

УДК 579.61

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ОЦЕНКА МЕТОДОВ КОНЦЕНТРИРОВАНИЯ БИОМАССЫ *FRANCISELLA TULARENSIS* 15 НИИЭГ С ЦЕЛЮ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В ПРОИЗВОДСТВЕ ЖИВОЙ ТУЛЯРЕМИЙНОЙ ВАКЦИНЫ

Д.Н. Бибиков¹, О.А. Волох¹, А.В. Комиссаров^{1*}, Ю.И. Самохвалова¹,
Н.Г. Авдеева¹, А.К. Никифоров^{1,2**}

Резюме. Исследована возможность применения седиментационного, центробежного и фильтрационного методов концентрирования суспензии *Francisella tularensis* 15 НИИЭГ, полученной после ее глубинного культивирования. Выявлена преимущество использования метода тангенциальной фильтрации с целью внедрения в технологический процесс производства живой туляремийной вакцины. Изучены характеристики концентрата *F. tularensis* 15 НИИЭГ, хранимого при разных температурно-временных параметрах. Показано, что концентраты целесообразно хранить при температуре 4 °C не более 6 сут.

Ключевые слова: *Francisella tularensis*, концентрирование, живая туляремийная вакцина.

EXPERIMENTAL EVALUATION OF THE METHODS FOR *FRANCISELLA TULARENSIS* 15 NIEG BIOMASS CONCENTRATION TO BE USED IN MANUFACTURING OF LIVE TULAREMIA VACCINE

D.N. Bibikov¹, O.A. Volokh¹, A.V. Komissarov^{1*}, Yu.I. Samokhvalova¹, N.G. Avdeeva¹, A.K. Nikiforov^{1,2}

Abstract. The possibility of applying sedimentation, centrifuge, and filtration techniques for concentration of *F. tularensis* 15 NIEG suspensions obtained after submerged cultivation has been evaluated. It is established that realization of tangential ultrafiltration as part of technological process of live tularemia vaccine production is of distinct advantage. Characteristics of *Francisella tularensis* 15 NIEG concentrate stored under different temperature/time-dependent conditions have also been studied. It is demonstrated that it is practical to preserve them at 4 °C within ≤6 days.

Keywords: *Francisella tularensis*, concentration, live tularemia vaccine.

1 – Федеральное казенное учреждение здравоохранения Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, 410005, Россия, г. Саратов, ул. Университетская, д. 46

2 – Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Саратовский государственный аграрный университет им. Н.И. Вавилова» Министерства сельского хозяйства Российской Федерации, 410012, Россия, г. Саратов, Театральная пл., д. 1

1 – Federal Government Health Institution Russian Research Anti-Plague Institute «Microbe», Federal Service for Surveillance in the Sphere of Consumers Rights Protection and Human Welfare, 46, Universitetskaya str., Saratov, 410005, Russia

2 – Federal State Funded Educational Institution of Higher Postgraduate Education «N.I. Vavilov Saratov State Agrarian University», Ministry of Agriculture of the Russian Federation, 1, Theatrical Square, Saratov, 410012, Russia

* адресат для переписки:
E-mail: rusrap@microbe.ru
Тел.: (8452) 26 21 31

** адресат для переписки:
E-mail: rector@sgau.ru
Тел.: (8452) 23 32 92

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время единственным иммунобиологическим лекарственным препаратом, применяемым для специфической профилактики туляремии в Российской Федерации, является живая туляремийная вакцина (ЖТВ). Вакцинация против туляремии 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 [1].

Технология производства ЖТВ предусматривает получение посевных культур I, II и III ге-

нерации штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ, процесс накопления биомассы, необходимой для приготовления микробной взвеси определенной концентрации, к последующим розливом, замораживанием, сублимационным высушиванием, герметизацией и упаковкой препарата, при этом количество микробных клеток в 1 мл готовой лекарственной формы препарата должно быть 20±10 млрд [2, 3].

Отсутствие стадии концентрирования туляремийного микроба в технологии ее производства приводит к ряду отрицательных моментов:

- потенциальная возможность выбраковки биомассы после процесса ее накопления в случае недостаточной для приготовления готовой лекарственной формы концентрации микроорганизма;
- возможная повышенная реактогенность вакцины из-за наличия питательной среды после выращивания микроорганизмов.

Принято выделять следующие методы концентрирования, нашедшие наиболее широкое применение для сгущения бактериальной массы, выращенной глубинным способом: седиментация, центрифугирование (сепарирование) и фильтрование, обладающие присущими им недостатками и достоинствами.

В связи с этим проведение научных исследований с целью экспериментального обоснования технологии концентрирования бактерий *F. tularensis* 15 НИИЭГ является актуальным.

Готовая лекарственная форма живой туляремийной вакцины представляет собой лиофилизат. Временной промежуток после получения нативной культуры *F. tularensis* 15 НИИЭГ до начала процесса сублимационного высушивания довольно длительный, что связано с оценкой качества нативной культуры с целью принятия (или непринятия) решения о начале процесса лиофилизации. Кроме того, в любом производстве возможно возникновение ситуаций, в результате которых проведение процесса сублимационной сушки в установленное время не представляется возможным.

Таким образом, актуальность исследований по определению условий и времени хранения концентратов биомассы *F. tularensis* вакцинного штамма 15 НИИЭГ представляет определенную научно-практическую значимость.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали штамм *F. tularensis* 15 линии НИИЭГ, полученный из Государственной коллекции патогенных бактерий «Микроб». В качестве плотной питательной среды на этапах подготовки культуры и анализа ее свойств использовали FT-агар (производство ГНЦ ПБМ, Оболенск).

Для оценки применимости методов концентрирования испытаниям подвергалась нативная культура *F. tularensis* 15 НИИЭГ, выращенная методом глубинного культивирования в течение 22 ± 1 ч при температуре $(37 \pm 0,5)$ °C на жидкой питательной среде на основе ферментативного гидролизата фибрина (рН $7,2 \pm 1$) [4]. В качестве критерия технологического применения методов концентрирования было принято 10-кратное увеличение концентрации микроорганизмов. Седиментацию суспензии туляремийного микроба проводили при температуре 2...10 °C с периодическим отбо-



Центрифуга Avanti J-301, Beckman Coulter

ром проб. Сгущение биомассы центрифугированием осуществляли на центрифуге Avanti J-301 (Beckman Coulter, США) при числе оборотов ротора, равном 12000, в течение 25 мин. Для оценки возможности применения фильтрационных методов использовали тангенциальную микрофильтрацию на микрофильтрационной установке Vivaflow 200 (Sartorius, Германия) через мембраны с размером пор 0,2 мкм.

Для исследований изменений характеристик концентрированной культуры *F. tularensis* 15 НИИЭГ в процессе хранения были выбраны 2 температурных интервала хранения – 2–8 °C и 18–24 °C.

Полученные концентраты анализировали по следующим показателям: концентрация микробных клеток, процент живых микробных клеток, степень диссоциации. Применяли методы, изложенные в фармакопейной статье на вакцину туляремийную живую [2].

Концентрацию микробных клеток измеряли по отраслевому стандартному образцу мутности – ОСО мутности 42-28-85-П (10 МЕ) ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России, эквивалентной концентрации 5 млрд кл. мл⁻¹, с учетом разведения пробы. Для расчета общей концентрации (ОК) использовали формулу:

$$OK = \frac{(0,5 + V) \times 5 \times 10^9}{0,5},$$

где V – объем 0,9% раствора натрия хлорида, взятого на разведение пробы, мл; 0,5 – объем испытуемого образца, мл; 5×10^9 – эквивалент туляремийного мик-

роба, соответствующий стандарту мутности (10 МЕ), м.к./мл.

Жизнеспособность (процент живых микробных клеток) определяли высевом на пластинки с ФТ агаром, учет проводили через 5 сут выдерживания посевов при температуре (37±1) °С. Из полученных проб (образцов) делали последовательные десятикратные разведения до 10⁻⁷, из которого по 0,1 мл взвеси отдельно для каждого образца высевали на 3 чашки Петри с питательной средой. За количество живых микробных клеток принимали среднее арифметическое определений количества выросших колоний в трех образцах. Содержание живых микробных клеток в процентах (% живых м.к.) рассчитывали по формуле:

$$\% \text{ живых м.к.} = \frac{\text{БК}}{\text{ОК}} \times 100\%,$$

где БК – количество живых м.к. в 1 мл; ОК – общая концентрация м.к.

Степень диссоциации культуры определяли по числу SR (белых) колоний от общего количества выросших колоний. После инкубации чашек Петри в термостате при температуре (37±1) °С в течение 5 сут их помещали на 24 ч в холодильник при температуре от 2 до 8 °С. После этого подсчитывали число иммуногенных, «белых», и неиммуногенных, «серых», колоний и вычисляли их процентное соотношение.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты исследований по экспериментальному обоснованию технологии концентрирования бактерий *F. tularensis* 15 НИИЭГ представлены в таблице 1.

Исходные показатели полученной биомассы (микробной суспензии) были следующие: концентрация микробных клеток – 26,8×10⁹ м.к./мл, жизнеспособность – (98±1)%, степень диссоциации – (81±2)%.

Таблица 1.

Результаты исследований
по экспериментальному обоснованию технологии
концентрирования бактерий *F. tularensis* 15 НИИЭГ

Метод концентрирования	После концентрирования		
	концентрация микробных клеток, м.к. в 1 мл	процент живых микробных клеток, %	степень диссоциации, % (кол-во SR (белых) колоний)
Центрифугирование	(270,9±0,9)×10 ⁹	58,9±2,2	87,2±2,2
Тангенциальная фильтрация	(315,9±0,9)×10 ⁹	98,2±0,2	81,3±0,5
Седиментация (до ½ объема)	(27,2±0,5)×10 ⁹	85,5±0,5	50±1

Исходя из данных, представленных в таблице, можно сделать вывод о том, что использование микрофильтрации позволяет достигнуть 10-кратного увеличения концентрации микробов в суспензии, при этом время протекания технологического процесса при объеме исходного материала 1,0 дм³ составило не более 1 ч. Это является более предпочтительным по сравнению с результатами седиментации, при которой 10-кратная степень концентрирования не была достигнута и через 39 сут (время наблюдения). Возможно, что добавление седиментирующих веществ позволит сократить время и увеличить количество иммуногенных (SR-колоний) клеток. Таким образом, время приготовления микробного концентрата сократилось более чем в 900 раз (в часах или в 38 раз – в сутках). В полуфабрикате вакцинного препарата, произведенном методом мембранного разделения (микрофильтрации), не происходило ухудшения характеристик в сравнении с нативной культурой *F. tularensis* 15 НИИЭГ, полученной после ее глубинного культивирования.

Что касается использования центробежного метода для концентрирования туляремийного микроба, можно констатировать следующее. Необходимая степень концентрирования достигалась за то же время, что и при тангенциальной фильтрации. Но жизнеспособность микробной суспензии сильно снижалась – на 40%, хотя этот показатель оставался в пределах регламентируемого (количество живых клеток должно составлять не менее 40% от общего количества микробных клеток). Данный способ концентрирования не влиял на степень диссоциации субпопуляции. Использование центробежного метода требует наличия боксированного сепарационного оборудования с автоклавируемыми узлами (ротор) для обеспечения защиты от контаминации суспензии вакцинного штамма и биологической безопасности производственного процесса.

Следует сказать о том, что полученные данные коррелируют с данными других исследователей. Так, в авторском свидетельстве на изобретение № 1792969 констатируется, что «осаждение бактериальных спор, полученных на плотных питательных средах и ресуспендированных в физиологическом растворе, проходит за 10 и более суток», а «полученных суспензионным способом – более чем за 35 суток» [5]. Также уместно привести результаты исследований, проведенные А.В. Пиковым. Им определен ряд недостатков сепарирования для концентрирования клеток *Brucella melitensis* REV-1 в технологическом процессе производства противобруцеллезной вакцины: сложность аппаратного оформления процесса; необходимость паровой стерилизации сепаратора; гибель клеток *B. melitensis* REV-1 из-за создаваемого давления в сепараторе и повышенной температуры; потери продукта

Таблица 2.

Результаты исследований по определению условий
и времени хранения концентратов биомассы
F. tularensis 15 НИИЭГ

Время хранения	Условия хранения	Показатели				
		концентрация микробных клеток, $\times 10^9$ м.к. в 1 мл.		процент живых микробных клеток, %		степень диссоциации, %
сут		2–8 °C	18–24 °C	2–8 °C	18–24 °C	2–8 °C
1		315,9 $\pm$ 0,9	315,9 $\pm$ 0,9	98,2 $\pm$ 0,2	97,5 $\pm$ 0,5	80,7 $\pm$ 0,5
2		н.о.*	н.о.*	95,6 $\pm$ 0,4	92,8 $\pm$ 0,8	83,8 $\pm$ 2,5
3		н.о.*	н.о.*	92,4 $\pm$ 0,4	84,5 $\pm$ 7,5	82,5 $\pm$ 1,5
6		н.о.*	н.о.*	87,3 $\pm$ 4,5	18,2 $\pm$ 4,5	81,3 $\pm$ 6,2
7		н.о.*	н.о.*	98,5 $\pm$ 0,5	3,2	79,5 $\pm$ 4,9
21		224 $\pm$ 5	200 $\pm$ 5	65 $\pm$ 0,5	0	61,5 $\pm$ 1,5
31		232 $\pm$ 5	н.о.	82,5 $\pm$ 0,5	0	63 $\pm$ 0,5
54		241 $\pm$ 5	н.о.	74,5 $\pm$ 6,4	н.о.	67,5 $\pm$ 0,5

Примечание: * – для титрации использовали значения концентрации, определенные на 1-е сутки [(315,9 $\pm$ 0,9) $\times 10^9$ м.к. в 1 мл].

при сепарировании из-за уноса части клеточной биомассы в фугат; длительность процесса. Вышеперечисленные недостатки были устранены за счет использования концентрирования клеток *B. melitensis* REV-1 микрофильтрацией в тангенциальном потоке жидкости с применением плоскостных мембранных модулей с порогом отсечки 0,2 мкм. При этом полученные концентраты полностью удовлетворяли требованиям нормативных документов [6].

На следующем этапе исследований определяли максимальный временной промежуток после получения концентрированной культуры *F. tularensis* 15 НИИЭГ до начала процесса сублимационного высушивания. Результаты исследований представлены в таблице 2.

Анализ данных таблицы 2 свидетельствует о том, что оптимальное время хранения концентрированной культуры *F. tularensis* 15 НИИЭГ при комнатной температуре составляет не более 3 сут, в условиях холодильника – не более 6 сут. По показателям концентрации микробных клеток и их жизнеспособности концентрат полупродукта соответствовал нормируемым значениям при хранении до 1 месяца при температуре от 2 до 8 °C. Возможно, что добавление в концентрат криопротекторов среды высушивания позволит увеличить продолжительность хранения без ухудшения показателя «степень диссоциации».

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в ходе проведенных исследований экспериментально оценены следующие методы концентрирования биомассы *F. tularensis* вакцинного штамма 15 НИИЭГ с целью использования в производстве живой туляреминой вакцины: се-

диментация, центрифугирование и тангенциальная фильтрация. Сравнительное изучение временных характеристик процессов, свойств полученных концентратов выявило преимущественность применения метода тангенциальной фильтрации. Выявлены температурно-временные режимы хранения концентрата туляреминого микроба до его переработки. Показана целесообразность хранения полупродукта до его дальнейшей переработки при температуре 2–8 °C не более 6 сут.

ЛИТЕРАТУРА

1. Об утверждении национального календаря профилактических прививок и календаря профилактических прививок по эпидемическим показаниям. Приказ Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации от 31 января 2011 г. № 51н. URL: <http://www.garant.ru/products/ipo/prime/doc/4092137/> (дата обращения 18.11.2016).
2. ФС.3.3.1.0019.15. Вакцина туляреминая живая // Государственная фармакопея Российской Федерации, XIII изд. Т. III. – М.: ФЭМБ, 2015. С. 952–957.
3. Инструкция по применению лекарственного препарата для медицинского применения. Вакцина туляреминая живая // Государственный реестр лекарственных средств. URL: http://grls.rosminzdrav.ru/Grls_View_v2.aspx?routingGuid=9ba98af5-a6d4-4b6f-afd9-5ff24b64bc65&t= (дата обращения 21.11.2016).
4. Патент RU № 2518282, МПК C12N1/20. Питательная среда для глубокого культивирования туляреминого микроба / О.А. Волох, М.В. Антонычева, Н.Г. Авдеева, Н.И. Вахрушина, А.К. Никифоров. – Бюлл. № 16. 2014.
5. Авторское свидетельство № 1792969 СССР, кл. С 12 N 1/02. Способ концентрирования бактериальных спор / И.А. Бакулов, В.А. Гаврилов, Ю.В. Числов и др. Заявл. 20.12.1988; опубл. 07.02.1993.
6. А.В. Пиков. Оценка различных фильтрующих модулей в технологии мембранного концентрирования нативных культур клеток *Brucella melitensis* REV-1 для получения полуфабриката противобруцеллезной вакцины // Ветеринарная медицина. 2009. № 4. С. 4–6.