УДК 579.24:579 842,23

**С.Е. Гостищева, Л.С. Катунина, А.А. Курилова, Н.В. Абзаева, Ю.С. Ковтун, Н.В. Жаринова, О.А. Коняева, Е.Б. Жилченко, А.Н. Куличенко**

**Применение плотной питательной среды на основе гидролизата кукурузного экстракта сгущенного в производстве вакцины чумной живой и для хранения штаммов чумного микроба**

*ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора, Ставрополь, Российская Федерация*

**Цель исследования** – разработка плотной питательной среды на основе ферментативного гидролизата кукурузного экстракта для использования в производстве вакцины чумной живой и хранения на ней штаммов возбудителя чумы. **Материалы и методы.** Вакцинный и вирулентные штаммы *Yersinia pestis*, питательные среды для накопления и хранения. Исследуемые параметры изучались согласно нормативной документации. **Результаты и выводы.** Разработана питательная среда на основе ферментативного гидролизата кукурузного экстракта сгущенного с ростостимулирующими добавками – солью Мора и натрием сернистокислым. Изучены ее физико-химические и биологические свойства. Апробация среды в производственной лаборатории показала ее высокую продуктивность и возможность применения в промышленном выпуске вакцины чумной живой – получены серии препарата с оптической концентрацией 100 млрд/мл и жизнеспособностью 68,2±0,9 %. Применение данной среды позволяет повысить выход биомассы и снизить себестоимость конечной продукции. Подтверждена возможность хранения на разработанной среде вирулентных штаммов возбудителя чумы при температуре (4±2) ºС в течение 18 месяцев, без снижения жизнеспособности культуры.

*Ключевые слова:* питательные среды, чумной микроб, гидролизат кукурузного экстракта сгущенного.

Периодическая активизация природных очагов чумы на территории Российской Федерации создает риск возникновения эпизоотий, что может способствовать осложнению эпидемиологической ситуации. В основе специфической профилактики чумы в нашей стране – иммунизация живой вакциной из штамма *Yersinia pestis* EV линии НИИЭГ. В настоящее время эта вакцина остается наиболее эффективным и единственным лицензированным профилактическим противочумным препаратом в России. Важным ее преимуществом является способность после однократной прививки относительно быстро индуцировать специфический иммунитет против основных форм (бубонная и легочная) чумной инфекции. Вакцина обеспечивает у привитых развитие иммунитета продолжительностью до 1 года, иммунизацию проводят по эпидемическим показаниям.

Препарат вакцины чумной живой выпускается на базе ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора согласно Промышленному регламенту ПР 01897080-09-16, в соответствии с его технологическими этапами (стадии). Сохраняемая актуальность совершенствования различных этапов изготовления препарата при неизменности основных биотехнологических стадий. Одна из главных задач - повышение выхода биомассы вакцинного штамма.

В производстве вакцины чумной живой велико значение качества питательных сред, их ростовых свойств, зависящих от используемых компонентов и состава используемого сырья. В настоящее время в качестве основы питательных сред для культивирования чумного микроба применяют гидролизат Хоттингера из говяжьего мяса при этом в последнее время отмечается снижение ростовых свойств этих сред. Возможной причиной может быть негативное влияние антибиотиков и гормонов в мясе. При культивировании бактерий на средах, приготовленных из таких питательных основ, наблюдается снижение скорости роста биомассы. Кроме того мясо является относительно дорогим сырьем. Таким образом, проблема совершенствования питательных основ и сред, используемых в производстве чумной вакцины, сохраняет свое значение.

Актуальность работ в данном направлении обусловлена также очевидной заинтересованностью как производителя, так и потребителя в снижении себестоимости готового препарата с сохранением или даже улучшением регламентированных параметров качества.

По данным литературы, для получения биомассы в процессе производства экспериментальных и коммерческих серий чумной вакцины предлагались различные среды, приготовленные на питательных основах из мяса, рыбы, казеина, кровяных сгустков, кукурузного экстракта и т.д. [3,4]. Однако, в связи с высокой себестоимостью одних и нестандартностью других, остается востребованным поиск и апробация подходящего для этой цели стандартного и недорогого сырья. Первые данные о возможности использования питательных сред из кукурузного экстракта в производстве чумной вакцины были получены Канчух А.А. еще в 1960-1980 годах [1]. Однако, несмотря на доступность растительных субстратов, они не получили широкого распространения в производстве бакпрепаратов вследствие недостаточных ростовых свойств получаемых из них сред.

На данный момент в промышленном выпуске вакцины чумной живой предусмотрено применение двух сред: агаровой из гидролизата говяжьего мяса по Хоттингеру и кукурузно-казеинового агара, при этом недостатками первой среды является ее дороговизна и нестабильность ростовых свойств, а второй, состоящей из смеси гидролизатов кукурузного экстракта и казеина в отношении 1:2 – сложность и громоздкость приготовления.

В ряде экспериментов показано, что добавление в питательную среду, состоящую из моноосновы – ферментативного гидролизата кукурузного экстракта сгущенного соли Мора в сочетании с натрием сернистокислым повышает ее ростовые свойства [2]. Применение данной композиции стимулирующих рост возбудителя чумы добавок позволит исключить гидролизат казеина из состава среды, что приведет к значительному упрощению технологии изготовления и существенно снизит себестоимость как самой среды, так и препарата чумной вакцины.

**Цель исследования** – разработка плотной питательной среды на основе ферментативного гидролизата кукурузного экстракта сгущенного для использования в производстве вакцины чумной живой и изучение возможности хранения на ней штаммов возбудителя чумы.

**Материалы и методы.** В работе были использованы: вакцинный штамм чумного микроба *Yersinia pestis* EV линии НИИЭГ*,* девять вирулентных штаммов возбудителя чумы из коллекции института – семь штаммов *Y. рestis sybspecies pestis* из Центрально-Кавказского высокогорного и Прикаспийского песчаного природных очагов чумы и два штамма *Y. Pesti sybspecies caucasica* из Восточно-Кавказского высокогорного природного очага. Штаммы проявляли биологические свойства, типичные для основного подвида.

При работе с вирулентными штаммами руководствовались Санитарно-эпидемиологическими правилами СП 1.3.3118-13 «Безопасность работы с микроорганизмами I-II групп патогенности (опасности)».

Экспериментальной питательной средой для выращивания биомассы в процессе производства вакцины чумной живой служила плотная среда на основе ферментативного гидролизата кукурузного экстракта сгущенного – питательный агар (ГКЭС), включающий соль Мора и натрий сернистокислый. При изучении возможности использования среды для хранения вирулентных штаммов чумы готовили «голодный» вариант среды – без вышеуказанных стимуляторов роста.

Питательные основы получали при помощи реактора гидролиза животных белков, рабочий объем 0,25 м3 (ООО «ЮВС», г. Обнинск).

Физико-химические свойства гидролизатов и сред определяли согласно МУК 4.2.2316-08 «Методы контроля бактериологических питательных сред». Биологические показатели качества питательных сред (чувствительность, скорость роста колоний, стабильность культурально-морфологических свойств микроорганизмов) изучали при помощи тест-штамма *Y. рestis* EV в соответствии с МУ 3.3.2.2124-06 «Контроль диагностических питательных сред по биологическим показателям для возбудителей чумы, холеры, сибирской язвы, туляремии, бруцеллеза, легионеллеза».

Из выращенной на экспериментальной питательной среде и средах сравнения в аппарате для культивирования микроорганизмов Шестеренко (АКМ-Ш) (Технолог, Россия) биомассы вакцинного штамма готовили экспериментальные серии вакцины чумной. После смыва с агара биомассу фасовали по 2 мл в ампулы и лиофилизировали на сублимационной установке LР-30 R (IlShin, Южная Корея).

Качество экспериментальных серий вакцины было исследовано по основным показателям: жизнеспособности и термостабильности (бактериологический метод); потере в массе при высушивании (весовой метод) согласно ФСП 42-8654-07. Для сравнения использовали серии препарата, полученные при тех же условиях на агаре Хоттингера и кукурузно-казеиновом агаре.

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 р≤0,05.

**Результаты и обсуждение.**

Авторами был подобран и отработан оптимальный состав питательной среды для выращивания биомассы в процессе производства вакцины чумной живой. В качестве исходного сырья для питательной основы использовали кукурузный экстракт (сгущенный), характеризующийся наличием, в среднем, 9,4 % белка и высоким содержанием азотистых веществ (до 45 %) и углеводов (до 25 %) в сухом остатке. Экстракт богат минеральными веществами, витаминами и аминокислотами. В качестве стимуляторов роста чумного микроба добавляли соль Мора и натрий сернистокислый, а в качестве буферного соединения в состав среды вводили натрий фосфорнокислый 2-замещенный 12-водный – малотоксичные неорганические соединения, обладающие буферным действием в физиологически важном диапазоне рН [3]. Аминный азот в гидролизате кукурузного экстракта (сгущенного) составил 1123±0,2 мг%, сухой остаток – 25,5±1,4 %. Результаты исследования физико-химических показателей разработанной экспериментальной среды в сравнении с регламентированными средами для выращивания биомассы вакцинного штамма чумного микроба представлены в таблице 1.

Таблица 1. Сравнительный анализ свойств питательных сред для культивирования
 *Y*. *pestis* EV

|  |  |
| --- | --- |
| Основные показатели | Питательные среды |
| Кукурузно-казеиновый агар | АгарХоттингера | Питательный агар (ГКЭС)  |
| Основа питательной среды | Ферментативные гидролизаты кукурузного экстракта и казеина (1:2) | Ферментативный гидролизат говяжьегомяса | Ферментативный гидролизат кукурузного экстракта сгущенного |
| рН всреде | 7,1±0,1 | 7,1±0,1 | 7,1±0,1 |
| Аминный азот в гидролизате, мг% | 794±0,3 | 928±0,3 | 1123±0,2 |
| Аминный азот в питательной среде, мг% | 119±3,6 | 120±1,4 | 124±4,5 |
| Сухой остаток в гидролизате, % | 13,7±1,6 | 14,1±1,3 | 25,5±1,4 |
| Сухой остаток в питательной среде, % | 4,0±0,5 | 4,3±0,5 | 4,3±0,6 |
| Хлориды (в пересчете нанатрия хлорид), %  | 0,5±0,1 | 0,5±0,1 | 0,5±0,1 |
| Прочность геля, г | 360,0±10,0 | 350,0±25,0 | 350,0±20,0 |
| Температура плавления, ºС | 85±2,0 | 85±2,0 | 85±2,0 |
| Температура застудневания, ºС | 36±0,5 | 35±0,5 | 35±0,5 |
| Продолжительность плавления, мин | 53±2,0 | 55±2,0 | 52±5,0 |

Проведено комплексное изучение регламентированных показателей качества вакцины чумной, приготовленной из биомассы, выращенной на разработанной среде в условиях производственной лаборатории. Показано,что полученный препарат по всем тестам соответствовал требованиям нормативно-технической документации (табл. 2).

Таблица 2. Сравнительная оценка серий вакцины чумной живой, полученных при использовании изучаемых питательных сред

|  |  |
| --- | --- |
| Основные показатели | Питательные среды |
| Регламентированные параметры | АгарХоттингера | Кукурузно-казеиновый агар | Питательный агар (ГКЭС) |
| Оптическая концентрация, млрд/мл | 50-100 | 80 | 80 | 100 |
| Жизнеспособность, % | не менее 25,0 | 38,1±2,3 | 36,3±2,2 | 68,2±0,9 |
| Термостабильность, сут | не менее 4 | 6,8 | 7,4 | 13,5 |
| Потеря в массе при высушивании, % | не более 4,0 | 1,5 | 1,8 | 1,3 |
| Себестоимость среды(1 л), руб | - | 875 | 580 | 250 |

Питательная среда на ферментативной основе кукурузного экстракта сгущенного обеспечивала сбор биомассы вакцинного штамма *Y. рestis* EV в количестве 110 млрд. м.к. в 1 мл взвеси, что в 1,4 раза выше выхода бакмассы по сравнению с контрольными средами. Процент живых микробных клеток после смыва составил 96,7±2,8 %. После лиофилизации оптическая концентрация снизилась до 100 млрд/мл, а жизнеспособность до 68,2±0,9 %, что выше, по сравнению с контрольными сериями. Показатели термостабильности и потери в массе при высушивании во всех исследуемых образцах соответствовали регламентированным параметрам.

Таким образом, сконструированная плотная питательная среда на основе гидролизата кукурузного экстракта сгущенного (ГКЭС) обеспечивала высокий сбор биомассы вакцинного штамма чумного микроба и, следовательно, может быть рекомендована для его культивирования при изготовлении препарата вакцины чумной живой.

В дальнейших исследованиях изучена возможность использования среды для хранения штаммов возбудителя чумы. В настоящее время для сохранения жизнеспособности микроорганизмов используют агар Хоттингера, приготовленный на ферментативной основе из говяжьего мяса. Пересевы культур при этом проводят не менее 1 раза в 3 месяца.

Для сравнения длительности хранения вирулентных и авирулентных штаммов чумного микроба на плотной питательной среде в пробирки со скошенным агаром ГКЭС и агаром Хоттингера (по 20 пробирок каждой) засевали двухсуточные культуры штаммов *Y. pestis*. Пробирки с посевами запаивали и хранили при температуре (4±2) °С в течение 18 месяцев.

Результаты ежемесячного контроля показали, что по ростовым свойствам агар ГКЭС не уступал агару Хоттингера и все испытуемые штаммы оставались жизнеспособными в течение срока наблюдения, что нельзя сказать о контрольной среде (табл. 3).

Таблица 3. Сравнительный контроль ростовых свойств питательных сред для хранения вирулентных штаммов чумного микроба

|  |  |
| --- | --- |
| Основные показатели | Питательные среды |
| АгарХоттингера | Питательный агар (ГКЭС) |
| Срок сохранения жизнеспособности испытуемых штаммов в пробирках со скошенным агаром при (4±2) °С, мес | 12  | 18  |
| Размер колоний, мм | 1,3±0,2 | 1,5±0,3 |
| Стабильность культурально-морфологических свойств микроорганизмов (число атипичных колоний), % | 0,15±0,03 | 0,14±0,02 |
| Показатель прорастания, % | 64±2,3 | 67±1,4 |
| Культурально-морфологические и биохимические свойства | Без изменений | Без изменений |

Следовательно, предложенная питательная среда может быть использована для хранения рабочих и исследовательских коллекций чумного микроба в лабораториях.

Таким образом, показано, что разработанная среда может успешно использоваться как для культивирования вакцинных и вирулентных штаммов *Y. pestis* с присущими им питательными потребностями, так и при их непродолжительном хранении (1-1,5 года) в коллекциях лабораторий. Использование данной питательной среды в промышленном выпуске чумной вакцины позволит снизить себестоимость конечной продукции.

По результатам проведенной работы составлен пусковой регламент на производство «Питательный агар для культивирования микроорганизмов (ГКЭС)» ПУР № 01897080-34-17, получен патент РФ № 2626568 на изобретение «Питательная среда плотная для культивирования и сбора биомассы чумного микроба вакцинного штамма *Yersinia pestis* EV». На заявку на изобретение «Питательная среда плотная для хранения микроба чумы», приоритет от 28.06.17 г. получено уведомление о положительном решении формальной экспертизы от 24.07.17 г.

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

**Список литературы:**

1. Канчух А.А., Сагатовский В.Н., Сурнина Н.С., Мелехина А.Ф. Изучение живой противочумной вакцины, приготовленной на средах с кукурузным экстрактом. Микробиология и иммунология особо опасных инф. 1964; С. 131-137.

2. Катунина Л.С., Куличенко А.Н., Курилова А.А., Будыка Д.А., Абзаева Н.В., Гостищева С.Е., Ковтун Ю.С., Коготкова О.И., Василенко Е.И., Зуенко А.А., Зимин С.И. Питательная среда плотная для культивирования и сбора биомассы чумного микроба вакцинного штамма *Yersinia pestis* EV. Патент РФ № 2626568, опубл. 28.07.2017.

3. Курилова А.А., Таран Т.В., Катунина Л.С., Головнева С.И. Разработка питательных сред из растительного сырья для культивирования возбудителей особо опасных инфекций. Пробл. особо опасных инф. 2009; 3 (101): 66-68.

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

**References:**

1. Kanchuh A. A., Sagatovsky V. N., Surnina N., Melekhina, A. F. [Study of live anti-plague vaccine prepared on a medium with corn extract]. Microbiology and immunology OsoboOpasn. Infek. 1964; P. 131-137.

2. Katunina L.S., Kulichenko A.N., Kurilova A.A., Budyka D.A., Abzaeva N.V., Gostishcheva S.E., KovtunYu.S., Kogotkova O.I., Vasilenko E.I., Zuenko A.A., Zimin S.I.[The nutrient medium is dense for cultivation and collection of biomass of plague microbe of the vaccine strain Yersinia pestis EV]. RFPatent № 2626568, publ. 28.07.2017.

3. Kurilova A.A., Taran T.V., Katunina L.S., Golovneva S.I. [Development of nutrient media from plant material for the cultivation of pathogens of especially dangerous infections]. Probl.OsoboOpasn. Infek. 2009; 3 (101): 66-68.

4. Polyak M.S., Suharevich V.I., Suharevich M.E. [Nutrient media for medical and sanitary microbiology]. "Elbi-SPb"; 2008.352 p.

**Об авторах:**

Гостищева С.Е., Катунина Л.С., Курилова А.А., Абзаева Н.В., Ковтун Ю.С., Жаринова Н.В., Коняева О.А., Жилченко Е.Б., Куличенко А.Н.

ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора

Российская Федерация, 355035, Ставрополь, ул. Советская, 13-15,

Тел./факс: (865-2)26-20-50. E-mail: stavnipchi@mail.ru

**Authors:**

Gostischeva S.E., Katunina L.S., Kurilova A.A., KovtunYu.S., Abzaeva N.V., Zharinova N.V., Konyaeva O.A., Zhilchenko E.B., Kulichenko А.N.

Federal Government Health Institution “Stavropol Plague Control Research Institute” of Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing

355035, Russian Federation, Stavropol, St. Soviet, 13-15,

Phone: (865-2) 26-20-50. E-mail: stavnipchi@mail.ru