

Д.А.Будыка, Н.В.Абзаева, Г.Ф.Иванова, С.Е.Гостищева, А.А.Фисун, Л.В.Ляпустина

## СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ СЕРИЙ ВАКЦИНЫ ЧУМНОЙ ЖИВОЙ ПО ПОКАЗАТЕЛЯМ ЖИЗНЕСПОСОБНОСТИ И ТЕРМОСТАБИЛЬНОСТИ

ФГУЗ «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт»

Проведено сравнительное изучение регламентированных показателей (жизнеспособность, термостабильность) препаратов вакцины чумной живой, изготовленных по различным биотехнологическим схемам производства. Показано, что комбинация оптимальной температуры выращивания биомассы штамма *Yersinia pestis* EV ( $21 \pm 1$ ) °С и оптимального соотношения концентрации микробной взвеси и стабилизатора в суспензии с уменьшенной оптической плотностью и объемом способствует эффективному удалению из препарата влаги, что в итоге стабилизирует показатель жизнеспособности микробных клеток (м.к.) в процессе хранения.

**Ключевые слова:** чумная живая вакцина, жизнеспособность, термостабильность, температура выращивания, количественные параметры.

Применяемые при производстве живой чумной вакцины технологические приемы оказывают значительное влияние на жизнеспособность микробных клеток вакцинного штамма *Y. pestis* EV. Количество жизнеспособных микроорганизмов в процессе лиофилизации и хранения зависит от многих факторов: условий культивирования, фаз роста, концентрации в суспензии, используемой защитной среды, технологии высушивания, температуры, сроков хранения и способов выведения клеток из анабиоза [2].

Биотехнология производства чумной вакцины основана на температуре культивирования биомассы ( $27 \pm 1$ ) °С [7]. Однако согласно литературным данным [1], температура выращивания чумного микроба 20–25 °С стимулирует биологическую активность возбудителя чумы, что может значительно улучшить качество вакцины за счет увеличения в биомассе процента живых микробных клеток. Ранее проведенные опыты по отработке температурных режимов культивирования биомассы в биотехнологии производства вакцины чумной живой при ( $21 \pm 1$ ) °С в сравнении с регламентированной ( $27 \pm 1$ ) °С показали, что температура выращивания существенно влияет на количество жизнеспособных микробных клеток в готовом препарате. При этом температура выступает как фактор, влияющий на биосинтетические процессы в цитоплазматических мембранах клеток за счет увеличения содержания ненасыщенных жирных кислот, накопление которых в мембранах клеток способствует их большей устойчивости к лиофилизации [4, 5].

Вместе с тем экспериментально доказано, что вакцина с целенаправленно уменьшенной концентрацией микробных клеток в суспензии обладает качественными характеристиками (жизнеспособность, термостабильность, содержание живых микробов в человекодозе), превосходящими стандартные коммерческие образцы [2, 3, 6]. Это происходит вследствие более сбалансированного соотношения микробных клеток и защитной среды, а также возможности достичь в регламентированных пределах состояния более глубокого анабиоза живых клеток при лиофилизации за счет уменьшения объема суспензии

вакцины с 2,0 до 1,0 мл в ампуле. В настоящее время разработана и внедрена вакцина чумная живая с содержанием от 20 до 50 человекодоз в ампуле, полностью соответствующая требованиям регламента производства данного препарата [3].

### Материалы и методы

Экспериментальные образцы вакцины чумной живой были приготовлены при сочетанном воздействии на микробные клетки штамма *Y. pestis* EV обоих указанных выше факторов: температурных и количественных.

Изучены показатели жизнеспособности и термостабильности экспериментальных образцов препарата, полученных при температуре культивирования биомассы ( $21 \pm 1$ ) °С, имеющих различную концентрацию суспензии (около 20 и 80 млрд м.к./мл) и объем в ампуле (1,0 и 2,0 мл соответственно). Для контроля параллельно проверяли показатели образцов, полученных при регламентированной температуре выращивания ( $27 \pm 1$ ) °С с аналогичными параметрами оптической концентрации и объема суспензии.

Жизнеспособность и термостабильность микробов определяли культуральным методом [7]. Вакцину выращивали одномоментно на одной серии агара Хоттингера (рН 7,1±0,1), что исключило влияние ростовых качеств питательной среды на отдельные образцы препарата. В полученных сериях вакцины определяли жизнеспособность микробных клеток во время розлива и после сушки, а также в процессе хранения (в течение 2 лет) при температуре ( $4 \pm 2$ ) °С.

### Результаты и обсуждение

В результате проведенных исследований установлено, что температура выращивания вакцинного штамма оказывает существенное влияние на показатели жизнеспособности биомассы даже до этапа лиофильного высушивания, а жизнеспособность препарата, выращенного при ( $21 \pm 1$ ) °С, практически во всех образцах превосходит таковую у вакцины,

Жизнеспособность вакцины чумной живой, полученной при различных температурных условиях и количественно-объемных параметров до и после этапа лиофильного высушивания

Количество определений	Жизнеспособность, %			
	Оптическая концентрация 20 млрд/мл, объем в ампуле 1 мл		Оптическая концентрация 80 млрд/мл, объем в ампуле 2 мл	
	до лиофилизации	после лиофилизации	до лиофилизации	после лиофилизации
<i>Выращена при (27±1) °С</i>				
3	36,4±2,1	26,8±3,0	46,4±0,3	28,1±0,9
3	43,1±0,8	30,8±2,6	41,3±1,4	30,6±3,1
M±m	39,8±3,3	28,8±2,0	43,8±2,6	29,4±1,3
<i>Выращена при (21±1) °С</i>				
3	67,0±3,7	43,8±4,8	42,7±0,9	36,1±1,7
3	48,1±1,3	35,2±2,6	62,3±2,4	53,4±4,8
3	54,3±3,9	49,2±7,3	-	-
3	50,1±1,7	37,7±3,5	-	-
3	46,6±2,2	38,4±3,0	-	-
3	52,9±1,1	46,1±2,0	-	-
M±m	53,2±3,0	41,7±2,2	52,9±9,8	44,8±8,7
t	3,0	4,3	0,9	1,8

Примечание. Прочерк – оптическая концентрация не определялась.

выращенной при (27±1) °С, оставаясь более высокой и после сушки (табл. 1).

Отдельного внимания заслуживает анализ показателей жизнеспособности образцов в зависимости от количественных параметров вакцины в ампуле. В пределах каждой группы (по температуре выращивания) существенной разницы в жизнеспособности готовых образцов не отмечается. В то же время при сравнительном анализе сходных по параметрам образцов вакцины между группами с различными температурами культивирования суспензии, четко регистрируется преимущество вакцин, выращенных при (21±1) °С, особенно у образцов со сниженной концентрацией микробных клеток и объемом суспензии в ампуле (t=4,3).

Сравнительная характеристика жизнеспособности образцов чумной вакцины в процессе длительного (2 года) хранения при температуре (4±2) °С показала, что во все сроки исследования этот показатель был выше у вакцины, выращенной при (21±1) °С. При этом уровень жизнеспособности в экспериментальных сериях даже через два года хранения превышал показатель в 35 %, а в контрольных образцах в те же сроки он не достигал даже регламентированной нормы в 25 %.

Следует особо отметить, что у исследованных образцов экспериментальной вакцины, приготовленной со снижением концентрации и объема суспензии в ампуле, во все сроки наблюдения разница в показателях жизнеспособности была существенно выше, чем у регламентированных аналогов (табл. 2).

Помимо анализа жизнеспособности, были проведены исследования по сравнительному изучению термостабильности для экспериментальных (21±1) °С и

контрольных (27±1) °С образцов живой чумной вакцины, имеющих концентрацию 19–21 млрд м.к./мл и разлитых по 1 мл в ампулу. В целом показатель термостабильности оказался выше у вакцины, полученной при температуре культивирования (21±1) °С, составляя в среднем 11 сут, а у некоторых образцов он достигал величины 14,3 сут на фоне более высоких показателей биологической концентрации. При этом у (27±1) °С аналогов показатель термостабильности находился в пределах 10 сут.

Для дополнительной объективизации полученных данных по динамике жизнеспособности микробных клеток изучаемых образцов вакцины в процессе хранения представляло интерес определение этих же показателей под влиянием длительного воздействия повышенной температуры.

В условиях длительного экстремального температурного воздействия в процессе хранения образцов при температуре (37±1) °С в течение 30 сут жизнеспособность микробных клеток в исследуемых препаратах уменьшалась. Динамика изменений представлена на рисунке.

В целом серии, полученные при температуре культивирования (21±1) °С, обнаруживали большую устойчивость к температурному стрессовому фактору, причем наиболее устойчивыми оказались образцы с меньшей концентрацией и объемом суспензии в ампуле, которые также имели меньшие показатели потери в массе при высушивании (1,6 % против 2,7 % – у контрольных). Динамика отмирания живых микробов в вакцине при экстремальных условиях (хранение при (37±1) °С коррелирует с изменением процента живых микробов в процессе длительного хранения при (4±2) °С. При этом на 20-е сутки хра-

Анализ жизнеспособности вакцины чумной живой, полученной при различных условиях культивирования из разной оптической концентрации микробной суспензии, в процессе хранения при (4±2) °С

Количество определений	Жизнеспособность, %					
	Оптическая концентрация 20 млрд/мл, объем в ампуле 1 мл			Оптическая концентрация 80 млрд/мл, объем в ампуле 2 мл		
	после сушки	через 1 год	через 2 года	после сушки	через 1 год	через 2 года
<i>Выращена при (27±1) °С</i>						
3	26,8±3,0	24,3±0,8	24,2±1,2	28,1±0,9	24,4±1,2	24,1±1,6
3	30,8±2,6	30,2±0,3	25,0±1,3	30,6±3,1	25,2±1,6	24,7±3,4
M±m	28,8±2,0	27,3±3,0	24,6±0,4	29,4±1,3	24,8±0,4	24,4±0,3
<i>Выращена при (21±1) °С</i>						
3	35,2±2,6	32,4±1,2	30,1±2,4	36,1±1,7	34,3±0,6	29,3±3,6
3	49,2±7,3	43,6±3,9	39,8±0,8	53,4±4,8	44,5±2,2	42,9±1,3
3	43,8±4,8	40,2±0,5	36,6±2,2	-	-	-
3	37,7±3,5	35,8±1,9	29,1±1,2	-	-	-
3	38,4±3,0	38,1±1,6	35,2±0,7	-	-	-
3	46,1±2,0	45,0±4,1	40,9±1,8	-	-	-
M±m	41,7±2,2	39,2±1,9	35,3±2,0	44,8±8,7	39,4±5,1	36,1±6,8
t	4,3	3,4	5,2	1,8	2,9	1,7

Примечание. Прочерк – оптическая концентрация не определялась.

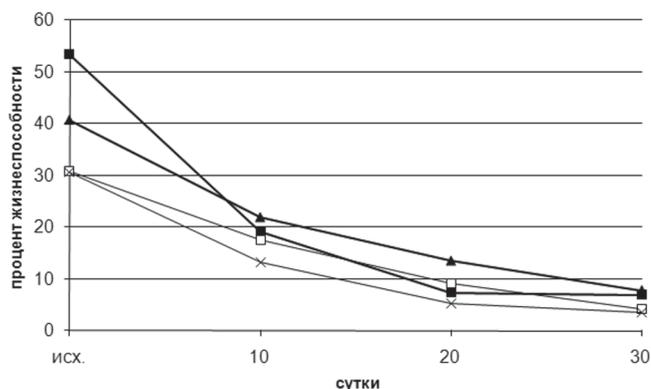
нения при (37±1) °С происходит закономерное снижение количества живых микробных клеток в образцах, что сравнимо с уменьшением жизнеспособности через 1 год хранения вакцины в условиях соблюдения «холодовой цепи». На 30-е сутки нахождения образцов в экстремальных условиях жизнеспособность клеток еще более снижается, но при этом четко прослеживается тенденция большей устойчивости к отмиранию микробных клеток в образцах вакцины, полученных при температуре культивирования (21±1) °С по сравнению с (27±1) °С образцами, что соответствует большей устойчивости и при длительном хранении вакцины при (4±2) °С в течение 2 лет.

Таким образом, полученные результаты показали, что температура культивирования вакцинного штамма *Y. pestis* EV, как и изменение концентрации

и объема суспензии в ампуле, оказывают большое влияние на такие качественные показатели готового препарата, как жизнеспособность и термостабильность. Наилучших результатов в биотехнологии производства чумной живой вакцины удается достичь при сочетанном воздействии на микробную суспензию оптимальных температурных и количественных параметров.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Алутин И.М. Влияние температуры окружающей среды на биологическую активность возбудителя чумы [автореф. дис. ... канд. мед. наук]. Саратов; 1974. 19 с.
2. Будыка Д.А. Научно-методические основы совершенствования живой чумной вакцины [дис. ... д-ра мед. наук]. Ставрополь; 2002. 279 с.
3. Ефременко А.А. Разработка биотехнологии вакцины чумной живой сухой со сниженным количеством члвководоз в производственной упаковке (ампуле) [дис. ... канд. мед. наук]. Ставрополь; 2005. 117 с.
4. Иванова Г.Ф., Будыка Д.А., Гюлушанян К.С., Руднев С.М. Оптимизация температурных режимов выращивания бактериальной массы в технологии производства чумной вакцины В кн.: Вторая междунар. конф., посв. 75-летию института им. Пастера: Идеи Пастера в борьбе с инфекциями. СПб; 1998. С. 47.
5. Иванова Г.Ф., Будыка Д.А., Абзаева Н.В. Сравнительное изучение эффективности противочумных вакцин, полученных из биомасс, выращенных при (21±1) °С. В кн.: Фундаментальные исследования в биологии и медицине: Сб. научных трудов. Федеральное агентство по оборудованию. СГУ. Ставрополь; 2007. С. 186–8.
6. Тинкер А.И., Будыка Д.А., Верховцева Г.Н., Печников Н.Е. Опыт производственного приготовления живой чумной вакцины со сниженным показателем оптической плотности и оценка ее термостабильности. В кн.: Актуальные вопросы профилактики опасных инфекционных заболеваний: Тез. докл. межведомственной науч. конф.; 26–28 марта 1991. Киров; 1991. С. 38–40.
7. Фармакопейная статья предприятия ФСП 42-8654-07 «Вакцина чумная живая, лиофилизат для приготовления суспензии для инъекций, накожного скарификационного нанесения и ингаляций».



Динамика отмирания живых микробов в чумной вакцине, полученной при различных сочетаниях биологических и количественных параметров:

▲ – 22 °С, 1 мл; ■ – 22 °С, 2 мл; □ – 28 °С, 1 мл; × – 28 °С, 2 мл

**Об авторах:**

Будыка Д.А., Абзаева Н.В., Иванова Г.Ф., Гостищева С.Е., Фисун А.А., Ляпустина Л.В. Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт. 355035, Ставрополь, ул. Советская, 13–15. E-mail: admnip@mail.stv.ru

D.A.Budyka, N.V.Abzaeva, G.F.Ivanova, S.E.Gostischeva, A.A.Fissun, L.V.Lyapustina

**Comparative Analysis of Experimental Series of Plague Live Vaccine as for Viability and Thermostability Indices**

*Stavropol Research Anti-Plague Institute*

Comparative analysis of specified indices (viability, thermostability) of plague live vaccine preparations, produced in accordance with different

biotechnological production schemes, have been carried out. Shown is that the combination of optimal temperature for *Yersinia pestis* strain EV biomass propagation ( $21 \pm 1$ ) °C as well as optimal concentration proportion of bacteria and stabilizer in suspension with decreased optical density and volume facilitates effectual moisture removal out of preparation, thus stabilizing microbial cells viability index in the process of storage.

Key words: plague live vaccine, viability, thermostability, propagation temperature, quantitative parameters.

**Authors:**

*Budyka D.A., Abzaeva N.V., Ivanova G.F., Gostischeva S.E., Fissun A.A., Lyapustina L.V.* Stavropol Anti-Plague Research Institute. 355035, Stavropol, Sovetskaya St., 13–15.

Поступила 14.05.09.