

DOI: 10.21055/0370-1069-2018-3-46-49

УДК 616.98:579.842.23

С.Е. Гостищева, Н.В. Абзаева, Г.Ф. Иванова, Д.В. Ростовцева, Л.С. Катунина, А.А. Зуенко

## ОЦЕНКА КАЧЕСТВА ВАКЦИНЫ ЧУМНОЙ ЖИВОЙ, ПРИГОТОВЛЕННОЙ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ НА ОСНОВЕ ГИДРОЛИЗАТА КУКУРУЗНОГО ЭКСТРАКТА СГУЩЕННОГО

ФКУЗ «Ставропольский противочумный институт», Ставрополь, Российская Федерация

**Цель** исследования – апробация питательной среды на основе ферментативного гидролизата кукурузного экстракта сгущенного для масштабированного производства вакцины чумной живой, а также проверка качества полученных серий согласно регламентированным показателям. **Материалы и методы.** Для выращивания биомассы в процессе производства вакцины чумной живой использована плотная питательная среда на основе кукурузного экстракта. Параметры качества полученного вакцинного препарата изучались регламентированными методами, изложенными в нормативной документации. **Результаты и обсуждение.** Контроль вакцины осуществляли на всех этапах ее изготовления, включая контроль готовой лекарственной формы, в строгом соответствии с утвержденной нормативной документацией. Все полученные экспериментально-производственные серии соответствовали регламентированным показателям. Апробация среды в условиях производственного цикла получения вакцины чумной живой показала ее высокую продуктивность и возможность применения в промышленном выпуске препарата.

**Ключевые слова:** питательная среда, вакцина чумная живая, гидролизат кукурузного экстракта сгущенного

*Корреспондирующий автор:* Гостищева Светлана Евгеньевна, e-mail: stavnipchi@mail.ru.

*Для цитирования:* Гостищева С.Е., Абзаева Н.В., Иванова Г.Ф., Ростовцева Д.В., Катунина Л.С., Зуенко А.А. Оценка качества вакцины чумной живой, приготовленной с использованием питательной среды на основе гидролизата кукурузного экстракта сгущенного. *Проблемы особо опасных инфекций.* 2018; 3:46–49. DOI: 10.21055/0370-1069-2018-3-46-49

S.E. Gostishcheva, N.V. Abzaeva, G.F. Ivanova, D.V. Rostovtseva, L.S. Katunina, A.A. Zuenko

## Quality Assessment of the Live Plague Vaccine Prepared Using Nutrient Medium on the Basis of Hydrolysate of Concentrated Corn Steep

Stavropol Research Anti-Plague Institute, Stavropol, Russian Federation

**Abstract. Objective** of the study was to test the nutrient medium based on the enzymatic hydrolysate of corn extract condensed for a scaled production of live plague vaccine and to check the quality of the obtained batches against the specified parameters. **Materials and methods.** A dense nutrient medium based on corn extract was used to grow biomass in the process of live plague vaccine production. The quality parameters of the vaccine preparation obtained were studied by the regulated methods set forth in the regulatory documentation. **Results and conclusions.** The vaccine was monitored at all stages of its manufacture, including control of the finished dosage form, in strict accordance with the approved regulatory documentation. All the experimental production series complied with the specified indices. Approbation of the production cycle environment for live plague vaccine manufacturing showed efficiency of the conditions and the possibility of environment's application in the industrial production of the preparation.

**Key words:** nutrient media, live plague vaccine, hydrolysate of concentrated corn extract.

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

*Corresponding author:* Svetlana E. Gostishcheva, e-mail: stavnipchi@mail.ru.

*Citation:* Gostishcheva S.E., Abzaeva N.V., Ivanova G.F., Rostovtseva D.V., Katunina L.S., Zuenko A.A. Quality Assessment of the Live Plague Vaccine Prepared Using Nutrient Medium on the Basis of Hydrolysate of Concentrated Corn Steep. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2018; 3:46–49. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2018-3-46-49

*Received* 25.06.18. *Revised* 11.09.18. *Accepted* 14.09.18.

С целью профилактики чумы в России применяют вакцину чумную живую [7, 8, 9], для производства которой в основном используют питательные среды с производными гидролизатов Хоттингера или казеина.

Тактика совершенствования биотехнологии производства вакцины чумной осуществляется в направлении дальнейшей стандартизации препарата и подбора полноценных питательных сред, имеющих низкую себестоимость, что является актуальным для

выполнения производственных задач [5].

По литературным данным, для выращивания вакцинного штамма разработаны различные питательные среды, основой которых являлись не мясные субстраты: соя, кровь животных, кукурузный экстракт, рыбкостная мука, кормовые дрожжи и др. [1, 3, 4, 6]. Главное требование к применяемой в производстве вакцины чумной питательной среде – максимальный выход жизнеспособной микробной массы, состоящей из популяции клеток, обладающих всеми типичными

свойствами, присущими исходной культуре.

В настоящее время в производстве вакцины чумной для накопления биомассы вакцинного штамма и на всех этапах контроля используется бульон и агар из мясного перевара по Хоттингеру. Основными недостатками традиционно используемых для производства вакцины питательных сред являются высокая себестоимость и недостаточная стандартность, обусловленные дороговизной и качеством используемого сырья животного происхождения, а также сложность технологического процесса его переработки, что указывает на целесообразность использования альтернативных сырьевых источников.

Ранее нами для разработки возможной замены дорогостоящих сортов говяжьего мяса, используемых при приготовлении питательных сред в производстве вакцины чумной, в качестве сырья использовался гидролизат кукурузного экстракта сгущенного [2].

**Цель** исследования – апробация питательной среды ГКЭС для масштабированного производства вакцины чумной живой и проверка качества полученных серий согласно регламентированным показателям.

### Материалы и методы

В работе использован вакцинный штамм чумного микроба *Yersinia pestis* EV линии НИИЭГ.

Экспериментальной питательной средой для выращивания биомассы в процессе производства вакцины чумной живой являлась плотная питательная среда на основе ферментативного гидролизата кукурузного экстракта сгущенного (ГКЭС), включающая соль Мора и натрий сернистокислый.

Выращенную на экспериментальной питательной среде в аппарате для культивирования микроорганизмов Шестеренко (АКМ-Ш) (Технолог, Россия) биомассу смывали двукратно последовательно стабилизатором – средой высушивания. Из полученной взвеси вакцинного штамма готовили экспериментальные серии вакцины. После смыва с агара биомассу фасовали по 2 мл в ампулы и лиофилизировали на сублимационной установке LP-30 R (IIShin, Южная Корея).

Качество экспериментальных серий вакцины исследовано по основным показателям – жизнеспособность и термостабильность (бактериологический метод), потеря в массе при высушивании (весовой метод) и иммуногенность (биологический метод) согласно ФСП 42-8654-07.

Статистический анализ проводили с использованием пакета прикладных программ Statistica 6.0.

### Результаты и обсуждение

Изменения в биотехнологии производства вакцины чумной могут привести к изменению условий физиологического развития культуры, поэтому необходимо контролировать сохранение комплекса основных свойств препарата. Контроль вакцины осу-

ществляли на всех этапах ее изготовления, включая готовую лекарственную форму, в строгом соответствии с утвержденной нормативной документацией.

Сконструированная среда использовалась как накопительная для выращивания вакцины чумной аппаратным методом (АКМ-Ш) в производственных условиях. Из полученной биомассы вакцинного штамма отбирали пробы для определения оптической и биологической концентрации.

На данном производственном этапе среднее количество биомассы, полученной с 1 мл питательной среды, составило  $(4,68 \pm 0,28)$  млрд м.к./мл, что сопоставимо с выходом при использовании агара Хоттингера, изготовленного из мясного сырья. Питательная среда считается пригодной для производства биомассы чумного микроба при показателе эффективности не менее 4 млрд м.к. с 1 мл среды (табл. 1).

На этапе розлива (фасовки) полуфабриката препарата вакцины чумной живой проверяются такие показатели, как процент живых микробных клеток в биомассе и оптический стандарт. Средний процент жизнеспособных клеток составил  $(81,2 \pm 4,8)$  (табл. 2).

Разлитые по ампулам экспериментальные образцы замораживали и лиофилизировали по регламентированной методике. Получено восемь экспериментальных серий, проверенных на соответствие требованиям нормативной документации, а именно: чистота вакцины, оптическая и биологическая концентрация (жизнеспособность), термостабильность, потеря в массе при высушивании, безвредность, иммуногенность. При этом наблюдалось закономерное снижение оптической и биологической концентраций в сериях на каждом биотехнологическом этапе, особенно после лиофилизации. Основные показатели ка-

Таблица 1 / Table 1

Параметры качества биомассы вакцинного штамма *Yersinia pestis* EV на этапе смыва

Characteristics of biomass quality of vaccine strain *Yersinia pestis* EV at the stage of wash-off

АКМ-Ш		Концентрация микробных клеток		Выход с 1 мл питательной среды, млрд м.к./мл
		Оптическая, млрд/мл	Биологическая (жизнеспособность), %	
Опыт 1	Смыв 1	110	96,7	5,2
	Смыв 2	25	82,0	
Опыт 2	Смыв 1	85	94,7	4,9
	Смыв 2	30	94,1	
Опыт 3	Смыв 1	60	96,2	4,0
	Смыв 2	50	103,0*	
Опыт 4	Смыв 1	90	78,8	4,3
	Смыв 2	50	61,0	
Опыт 5	Смыв 1	100	109,0*	5,0
	Смыв 2	25	84,9	
M±m		62,5±11,75	90,0±4,65	4,68±0,28

\* значение показателя, превышающее 100 %, входит в 20 % допускаемой методом погрешности.

Таблица 2 / Table 2

Параметры качества экспериментальных серий вакцины чумной живой на этапе розлива  
Quality characteristics of experimental batches of live plague vaccine at the stage of bottling

Серия	Концентрация микробных клеток		
	Оптическая, млрд/мл	Биологическая	
		%	млрд ж.м.к./мл
1	80	97,3	77,8
2	90	74,0	66,6
3	85	81,4	69,2
4	95	85,0	80,8
5	50	101,5	50,1
6	85	60,7	36,4
7	75	74,3	55,7
8	75	75,3	56,5
M±m	76,3±5,3	81,2±4,8	61,6±5,7

чества полученной вакцины представлены в табл. 3.

Готовая вакцина имела вид белой (кремовой) пористой массы, легко отделяющейся от стенок ампулы, и быстро растворялась в 0,9 % растворе натрия хлорида, образуя гомогенную взвесь.

Морфология бактерий в мазках из вакцины, а также посевы на плотных и жидких питательных средах типичны для чумного микроба. При этом на агаре через 48 ч инкубации при температуре (27±1) °С культура чумного микроба вырастала в виде колоний шероховатого типа с бугристым центром бурого цвета и «кружевной» периферией, средний размер колоний превышал 2 мм, данный показатель важен для питательных сред, на которых осуществляется подсчет жизнеспособных микробных клеток.

Все серии вакцины прошли контроль на специфическую стерильность. Потеря в массе при высушивании (остаточная влажность) в разных сериях

Таблица 3 / Table 3

Показатели качества полученных экспериментальных серий вакцины чумной живой  
Quality characteristics of the obtained experimental series of live plague vaccine

Серия	Показатели качества			
	Оптическая концентрация, млрд/мл	Жизнеспособность, %	Термостабильность, сут	Потеря в массе при высушивании, %
1	75	68,2	13,5	1,3
2	80	36,3	5,8	0,2
3	78	26,1	10,6	0,8
4	90	45,0	13,3	0,7
5	50	46,1	9,2	1,7
6	80	27,6	22,0	1,2
7	70	26,7	9,7	1,3
8	70	30,4	4,5	0,8
M±m	74,1±4,1	39,0±5,3	39,0±5,3	1,1±0,1

вакцины колеблется в пределах 0,2–1,7 %, при норме не более 4,0 %. Жизнеспособность вакцины непосредственно после лиофилизации находилась в пределах, характерных для производственных серий (не менее 25 %).

Величина термостабильности также соответствовала регламентированным нормам во всех сериях – 10–15 сут (не менее 4 сут).

Проверка специфической безопасности полученных серий вакцины чумной живой была проведена на морских свинках. При подкожном введении вакцины в дозе 15 млрд м.к. на 6 сут видимых патологоанатомических изменений не выявлено, у всех подопытных животных отмечено образование инфильтратов, небольших кровоизлияний в месте введения вакцины, увеличение регионарных лимфатических узлов. У двух из восьми морских свинок наблюдалась ограниченная узелковая реакция в селезенке и печени. Ни одна из экспериментальных серий вакцины не вызывала гибели животного или потери веса больше, чем на 1/5, что свидетельствует о безопасности препарата.

Что касается иммуногенных свойств, то данный показатель регистрируется на весьма высоком уровне как на белых мышках, так и на морских свинках. Величина ED<sub>50</sub> для белых мышей составила 10647 ж.м.к., что не превышает регламентированную норму 4·10<sup>4</sup> ж.м.к. Для морских свинок показатель ED<sub>50</sub> также был не более допустимого (1·10<sup>4</sup>) – 5593 ж.м.к.

Проанализированные данные позволяют сделать вывод о том, что вакцина чумная, приготовленная на питательной среде из ферментативного гидролизата кукурузного экстракта сгущенного, по всем исследованным свойствам (физические, культурально-морфологические, остаточная влажность, термостабильность, безвредность) идентична вакцине, приготовленной на основе гидролизата говяжьего мяса по Хоттингеру и соответствует требованиям нормативной документации.

Среда на основе ГКЭС дает возможность использовать одну партию гидролизата в производстве вакцины в течение одного года, что в свою очередь облегчает поддержание стандартности этапа производственного цикла.

Использование данной питательной среды при промышленном выпуске чумной вакцины взамен питательной среды из дорогостоящего и не всегда качественного мясного сырья позволит повысить стандартность и снизить себестоимость конечной продукции при сохранении ее качества.

В плане продолжения исследований – изучение долгосрочной стабильности серий, изготовленных с использованием экспериментальной питательной среды (ГКЭС), в течение срока годности (3 года).

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

## Список литературы

1. Авдеева Н.Г., Дятлов И.А., Еремин С.А. Разработка технологии производства дрожжевых аутолизатов как основы конструирования питательных сред для чумного микроба и холерного вибриона. Деп. в ВИНИТИ 10.04.00. № 925-B00. Саратов; 2000. 17 с.
2. 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. Применение плотной питательной среды на основе гидролизата кукурузного экстракта сгущенного в производстве вакцины чумной живой и для хранения штаммов чумного микроба. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2018; 1:75–8. DOI: 10.21055/0370-1069-2018-1-75-78.
3. Канчух А.А., Сагатовский В.Н., Сурнина Н.С., Мелехина А.Ф. Изучение живой противочумной вакцины, приготовленной на средах с кукурузным экстрактом. В кн.: Микробиология и иммунология особо опасных инфекций. Саратов; 1964. С. 131–7.
4. Курилова А.А., Таран Т.В., Катунина Л.С., Головнева С.И. Разработка питательных сред из растительного сырья для культивирования возбудителей особо опасных инфекций. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2009; 3:66–8.
5. Федорова О.В., Понкратова С.А., Валева Р.Т., Исламгулов И.Р. Питательные среды в производствах медицинских и ветеринарных препаратов. *Вестник технологического университета*. 2017; 20(4):130–3.
6. Шепелин А.П., Дятлов И.А., Марчихина Е.Н., Миронова Е.Н. Разработка технологии приготовления панкреатического гидролизата рыбной муки – белковой основы бактериологических питательных сред. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2011; 9:48–9.
7. Cui Y., Yang X., Xiao X., Anisimov A.P., Li D., Yan Y.I. Zhou D., Rajerison M., Carniel E., Achtman M., Yang R., Song Y. Genetic variations of live attenuated plague vaccine strains (*Yersinia pestis* EV76 lineage) during laboratory passages in different countries. *Infect. Genet. Evol.* 2014; 26:172–9. DOI: 10.1016/j.meegid.2014.05.023.
8. Verma S.K., Tuteja U. Plague Vaccine Development: Current Research and Future Trends. *Front. Immunol.* 2016; 7:602. DOI: 10.3389/fimmu.2016.00602.
9. Wang X., Zhang X., Zhou D., Yang R. Live-attenuated *Yersinia pestis* vaccines. *Expert. Rev. Vaccines*. 2013; 12(6):677–86. DOI: 10.1586/erv.13.42.

## References

1. Avdeeva N.G., Dyatlov I.A., Eremin S.A. [Development of the technology for yeast auto-lysate production as the basis for designing nutrient media for plague microbe and cholera vibrio]. Dep. with All-Union Institute of Scientific and Technical Information on April 10, 2000. No 925-B00. Saratov; 2000; 17 p.
2. Gostishcheva S.E., Katunina L.S., Kurilova A.A., Abzaeva N.V., Kovtun Yu.S., Zharinova N.V., Konyaeva O.A., Zhilchenko

E.B., Kulichenko A.N. [Usage of solid medium on the basis of corn-steep extract hydrolysate in manufacturing of live plague vaccine and for plague agent strain preservation]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2018; 1:75–8. DOI: 10.21055/0370-1069-2018-1-75-78.

3. Kanchukh A.A., Sagatovsky V.N., Sumina N.S., Melekhina A.F. [Study of live anti-plague vaccine prepared on media with corn extract]. In: [Microbiology and Immunology of Particularly Dangerous Infections]. Saratov; 1964. P. 131–7.

4. Kurilova A.A., Taran T.V., Katunina L.S., Golovneva S.I. [Development of nutrient media out of vegetable material for culturing particularly dangerous infections agents]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2009; 3:66–8.

5. Fedorova O.V., Ponkratova S.A., Valeeva R.T., Islamgulov I.R. [Nutrient media in the production of medical and veterinary drugs]. *Vestnik Tekhnologicheskogo Universiteta (Bulletin of the Technological University)*. 2017; 20(4):130–3.

6. Shepelin A.P., Dyatlov I.A., Marchikhina E.N., Mironova E.N. [Development of the technology for preparation of pancreatic hydrolysate of fishmeal – the protein basis of bacteriological nutrient media]. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika*. 2011; 9:48–9.

7. Cui Y., Yang X., Xiao X., Anisimov A.P., Li D., Yan Y.I. Zhou D., Rajerison M., Carniel E., Achtman M., Yang R., Song Y. Genetic variations of live attenuated plague vaccine strains (*Yersinia pestis* EV76 lineage) during laboratory passages in different countries. *Infect. Genet. Evol.* 2014; 26:172–9. DOI: 10.1016/j.meegid.2014.05.023.

8. Verma S.K., Tuteja U. Plague Vaccine Development: Current Research and Future Trends. *Front. Immunol.* 2016; 7:602. DOI: 10.3389/fimmu.2016.00602.

9. Wang X., Zhang X., Zhou D., Yang R. Live-attenuated *Yersinia pestis* vaccines. *Expert. Rev. Vaccines*. 2013; 12(6):677–86. DOI: 10.1586/erv.13.42.

## Authors:

Gostishcheva S.E., Abzaeva N.V., Ivanova G.F., Rostovtseva D.V., Katunina L.S., Zuenko A.A. Stavropol Research Anti-Plague Institute. 13–15, Sovetskaya St., Stavropol, 355035, Russian Federation. E-mail: stavnipchi@mail.ru.

## Об авторах:

Гостищева С.Е., Абзаева Н.В., Иванова Г.Ф., Ростовцева Д.В., Катунина Л.С., Зуенко А.А. Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт. Российская Федерация, 355035, Ставрополь, ул. Советская, 13–15. E-mail: stavnipchi@mail.ru.

Поступила 25.06.18.

Отправлена на доработку 11.09.18.

Принята к публ. 14.09.18.