

О.А.Волох, А.В.Комиссаров, М.В.Антонычева, О.А.Лобовикова, Н.Г.Авдеева, Н.И.Вахрушина,
Н.П.Миронова, Д.Н.Бибиков, А.К.Никифоров

СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ ЖИВОЙ ТУЛЯРЕМИЙНОЙ ВАКЦИНЫ

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

Цель исследования. Разработка и апробация новых биотехнологических приемов в технологии получения живой туляреминой вакцины. **Материалы и методы:** Штамм *Francisella tularensis* 15 НИИЭГ использовали в качестве штамма-продуцента, штамм *F. tularensis* 503 – в качестве тест-заражающего. Проводили культивирование штамма-продуцента на плотных и жидких питательных средах, тангенциальную ультрафильтрацию на ультра-микрофильтрационной установке «Вива-флоу», лиофилизацию в сублимационной сушильной установке FreeZone 2,5 L. **Результаты и обсуждение.** Использование сконструированной жидкой питательной среды на основе ферментативного гидролизата фибрина и применение глубинного культивирования штамма-продуцента позволило увеличить выход биомассы. На этапе концентрирования культуры туляреминого микроба методом микрофильтрации через мембраны с размером пор 0,2 мкм в режиме тангенциального потока жидкости увеличено содержание микробных клеток и проведено освобождение от остатков питательной среды. Проведенный сравнительный анализ полученных по экспериментальной технологии лабораторных серий вакцины с коммерческим препаратом вакцины туляреминой живой показал их соответствие нормативным свойствам. Установлено, что применение новой жидкой питательной среды, глубинного культивирования, способов концентрирования и сепарации биомассы не оказывает отрицательного влияния на основные свойства живой туляреминой вакцины и в дальнейшем позволит в значительной степени повысить технологичность производства.

Ключевые слова: *Francisella tularensis*, живая туляреминая вакцина, питательная среда, культивирование, ультрафильтрация.

Корреспондирующий автор: Волох Оксана Александровна, e-mail: rusrapi@microbe.ru.

O.A.Volokh, A.V.Komissarov, M.V.Antonycheva, O.A.Lobovikova, N.G.Avdeeva, N.I.Vakhrushina,
N.P.Mironova, D.N.Bibikov, A.K.Nikiforov

Enhancement of the Technology for Live Tularemia Vaccine Production

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

Objective of the study was to develop and test new biotechnological approaches for live tularemia vaccine production. **Materials and methods:** *Francisella tularensis* 15 NIEG strain was used as producer-strain; *Francisella tularensis* 503 strain – as test infecting one. Producer strain was cultivated on solid and liquid nutrient media. Tangential ultrafiltration was performed with the help of microfiltration module "Viva-flow". Lyophilization was conducted using drying installation – Free Zone 2.5 L. **Results and discussion:** Application of the designed liquid nutrient medium on the basis of enzymatic fibrin hydrolysate and submerged cultivation of the producer-strain has allowed for a significant biomass yield increment. At the stage of tularemia microbe culture concentration via microfiltration through filtering membranes with pore size of 0.2 μm, in the mode of tangential liquid flow, increased has been the content of microbe cells; the nutrient media residues – removed. Comparative analysis of the obtained in accordance with experimental technique laboratory series of the vaccine and commercial preparation of live tularemia vaccine has demonstrated their conformity with the specific normative properties. It is established that application of modified liquid nutrient medium, submerged cultivation conditions, methods of biomass concentration and separation has no negative influence on the main properties of live tularemia vaccine and will provide for considerable produce-ability increase in the future.

Key words: *Francisella tularensis*, live tularemia vaccine, nutrient medium, cultivation, ultra-filtration.

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

Corresponding author: Oksana A. Volokh, e-mail: rusrapi@microbe.ru.

Citation: Volokh O.A., Komissarov A.V., Antonycheva M.V., Lobovikova O.A., Avdeeva N.G., Vakhrushina N.I., Mironova N.P., Bibikov D.N., Nikiforov A.K. Enhancement of the Technology for Live Tularemia Vaccine Production. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2016; 3:81–84. (In Russ.). DOI: 10.21055/0370-1069-2016-3-81-84

Вакцинопрофилактика является одним из наиболее развитых направлений противоэпидемической защиты. В РФ для специфической профилактики туляремии применяют туляремию живую сухую вакцину, которая в 2011 г. Приказом Министерства

здравоохранения и социального развития РФ (№ 51н от 31 января 2011 г.) включена в Национальный календарь профилактических прививок по эпидемическим показаниям.

В этой связи становится очевидным необходи-

мость совершенствования технологии производства живой туляремийной вакцины (ЖТВ). Основным компонентом вакцины туляремийной живой сухой являются клетки вакцинного штамма *Francisella tularensis* 15 линии НИИЭГ.

Поиском новых штаммов-кандидатов для живой туляремийной вакцины занимаются как отечественные [3, 4, 6], так и зарубежные исследователи [8, 9, 10, 11, 12, 13]. В настоящее время новая живая туляремийная вакцина не зарегистрирована.

Наша работа по совершенствованию этапов производства живой туляремийной вакцины проводилась в следующих направлениях оптимизации производственного процесса: разработка высокоэффективных жидких питательных сред для глубинного культивирования штамма-продуцента; подбор условий глубинного культивирования; применение щадящих методов концентрирования и сепарации для сохранения максимальной жизнеспособности и иммуногенности вакцины.

Материалы и методы

В работе использовали штамм-продуцент *F. tularensis* 15 линии НИИЭГ, заражающий тест-штамм голарктического подвида *F. tularensis* 503. Штаммы получены из Государственной коллекции патогенных бактерий «Микроб». Проведенный контроль свойств штамма-продуцента *F. tularensis* 15 НИИЭГ и заражающего тест-штамма *F. tularensis* 503 показал их соответствие требованиям, предъявляемым МУ 3.3.1.2161-07

В качестве плотной питательной среды на этапах подготовки культуры и анализа ее свойств использовали FT агар (ГНЦ ПБМ, Оболенск).

Культивирование на экспериментальной жидкой питательной среде проводили на биореакторе с рабочим объемом 14 л, на термостатируемом шейкере-инкубаторе «Multitron II» в культуральных колбах объемом 2 и 3 л. Концентрацию микробных клеток измеряли по отраслевому стандартному образцу мутности – ОСО мутности 42-28-85-П (10 МЕ) ФГБУ НЦЭСМП Минздравсоцразвития России, эквивалентной концентрации 5 млрд кл. мл⁻¹. Жизнеспособность определяли высевом на пластинки с FT агаром, учет проводили в течение 5 сут. Тангенциальную ультрафильтрацию проводили на ультра-микрофильтрационной установке «Вивафлоу» через мембраны с размером пор 0,2 мкм. Лиофилизат получали в сублимационной сушильной установке FreeZone 2,5 L. Температура коллектора – 85 °С. Значение вакуума при проведении процесса сушки – 0,133 мВар. Проверку иммуногенности, безопасности и прививаемости вакцины проводили на модели морских свинок. В качестве заражающего штамма использовали штамм голарктического подвида *F. tularensis* 503 (LD₅₀ 2 м.к.). Время наблюдения после заражения вакцинированных и контрольной групп составляло 30 сут.

Результаты и обсуждение

В технологии производства живой туляремийной вакцины получение биомассы осуществляют на полужидких питательных средах в культуральных флаконах с аэрацией [5]. В условиях глубинного культивирования на биореакторе эффективно использование жидких питательных сред. В связи с этим проведена работа по конструированию жидкой питательной среды для накопления биомассы туляремийного микроба. В результате сконструирована питательная среда на основе ферментативного гидролизата фибрина для глубинного культивирования туляремийного микроба. Использование этой питательной среды позволяло накапливать и получать в течение (20±2) ч высокую концентрацию, до (35±0,5) млрд м.к. в 1 мл среды, жизнеспособной, КОЕ (62±20) %, биомассы *F. tularensis*. Степень диссоциации составляла менее 5 % (отмечено (97±1) % SR – белых) иммуногенных колоний от общего количества выросших. Культурально-морфологические признаки были типичные для туляремийного микроба: мелкие кокковидные палочки, неподвижные, грамтрицательные. Культура агглютинировалась туляремийной сывороткой до титра 1:3200. Показатель эффективности среды на основе гидролизата фибрина был в 2 раза выше по сравнению со средой, полученной на основе панкреотического гидролизата рыбкопостной муки. Использование в составе жидкой среды гидролизата фибрина, являющегося отходом сывороточно-вакцинного производства, позволяет утилизировать отходы и снижает загрязнение внешней среды, а также повышает рентабельность производства вакцины за счет использования экономически выгодной питательной среды. Сконструированная питательная среда расширяет спектр питательных сред для накопления бактериальной массы *F. tularensis* в условиях глубинного культивирования. На разработанную питательную среду был получен патент на изобретение [1].

Введение в технологический процесс выращивания туляремийного микроба дополнительных операций отъемно-доливного метода в экспоненциальной фазе роста [7] позволило при однократной подготовке посевного материала увеличить выход биомассы, что привело к сокращению временных затрат и дало возможность получить максимальное количество биомассы с однотипными свойствами.

Следующим этапом было совершенствование сепарации выращенной биомассы с целью получения высококонцентрированной, не контаминированной посторонней микрофлорой, жизнеспособной клеточной массы. Для этого разработан способ концентрирования микробной массы путем микрофильтрации культуры туляремийного микроба через мембраны с размером пор 0,2 мкм в режиме тангенциального потока жидкости. Возможность использования микрофильтрационного концентрирования микробных клеток туляремии в режиме тангенциального потока жидкости установлена нами экспериментальным путем.

Экспериментальная вакцина туляремийная живая сухая

Показатель	Метод	Норма	Сер. 005	Сер. 006	Сер. 009	Сер. 010
Описание	Визуальный	Пористая желтовато-белая масса	+	+	+	+
Подлинность	Иммуно-флуоресцентный	Должна быть чистая культура вакцинного штамма туляремийного микроба	+	+	+	+
Время растворения, мин	Визуальный	В течение 3 мин	0,5	0,5	0,5	0,5
pH	Потенциометрический, ГФ XII	7,0±0,2	7,1	7,2	7,2	7,1
Размер частиц	ГФ XI	Суспензия должна свободно проходить в шприц через иглу № 0840	+	+	+	+
Отсутствие посторонней микрофлоры	Бактериологический	Не должна содержать посторонних бактерий и грибов	+	+	+	+
Безопасность	Биологический	Должна быть безвредной	+	+	+	+
Специфическая активность	Визуальный	От 1·10 ¹⁰ до 3·10 ¹⁰ м.к. в 1 мл	1,2·10 ¹⁰	1,2·10 ¹⁰	3·10 ¹⁰	3·10 ¹⁰
концентрация микробных клеток, м.к.	Бактериологический	Не менее 40 %	40	42	47	48
живые микробные клетки, %		Число SR (белых) иммуногенных колоний не менее 80 %	96	98	92	87
Степень диссоциации, %						
Количество накожных доз	По разделу «Специфическая активность»	От 15 до 50 накожных доз в ампуле	15	21	47	63
Прививаемость, мм	Биологический	При накожной иммунизации морских свинок (м.св.) дозой 2·10 ⁷ живых м.к. в 0,1 мл должна вызывать реакцию в виде инфильтрата и гиперемии диаметром от 5 до 15 мм вокруг насечек	5	5	9	10
Иммуногенность	Биологический	Не менее 8 из 10 морских свинок, привитых накожно 2·10 ⁷ живых м.к. в объеме 0,1 мл, должны быть предохранены от гибели при подкожном заражении 1000 Dcl тест-заражающего штамма туляремийного микроба голарктической расы, 1 Dcl которого не должна превышать 5 м.к.	10 из 10 м.св. живы	8 из 10 м.св. живы	10 из 10 м.св. живы	9 из 10 м.св. живы

Примечание: «+» – соответствие нормативным показателям, «-» – несоответствие нормативным показателям.

Культуру *F. tularensis* вакцинного штамма 15 НИИЭГ выращивают методом глубинного культивирования на подготовленной жидкой питательной среде при температуре 37 °С в течение (20±2) ч. После окончания процесса культивирования нативная культура *F. tularensis* вакцинного штамма 15 НИИЭГ имеет следующие характеристики: pH 7,0±0,1, концентрация микробных клеток (35±0,50) млрд кл. мл⁻¹ (по ОСО мутности 42-28-85-П (10 МЕ) ФГБУ НЦЭСМП Минздравсоцразвития России, эквивалентной концентрации 5 млрд кл. мл⁻¹), коэффициент жизнеспособности (62±0,5) %, посторонняя микрофлора отсутствует. Далее полученную микробную суспензию *F. tularensis* подвергают тангенциальной микрофльтрации на ультра-микрофльтрационной установке «Вива-флоу» через мембраны с размером пор 0,2 мкм до сокращения объема микробного осадка в четыре раза. При необходимости добавляют в концентрат стерильный 0,9 % раствор натрия хлорида до восстановления исходного объема нативной культуры и процесс концентрирования повторяют. Полученный концентрат микробных клеток имел следующие характеристики: pH 7,2±0,1, концентрация микробных клеток – (135±1,0) млрд кл. мл⁻¹ (по отраслевому стандарту мутности ФГБУ НЦЭСМП), коэффици-

ент жизнеспособности – (60±0,1) %, посторонняя микрофлора отсутствует. Контроль специфической стерильности фильтрата свидетельствовал об отсутствии в нем туляремийного микроба, что говорит о правильном подборе размера пор мембран.

В результате получали концентрат микробных клеток туляремийного микроба пригодный по своим характеристикам для получения живой туляремийной вакцины. В полученном концентрате не происходило ухудшения характеристик (в сравнении с нативной культурой *F. tularensis* вакцинного штамма 15 НИИЭГ после ее глубинного культивирования). В частности, pH и коэффициент жизнеспособности оставались на прежнем уровне и не происходило контаминации посторонней микрофлорой, а концентрация увеличивалась в 3–4 раза. На данное изобретение получен патент [2].

В результате по усовершенствованной технологии получено 10 лабораторных серий экспериментальной живой туляремийной вакцины (ЭЖТВ). Из них 4 серии прошли контроль на соответствие нормативным показателям. Результаты основных показателей представлены в таблице.

В течение 2 лет (2014–2015 гг.) проводили анализ стабильности препарата ЭЖТВ по показателям спе-

цифической активности. Было установлено, что жизнеспособность снижается до 30–35 % к концу первого года и до 10–15 % к концу второго года хранения при 4 °С. Это может быть связано с условиями сушки препарата (проводили в сублимационной сушильной установке FreeZone 2,5 L) и запайки ампул (без вакуума). Для решения вопроса стабильности необходимо проведение дальнейших исследований по оптимизации условий сушки микробной массы для получения готовой лекарственной формы препарата.

Таким образом, применение новой жидкой питательной среды, глубинного культивирования, способов концентрирования и сепарации биомассы, а также оптимизированных условий сушки позволит в значительной степени повысить технологичность производства живой туляремийной вакцины.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Волох О.А., Антонычева М.В., Авдеева Н.Г., Вахрушина И.И., Никифоров А.К. Питательная среда для глубинного культивирования туляремийного микроба. Патент 2518282 РФ. Бюл. № 16, опублик. 10.06.2014.
2. Волох О.А., Комиссаров А.В., Никифоров А.К., Самохвалова Ю.И., Авдеева Н.Г. Способ получения концентрата микробных клеток для получения живой туляремийной вакцины. Патент 2528878 РФ. Бюл. № 26, опублик. 20.09.2014
3. Кисличкин Н.Н., Кисличкина О.Н. Живая туляремийная вакцина Nik-sp. *Francisella tularensis*. Патент 2308969 РФ. Бюл. № 30, опублик. 27.10.07.
4. Мешерякова И.С. Туляремия. В кн.: Природная очаговость болезней: исследования института им. Н.И.Гамалеи РАМН. М.; 2003. С. 137–60.
5. Олсуфьев Н.Г. Таксономия, микробиология и лабораторная диагностика возбудителя туляремии. М.: Медицина; 1975. 190 с.
6. Павлов В.М., Дятлов И.А. Молекулярно-генетические исследования бактерий рода *Francisella* и их прикладное значение. М.: ООО «ТиРу»; 2012. 267 с.
7. Шепелёв И.А., Волох О.А., Еремин С.А., Авдеева Н.Г., Кузнецова Е.М. Способ получения биомассы туляремийного микроба. Патент 2451743 РФ. Бюл. № 15, опублик. 27.05.2012.
8. Barry E.M., Cole L.E., Santiago A.E. Vaccine against tularemia. *Hum. Vaccine*. 2009; 5(12):832–8. DOI: 10.4161/hv.10297.
9. Conlan J.W., Oyston P.C.F. Vaccines against *Francisella tularensis*. *Ann. NY Acad. Sci.* 2007; 1105:325–50. DOI: 10.1196/annals.1409.012.
10. Forslund A.L., Kuoppa., Svensson K., Salomonsson E., Johansson A., Bystro M., Oyston P.C.F., Michell S.L., Titball R.W. Direct repeat-mediated deletion of a type IV pilin gene results in major virulence attenuation of *Francisella tularensis*. *Mol. Microbiol.* 2006; 59:1818–30. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2006.05061.x.
11. Jia Q., Lee B.Y., Bowen R. *Francisella tularensis* live vaccine strain (LV5) mutant with a deletion in capB, encoding a putative capsular biosynthesis protein, is significantly more attenuated than LV5 yet induces potent protective immunity in mice against *F. tularensis* challenge. *Infect. Immun.* 2010; 78(10):4341–55. DOI: 10.1128/IAI.00192-10.
12. Marohn M.E., Barry E.M. Live attenuated tularemia vaccines: recent developments and future goals. *Vaccine*. 2013; 31(35):3485–91. DOI: 10.1016/j.vaccine.2013.05.096.
13. Reed D.S., Smith L'K.P., Cole K.S., Santiago A.E., Mann B.J., Barry E.M. Live attenuated mutants of *Francisella tularensis* protect rabbits against aerosol challenge with a virulent type A strain. *Infect. Immun.* 2014; 2(5):2098–2105. DOI: 10.1128/IAI.01498-14.

References

1. Volokh O.A., Antonycheva M.V., Avdeeva N.G., Vakhrushina I.I., Nikiforov A.K. [Nutrient medium for submerged cultivation of tularemia microbe]. RF Patent No 2518282, 10.06.2014.
2. Volokh O.A., Komissarov A.V., Nikiforov A.K., Samokhvalova Yu.I., Avdeeva N.G. [Method for the production of microbe cell concentrate for manufacturing live tularemia vaccine]. RF Patent No 2528878, 20.09.2014.
3. Kislichkin N.N., Kislichkina O.N. [Live tularemia vaccine Nik-sp. *Francisella tularensis*]. RF Patent No 2308969, 27.10.07.
4. Meshcheryakova I.S. [Tularemia]. In: [Natural Focality of Diseases: Studies of the RAMS Research Institute after the Name of N.I. Gamaleya]. M.; 2003. P. 137–60.
5. Olsuf'ev N.G. [Taxonomy, Microbiology, and Laboratory Diagnostics of Tularemia Agent]. M.: Meditsina; 1975. 190 p.
6. Pavlov V.M., Dyatlov I.A. [Molecular-Genetic Studies of Bacteria *Francisella* and their Applied Significance]. M.: "TiRu" Ltd.; 2012. 267 p.
7. Shepelev I.A., Volokh O.A., Eremine S.A., Avdeeva N.G., Kuznetsova E.M. [Method of tularemia microbe biomass production]. RF Patent No 2451743, 27.05.2012.
8. Barry E.M., Cole L.E., Santiago A.E. Vaccine against tularemia. *Hum. Vaccine*. 2009; 5(12):832–8. DOI: 10.4161/hv.10297.
9. Conlan J.W., Oyston P.C.F. Vaccines against *Francisella tularensis*. *Ann. NY Acad. Sci.* 2007; 1105:325–50. DOI: 10.1196/annals.1409.012.
10. Forslund A.L., Kuoppa., Svensson K., Salomonsson E., Johansson A., Bystro M., Oyston P.C.F., Michell S.L., Titball R.W. Direct repeat-mediated deletion of a type IV pilin gene results in major virulence attenuation of *Francisella tularensis*. *Mol. Microbiol.* 2006; 59:1818–30. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2006.05061.x.
11. Jia Q., Lee B.Y., Bowen R. *Francisella tularensis* live vaccine strain (LV5) mutant with a deletion in capB, encoding a putative capsular biosynthesis protein, is significantly more attenuated than LV5 yet induces potent protective immunity in mice against *F. tularensis* challenge. *Infect. Immun.* 2010; 78(10):4341–55. DOI: 10.1128/IAI.00192-10.
12. Marohn M.E., Barry E.M. Live attenuated tularemia vaccines: recent developments and future goals. *Vaccine*. 2013; 31(35):3485–91. DOI: 10.1016/j.vaccine.2013.05.096.
13. Reed D.S., Smith L'K.P., Cole K.S., Santiago A.E., Mann B.J., Barry E.M. Live attenuated mutants of *Francisella tularensis* protect rabbits against aerosol challenge with a virulent type A strain. *Infect. Immun.* 2014; 2(5):2098–2105. DOI: 10.1128/IAI.01498-14.

Authors:

Volokh O.A., Komissarov A.V., Antonycheva M.V., Lobovikova O.A., Avdeeva N.G., Vakhrushina N.I., Mironova N.P., Bibikov D.N., Nikiforov A.K. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russian Federation. E-mail: rusrapi@microbe.ru

Об авторах:

Волох, О.А. Комиссаров А.В., Антонычева М.В., Лобовикова О.А., Авдеева Н.Г., Вахрушина Н.И., Миронова Н.П., Бибииков Д.Н., Никифоров А.К. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». Российская Федерация, 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrapi@microbe.ru

Поступила 21.08.15.