

DOI: 10.21055/0370-1069-2020-4-139-145

УДК 616.98:579.842.23

Д.А. Шаров, А.А. Лещенко, С.В. Багин, С.В. Логвинов, Д.А. Мохов, А.В. Ежов, А.Г. Лазыкин,
В.В. Крупин, И.В. Косенков

УСОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ КОНЦЕНТРИРОВАНИЯ МИКРОБНЫХ КЛЕТОК В ПРОИЗВОДСТВЕ ВАКЦИНЫ ЧУМНОЙ ЖИВОЙ, ТАБЛЕТКИ ДЛЯ РАССАСЫВАНИЯ

Филиал ФГБУ «48 Центральный научно-исследовательский институт» Министерства обороны Российской Федерации,
Киров, Российская Федерация

Цель работы – усовершенствование технологии концентрирования микробных клеток в производстве вакцины чумной живой, таблетки для рассасывания. **Материалы и методы.** Использовали вакцинный штамм *Yersinia pestis* EV линии НИИЭГ. Для глубинного выращивания нативной культуры чумного микроба применяли реактор БИОР-0,25 с автоматизированной системой управления. Концентрат микробной взвеси получали методом микрофильтрации с применением установок АСФ-009 и АСФ-020. Содержание живых микробных клеток определяли циторефрактометрическим методом. Оценку устойчивости *Y. pestis* штамма EV к технологическим факторам осуществляли методом фотометрической регистрации изменений оптической плотности суспензии бактерий в процессе литической реакции клеток на воздействие додецилсульфата натрия. Физико-химические и иммунобиологические свойства вакцины чумной живой, таблетки для рассасывания, определяли в соответствии с ФС.3.3.1.0021.15 Государственной фармакопеи Российской Федерации XIV издания. **Результаты и обсуждение.** Конструктивные особенности внедренного оборудования позволили осуществлять концентрирование микробной суспензии методом мембранной фильтрации, используя в качестве емкости промежуточного хранения реактор БИОР-0,25, что дало возможность исключить три технологические операции. Общая концентрация микробов в суспензии, полученной регламентным и усовершенствованным способами, составляла не менее 150 млрд м.к./мл. Различные гидродинамические режимы в рабочих полостях фильтрующих установок АСФ-009 и АСФ-020 при концентрировании не повлияли на морфометрические свойства и устойчивость микробных культур к технологическим факторам. На основании экспериментальных данных составлен материальный баланс процесса мембранной фильтрации. Выявлено, что выход концентрата с 1 л нативной культуры по усовершенствованной технологии достигал 0,13 л, продолжительность процесса сократилась до 5 ч, а выход готового препарата за один производственный цикл увеличился в три раза. Таким образом, усовершенствована технология концентрирования микробных клеток *Y. pestis* при производстве таблетированной формы чумной живой вакцины.

Ключевые слова: вакцинный штамм *Yersinia pestis* EV, вакцина чумная живая, технология вакцины чумной живой, показатели окислительного метаболизма, концентрирование микробной суспензии, материальный баланс, микрофильтрация.

Корреспондирующий автор: Лещенко Андрей Анатольевич, e-mail: NIC48CNII@mail.ru.

Для цитирования: Шаров Д.А., Лещенко А.А., Багин С.В., Логвинов С.В., Мохов Д.А., Ежов А.В., Лазыкин А.Г., Крупин В.В., Косенков И.В. Усовершенствование технологии концентрирования микробных клеток в производстве вакцины чумной живой, таблетки для рассасывания. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2020; 4:139–145. DOI: 10.21055/0370-1069-2020-4-139-145

Поступила 01.09.20. Отправлена на доработку 09.09.20. Принята к публ. 28.10.20.

D.A. Sharov, A.A. Leshchenko, S.V. Bagin, S.V. Logvinov, D.A. Mokhov, A.V. Ezhov, A.G. Lazykin,
V.V. Krupin, I.V. Kosenkov

Improvement of Microbial Cell Concentration Technology in the Production of Live Plague Vaccine in the Form of Orodispersible Tablets

Affiliated Branch of the “48th Central Research Institute” of the Ministry of Defense of the Russian Federation, Kirov,
Russian Federation

Abstract. The aim of the study was to improve the procedure for the *Yersinia pestis* EV strain cell concentration using the system for tangential flow microfiltration with the ASF-020 filter support unit. **Materials and methods.** The study used the vaccine *Y. pestis* EV strain derived from NIEG cell line. Submerged cultivation of the native culture was performed using BIOR-0.25 reactor with automated control system. Microbial suspension concentrate was produced through microfiltration applying (Adaptive filtration system) AFS-009 and AFS-020 installations. The content of live microbial cells was determined by cyto refractometry. Assessment of the resistance of *Y. pestis* EV strain cells to technological factors was performed by photometric registration of changes in the optical density of bacterial suspension during the lytic response of cells to sodium dodecyl sulfate. Physical-chemical and immunobiological properties of the dry live plague vaccine were determined in accordance with the pharmacopoeial item.3.3.1.0021.15 of the State Pharmacopoeia of the Russian Federation, 14th edition. **Results and discussion.** The design features of the equipment introduced made it possible to carry out membrane filtration of microbial suspension, using BIOR-0.25 reactor as an intermediate storage unit, thereby excluding three technological stages. The total concentration of microbes in the suspension obtained by routine and improved methods was more than 150 billion microbial cells per ml. A comparative study of the effect of various hydrodynamic regimes in the working cavities of AFS-009 and AFS-020 filter units did not significantly affect the morphometric properties and resistance of microbial cultures to extreme (technological) factors. Based on the experimental data, the mass balance of the membrane filtration process has been determined. The optimized technology gave 0.13

liter yield of concentrate from 1 liter of native culture, and the process duration was reduced to 5 hours, the yield of the finished product in one production cycle was increased by 3 times. Thus, the process of concentrating *Y. pestis* EV strain cells during the production of the tablet form of live plague vaccine has been enhanced. A comparative study of the morphometric properties and resistance of plague microbe cultures to technological factors in the process of their concentration using optimized technology did not reveal any significant differences as compared to the routine one. Technological stage of concentrating has been reduced to 5 h term with a three-fold increase in the yield of finished product.

Key words: *Yersinia pestis* EV vaccine strain, live plague vaccine, live plague vaccine manufacturing technology, microbial suspension concentration, mass balance, and microfiltration.

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

Corresponding author: Andrey A. Leshchenko, e-mail: NIC48CNII@mail.ru.

Citation: Sharov D.A., Leshchenko A.A., Bagin S.V., Logvinov S.V., Mokhov D.A., Ezhov A.V., Lazykin A.G., Krupin V.V., Kosenkov I.V. Improvement of Microbial Cell Concentration Technology in the Production of Live Plague Vaccine in the Form of Orodispersible Tablets. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2020; 4:139–145. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2020-4-139-145

Received 01.09.20. Revised 09.09.20. Accepted 28.10.20.

В настоящее время специфическая профилактика чумы в Российской Федерации осуществляется в соответствии с Национальным календарем прививок по эпидемическим показаниям [1]. В случае чрезвычайных ситуаций при необходимости проведения массовой вакцинации перспективной лекарственной формой, позволяющей быстро иммунизировать большое количество людей, является вакцина чумная живая в виде таблетки для рассасывания [2, 3]. Вакцина обладает высокой иммуногенностью и низкой реактогенностью, в качестве основного компонента используется активная биологическая субстанция, представляющая собой лиофилизированную живую культуру вакцинного штамма чумного микроба *Yersinia pestis* EV линии НИИЭГ.

Одним из основных этапов в технологии производства таблетированной формы вакцины чумной живой является процесс приготовления микробной взвеси заданной концентрации. Характеристики получаемой концентрированной микробной суспензии напрямую влияют на иммунобиологические свойства готовой формы препарата и технико-экономические показатели производства.

Совершенствование технологической стадии концентрирования микробной культуры при производстве вакцинных препаратов является одним из направлений развития биотехнологии и требует своевременного аппаратного переоснащения, использования высокоэффективных технологических методов и современных конструктивных материалов [4, 5].

Ранее проведенные исследования позволили внедрить в технологию производства таблетированной формы вакцины чумной живой комбинированный способ концентрирования микробных клеток [3]. Он предусматривает первичное осаждение микробной взвеси вакцинного штамма в реакторе, накопление осадка в емкости промежуточного хранения и последующее мембранное разделение на установке АСФ-009. Получение концентрата в рамках данной технологической стадии производства вакцины характеризуется многооперационностью и продолжительностью до 21 ч. Следствием комбинированного способа является малый выход концентрированной суспензии (0,04 л с 1 л нативной культуры).

Современный уровень развития биотехнологического оборудования, в том числе для мембранного разделения биологических продуктов, позволяет обеспечить увеличение выхода продукта с единицы объема полуфабриката при минимизации энергетических и временных затрат [4, 5].

Кроме того, установка АСФ-009 на сегодняшний день не выпускается отечественными производителями и не представлена на рынке технологического оборудования. Мембранные кассетные модули с данной установки производятся в индивидуальном порядке, что требует дополнительных материальных затрат [6].

Все перечисленное определяет актуальность исследований, направленных на совершенствование способа получения микробной взвеси в технологии таблетированной формы чумной вакцины за счет использования современного и более производительного оборудования.

Цель работы – усовершенствование технологии концентрирования микробных клеток в производстве вакцины чумной живой, таблетки для рассасывания.

Материалы и методы

В производстве препарата использовали вакцинный штамм *Y. pestis* EV линии НИИЭГ, разрешенный приказом Минздрава СССР от 21.03.1960 № 118 для производства вакцины чумной живой (далее – штамм EV) [1]. Штамм получен из Государственной коллекции возбудителей бактериальных инфекций, используемых для разработки и оценки эффективности медицинских средств биологической защиты, филиала ФГБУ «48 Центральный научно-исследовательский институт» Министерства обороны Российской Федерации (г. Киров).

Для глубинного выращивания клеток *Y. pestis* EV применяли реактор БИОР-0,25 с системой автоматизированного управления процессом. Концентрат микробной взвеси получали методом микрофильтрации с применением установок АСФ-009 и АСФ-020. Готовую форму вакцины получали путем прессования таблеточной массы, состоящей из смеси лиофилизированной в среде высушивания живой культуры вакцинного штамма EV чумного микроба и вспомо-

гательных веществ.

Содержание живых микробных клеток определяли циторефрактометрическим методом на микроскопе МБИ-6 с аноптральным контрастом и общим увеличением $\times 1350$. Содержание делящихся клеток оценивали в фазовом контрасте на микроскопе «Люам ИЗ». Документирование и анализ размеров микробных клеток осуществлялся на микроскопе «Биомед-4ПР» с цифровой камерой Digital Camera DSM 900 [7]. Общую концентрацию чумных микробов штамма EV в суспензии определяли по отраслевому стандартному образцу мутности бактериальных взвесей 10 международных единиц (МЕ), эквивалентной $0,95 \cdot 10^9$ м.к./мл чумного микроба.

Для прогнозирования устойчивости клеток чумного микроба штамма EV к экстремальным технологическим факторам стадии концентрирования использовали метод фотометрической регистрации изменений оптической плотности в процессе литической реакции клеток на воздействие ДСН [8].

Физико-химические и иммунобиологические свойства вакцины определяли в соответствии с ФС.3.3.1.0021.15 «Вакцина чумная живая, таблетки для рассасывания».

Испытания специфической безопасности и иммуногенности вакцины проводили на лабораторных животных. Эксперименты проводили на морских свинках массой (275 ± 25) г и на белых нелинейных мышах массой (19 ± 1) г. В работе использовали здоровых животных, полученных из питомника филиала ФГБУ «48 Центральный научно-исследовательский институт» Министерства обороны Российской Федерации (г. Киров). Морских свинок и белых нелинейных мышей выдерживали на стандартном рационе с достаточным количеством воды в течение 10 дней. Дальнейшие эксперименты на животных проводили в соответствии с Директивой № 2010/63/ ЕС Европейского парламента и Совета Европейского союза от 22.09.2010 «О защите животных, используемых для научных целей».

Материальный баланс стадии приготовления концентрированной микробной суспензии составляли согласно требованиям ОСТ 64-02-003-2002 «Продукция медицинской промышленности. Технологические регламенты производства. Содержание, порядок разработки, согласования и утверждения». Расчет выполняли на основании методики, представленной в практикуме по технологии лекарственных форм [9].

Достоверность результатов при принятой $P \leq 0,05$ оценивали по критерию Стьюдента [10].

Результаты и обсуждение

На первоначальном этапе исследований процесс концентрирования глубинной культуры вакцинного штамма EV чумного микроба осуществляли согласно промышленному регламенту, включающему следующие технологические операции:

- предварительное осаждение биомассы в биореакторе БИОР-0,25 продолжительностью 6 ч;

- отбор накопленного осадка и седиментация в емкости промежуточного хранения в течение 8 ч при температуре от 4 до 8 °С;

- концентрирование осадка микробной взвеси на протяжении 7 ч способом микрофльтрации на установке АСФ-009.

Микрофльтрационная установка оснащалась пятью мембранными модулями из полипропилена с размером пор 0,2 мкм и площадью поверхности фильтрации 0,1 м² каждый. Разделение проводили в температурном интервале от 18 до 22 °С. Общая концентрация чумных микробов штамма EV в суспензии после концентрирования составляла 150 млрд м.к./мл.

На следующем этапе исследований осуществлена попытка внедрения установки АСФ-020 в технологический процесс концентрирования биомассы чумного микроба. Ее конструктивные особенности позволили осуществить мембранную фильтрацию с использованием в качестве емкости промежуточного хранения полуфабрикатов сам реактор БИОР-0,25. Для микрофльтрации использовались восемь мембранных модулей из полиэфирсульфона с размером пор 0,2 мкм. Общая площадь фильтрующей поверхности составляла 5,6 м². Продолжительность баромембранного процесса не превышала 5 ч при температуре от 15 до 18 °С. Общая концентрация микробов в суспензии после концентрирования составляла не менее 150 млрд м.к./мл.

Движущей силой при тангенциальной фильтрации микробной суспензии является перепад давлений, который создается насосными агрегатами установки. В установке АСФ-009 используется перистальтический насос, а установка АСФ-020 оснащена высокопроизводительным герметичным центробежным насосом. Следует также учитывать, что гидродинамические характеристики мембранного оборудования способны оказывать воздействие на микробные клетки и влиять на их жизнеспособность в процессе концентрирования [11]. В связи с этим дальнейшие исследования целесообразно было направить на сравнительное изучение влияния конструктивных особенностей мембранных установок на показатели, характеризующие качество полуфабрикатов и готовых препаратов. В микробных культурах оценивали содержание клеток (живых и делящихся) и анализировали параметры их линейных размеров. Для определения морфологических показателей чумного микроба штамма EV использовали микроскопические методы исследований [7, 12]. Полученные результаты приведены в табл. 1.

Результаты исследований показали, что содержание живых и делящихся микробных клеток в нативной культуре выше, чем в микробном концентрате. Этот факт объясняется дефицитом питательного субстрата, возникшим в результате концентрирования клеток способом микрофльтрации [3, 7, 12].

Содержание живых клеток в микробных суспен-

Таблица 1 / Table 1

Характеристика морфометрических показателей клеток *Y. pestis* штамма EV до и после концентрирования ($\bar{X} \pm I_{95}$, n=5)
Morphometric parameters of *Y. pestis* EV strain cells before and after concentration ($\bar{X} \pm I_{95}$, n=5)

Исследуемая культура Tested culture		Содержание клеток, % Cell content, %		Линейные размеры клеток, мкм Linear dimension of cells, μ m	
		живых live cells	делящихся dividing cells	длина length	диаметр diameter
Микробная культура, выращенная в реакторе БИОР-0,25 Microbial culture cultivated in BIOR-0.25 reactor		94,8 \pm 1,7	7,0 \pm 3,9	1,81 \pm 0,09	0,75 \pm 0,04
Микробная суспензия, полученная методом Microbial suspension obtained using the method	регламентным routine	83,1 \pm 3,3	4,3 \pm 2,2	1,78 \pm 0,12	0,73 \pm 0,04
	усовершенствованным improved	90,5 \pm 4,5	4,2 \pm 2,6	1,75 \pm 0,10	0,68 \pm 0,03

зиях оставалось достаточно высоким и практически не зависело от метода концентрирования. Линейные размеры микробных клеток в нативной культуре незначительно отличались от размеров клеток в концентрированных микробных суспензиях.

Важным является исследование тестирования бактериальной популяции воздействием специфической литической добавки ДСН. Нарастание лизиса клеток за счет солюбилизации белково-липидных комплексов их мембран свидетельствует о наличии в суспензии бактерий с нарушенной защитной функцией оболочек, неустойчивых к «технологическому стрессу» на последующих стадиях приготовления вакцины. Этот метод позволяет судить об изменении состояния клеток под воздействием «стрессовых» факторов на этапах производства чумной вакцины [8]. Результаты показаны в табл. 2.

Представленные в табл. 2 результаты свидетельствуют, что прогнозируемая устойчивость клеток чумного микроба штамма EV к неблагоприятным факторам концентрирования на двух установках не имеет существенных различий.

На заключительном этапе экспериментальной работы нами приготовлены образцы вакцины чумной живой, таблетки для рассасывания, и проведена сравнительная оценка показателей качества препаратов на соответствие требованиям нормативной документации. Результаты проведенных исследований представлены в табл. 3.

Результаты исследований показали, что вакцина чумная живая, таблетки для рассасывания, произведенная по усовершенствованной технологии, отвечает требованиям нормативной документации и сохраняет свои свойства по истечении срока годности (1 год). При этом полученный препарат имеет лучшие показатели по содержанию живых микробов и микробиологической чистоте.

Такую разницу в количестве живых микробов в таблетке можно объяснить существенным сокращением продолжительности (с 21 ч до 5 ч) усовершенствованного этапа концентрирования. В свою очередь содержание непатогенных микроорганизмов в вакцине снижается за счет уменьшения числа технологических операций (с трех до одной) при получении

Таблица 2 / Table 2

Сравнительная оценка показателей устойчивости клеток *Y. pestis* штамма EV к технологическим факторам при различных методах концентрирования

Comparative assessment of the resistance of *Y. pestis* EV strain cells to technological factors when using different concentration methods

Исследуемый показатель качества, единица измерения The studied quality indicator, unit of measurement	Микробная суспензия, полученная методом Microbial suspension obtained by the method	
	регламентным routine	усовершенствованным improved
Общее содержание микробных клеток, млрд м.к./мл Total content of microbial cells, bln mc/ml	150,0	150,0
Содержание живых микробных клеток, млрд ж. м.к./мл Content of live microbial cells, bln live mc/ml	118,9	120,3
Резистентность клеток к воздействию ДСН, соответствующая концентрации детергента, вызывающего 50 % лизис клеток в суспензии, моль Cell resistance to SDS, matching the concentration of detergent that causes 50% cell lysis in suspension, mol	5,6	5,7
Прогнозируемая (расчетная) устойчивость бактерий, % Predicted (calculated) resistance of bacteria, %	56,8	57,1

Примечание: в таблице представлены данные средней величины трех измерений.

Note: the table presents the median values of three measurements.

Таблица 3 / Table 3

Характеристика основных показателей качества образцов вакцины чумной живой, таблетки для рассасывания ($\bar{X} \pm I_{95}$, n=5)Quality indicators for orodispersible plague live vaccine tablets ($\bar{X} \pm I_{95}$, n=5)

Наименование показателя качества, единица измерения Quality indicator, unit of measurement	Требования нормативной документации Requirements of normative documentation	Результаты оценки вакцины, полученной по технологии Results of assessment of the vaccine obtained through method			
		регламентной routine		усовершенствованной improved	
		на момент приготовления at the moment of preparation	по истечении срока годности (1 год) upon expiration date (1 year)	на момент приготовления at the moment of preparation	по истечении срока годности (1 год) upon expiration date (1 year)
Распадаемость Disintegration	Таблетка должна распадаться в течение 15 мин The tablet must be dispersed within 15 minutes term	13,9±0,9	14,1±0,7	13,2±0,8	13,6±0,8
Средняя масса, г Average mass	От 0,6 до 1,0 Ranging 0,6–1,0	0,823±0,05	0,922±0,04	0,892±0,03	0,91±0,02
Истираемость таблеток, % Friability of tablets, %	3,0, не более 3,0, but not more	2,0	2,1	2,0	2,1
pH растворенного препарата, ед. pH pH of the dissolved preparation, pH units	От 6,8 до 7,4 Ranging 6,8–7,4	6,9	6,9	6,9	6,9
Потеря в массе при высушивании, % Mass loss on drying	10,0, не более 10,0, not more	6,5±0,2	6,6±0,2	6,4±0,2	6,5±0,2
Микробиологическая чистота Microbiological purity	Таблетка может содержать не более $1 \cdot 10^3$ м.к. непатогенных микроорганизмов Tablet can contain $\leq 1 \cdot 10^3$ microbe cells of non-pathogenic microorganisms	185±21	174±21	155±25	139±25
Специфическая безопасность Specific safety	Вакцина должна быть специфически безопасной Vaccine must be specifically safe	Вакцина специфически безопасна Vaccine is specifically safe			
Содержание живых микробных клеток в таблетке, млрд ж. м.к. Content of live microbial cells in a tablet, bln live microbe cells	От 30 до 50 Ranging 30–50	40,3±6,2	38,1±1,8	47,8±6,3	45,8±5,3
Иммуногенность Immunogenicity	ED ₅₀ для морских свинок не должна превышать $1 \cdot 10^4$ ж. м.к. ID ₅₀ for Guinea pigs should not exceed $1 \cdot 10^4$ live microbe cells	4238	4165	3694	3856
	ED ₅₀ для белых мышей не должна превышать $4 \cdot 10^4$ ж. м.к. ID ₅₀ for white mice should not exceed $1 \cdot 10^4$ live microbe cells	10366	10488	9968	10124

нии требуемой концентрации микробных клеток.

Одной из наиболее значимых характеристик любого производства, позволяющей оценить эффективность технологии, как в целом, так и по отдельным стадиям, является материальный баланс [9].

Результаты сравнительной оценки материального баланса на этапе приготовления концентрированной микробной суспензии в производстве вакцины чумной живой, таблетки для рассасывания, представлены в табл. 4. Приготовленный из 1 л нативной культуры чумного микроба штамма EV объем концентрата при использовании АСФ-020 достигал величины 0,13 л. Данный показатель в три раза превысил объем получаемого продукта по сравнению с регламентной технологией. Продолжительность процесса концентрирования сократилась до 5 ч. Выход готовой формы препарата за один производственный

цикл увеличился с 3376 до 10124 человеко-доз.

Сравнительное изучение морфометрических свойств и устойчивости культур *Y. pestis* штамма EV к экстремальным факторам концентрирования по регламентной и усовершенствованной технологии не выявило существенных отличий. Показано, что чумная вакцина в форме таблетки для рассасывания, приготовленная из концентратов микробных клеток, полученных на установке АСФ-020, удовлетворяет требованиям нормативной документации и сохраняет свои свойства на протяжении срока годности. При этом она имела более высокие показатели по содержанию живых микробов и микробиологической чистоте. Проведенные исследования позволили реализовать данные технологические решения на стадии концентрирования микробной взвеси в производстве вакцины чумной живой, таблетки для рассасывания.

Таблица 4 / Table 4

Результаты сравнительной оценки материального баланса в технологии вакцины чумной живой таблетки для рассасывания, с использованием различных методов приготовления концентрированной микробной суспензии

Comparative evaluation of material balance in live plague vaccine technology using various methods for preparing concentrated microbial suspension

Методы концентрирования, продолжительность Methods for concentrating, duration	Нативная культура Native culture				Концентрированная микробная суспензия Concentrated microbial suspension				Фильтрат Filtrate				Потери микробной культуры Losses of microbial culture		Суммарные потери на стадии, % Cumulative losses at the stage, %	Выход полуфабриката на стадии, % Yield of semi finished product at the stage, %	Вакцинная взвесь, мл Vaccin suspension, ml	Лифолизат, г Lyophilizate, g	Таблетки, шт. (доз) Tablets, pcs (dozes)
	Объем, л Volume, l	Концентрация клеток, м.к./мл Concentration, microbe cells/ml	Общее содержание клеток, м.к. Total content of cells, microbe cells	Исходное содержание клеток, % Initial content of cells, %	Объем, л Volume, l	Концентрация клеток, м.к./мл Concentration, microbe cells/ml	Общее содержание клеток, м.к. Total content of cells, microbe cells	Содержание клеток от исходного, % Content of cells from initial content, %	Объем, л Volume, l	Концентрация клеток, м.к./мл Concentration, microbe cells/ml	Общее содержание клеток, м.к. Total content of cells, microbe cells	Содержание клеток от исходного, % Content of cells from initial content, %	В коммуникациях, % In communications, %	Проба на лабораторный контроль, % Laboratory control sample, %	22,9	25,7	11250	1688	3376
Регламентный, 21 ч Routine, 21 h	175,0	$25,0 \cdot 10^9$	$437,5 \cdot 10^{13}$	100	7,5	$15,0 \cdot 10^{10}$	$112,5 \cdot 10^{13}$	25,7	167,5	$17,6 \cdot 10^9$	$291,2 \cdot 10^{12}$	66,6	4,7	3,0					
Усовершенствованный, 5 ч Improved, 5 h					22,5	$15,0 \cdot 10^{10}$	$337,5 \cdot 10^{13}$	77,1	152,5	-	-	-	19,9	3,0	22,9	77,1	33750	5062	10124

Примечание: «>» – микробные клетки отсутствуют.

Note: «>» – absence of microbial cells.

Усовершенствование процесса концентрирования позволило увеличить выход микробной взвеси с единицы объема нативной культуры чумного микроба в три раза, сократить продолжительность технологической стадии в четыре раза и увеличить количество таблеток (человеко-доз) в одной производственной серии в три раза.

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

Список литературы

1. Микшис Н.И., Кутырев В.В. Современное состояние проблемы разработки вакцин для специфической профилактики чумы. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2019; 1:50–63. DOI: 10.21055/0370-1069-2019-1-50-63.
2. Воробьев А.А., Лебединский В.А. Массовые способы иммунизации. М.: Медицина; 1977. 255 с.
3. Лещенко А.А., Тетерин В.В., Лазыкин А.Г., Ежов А.В., Мохов Д.А., Бирюков В.В., Багин С.В., Логвинов С.В. Экспериментальное обоснование возможности получения концентрата микробных клеток штамма *Yersinia pestis* EV методом микрофилтрации. *Биопрепараты*. 2014; 1:31–5.
4. Комиссаров А.В., Никифоров А.К., Алешина Ю.А., Еремин С.А., Васин Ю.Г., Клокова О.Д., Белякова Н.И., Крайнова А.Г. Способ концентрирования нативных холероген-анатоксина и О-антигена *Vibrio cholerae* O1 классического биовара штамма 569 в серовара Инаба. Патент РФ № 2451522 C1, опубл. 27.05.2012. Бюл. № 15.
5. Комиссаров А.В., Еремин С.А., Ульянов А.Ю., Алешина Ю.А., Никифоров А.К., Васин Ю.Г., Клокова О.Д., Белякова Н.И. Разработка экспериментальной технологии концентрирования протективных антигенов штамма *Vibrio cholerae* 569B Инаба методом тангенциальной ультрафилтрации. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2011; 3:75–7. DOI: 0.21055/0370-1069-2011-3(109)-75-77.
6. Мембранные кассетные модули. ЗАО «Владисарт» – российский производитель фильтрационного оборудования на основе мембран разных видов. [Электронный ресурс]. URL: <https://vladisart.ru/products/filtruyschie-elementy/filtr-mkm.html>. (дата обращения 20.08.2020).
7. Ежов А.В., Садовой И.Н., Бирюков В.В., Мохов Д.А., Багин С.В., Чернядьев А.В., Коротышев О.В., Тетерин В.В. Возможность использования метода микрофилтрации в технологии вакцины чумной живой сухой. В кн.: Материалы Всероссийской научной конференции «Диагностика, лечение и профилактика опасных и особо опасных инфекционных заболеваний. Биотехнология». Киров: ФГУ «48 ЦНИИ Минобороны России»; 2008. Вып. 1. С. 313–6.
8. Дунашева Т.Ю., Серебрякова Е.В., Ежов А.В., Тетерин В.В. Способ прогнозирования устойчивости клеток чумного микроба штамма EV к лиофилизации. Патент РФ № 2380420 C2, опубл. 27.01.2010. Бюл. № 3.
9. Краснюк И.И., Михайлова Г.В., редакторы. Практикум по технологии лекарственных форм. М.: Академия; 2007. 432 с.
10. Лакин Г.Ф. Биометрия. М.: Высшая школа; 1990. 351 с.
11. Ураков Н.Н., Волков В.Я., Боровик Р.В. Функциональное состояние и механизмы повреждения микроорганизмов в процессе приготовления бактериальных препаратов. *Биотехнология*. 1988; 4(4):420–32.
12. Фихман Б.А. Микробиологическая рефрактометрия. М.: Медицина; 1967. 280 с.

References

1. Mikshis N.I., Kutyrev V.V. [Current State of the Problem of Vaccine Development for Specific Prophylaxis of Plague]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2019; 1:50–63. DOI: 10.21055/0370-1069-2019-1-50-63.
2. Vorobiev A.A., Lebedinsky V.A. [Mass methods of immunization]. Moscow: Medicine; 1977. 255 p.
3. Leshchenko A.A., Teterin V.V., Lazykin A.G., Ezhov A.V., Mokhov D.A., Biryukov V.V., Bagin S.V., Logvinov S.V. [Experimental substantiation of the possibility of obtaining a concentrate of *Y. pestis* EV strain cells by microfiltration]. *Biopreparaty [Biological products]*. 2014; 1:31–5.
4. Komissarov A.V., Nikiforov A.K., Aleshina Yu.A., Eremin S.A., Vasin Yu.G., Klokova O.D., Belyakova N.I., Krainova A.G. [Method for concentration of native cholero-gen-anatoxin and O-antigen of *Vibrio cholerae* O1, classical biovar, Inaba serovar 569 b strain]. RF Patent No. 2451522 C1. Publ. 27.05.2012. Bulletin No. 15.
5. Komissarov A.V., Eremin S.A., Ul'yanov A.Yu., Aleshina Yu.A., Nikiforov A.K., Vasin Yu.G., Klokova O.D., Belyakova N.I. [Development of the Experimental Technology for Protective Antigens of *Vibrio cholerae* 569B Inaba Concentration by Means of Tangential Ultrafiltration]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2011; 3:75–7. DOI: 0.21055/0370-1069-2011-3(109)-75-77.
6. Membrane cassette modules. CJSC “Vladisart” – the Russian producer of filtration equipment based on different types of membranes. (Cited 20 Aug 2020). [Internet]. Available from: <https://vladisart.ru/products/filtruyschie-elementy/filtr-mkm.html>.
7. Ezhov A.V., Sadovoy I.N., Biryukov V.V., Mokhov D.A., Bagin S.V., Chernyad'yev A.V., Korotyshev O.V., Teterin V.V. [The possibility of using the microfiltration method in the live dry plague vaccine technology]. In: [Proceedings of the All-Russian Scientific Conference “Diagnostics, Treatment and Prevention of Dangerous and Especially Dangerous Infectious Diseases. Biotechnology”]. Kirov: FSI “48 Central Research Institute of the Ministry of Defense of Russia”; 2008. Issue 1. P. 313–6.
8. Dunyasheva T.Yu., Serebryakova E.V., Ezhov A.V., Teterin V.V. [Method for predicting the resistance of *Y. pestis* EV strain cells to lyophilization]. RF Patent No. 2380420 C2. Publ. 27.01.2010. Bulletin No. 3.
9. Krasnyuk I.I., Mikhailova G.V., editors. [Practice on the Technology of Medicinal Forms]. M.: “Academy”; 2007. 432 p.
10. Lakin G.F. [Biometrics]. M.: “High School”; 1990. 351 p.
11. Urakov N.N., Volkov V.Ya., Borovik R.V. [Functional condition and mechanisms of microbial damage in the process of bacterial preparation production]. *Biotechnologiya. [Biotechnology]*. 1988; 4(4):420–432.
12. Fikhman B.A. [Microbiological Refractometry]. M.: “Meditsina”; 1967. 280 p.

Authors:

Sharov D.A., Leshchenko A.A., Bagin S.V., Logvinov S.V., Mokhov D.A., Ezhov A.V., Lazykin A.G., Krupin V.V., Kosenkov I.V. Affiliated Branch of the “48” Central Research Institute” of the Ministry of Defense of the Russian Federation. 119, Oktyabrsky Avenue, Kirov, 610000, Russian Federation. E-mail: NIC48CNII@mail.ru.

Об авторах:

Шаров Д.А., Лещенко А.А., Багин С.В., Логвинов С.В., Мохов Д.А., Ежов А.В., Лазыкин А.Г., Крупин В.В., Косенков И.В. Филиал ФГБУ «48 Центральный научно-исследовательский институт» Министерства обороны Российской Федерации. Российская Федерация, 610000, Киров, Октябрьский проспект, 119. E-mail: NIC48CNII@mail.ru.