс 30°C.

Ключевые слова: замораживание, высушивание, лиофилизация, биологические препараты.

А.Б. Әлиева, Д.Н. Қайсенов, Т.С. Әділ, С.В. Пузынин, К.Б. Барақбаев

«Биологиялық қауіпсіздік проблемаларының ғылыми-зерттеу институты» РМК,
Гвардейский қтп., Қазақстан

БИОЛОГИЯЛЫҚ ПРЕПАРАТТАРДЫ МҰЗДАТУ ЖӘНЕ КЕПТІРУ РЕЖИМІН ӘЗІРЛЕУ

Аннотация. Бұл мақалада «Юсифруа» кептіру құрылғысында Ньюкасла ауруына қарсы вакцина, ешкі шешек вирусының «G20-LKV» штаммынан алынған кесек дерматитке қарсы вакцина және ірі қара малдағы кесек дерматит вирусына иммундық талдау әдісі «Антиденелерді анықтауға арналған сынақ жүйесі [жинақ] үшін мұздату және кептіру режимдерін әзірлеу туралы деректер ұсынылған. Осылайша, вакцинаның 1 см³ көлемдегі препараттарын мұздату арқылы кептіру параметрлері белгіленді. Сонда мұздату температурасы минус 50-56°C; қыздыру температурасы 0-ден +30°C дейін; кептіру уақыты 36 сағат, соңғы кептіру температурасы плюс 22-24°C 8-10 сағат.

№8
2021

Олардың толық қатаю температуралары мен эвтектикалық аймақтары анықталды, олар Ньюкасла ауруына қарсы вакцина және ешкі шешек вирусының «G20-LKV» штаммынан алынған кесек дерматитке қарсы вакцина минус (50÷52)°C, жылыту плиталарының жұмыс режимі 0°C-тан плюс 30°C-қа дейін.

Кесек тері ауруларының вирусына ірі қара малға тестілеу жүйесі үшін минус (54÷56)°C, пластиналардың жұмыс жылытуы 0°C-тан плюс 30°C-қа дейін.

Кілт сөздер: мұздату, кептіру, лиофилизация, биологиялық препараттар.

A.B. Aliyeva, D.N. Kaysenov, T.S. Adil, S.V. Puzynin, K.B. Barakbayev

RSE "Scientific Research Institute of Biological Safety Problems",
 Gvardeysky, Kazakhstan

DEVELOPMENT OF A REGIME FOR FREEZING AND DRYING BIOLOGICAL PREPARATIONS

Abstract. The paper presents data on the development and development of freezing and freeze-drying regimes for the vaccine against Newcastle disease, the vaccine against lumpy dermatitis from the «G20-LKV» strain of the goat pox virus and the "Test system [kit] for detecting antibodies to lumpy dermatitis virus in cattle enzyme immunoassay method" at the «Yusifrua» sublimation unit. Thus, the parameters of freeze-drying of vaccine preparations by 1 cm³ were established. Freezing temperature from minus 50-56°C; heating temperature from 0 to +30°C; drying time 36 hours, final drying temperature plus 22-24°C 8-10 hours.

Their full solidification temperatures and eutectic zones were determined, which are for the vaccine against Newcastle disease and the vaccine against lumpy dermatitis from the G20-LKV strain of goat poxvirus minus (50÷52)°C, the operating mode of heating plates from 0°C to plus 30°C.

For the test system for the lumpy skin disease virus, the cattle is minus (54÷56)°C, with the working heating of the plates from 0°C to plus 30°C.

Key words: freezing, drying, lyophilization, biological preparations

Введение. Лيوфилизация или сублимационное высушивание – это высушивание в условиях глубокого вакуума предварительно замороженных бактерий, вирусов и других биологических препаратов и является наиболее современным и перспективным способом консервирования биоматериалов различной сложности. Лيوфилизация (сублимация) широко применяется в ветеринарной, медицинской, биологической практике и пищевой промышленности для длительного сохранения бактерий, вирусов, грибов, диагностических и лечебных биопрепаратов, животных и растительных тканей, продуктов [1].

Впервые метод лиофилизации применил в 1909 году американский ученый Л. Шеккель. Ученый высушивал в замороженном состоянии под вакуумом фиксированный вирус бешенства и комплемент морской свинки. Опыты по лиофилизации микробных культур, вирусов и диагностических сывороток в ветпрактике России были проведены в 1945-1949 годах С. Г. Колесовым. Позже этим вопросом (1955-1965 гг.) занимались другие ученые [2].

По данным литературы существуют несколько крупнейшие производители сублимационного оборудования – Niro Atlas-Stord Denmark A/S (Дания), Leybold (Германия), Stokes Vitris (США), Edwards (Великобритания), Kyowa Vacuum Engineering (Япония), Shanghai

Tofflon Science and Technology Co., Ltd (Китай), НПО «Вакууммаш» (Казань), фирмы «Шабетник» и компания «Биохиммаш» [3, 4].

Процесс лиофилизирования позволяет в течение нескольких лет сохранять биологические свойства бактерий, вирусов таких как вирулентность, антигенность и культурально-биохимические свойств), стабилизировать на длительное время иммуногенную активность живых микробов и вирусных вакцин, активных и специфичных диагностических сывороток, и антигенов, а также обеспечивает стандартность товарного вида препаратов и длительное хранение их биологической активности [5, 6, 7].

Метод замораживания – высушивания является основным процессом лиофилизации, который состоит из замораживания препарата, первичного высушивания, досушивания и укупорки ампул (флаконов) с высушенным препаратом, основан главным образом на том, что путем замораживания удается полностью остановить все жизненные процессы [8].

Предварительное замораживание материала проводят в морозильных камерах при t от минус 40 до минус 60°C или при помещении материала в смесь спирта с сухой углекислотой (-78°C), чем избегают вспенивания препарата в процессе лиофильной сушки. Замороженный материал в ампулах или флаконах быстро переносят в сушильную камеру (сублиматор), в которой создается глубокий вакуум и поддерживается пониженная температура (до минус 40°C). Существуют аппараты, в которых предварительное замораживание препаратов осуществляется непосредственно в сублимационной камере. В результате сублимации свободная вода удаляется с поверхности замороженного материала, препарат переходит из твердого (замороженного) состояния в сухое (пористая масса, почти не измененная в объеме). Досушивание объекта проводят в этой же камере при t до 20°C и выше. При этом из препарата удаляется связанная вода. После окончания лиофильной сушки вакуумный насос выключают, и в камеру через фильтр подают стерильный сухой воздух или азот [9].

Основным преимуществом лиофилизированного препарата является быстрая растворимость (1-2 мин), остаточная влажность, не превышающая 1-3%, исходная вязкость после растворения, сохранение активности, специфичности препаратов, а также малочувствительность к колебаниям температуры при хранении [10]. Данный процесс актуален как для фармацевтической индустрии, так и в области ветеринарии, а также на биологической практике. На сегодняшний день самым эффективным и наиболее востребованным является лиофильный метод высушивания.

Исходя из вышесказанного, целью нашей работы было разработка режима замораживания-высушивания биологических препаратов.

Материалы и методы исследований. Для проведения экспериментов по высушиванию выбраны вакцинные жидкости болезни Ньюкасла из штамма «Ла-Сота» и штамма «Н» и нодулярного дерматита из штамма «G20-LKV» вируса оспы коз и тест-системы к вирусу нодулярного дерматита КРС.

Ллиофилизацию проводили на сублимационной установке «Юзифруа».

Высушивание биопрепарата сублимационным методом. Перед загрузкой этажерку, морозильную и сублимационную камеру обрабатывали грубодисперсным аэрозолем 70% спирта-ректификата (из расчета 50 см³ на 1 см²) с последующей обработкой УФ-лучами в течение 30 мин.

Вакцинную жидкость (полуфабрикат биопрепарата) разливали в кассеты с ампулами или флаконами и помещали на этажерку с горизонтами и помещали в воздушную холодильную камеру. Содержимое ампул или флаконов замораживали до температуры около минус 58°C в течение 8-12 час.

Перед началом сушки перемещали этажерку с кассетами в предварительно охлажденную до минус (58-64)°C сублимационную камеру, закрывали ее крышкой, включали

вакуумный насос, контрольно-измерительные приборы, открывали задвижку между насосом и камерой и начинали высушивание вакцины. При создании вакуума в сублимационной камере в пределах 4-7 Па включали нагрев полок и дозатор нагрева. В период сушки регулировали за датчиками температуры нагрева полок (0–40)°С.

Процесс сушки проводили при температуре конденсатора минус (64–54)°С, температура материала колебалась от минус 58°С (исходная температура) до плюс 25°С (конечная температура). После завершения высушивания, закрывали задвижку между камерой и насосом и впускали в камеру стерильный воздух через фильтр.

Ампулы с высушенной вакциной запаивали на карусельно-коллекторном аппарате при остаточном давлении от 15 до 30 Па. Флаконы с вакциной перекрывали стерильными резиновыми пробками под вакуумом в специальной вакуумной установке и обкатывали металлическими колпачками.

Определение биологической активности. Титрование проводили в трех повторностях в пробирочной культуре клеток ПЯ. Для этого готовили десятикратные разведения вирусного материала на поддерживающей среде и по 1,0 см³ каждого разведения вносили в 4 пробирки с культурой клеток, предварительно слив из них ростовую среду. В пробирки с контрольной культурой клеток наливали по 1,0 см³ поддерживающей среды без вируса. Инфицированные и контрольные культуры клеток инкубировали при температуре плюс (37±1)°С в течение 14 суток, заменяя поддерживающую среду через каждые 2-3 суток.

В качестве поддерживающей среды использовали питательную среду ПСП с 600 мкг/мл глутамин и антибиотики, с 2 или 5% прогретой сывороткой крови крупного рогатого скота. Результаты учитывали по ЦПД вируса. Титр вируса рассчитывали по методу Рида и Менча [11]. Статистическую обработку результатов опытов проводили по методам, описанным в руководствах Ашмарина И.П. и Воробьева А.А. [12].

Результаты и обсуждение. В ходе экспериментов отработан режим замораживания и высушивания для улучшения технологии изготовления вакцины против болезни Ньюкасла из штамма «Ла-Сота» и штамма «Н», а также разработан режим замораживания и высушивания экспериментальной серии вакцины против нодулярного дерматита из штамма «G20-LKV» вируса оспы коз.

Разработка режима замораживания-высушивания биологических препаратов включала следующие основные этапы:

- лабораторные исследования и разработки, заканчивающиеся составлением лабораторного регламента замораживания-высушивания исследуемого препарата;
- апробация лабораторного регламента в производственных условиях, заканчивающиеся разработкой полупромышленного или промышленного регламента замораживания-высушивания препарата.

В связи с этим для разработки режима замораживания и лиофильного высушивания в ампулах с объемом 1 мл, нами были приготовлены образцы вакцинной жидкости вакцины против болезни Ньюкасла с защитной средой (6% пептон и 3% сахарозы) в соотношении 1:1, вакцина против нодулярного дерматита из штамма «G20-LKV» вируса оспы коз с защитной средой (5% пептон и 3% сахарозы) в соотношении 1:1 и «Тест-система [набор] для выявления антител к вирусу нодулярного дерматита крупного рогатого скота методом иммуноферментного анализа».

Были определены их температуры полного затвердевания и эвтектические зоны. Исследования проводили по методике Звягина И.В. и др. [3]. Результаты проведенных опытов представлены на рисунке 1 и в таблице 1.

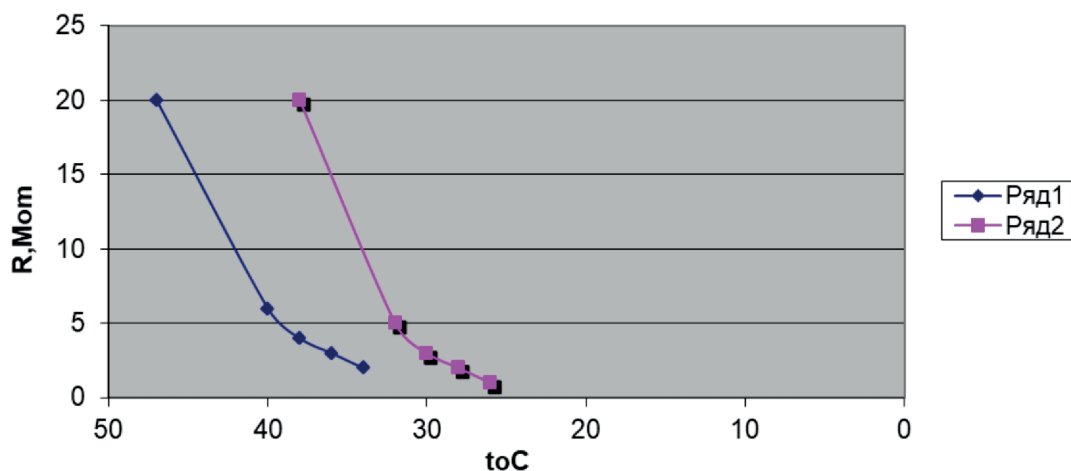


Рисунок 1 – Зависимость удельного сопротивления от температуры замороженного образца биопрепарата. Ряд 1 – образец тест-системы к вирусу НД КРС; ряд 2 – образец вакцинной жидкости штамма «G20-LKV» вируса оспы коз и образец вакцинной жидкости вакцины против болезни Ньюкасла

Таблица 1 – Режимы замораживания-высушивания биопрепарата

№ образца	Наименование образцов биопрепарата	Характеристики вакцинной жидкости		Режимы замораживания и высушивания				
		t полного затвердевания, °C	Эвтектическая зона, °C	t замораживания, °C	Время замораживания, час	t нагрева плит, °C	Режим дозатора, %	Время высушивания, час
1	Вакцина против болезни Ньюкасла	минус (50÷52)	минус (36÷34)	минус (50÷52)	10÷12	(5÷30)	10-20	36
2	Вакцина против нодулярного дерматита из штамма «G20-LKV» вируса оспы коз	минус (50÷52)	минус (36÷34)	минус (50÷52)	10÷12	(5÷30)	10-20	36
3	Тест-система к вирусу нодулярного дерматита КРС	минус (54÷56)	минус (47÷40)	минус (58÷60)	10÷12	(20÷30)	20-25	36

№8
2021

Из данных таблицы 1 следует, что температура полного затвердевания образцов №1, №2 составила минус (50÷52)°C, рабочий режим нагрева плит (0÷30)°C, тогда как у образца №3 составило минус (54÷56)°C, а рабочий режим нагрева плит (0÷30)°C.

Таким образом, с учетом полученных данных на сублимационной установке «Юзифруа» отработаны и разработаны режимы замораживания и лиофильного высушивания вакцины против болезни Ньюкасла, вакцина против нодулярного дерматита из штамма «G20-LKV» вируса оспы коз и «Тест-системы [набор] для выявления антител к вирусу нодулярного дерматита крупного рогатого скота методом иммуноферментного анализа».

Выводы. Метод сублимационного высушивания – является наиболее современным и перспективным способом консервирования биоматериалов различной сложности. Он обеспечивает стандартность товарного вида препаратов и длительное сохранение их

биологической активности. Необходимо отметить, что успех лиофилизации также зависит от качества используемых клеток, насколько они жизнеспособны и от условий роста [13]. При выращивании клеток необходимо контролировать количество клеток, в поздней экспоненциальной или ранней стационарной фазах роста, соответственно собранных в период максимальной стабильности и жизнеспособности культуры, чтобы в суспензии сохранилось не менее 10^8 клеток/мл [14].

Резюмируя, вышеизложенное следует отметить, что нами были проведены технологические процессы по определению эвтектических зон и разработаны режимы замораживания и высушивания биопрепаратов. Таким образом, установлены параметры сублимационной сушки вакцинных препаратов по 1 см^3 . Температура замораживания от минус $50-56^\circ\text{C}$; температура нагрева от 0 до $+30^\circ\text{C}$; продолжительность сушки 36 часов, конечная температура досушивания плюс $22-24^\circ\text{C}$ 8-10 часов.

Были определены их температуры полного затвердевания и эвтектические зоны, которые составляет для вакцины против болезни Ньюкасла и вакцины против нодулярного дерматита из штамма «G20-LKV» вируса оспы коз минус $(50\div 52)^\circ\text{C}$, рабочий режим нагрева плит от 0°C до плюс 30°C .

Для тест-системы к вирусу нодулярного дерматита КРС составляет минус $(54\div 56)^\circ\text{C}$, с рабочим нагревом плит от 0°C до плюс 30°C .

ЛИТЕРАТУРА

1. Долинов К.Е. Основы технологии сухих биопрепаратов // М., 1969. – 231 с.
2. Никитин Е.Е., Звягин И.В. Замораживание и высушивание биологических препаратов // М., 1971. – 343 с.
3. http://www.pharmtech.ru/liofil_main.htm.
4. <http://www.freezedry.ru/arts153.htm>.
5. Звягин И.В., Хорьков И.А., Токарик Э.Ф. и др. Методические рекомендации по разработке режимов замораживания-высушивания биологических препаратов. – М., 1981. – 33 с.
6. Токарик Э.Ф., Ковальская Л.А., Скотникова Т.А. и др. Методические подходы к конструированию защитных сред для живых вирусных вакцин // Научные основы производства ветеринарных препаратов. – М., 1989. – С. 17-21.
7. Токарик Э.Ф., Ковальская Л.А., Константинов В.М. Методы статистического анализа в исследованиях по стабилизации вирусных вакцин. Достижения и перспективы развития криобиологии и криомедицины // Тезисы докл. Межд. конф. Харьков, 1988. – С. 56.
8. Луппа Х. Основы гистохимии // Издательство «Мир». – Москва, 1980. – С. 12-13.
9. Slonim D. Nestovica vakcina Tepelna stabilizirana lyofilizirane vakciny // Cs. Epidem, 1978. – №1. – Р. 8-14.
10. Collier L.H. The preservation of smallpox vaccine // Trends Biochem. Sci. – 1978. – Vol. 3. – №2. – Р. 27-29.
11. Reed I.J., Muench H.A. A simple method of estimating fifty per cent endpoints // Am. J. Hyg., 1938. – Р. 493-497.
12. Ашмарин И.П., Воробьев А.А. Статистические методы в микробиологических исследованиях // Л., 1962. – 27 с.
13. Uzunova-Doneva T. Anabiosis and conservation of microorganisms / T. Uzunova-Doneva, T. Donev // Journal of culture collections. – 2004; 2005. – V. 4. – Р. 17-28.
14. Бланков, Б. И. Применение лиофилизации в микробиологии / Б.И. Бланков, В.Л. Клебанов. – М.: Медгиз, 1961. – 282 с.