

А.В.Комиссаров, М.В.Овчинникова, С.А.Бадарин, Д.Н.Бибиков, Н.В.Синицына, Н.И.Костылева,
И.А.Плотников

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ОБОСНОВАНИЕ НОВОЙ ФОРМЫ ВЫПУСКА ХОЛЕРНЫХ ДИАГНОСТИЧЕСКИХ СЫВОРОТОК

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

Цель исследования: экспериментальное обоснование возможности производства новой формы выпуска холерных диагностических сывороток – лиофилизат во флаконах. **Материалы и методы.** Холерные диагностические сыворотки. Лيوфилизацию проводили на установке Martin Christ Epsilon 2-6D. Остаточную влажность сухих сывороток определяли с использованием влагомера Sartorius MA 150. Определение растворимости экспериментальных образцов проводили визуально. pH определяли потенциометрически с использованием измерителя pH/ОВП/концентрации ионов/проводимости/концентрации PK SevenExcellence-475 Mettler Toledo. Специфическую активность и специфичность определяли в развернутой реакции агглютинации, используя соответствующие контрольные штаммы холерного вибриона. **Результаты и выводы.** Экспериментально обоснована возможность сублимационного высушивания холерных диагностических сывороток во флаконах. Определены оптимальные параметры лиофилизации. Установлено, что лиофилизация не приводит к ухудшению свойств холерных диагностических сывороток, так как по показателям качества они соответствуют требованиям нормативной документации. С использованием теста ускоренного старения показано, что новая форма выпуска холерных диагностических сывороток – лиофилизат во флаконах – сохраняет их специфическую активность в течение пяти лет (установленный срок годности), что полностью соответствует требованиям нормативной документации.

Ключевые слова: холерные диагностические сыворотки, лиофилизат, флаконы, стабильность.

Корреспондирующий автор: Комиссаров Александр Владимирович, e-mail: rusrapi@microbe.ru.

A.V.Komissarov, M.V.Ovchinnikova, S.A.Badarin, D.N.Bibikov, N.V.Sinitsyna, N.I.Kostyleva, I.A.Plotnikov

Experimental Substantiation of New Presentation Form of Cholera Diagnostic Sera

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

Objective of the study is experimental substantiation of possibility to produce new presentation form of cholera diagnostic sera – lyophilizate in bottles. **Materials and methods.** Cholera diagnostic sera. Lyophilization was performed in Martin Christ Epsilon 2-6D. Residual moisture of dry sera was determined using humidity meter Sartorius MA 150. Solubility of experimental samples was assessed visually. pH was evaluated by potentiometry with the help of PK SevenExcellence-475 Mettler Toledo device, measuring pH/ORP/Ion content/conductivity/concentration. Specific activity and specificity was analyzed through expanded agglutination reaction, using relevant control strains of cholera vibrio. **Results and conclusions.** Experimentally justified is the possibility to lyophilize cholera diagnostic sera in flasks. Specified are the optimum parameters of lyophilization. It is determined that lyophilization does not result in deterioration of properties, as judging by the quality indicators they meet the requirements of regulatory documentation. Using accelerated aging test, it is demonstrated that the new presentation form of cholera diagnostic sera – lyophilizate in flasks – maintains their specific activity within five years term (the set out shelf life), which fully conform to normative standards.

Key words: cholera diagnostic sera, lyophilizate, flasks, stability.

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

Funding: The authors received no specific funding for this work.

Corresponding author: Alexander V. Komissarov, e-mail: rusrapi@microbe.ru.

Citation: Komissarov A.V., Ovchinnikova M.V., Badarin S.A., Bibikov D.N., Sinitsyna N.V., Kostyleva N.I., Plotnikov I.A. Experimental Substantiation of New Presentation Form of Cholera Diagnostic Sera. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2017; 4:38–40. (In Russ.). DOI: 10.21055/0370-1069-2017-4-38-40

В РосНИПЧИ «Микроб» для идентификации *Vibrio cholerae* O1 серогруппы производятся пять наименований диагностических холерных сывороток для постановки реакции агглютинации: сыворотка диагностическая холерная O1 адсорбированная сухая, сыворотки диагностические холерные Огава и Инаба адсорбированные сухие, сыворотка диагностическая холерная RO адсорбированная сухая, сыворотка диагностическая холерная не O1 группы O139. Данные медицинские изделия производятся в лиофилизированной форме в ампулах.

Существующая технология предусматривает, в том числе, выполнение следующих технологических операций: замораживание разлитого в ампулы препарата в низкотемпературном холодильнике; перенос замороженного материала на полки сублимационной установки; непосредственно лиофилизация; герметизация ампул их запаиванием с использованием горючих газов (пропана, бутана, кислорода).

Во время выполнения вышеперечисленных стадий производственного процесса не исключено возникновение ситуаций, ухудшающих качество конеч-

ного продукта. Так, во время переноса замороженного материала на полки сублимационной установки может произойти его частичное оттаивание, приводящее к развитию коллапса и снижению активности сухого биопрепарата. При выгрузке ампул после лиофилизации и в процессе их запаивания может произойти контаминация образцов. При применении горючих газов для герметизации ампул, в случае их неконтролируемого выхода в производственные помещения, существует риск отравления персонала и возможного взрыва.

Предотвратить появление подобных ситуаций представляется возможным разработкой технологии лиофилизации холерных диагностических сывороток во флаконах на сублимационном сушильном оборудовании, позволяющем производить операции замораживания препарата и герметизации первичной упаковки непосредственно в камере лиофилизатора. Современный рынок предлагает достаточно широкий спектр такого оборудования [4].

Все вышеперечисленное определило перспективность экспериментального обоснования новой формы выпуска холерных диагностических сывороток в лиофилизированной форме во флаконах.

Материалы и методы

Лиофилизация экспериментальных образцов проводилась на сублимационной сушильной установке Martin Christ Epsilon 2-6D (Германия). Препараты четырех наименований сывороток разливали по 1 мл в пенициллиновые флаконы вместимостью 10 мл, закрывали специальными колпачками для лиофилизации и замораживали до минус 50 °С в камере сублимационной установки. Нагрев препаратов осуществляли таким образом, чтобы в процессе сушки показатель LyoRx, характеризующий электрическое сопротивление материала и контролируемый средствами измерения сушильной установки, не превышал 96–97 %. Данный методический прием успешно апробирован при оптимизации процесса сушки иммуногенов холерной химической вакцины [2]. Одновременно производили препараты по традиционной технологии.

Остаточную влажность определяли с использованием влагомера Sartorius MA 150 (Германия). Растворимость экспериментальных образцов оценивали визуально. Определение pH проводили потенциометрическим методом с помощью измерителя pH/ОВП/концентрации ионов/проводимости/концентрации РК SevenExcellence-475 Mettler Toledo. Специфическую активность и специфичность оценивали в развернутой реакции агглютинации, используя контрольные тест-штампы холерного вибриона. Растворимость лиофилизатов определяли путем растворения в 1 мл очищенной воды при встряхивании ампулы или флакона.

Для подтверждения срока годности экспериментальных образцов препаратов требованиям норма-

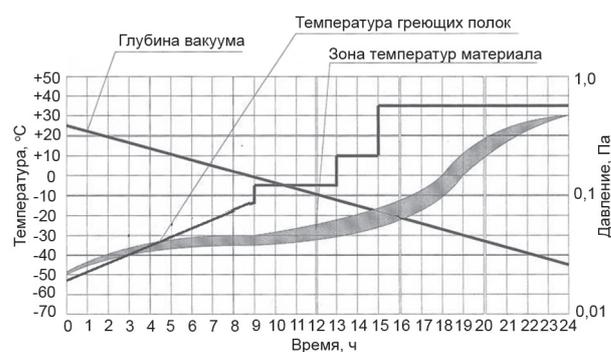
тивной документации применяли метод ускоренного старения, заключающийся в выдерживании испытуемого препарата при температурах, превышающих более чем на 10 °С температуру его хранения [3]. Данный метод успешно применен для установления срока годности отраслевого стандартного образца активности вакцины против краснухи [5] и стабилизированной формы альфа-интерферона [1].

Результаты и обсуждение

В результате проведенных исследований по лиофилизации препаратов во флаконах определены параметры технологического процесса, показанные на рисунке. Выявлено отсутствие необходимости стадии досушивания (выдерживания материала при температуре 25–30 °С) в силу того, что высушенные препараты имели остаточную влажность от 0,4 до 0,8 % (при норме не более 2 %). Это приводило к снижению продолжительности процесса до 5 ч в сравнении с регламентной технологией.

Проведенный контроль основных характеристик диагностических холерных сывороток, изготовленных по традиционной и предлагаемой технологиям, выявил их подобие (таблица). Установлено, что растворимость лиофилизатов во флаконах не превышала 30 с (норма не более 10 мин). Кроме того следует отметить, что значения таких контролируемых показателей, как специфическая активность и pH аналогичны у всех четырех препаратов до и после их лиофилизации.

Соответствие срока годности экспериментальных образцов препаратов требованиям нормативной документации устанавливали, применяя метод ускоренного старения, при этом сыворотки выдерживали при температурах 37, 50 и 65 °С. Срок наблюдения составлял 30 сут. При хранении всех сывороток при температуре 37 °С снижения специфической активности не зафиксировано. Выдержка препаратов при температуре 50 °С выявила, что значение исследуемого показателя на 30-е сутки составляло 90 % от исходного. Хранение сывороток при температуре 65 °С дало следующие результаты: на 25-е сутки активность у всех препаратов снизилась на 10 %, на 30-е сутки зафиксировано снижение данного показателя



Режим высушивания

Сравнительная характеристика основных контролируемых показателей диагностических холерных сывороток, изготовленных по традиционной и предлагаемой технологии

Наименование препарата	Контролируемые показатели производственных серий			Контролируемые показатели экспериментальных серий		
	Специфическая активность, величина обратная разведению	pH	Потеря в массе при высушивании, %	Специфическая активность, величина обратная разведению	pH	Потеря в массе при высушивании, %
Сыворотка диагностическая холерная O1 адсорбированная сухая, для реакции агглютинации	≥1600 / 2000	7,2–8,8 / 8,4±0,2	≤2,0 / 0,64±0,2	≥1600 / 2000	7,2–8,8 / 8,5±0,3	≤2,0 / 0,8±0,1
Сыворотка диагностическая холерная RO адсорбированная сухая, для реакции агглютинации	≥800 / 1600	7,2–8,8 / 8,6±0,1	≤2,0 / 0,39±0,2	≥800 / 1600	7,2–8,8 / 8,5±0,2	≤2,0 / 0,42±0,2
Сыворотка диагностическая холерная Огава адсорбированная сухая, для реакции агглютинации	≥400 / 800	7,2–8,8 / 8,5±0,2	≤2,0 / 0,55±0,3	≥400 / 800	7,2–8,8 / 8,5±0,2	≤2,0 / 0,6±0,2
Сыворотка диагностическая холерная Инаба адсорбированная сухая, для реакции агглютинации	≥400 / 800	7,2–8,8 / 8,4±0,1	≤2,0 / 0,54±0,1	≥400 / 800	7,2–8,8 / 8,3±0,1	≤2,0 / 0,55±0,3

Примечание. В числителе приведены нормируемые значения показателей, в знаменателе – результаты контроля.

у сывороток O1 и RO до 70 % и у сывороток Инаба и Огава до 80 %.

По полученным данным, в соответствии с алгоритмом, предложенным Петуховым В.Г. [1], вычислили константы скорости инактивации K_T для каждого из препаратов, значения которых составили: для сывороток диагностических холерных O1 и RO – $4,57 \cdot 10^{-6}$; для сывороток диагностических холерных Огава и Инаба – $4,44 \cdot 10^{-6}$.

На заключительном этапе определили время хранения препаратов по формуле:

$$t = 2,303 \frac{\log \frac{100}{99}}{K_T}$$

где t – время хранения препаратов, K_T – скорость инактивации.

При допуске снижении активности не более чем на 1 % предполагаемое время хранения составило: для сывороток диагностических холерных O1 и RO – 2177 дней или 5,96 года; для сывороток диагностических холерных Огава и Инаба – 2263 дней или 6,2 года.

Учитывая, что нормируемый срок хранения каждой из сывороток составляет 5 лет, можно говорить о том, что примененные технологические процедуры позволяют получать препараты, соответствующие требованиям нормативных документов.

Таким образом, в результате проведенных исследований экспериментально обоснована новая форма выпуска холерных диагностических сывороток – лиофилизат во флаконах, проверена стабильность их свойств в тесте ускоренного старения, что позволяет приступить к этапу технических испытаний препаратов.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Губайдуллина А.А., Бобкова Е.В., Мелентьев А.И. Метод ускоренного старения для прогнозирования срока годности стабилизированной формы альфа-интерферона. *Труды БГУ.* 2010; 4(2):1–6.
2. Комиссаров А.В., Кочкалова Н.Н., Синицына Н.В., Бадарин С.А., Костылева Н.И., Волох О.А., Клокова О.Д., Никифоров А.К. Исследование процесса сублимационного высушивания иммуногенов холерной химической вакцины. *Пробл. особо опасных инф.* 2016; 1:90–3. DOI: 10.21055/0307-1069-2016-1-90-93.
3. Петухов В.Г. Определение стабильности стандартных образцов ускоренным методом. *Биопрепараты. Профилактикт., диагн., лечение.* 2006; 4:5–8.
4. Технология лиофилизации – наука, искусство и люди, или как добиться безупречной лиофилизации. *Фармацевтические технологии и упаковка.* 2010; 4:72–3.
5. Юнаслова Т.Н., Фадейкина О.В., Сидоренко Е.С., Суханова С.М., Шитикова О.Ю., Саркисян К.А., Ильясова Т.Н., Бинятова А.С., Терешкина Н.В., Устинникова О.Б., Волкова Р.А., Мовсесянц А.А., Шведов Д.В. Разработка и изучение отраслевого стандартного образца активности вакцины против краснухи. *Биопрепараты. Профилактикт., диагн., лечение.* 2015; 3(55):49–53.

References

1. Gubaidullina A.A., Bobkova E.V., Melent'ev A.I. [Method of accelerated aging for forecasting date of expiry of stabilized alfa-interferon]. *Works of Belorussian State University.* 2010; 4(2):1–6.
2. Komissarov A.V., Kochkalova N.N., Sinitsyna N.V., Badarin S.A., Kostyleva N.I., Volokh O.A., Kloikova O.D., Nikiforov A.K. [Studies of freeze-drying of cholera chemical vaccine immunogens]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2016; 1:90–3. DOI: 10.21055/0307-1069-2016-1-90-93.
3. Petukhov V.G. [Determination of stability of standard samples using acceleration method]. *Biopreparaty. Profilakt. Diagnost. Lechenie.* 2006; 4:5–8.
4. [Lyophilization technology – science, art and people, or how to achieve flawless lyophilization]. *Farmatsevt. Tekhnol. i Upakovka.* 2010; 4:72–3.
5. Yunasova T.N., Fadeikina O.V., Sidorenko E.S., Sukhanova S.M., Shitikova O.Yu., Sarkisyan K.A., Ilyasova T.N., Binyatova A.S., Tereshkina N.V., Ustinnikova O.B., Volkova R.A., Movsesyants A.A., Shvedov D.V. [Development and studies of departmental standard sample of rubella vaccine activity]. *Biopreparaty. Profilakt. Diagnost. Lechenie.* 2015; 3(55):49–53.

Authors:

Komissarov A.V., Ovchinnikova M.V., Badarin S.A., Bibikov D.N., Sinitsyna N.V., Kostyleva N.I., Plotnikov I.A. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russian Federation. E-mail: rusrapi@microbe.ru.

Об авторах:

Комиссаров А.В., Овчинникова М.В., Бадарин С.А., Бибииков Д.Н., Синицына Н.В., Костылева Н.И., Плотников И.А. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». Российская Федерация, 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrapi@microbe.ru.

Поступила 05.04.17.