

DOI: 10.21055/0370-1069-2021-1-152-155

УДК 616.932:615.371

А.Ю. Ульянов, О.Д. Клокова, О.В. Громова, В.Р. Вольников, О.А. Волох, А.К. Никифоров

## ПУТИ СНИЖЕНИЯ КОНТАМИНАЦИИ НА ЭТАПАХ ПРОИЗВОДСТВА ХОЛЕРНОЙ ХИМИЧЕСКОЙ ТАБЛЕТИРОВАННОЙ ВАКЦИНЫ

ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов, Российская Федерация

**Цель работы** – оценка степени контаминации холерной химической вакцины на этапах приготовления и определение путей ее снижения. **Материалы и методы.** В работе использовали жидкие и лиофилизированные компоненты холерной химической вакцины: холероген-анатоксин и О-антигены штаммов *Vibrio cholerae* 569B и *Vibrio cholerae* M-41, а также вспомогательные вещества (сахароза, тальк, кальция стеарат, крахмал). Гранулирование осуществляли на аппарате, работающем по принципу псевдоожиженного слоя, GPCG 2 фирмы GLATT (Германия). Последующее таблетирование смеси проводили с помощью пресса MiniTabT фирмы LUXNER (Германия). Проведены исследования по оценке показателя «микробиологическая чистота» на стадиях изготовления холерной химической вакцины, таблеток, покрытых кишечнорастворимой оболочкой. Наличие или отсутствие роста микроорганизмов на чашках Петри с питательными средами оценивали визуально. **Результаты и обсуждение.** Выявлена динамика изменения микробной загрязненности на отдельных технологических стадиях производства вакцины. Показано, что растворы антигенов в процессе выделения подвержены микробной контаминации, что связано с использованием при осаждении антигенов сульфата аммония и нестерильной воды на стадии диализа. Стерильность полуфабрикатов достигалась двухэтапной фильтрацией холерогена-анатоксина и стерилизацией О-антигенов *V. cholerae* 569B и *V. cholerae* M-41 текучим паром при  $(100 \pm 1)^\circ\text{C}$  в течение 30 мин. Для снижения микробной контаминации на технологической стадии гранулирования установлены дополнительные фильтры тонкой очистки в системе подачи воздуха. Далее провели сравнительное определение микробиологической чистоты серий вакцины, полученных методами прямого прессования и с предварительным гранулированием. Экспериментально показано, что применение гранулирования компонентов таблеточной смеси холерной вакцины приводит к снижению уровня бактериальной контаминации и улучшает показатели микробиологической чистоты в готовой лекарственной форме.

**Ключевые слова:** холерная химическая вакцина, технология, таблетка, контаминация, микробиологическая чистота.

Корреспондирующий автор: Ульянов Александр Юрьевич, e-mail: rusrapi@microbe.ru.

Для цитирования: Ульянов А.Ю., Клокова О.Д., Громова О.В., Вольников В.Р., Волох О.А., Никифоров А.К. Пути снижения контаминации на этапах производства холерной химической таблетированной вакцины. Проблемы особо опасных инфекций. 2021; 1:152–155. DOI: 10.21055/0370-1069-2021-1-152-155. Поступила 04.09.2018. Отправлена на доработку 18.01.2019. Принята к публ. 17.07.2020.

A.Yu. Ul'yanov, O.D. Klokov, O.V. Gromova, V.R. Vol'nikov, O.A. Volokh, A.K. Nikiforov

## Ways to Reduce the Level of Contamination at the Stages of Tableted Chemical Cholera Vaccine Production

Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov, Russian Federation

**Abstract. Objective** of the study was an assessment of the degree of contamination of cholera chemical vaccine at the stages of preparation and determination of the ways to reduce it. **Materials and methods.** Liquid and lyophilized components of the cholera chemical vaccine used in the study: cholero-gen-anatoxin and O-antigens of *Vibrio cholerae* 569B and *V. cholerae* M-41 strains, as well as auxiliary substances (sucrose, talc, calcium stearate, starch). Granulation was carried out in a device that works on a fluidized bed principle, GPCG 2 (GLATT, Germany). Subsequent tabletting of the mixture was performed using MiniTabT compression machine (LUXNER, Germany). Studies were conducted on the evaluation of "microbiological purity" at the stages of manufacturing of the cholera chemical vaccine, tablets coated with an enteric coating. Positive or negative growth of microorganisms on Petri dishes with nutrient media was determined on visual inspection. **Results and conclusions.** The dynamics of changes in microbial contamination at certain technological stages of vaccine production has been revealed. It is shown that the solutions of antigens in the process of separation are subject to microbial contamination which is associated with the use of ammonium sulfate during precipitation and non-sterile water at the stage of dialysis. Sterility of semi-finished products has been achieved through two-phase filtration of cholero-gen-anatoxin and sterilization of O-antigens of *V. cholerae* 569B and *V. cholerae* M-41 strains with flowing steam at  $(100 \pm 1)^\circ\text{C}$  for 30 minutes. In order to decrease microbial contamination at the stage of granulation additional fine filters were installed in the air-supply system. Further on comparative assessment of microbial purity of vaccine batches obtained using both, direct compression and preliminary granulation, was carried out. It has been experimentally demonstrated that granulation of the components of a tablet mixture of cholera vaccine leads to a decrease in the level of bacterial contamination and improves the microbiological purity of the finished dosage form.

**Key words:** chemical cholera vaccine, technology, tablet, contamination, microbiological purity.

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

**Corresponding author:** Alexander Yu. Ul'yanov, e-mail: rusrapi@microbe.ru.

Citation: Ul'yanov A.Yu., Klokov O.D., Gromova O.V., Vol'nikov V.R., Volokh O.A., Nikiforov A.K. Ways to Reduce the Level of Contamination at the Stages of Tableted Chemical Cholera Vaccine Production. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2021; 1:152–155. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2021-1-152-155

Received 04.09.2018. Revised 18.01.2019. Accepted 17.07.2020.

Ul'yanov A.Yu., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6933-8278>  
Klokov O.D., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7119-0516>  
Gromova O.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0172-2964>

Vol'nikov V.R., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0791-895X>  
Volokh O.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3044-971X>  
Nikiforov A.K., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1130-3504>

В связи с эпидемиологической ситуацией по холере в России и в мире существует необходимость ее специфической профилактики [1–4]. В 2001 г. в России вакцинация против холеры включена в календарь профилактических прививок по эпидемическим показаниям (приказ Минздрава России от 27.07.2001 № 229). Холерная химическая вакцина, разработанная в РосНИПЧИ «Микроб» и лицензированная на территории России, представляет собой смесь лиофилизированных холерогена-анатоксина и О-антигенов, полученных из инактивированных формалином бульонных культур холерных вибрионов О1 серогруппы, – *Vibrio cholerae* 569В классического биовара серовара Инаба и *V. cholerae* М-41 классического биовара серовара Огава [5].

Процесс приготовления холерной химической вакцины является сложным и многостадийным. На первом этапе проводится культивирование штаммов *V. cholerae* с целью получения антигенов; далее следует выделение иммуногенов; стерилизация жидких специфических антигенов; получение лиофильно высушенных антигенных фракций; стерилизация и смешивание компонентов таблеточной смеси, таблетирование путем прямого прессования или с предварительным гранулированием, покрытие таблетки кишечнорастворимой оболочкой согласно нормативной документации на вакцину. В качестве вспомогательных веществ используются следующие наполнители: сахароза, крахмал, тальк, кальций стеарат. В качестве кишечнорастворимой оболочки использовали ацетилфталилцеллюлозу.

Многостадийность технологии производства и многокомпонентность таблеток вакцины обуславливают возможность контаминации препарата посторонней микрофлорой, что требует контроля на каждой стадии, уменьшение рисков контаминации вакцины позволит улучшить ее качество [6, 7]. Решение проблемы микробиологической чистоты таблеточной смеси на этапах получения готовой лекарственной формы вакцины является актуальным [8].

**Целью** данной работы явилась оценка степени контаминации вакцины на этапах приготовления и определение путей ее снижения.

### Материалы и методы

В работе использовали жидкие и лиофилизированные компоненты холерной химической вакцины: холероген-анатоксин и О-антигены, полученные из инактивированных формалином бульонных культур холерных вибрионов *V. cholerae* 569 В классического биовара серовара Инаба и *V. cholerae* М-41 О1 серо-

группы классического биовара серовара Огава; в качестве вспомогательных веществ применяли сахарозу, тальк, кальция стеарат, крахмал картофельный.

Гранулирование компонентов вакцины проводили на грануляторе, работающем по принципу псевдоожиженного слоя, GPCG 2 фирмы GLATT (Германия). Таблетирование осуществляли на таблеточном прессе MiniTabT (Германия).

Оценку качества вакцины по показателю «микробиологическая чистота» осуществляли в соответствии с ГФ XIV [9]. Микробиологическую чистоту определяли в смеси, приготовленной при растирании в ступке 5 таблеток вакцины в 20 мл 0,9 % раствора натрия хлорида. Полученную смесь в количестве по 0,2 мл высевали на 5 чашек Петри с мясопептонным агаром, содержащим (4±1) % крови и 10 чашек с мясопептонным агаром. 1 мл смеси высевали в 50 мл 10 % желчного бульона. Посевы выдерживали в течение 48 ч при температуре (37±1) °С. Через 48 ч пробы с желчного бульона в количестве 0,2 мл высевали на 5 чашек Петри с агаром Эндо и выдерживали в течение 48 ч при (37±1) °С. Наличие или отсутствие роста микроорганизмов на чашках Петри с питательными средами оценивали визуально.

### Результаты и обсуждение

Оценка степени контаминации антигенов и вспомогательных материалов на этапах приготовления вакцины до и после стерилизации стала первым этапом нашей работы. Согласно способу получения пероральной химической вакцины стерилизацию термостабильного О-антигена перед сублимацией проводили текучим паром при (100±1) °С в течение 30 мин, а холерогена-анатоксина – стерилизующей фильтрацией. В лиофилизированных фракциях определяли содержание антигенов и конструировали таблетки. Предварительно вспомогательные вещества (сахар, крахмал, тальк) стерилизовали во флаконах объемом 200 мл в сухожаровом шкафу при температуре (120±2) °С в течение 20 мин.

На анализ брали количество вещества, эквивалентное одной таблетке вакцины. В результате определения количества условно-патогенных микроорганизмов в образцах вспомогательного сырья (сахароза, крахмал, тальк, кальция стеарат) выявлена низкая микробная загрязненность компонентов (наибольшее количество КОЕ содержали образцы сахарозы – (78±7)). Обработка вспомогательного сырья в сухожаровом шкафу при температуре (120±2) °С в течение 20 мин приводила к получению стерильных образцов.

В большей степени контаминации были подвержены растворы антигенов в процессе выделения, что связано с использованием на стадии осаждения нестерильного сульфата аммония и нестерильной воды на стадии диализа. Так, образцы холерогена-анатоксина до стадии стерилизации содержали  $(740 \pm 28)$  КОЕ условно-патогенных микроорганизмов, образцы О-антигенов Инаба и Огава –  $(348 \pm 20)$  КОЕ. Следует отметить, что разработанные методы стерилизации растворов антигенов, в том числе двухэтапная фильтрация холерогена-анатоксина, приводят к получению стерильных полуфабрикатов. Таким образом, антигены вакцины и вспомогательные компоненты к процессу таблетирования были стерильны.

Далее нами изготовлены серии вакцины с использованием метода прямого прессования и предварительного гранулирования для получения таблеток. В соответствии с нормативной документацией во время технологического процесса смеситель, гранулятор, вибропривод, таблеточный пресс и установку для нанесения покрытия на таблетки обрабатывали 96° спиртом. После таблетирования производили нанесение ацидорезистентного покрытия в дражировочном котле.

В процессе приготовления таблеток методом прямого прессования в смеситель помещали сначала вспомогательные компоненты вакцины и тщательно перемешивали в течение 15 мин. Далее прибавляли небольшими порциями 2,5 % раствор крахмального клейстера при постоянном перемешивании. После этого к смеси добавляли специфические компоненты (лиофилизированные холероген-анатоксин и О-антигены Инаба и Огава) в рассчитанных количествах и тщательно перемешивали в течение 10–15 мин. Полученную смесь высушивали в термостате, периодически перемешивая в течение 30–60 мин при температуре  $(35 \pm 2)$  °С, затем смесь таблетировали. Результаты определения бактериальной контаминации пяти серий готовой лекарственной формы, полученной методом прямого прессования, показали, что количество КОЕ непатогенной микрофлоры в среднем составляло  $(187,2 \pm 15)$  на таблетку. В соответствии с установленными требованиями в готовой лекарственной форме не допускается наличие патогенной микрофлоры и регламентируется наличие непатогенной микрофлоры (не более  $1 \cdot 10^3$  колоний) [9].

Далее были изготовлены пять серий вакцины с предварительным гранулированием компонентов. Приготовление гранул проводили на аппарате GPCG 2 LabSystem, в котором процесс гранулирования материалов производится методом псевдооживленного слоя с подачей связующего вещества сверху [10]. Как известно из литературы [6], на стадии гранулирования фактором риска является подача нестерильного воздуха. Для снижения микробной контаминации на данной технологической стадии установили дополнительные фильтры тонкой очист-

ки в системе подачи воздуха и проводили обработку спиртом фильтра для таблеточной смеси гранулятора. Далее определяли микробиологическую чистоту полученных серий. Результаты определения бактериальной контаминации пяти серий готовой лекарственной формы, полученной методом предварительного гранулирования, показали, что количество КОЕ непатогенной микрофлоры в среднем составляло  $(112,8 \pm 12)$ .

В результате проведенной работы показано, что таблетки вакцины, полученные методом предварительного гранулирования компонентов таблеточной смеси, имеют значительно лучшие показатели микробиологической чистоты. Установка дополнительных фильтров тонкой очистки в системе подачи воздуха на данной технологической стадии привела к снижению уровня бактериальной контаминации таблеток.

Таким образом, введение дополнительного оборудования в технологическую схему получения вакцины не привело к повышению микробиологического загрязнения. Точное выполнение методов стерилизации, улучшение технологических схем получения препарата позволяют получать иммунобиологические лекарственные препараты надлежащего качества.

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

### Список литературы

1. Онищенко Г.Г., Дроздов И.Г. Актуальные аспекты проблемы противодействия биологической опасности. *Вестник Российской академии медицинских наук*. 2004; 5:14–20.
2. Longini I.M. Jr., Nizam A., Ali M., Yunus M., Shenvi N., Clemens J.D. Controlling endemic cholera with oral vaccines. *PLOS Med.* 2007; 4(11):e336. DOI: 10.1371/journal.pmed.0040336.
3. Cholera vaccines: WHO position paper. *Wkly Epidemiol. Rec.* 2010; 85(13):117–28.
4. Горяев А.А., Саяпина Л.В., Обухов Ю.И., Бондарев В.П. Эффективность и безопасность вакцин для профилактики холеры. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2018; 18(1):42–9. DOI: 10.30895/2221-996X-2018-18-1-42-49.
5. Кутырев В.В., Щуковская Т.Н. Холерные вакцины. В кн.: Вакцины и вакцинация: национальное руководство. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2011. С. 431–45.
6. Туманов А.С., Тетерин В.В., Лещенко А.А., Ежов А.В., Бирюков В.В., Багин С.В., Мохов Д.А., Логвинов С.В., Лазыкин А.Г., Белобородов Д.С., Бредихин В.Н., Поздняков И.В. Пути снижения контаминации таблетированной чумной живой вакцины на этапах ее производства. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2016; 1:102–5. DOI: 10.21055/0370-1069-2016-1-102-105.
7. Шуб Т.А., Каграманова К.А., Кивман Г.Я., Бухарцева Е.В., Гунар О.В., Николаенко Н.С. Пути контаминации нестерильных лекарственных средств. *Химико-фармацевтический журнал*. 1991; 25(12):45–7.
8. Суханова С.М., Бердникова З.Е., Захарова Н.Е., Меркулов В.А. Испытание на стерильность иммунобиологических лекарственных препаратов в России. История вопроса и современные требования. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2018; 18(1):5–15. DOI: 10.30895/2221-996X-2018-18-1-5-15.
9. Государственная фармакопея Российской Федерации. МЗ РФ. XIV изд. Т. 4. [Электронный ресурс]. URL: [http://resource.rucml.ru/feml/pharmacopria/14\\_4/HTML/index.html](http://resource.rucml.ru/feml/pharmacopria/14_4/HTML/index.html) (дата обращения 18.12.2018).
10. Белявская В.А., Ромашева Н.Г., Сорокулова И.Б., Ильичев А.А., Нестеров А.Н., Колосов А.В., Подкуйко В.В., Михайлов В.В. Разработка технологии получения таблеточной формы препарата субалин. *Биотехнология*. 2001; 2:64–9.

## References

1. Onishchenko G.G., Drozdov I.G. [Relevant aspects of the issue of countering biological hazards]. *Vestnik Rossiyskoy Akademii Meditsinskikh Nauk [Bulletin of the Russian Academy of Medical Sciences]*. 2004; 5:14–20.
2. Longini I.M. Jr., Nizam A., Ali M., Yunus M., Shenvi N., Clemens J.D. Controlling endemic cholera with oral vaccines. *PLOS Med.* 2007; 4(11):e336. DOI: 10.1371/journal.pmed.0040336.
3. Cholera vaccines: WHO position paper. *Wkly Epidemiol. Rec.* 2010; 85(13):117–28.
4. Goryaev A.A., Sayapina L.V., Obukhov Yu.I., Bondarev V.P. [Efficacy and safety of vaccines for cholera prevention]. *BIOpreparaty. Profilaktika, Diagnostika, Lechenie [BIOPreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment]*. 2018; 18(1):42–9. DOI: 10.30895/2221-996-X-2018-18-1-42-49.
5. Kutyrev V.V., Shchukovskaya T.N. [Cholera vaccines]. In: [Vaccines and Vaccination: National Guidelines]. Moscow: “GEOTAR-Media”; 2011. P. 431–45.
6. Tumanov A.S., Teterin V.V., Leshchenko A.A., Yezhov A.V., Biryukov V.V., Bagin S.V., Mokhov D.A., Logvinov S.V., Lazykin A.G., Beloborodov D.S., Bredikhin V.N., Pozdnyakov I.V. [Ways to reduce contamination of tableted live plague vaccine at the stages of its production]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2016; 1:102–5. DOI: 10.21055/0370-1069-2016-1-102-105.
7. Shub T.A., Kagramanova K.A., Kivman G.Ya., Bukhartseva E.V., Gunar O.V., Nikolaenko N.S. [Ways of contamination of non-sterile drugs]. *Khimiko-Farmatsevtichesky Zhurnal [Pharmaceutical Chemistry Journal]*. 1991; 25 (12):45–7.
8. Sukhanova S.M., Berdnikova Z.E., Zakharova N.E., Merkulov V.A. [Sterility testing of immunobiological drugs in Russia. History of the issue and modern requirements]. *BIOpreparaty. Profilaktika, Diagnostika, Lechenie [BIOPreparations. Prevention, diagnosis, treatment]*. 2018; 18(1):5–15. DOI: 10.30895/2221-996-X-2018-18-1-5-15.
9. [State Pharmacopoeia of the Russian Federation. Ministry of Health of the Russian Federation]. XIV ed. Vol. 4. (Cited: December 18, 2018). [Internet]. Available from: [http://resource.rucml.ru/feml/pharmacopia/14\\_4/HTML/index.html](http://resource.rucml.ru/feml/pharmacopia/14_4/HTML/index.html).
10. Belyavskaya V.A., Romasheva N.G., Sorokulova I.B., Il'ichev A.A., Nesterov A.N., Kolosov A.V., Podkuiko V.V., Mikhailov V.V. [Development of a technology for obtaining a tableted form of the drug Subalin]. *Biotehnologiya [Biotechnology]*. 2001; 2:64–9.

## Authors:

Ul'yanov A.Yu., Kloko O.D., Gromova O.V., Vol'nikov V.R., Volokh O.A., Nikiforov A.K. Russian Research Anti-Plague Institute “Microbe”. 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russian Federation. E-mail: [rusrapi@microbe.ru](mailto:rusrapi@microbe.ru).

## Об авторах:

Ульянов А.Ю., Клокова О.Д., Громова О.В., Вольников В.Р., Волох О.А., Никифоров А.К. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». Российская Федерация, 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: [rusrapi@microbe.ru](mailto:rusrapi@microbe.ru).