

DOI: 10.21055/0370-1069-2019-4-37-40

УДК 616.98:579.842.23

С.Е. Гостищева, Н.В. Абзаева, Г.Ф. Иванова, Л.С. Катунина, Д.В. Ростовцева, А.В. Костроминов

## МОНИТОРИНГ СТАБИЛЬНОСТИ ВАКЦИНЫ ЧУМНОЙ ЖИВОЙ, ПРИГОТОВЛЕННОЙ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ НА ОСНОВЕ ГИДРОЛИЗАТА КУКУРУЗНОГО ЭКСТРАКТА СГУЩЕННОГО

*ФКУЗ «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт», Ставрополь, Российская Федерация*

**Цель** исследования – проанализировать стабильность препарата вакцины чумной живой, изготовленного с использованием экспериментальной питательной среды в течение срока годности. **Материалы и методы.** В работе изучены серии вакцины чумной живой на основе штамма *Yersinia pestis* EV линии НИИЭГ, изготовленные с использованием экспериментальной питательной среды. Исследовали наиболее значимые параметры качества препарата согласно спецификации: концентрация микробных клеток, процент живых микробных клеток, термостабильность, потеря в массе при высушивании и иммуногенность. **Результаты и обсуждение.** Проведен мониторинг стабильности вакцины, изготовленной с использованием питательной среды на основе гидролизата кукурузного экстракта сгущенного, в течение установленного срока годности (три года). Сравнительный анализ жизнеспособности всех экспериментальных серий вакцины проведен в определенные временные промежутки – краткосрочное хранение (до 3 месяцев) и до истечения срока годности. За время хранения наблюдалось незначительное снижение процента живых микробных клеток, при этом ни в одной серии уменьшение жизнеспособности ниже регламентированного уровня (25 %) не произошло. Такое снижение закономерно для «живого препарата» и не является критическим в полученных пределах. Остальные исследуемые показатели практически не претерпели изменений. Таким образом, анализ полученных данных свидетельствует о том, что во все изученные сроки препарат сохраняет стабильность основных регламентированных показателей. Проведенные исследования подтверждают целесообразность использования предложенной питательной среды на основе гидролизата кукурузного экстракта сгущенного в промышленном производстве препарата вакцины чумной живой.

**Ключевые слова:** вакцина чумная живая, качество препарата, стабильность, жизнеспособность, термостабильность.

*Корреспондирующий автор:* Гостищева Светлана Евгеньевна, e-mail: stavnipchi@mail.ru.

*Для цитирования:* Гостищева С.Е., Абзаева Н.В., Иванова Г.Ф., Катунина Л.С., Ростовцева Д.В., Костроминов А.В. Мониторинг стабильности вакцины чумной живой, приготовленной с использованием питательной среды на основе гидролизата кукурузного экстракта сгущенного. *Проблемы особо опасных инфекций.* 2019; 4:37–40. DOI: 10.21055/0370-1069-2019-4-37-40

S.E. Gostishcheva, N.V. Abzaeva, G.F. Ivanova, L.S. Katunina, D.V. Rostovtseva, A.V. Kostrominov

## Monitoring of Stability of the Live Plague Vaccine Produced Using Condensed Corn Steep Extract Hydrolysate-Based Nutrient Medium

*Stavropol Research Anti-Plague Institute, Stavropol, Russian Federation*

**Abstract. Objective** of the study was to analyze the stability of the preparation of a live plague vaccine made using an experimental nutrient medium over its shelf life. **Materials and methods.** A series of live plague vaccine based on *Yersinia pestis* EV NIEG strain produced using experimental nutrient medium were utilized in this work. Most significant qualitative parameters of the preparation were studied: microbe cell content, viability, thermal stability, mass loss during the process of drying, and immunogenicity. **Results and discussion.** The stability of the vaccine produced using the nutrient medium based on hydrolysate of condensed corn steep extract was monitored over a specified shelf life (three years). A comparative analysis of the viability of all experimental vaccine series was carried out at certain time intervals – short-term storage (up to 3 months) and before the expiration date. During storage, there was an insignificant decrease in the percentage of living microbial cells, while in no series the viability decrease reached below the regulated levels of 25 %. Such a decrease is natural for a “live preparation” and is not critical within the obtained limits. The rest of the studied indicators practically did not change. Thus, the analysis of the data obtained indicates that in all the periods of observation the drug retained the stability of the main regulated indicators. The studies confirm the feasibility of using this referred nutrient medium based on hydrolyzed corn steep extract in industrial production of the plague live vaccine preparation.

**Key words:** live plague vaccine, preparation quality, stability, viability, thermostability.

**Conflict of interest:** The authors declare no conflict of interest.

*Corresponding author:* Svetlana E. Gostishcheva, e-mail: stavnipchi@mail.ru.

*Citation:* Gostishcheva S.E., Abzaeva N.V., Ivanova G.F., Katunina L.S., Rostovtseva D.V., Kostrominov A.V. Monitoring of Stability of the Live Plague Vaccine Produced Using Condensed Corn Steep Extract Hydrolysate-Based Nutrient Medium. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2019; 4:37–40. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2019-4-37-40

Received 27.08.19. Revised 26.09.19. Accepted 14.11.19.

С целью специфической профилактики чумы в России применяют вакцину чумную живую из вак-

цинного штамма *Yersinia pestis* EV линии НИИЭГ [1–3]. В биотехнологии приготовления препарата на

этапе накопления биомассы в биореакторе (АКМ-Ш) используются питательные среды на основе гидролизатов Хоттингера или казеина, оптимальные для культивирования микроорганизмов и стабилизации количества живых микробных клеток при хранении вакцины (Промышленный регламент на производство ПР 01897080-09-16) [4–6].

Важным требованием при изготовлении живых вакцин является обеспечение сохранения качества препарата в течение длительного времени, то есть стабильность показателей в соответствии с установленной спецификацией (Фармакопейная статья предприятия ФСП 42-8654-07) [7–9].

Стабильность (устойчивость) лекарственных средств – это способность сохранять физико-химические свойства и фармакологическую активность, предусмотренные требованиями нормативной документации (НД) в течение установленного срока годности (ОФС.1.1.0009.18 «Стабильность и сроки годности лекарственных средств») [10–12].

На стабильность вакцины чумной живой значительное влияние оказывают условия культивирования штамма *Yersinia pestis* EV и последующей лиофилизации, а также транспортирование и хранение готового препарата [13–15]. Одним из основных требований получения высокоэффективного вакцинного препарата является использование в производстве качественной питательной среды, обеспечивающей стабильный выход биомассы. Микробная популяция на этапах получения генераций посевных культур испытывает ряд неблагоприятных воздействий и может содержать не только биологически неполноценные (незрелые), но и поврежденные микробные клетки, что является одной из причин их гибели в процессе лиофилизации [16, 17]. Для сохранения большего процента жизнеспособных клеток в вакцине при лиофилизации применяют стабилизатор (среда высушивания), обеспечивающий стабильность свойств препарата в течение срока годности. Следует отметить, что в соответствии с регламентированными требованиями вакцины хранят при температуре от 2 до 8 °С. Кроме этого, соблюдение требований «холодовой цепи» является обязательным при транспортировке для обеспечения безопасности и сохранности качества препарата (СП 3.3.2.3332-16 «Условия транспортирования и хранения иммунобиологических лекарственных препаратов»).

Ранее нами в качестве сырья для приготовления питательных сред в производстве вакцины чумной живой апробирован гидролизат кукурузного экстракта сгущенного (ГКЭС) [18]. Вакцина чумная живая, приготовленная на этой питательной среде, по всем регламентированным свойствам соответствовала требованиям НД.

В соответствии с требованиями Государственной фармакопеи РФ для подтверждения сохранности свойств лекарственных препаратов в течение гарантированного срока годности, необходимо проводить долгосрочные исследования стабильности готовых

серий вакцины чумной живой [19].

**Цель** исследования – проанализировать стабильность препарата вакцины чумной живой, изготовленного с использованием питательной среды ГКЭС в течение срока годности.

### Материалы и методы

В работе использованы восемь серий вакцины чумной живой на основе штамма *Yersinia pestis* EV линии НИИЭГ, изготовленные с использованием питательной среды ГКЭС.

Стабильность экспериментальных серий вакцины исследована по основным показателям спецификации: жизнеспособность и термостабильность (бактериологический метод), потеря в массе при высушивании (гравиметрический метод), иммуногенность (биологический метод) в соответствии с ФСП 42-8654-07.

Статистический анализ проводили с использованием пакета прикладных программ Statistica 6.0. Для выявления статистической значимости различий результатов использовали t-критерий Стьюдента. Различия считались достоверными при  $p \leq 0,05$ .

### Результаты и обсуждение

Экспериментальные серии вакцины чумной живой проверили на соответствие требованиям спецификации НД при выпуске. Все образцы при исследовании соответствовали требованиям, предъявляемым к готовому препарату вакцины чумной живой.

Далее в течение срока хранения (три года) провели исследование стабильности полученных серий по основным показателям качества: специфическая активность (процент живых микробных клеток и концентрация микробных клеток) иммуногенность, термостабильность, потеря в массе при высушивании согласно ФСП 42-8654-07 (таблица).

Из данных, представленных в таблице, видно, что за время хранения наблюдается снижение процента живых микробных клеток. Остальные свойства вакцины при хранении в течение установленного срока годности практически не претерпевают изменений. Различия между показателями стандартных отклонений повторяемости для изученных показателей статистически недостоверны ( $p \leq 0,05$ ).

Основополагающим фактором для живой вакцины является количество жизнеспособных клеток в лиофилизированном препарате, по которому, в соответствии с требованиями НД, определяется число доз в ампуле.

В процессе хранения показатель жизнеспособности препарата может снижаться, особенно в течение первых трех месяцев. Учитывая это, проведен сравнительный анализ жизнеспособности всех экспериментальных серий вакцины в определенные временные промежутки (рисунок).

Непосредственно после изготовления вакцины

# Мониторинг показателей качества вакцины чумной живой в течение срока годности

## Monitoring of indicators of live plague vaccine quality over the shelf life

| Показатели качества препарата<br>Preparation quality indicators  | Требования ПР<br>Master formula requirements | На дату выпуска<br>At the date of production | 2016     | 2017     | 2018     |
|--|--|--|----------|----------|----------|
| Концентрация микробных клеток, м.к./мл<br>Microbe cell content, mc/ml  | $50 \cdot 10^9 - 100 \cdot 10^9$             | 74,1±4,1                                     | 74,1±4,1 | 73,8±3,6 | 73,6±3,7 |
| Жизнеспособность, %<br>Viability, %  | $\geq 25$                                    | 39,0±5,3                                     | 38,6±4,1 | 37,4±5,2 | 33,2±3,6 |
| Термостабильность, сут<br>Thermostability, day   | $\geq 4$                                     | 10,9±2,0                                     | 10,5±3,1 | 10,1±2,4 | 9,0±3,6  |
| Потеря в массе при высушивании, %<br>Mass loss during drying, %  | $\leq 4,0$                                   | 1,1±0,1                                      | 1,1±0,1  | 1,1±0,1  | 1,1±0,1  |
| ЕД <sub>50</sub> для белых мышей, ж.м.к.<br>Immunogenic Dose (ID) <sub>50</sub> for white mice, live microbe cells | $\leq 4 \cdot 10^4$                          | 13420  | -        | 10647    | -        |
| ЕД <sub>50</sub> для морских свинок, ж.м.к.<br>ID <sub>50</sub> for guinea pigs, live microbe cells                | $\leq 1 \cdot 10^4$                          | 8237   | -        | 5593     | -        |

жизнеспособность составляла (39,0±5,3) %. К концу срока хранения данный показатель снижался и в итоге составил (33,2±3,6) %. При этом следует отметить, что такое снижение закономерно для «живого препарата» и не является критическим в полученных пределах. Вместе с тем ни в одной серии уменьшения жизнеспособности ниже регламентированного уровня (25 %) не произошло.

Проведенные исследования показывают, что препарат вакцины чумной живой, полученной на среде из гидролизата кукурузного экстракта сгущенного, сохраняет стабильность регламентированных показателей в течение всего срока годности, что еще раз подтверждает целесообразность использования данной питательной среды в промышленном производстве препарата.

**Конфликт интересов.** Авторы подтверждают отсутствие конфликта финансовых/нефинансовых интересов, связанных с написанием статьи.

## Список литературы

1. Verma S.K., Tuteja U. Plague vaccine development: current research and future trends. *Front. Immunol.* 2016; 7:602. DOI: 10.3389/fimmu.2016.00602.
2. Бывалов А.А., Кутырев В.В. Современное состояние проблемы совершенствования средств вакцинопрофилактики чумы. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.* 2011; 2:97–104.

2011; 2:97–104.

3. Williamson E.D., Oyston P.C. Protecting against plague: towards a next-generation vaccine. *Clin. Exp. Immunol.* 2013; 172(1): 1–8. DOI: 10.1111/cei.12044.

4. Поляк М.С., Сухаревич В.И., Сухаревич М.Э. Питательные среды для медицинской и санитарной микробиологии. «Элб-СПб»; 2008. 352 с.

5. Михайлова В.С., Поляк М.С., Суханова С.М. О роли внутрилабораторного контроля качества в стандартизации питательных сред для микробиологических исследований в клинико-диагностических лабораториях. *Проблемы стандартизации в здравоохранении.* 2009; 5–6:8–15.

6. Башкирова С.Н., Погребняк А.В., Степанова Э.Ф. Теоретическая оценка взаимного влияния компонентов на общую стабильность препарата. *Вестник новых медицинских технологий.* 2006; 13(1):102–4.

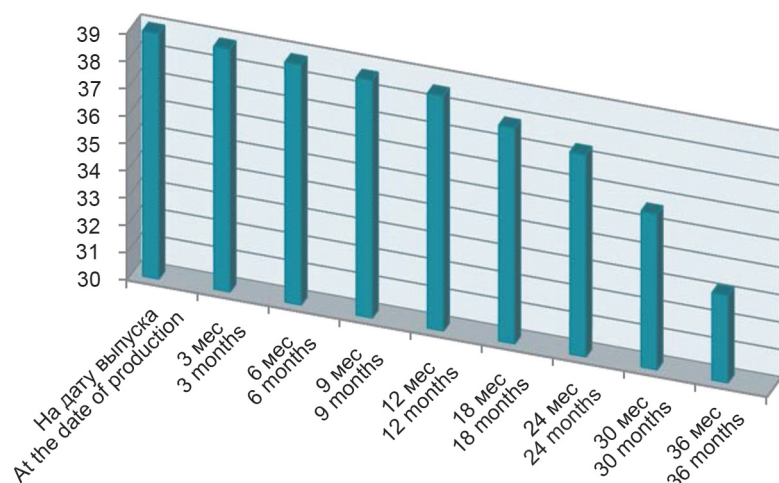
7. Jadhav S.S., Dogar V., Gautam M., Gairola S. Stability testing of vaccines: Developing Countries Vaccine Manufacturers' Network (DCVMN) perspective. *Biologicals.* 2009; 37(6):360–3. DOI: 10.1016/j.biologicals.2009.08.003.

8. Pfeleiderer M. Stability of vaccines – bridging from stability data to continuous safety and efficacy throughout shelf life – An always reliable approach? *Biologicals.* 2009; 37(6):364–8. DOI: 10.1016/j.biologicals.2009.08.013.

9. Касина И.В., Алексеева С.А., Фадейкина О.В., Немировская Т.И., Волкова Р.А. Аттестация новой серии отраслевого стандартного образца для контроля специфической активности и термостабильности вакцины чумной живой. *Биопрепараты. Профилактика, диагностика, лечение.* 2018; 18(4):262–7. DOI: 10.30895/2221-996X-2018-18-4-262-267.

10. Давыдов Д.С. Анализ стабильности показателей качества биологических лекарственных препаратов при проведении испытаний в рамках подтверждения соответствия. *Биопрепараты. Профилактика, диагностика, лечение.* 2017; 17(4):230–2.

11. Сакаева И.В., Бунятян Н.Д., Ковалева Е.Л., Саканян Е.И., Митькина Л.И., Прокопов И.А., Шелехина Е.С., Митькина Ю.В. Основные подходы к изучению стабильности лекарственных



Анализ жизнеспособности вакцины чумной живой на протяжении срока годности

Analysis of viability of live plague vaccine over the shelf life



ных средств: отечественный и международный опыт. *Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения*. 2013; 3:8–11.

12. Колышкин В.М., Васильев А.В. Оценка стабильности производства коревой вакцины. *Биотехнология*. 2008; 1:57–63.

13. Николаева Л.Л., Гулякин И.Д., Орлова О.Л., Полозкова А.П., Оборотова Н.А., Санарова Е.В., Ланцова А.В., Хламов В.В., Бунятян Н.Д. Лиофилизация как способ стабилизации лекарственных препаратов (обзор). *Химико-фармацевтический журнал*. 2017; 51(4):54–9. DOI: 10.30906/0023-1134-2017-51-4-54-58.

14. Комиссаров А.В., Бибииков Д.Н., Волох О.А., Бадарин С.А., Синицына Н.В., Костылева Н.И., Германчук В.Г., Никифоров А.К. Лиофилизация живых вакцин. *Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова*. 2018; 14(3):56–73.

15. Файбич М.М. Стабилизация вакцинных препаратов в процессе высушивания и хранения. *Успехи микробиологии*. 1983; 18:193–215.

16. Бекер М.Е., Дамберг Б.Э., Рапопорт А.И. Анабиоз микроорганизмов. Рига: «Зинатне»; 1981. 252 с.

17. Островский Д.Н., Капельянтс А.С., Лукьянова М.А. Прикладные аспекты биохимии мембран. *Прикладная биохимия и микробиология*. 1983; 19(1):60–70.

18. Гостищева С.Е., Абзаева Н.В., Иванова Г.Ф., Ростовцева Д.В., Катунина Л.С., Зуенко А.А. Оценка качества вакцины чумной живой с использованием питательной среды на основе гидролизата кукурузного экстракта сгущенного. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2018; 3:46–49. DOI: 10.21055/0370-1069-2018-3-46-49.

19. Государственная Фармакопея Российской Федерации, XIV издание. Москва; 2018. Т. 1.

## References

1. Verma S.K., Tuteja U. Plague vaccine development: current research and future trends. *Front. Immunol.* 2016; 7:602. DOI: 10.3389/fimmu.2016.00602.

2. Byvalov A.A., Kutyrev V.V. [Current state of the problem of improving the means of vaccine prophylaxis of plague]. *Zhurnal Mikrobiologii, Epidemiologii i Immunobiologii* [Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology]. 2011; (2):97–104.

3. Williamson E.D., Oyston P.C. Protecting against plague: towards a next-generation vaccine. *Clin. Exp. Immunol.* 2013; 172(1):1–8. DOI: 10.1111/cei.12044.

4. Polyak M.S., Sukharevich V.I., Sukharevich M.E. [Nutrient media for medical and sanitary microbiology]. “Elbi-SPb”; 2008. 352 p.

5. Mikhailova V.S., Polyak M.S., Sukhanova S.M. [On the role of intralaboratory quality control in the standardization of nutrient media for microbiological research in clinical diagnostic laboratories]. *Problemy Standartizatsii v Zdravookhraneni* [Problems of Standardization in Healthcare]. 2009; 5(6):8–15.

6. Bashkirova S.N., Pogrebnyak A.V., Stepanova E.F. [Theoretical assessment of the mutual influence of the components on the overall stability of the drug]. *Vestnik Novykh Meditsinskih Tekhnologiy* [Bulletin of New Medical Technologies]. 2006; 13(1):102–4.

7. Jadhav S.S., Dogar V., Gautam M., Gairola S. Stability testing of vaccines: Developing Countries Vaccine Manufacturers' Network (DCVMN) perspective. *Biologicals*. 2009; 37(6):360–3. DOI: 10.1016/j.biologicals.2009.08.003.

8. Pfeleiderer M. Stability of vaccines – bridging from stability data to continuous safety and efficacy throughout shelf life – An always reliable approach? *Biologicals*. 2009; 37(6):364–8. DOI: 10.1016/j.biologicals.2009.08.013.

9. Kasina I.V., Alekseeva S.A., Fadeykina O.V., Nemirovskaya T.I., Volkova R.A. [Certification of a new series of industry standard sample to control the specific activity and thermostability of the plague live vaccine]. *BIOpreparaty. Profilaktika, Diagnostika, Lechenie* [BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment]. 2018; 18(4):262–7. DOI: 10.30895/2221-996X-2018-18-4-262-267.

10. Davydov D.S. [Analysis of stability indicators of biological drug quality during the tests in the framework of conformity assessment]. *BIOpreparaty. Profilaktika, Diagnostika, Lechenie* [BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment]. 2017; 17(4):230–2.

11. Sakaeva I.V., Bunyatyan N.D., Kovaleva E.L., Sakanyan E.I., Mit'kina L.I., Prokopov I.A., Shelekhina E.S., Mit'kina Yu.V. [The main approaches to the study of drug stability: domestic and international experience]. *Vedomosti Nauchnogo Tsentra Ekspertizy Sredstv Meditsinskogo Primeneniya* [The Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products] 2013; (3):8–11.

12. Kolyshekin V.M., Vasil'ev A.V. [Assessment of the stability of measles vaccine production]. *Biotechnologiya* [Biotechnology]. 2008; (1):57–63.

13. Nikolaeva L.L., Gulyakin I.D., Orlova O.L., Polozkova A.P., Oborotova N.A., Sanarova E.V., Lantsova A.V., Khlamov V.V., Bunyatyan N.D. [Lyophilization as a way to stabilize drugs (review)]. *Khimiko-Farmatsevticheskiy Zhurnal* [Chemical Pharmaceutical Journal]. 2017; (4):54–9. DOI: 10.30906/0023-1134-2017-51-4-54-58.

14. Komissarov A.V., Bibikov D.N., Volokh O.A., Badarin S.A., Sinitsyna N.V., Kostyleva N.I., Germanchuk V.G., Nikiforov A.K. [Lyophilization of live vaccines]. *Vestnik Biotechnologii i Fiziko-Khimicheskoi Biologii im. Yu.A. Ovchinnikova* [Yu.A. Ovchinnikov Bulletin of Biotechnology and Physical-Chemical Biology]. 2018; 14(3):56–73.

15. Faibich M.M. [Stabilization of vaccines in the process of drying and storage]. *Uspekhi Mikrobiologii* [Advances in Microbiology]. 1983; (18):193–215.

16. Beker M.E., Damberg B.E., Rapoport A.I. [Anabiosis of microorganisms]. Riga: «Zinatne»; 1981. 246 p.

17. Ostrovsky D.N., Kapel'yants A.S., Lukyanova M.A. [Applied aspects of the biochemistry of membranes]. *Prikladnaya Biokhimiya i Mikrobiologiya* [Applied Biochemistry and Microbiology]. 1983; 19(1):60–70.

18. Gostishcheva S.E., Abzaeva N.V., Ivanova G.F., Rostovtseva D.V., Katunina L.S., Zuenko A. A. [Quality assessment of the live plague vaccine prepared using nutrient medium on the basis of the hydrolysate of concentrated corn steep]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii* [Problems of Particularly Dangerous Infections]. 2018; (3): 46–9.

19. [The State Pharmacopoeia of the Russian Federation, XIV edition]. Moscow; 2018. Vol. 1.

## Authors:

Gostishcheva S.E., Abzaeva N.V., Ivanova G.F., Katunina L.S., Rostovtseva D.V., Kostrominov A.V. Stavropol Research Anti-Plague Institute. 13–15, Sovetskaya St., Stavropol, 355035, Russian Federation. E-mail: stavnipchi@mail.ru.

## Об авторах:

Гостищева С.Е., Абзаева Н.В., Иванова Г.Ф., Катунина Л.С., Ростовцева Д.В., Костроминов А.В. Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт. Российская Федерация, 355035, Ставрополь, ул. Советская, 13–15. E-mail: stavnipchi@mail.ru.

Поступила 27.08.19.

Отправлена на доработку 26.09.19.

Принята к публ. 14.11.19.