

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА ПО НАДЗОРУ В СФЕРЕ ЗАЩИТЫ ПРАВ
ПОТРЕБИТЕЛЕЙ И БЛАГОПОЛУЧИЯ ЧЕЛОВЕКА
ФЕДЕРАЛЬНОЕ КАЗЕННОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
«РОССИЙСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ПРОТИВОЧУМНЫЙ ИНСТИТУТ «МИКРОБ»



На правах рукописи

БИБИКОВ ДМИТРИЙ НИКОЛАЕВИЧ

**РАЗРАБОТКА НОВЫХ МЕТОДИЧЕСКИХ ПРИЕМОВ
КУЛЬТИВИРОВАНИЯ, КОНЦЕНТРИРОВАНИЯ, ЛИОФИЛИЗАЦИИ И
МЕТОДОВ ОЦЕНКИ КАЧЕСТВА
ВАКЦИННОГО ШТАММА *FRANCISELLA TULARENSIS* 15 НИИЭГ**

03.01.06 – «Биотехнология (в том числе бионанотехнологии)»
03.02.03 «Микробиология»

Диссертация
на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Научные руководители
доктор биологических наук, профессор
КОМИССАРОВ АЛЕКСАНДР
ВЛАДИМИРОВИЧ

кандидат биологических наук
ВОЛОХ ОКСАНА АЛЕКСАНДРОВНА

Содержание

ВВЕДЕНИЕ.....	4
ГЛАВА 1 БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ И МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ПОЛУЧЕНИЯ ВАКЦИННЫХ ПРЕПАРАТОВ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ).....	16
1.1 Методы и технологии процессов культивирования, концентрирования и высушивания живых микробных культур.....	16
1.1.1 Методы и технологии процессов культивирования микробных культур.....	16
1.1.2 Концентрирование микроорганизмов.....	18
1.1.3 Лиофилизация микроорганизмов.....	23
1.2 Культивирование туляремийного микроба.....	30
1.3 Методы контроля физиологического состояния микроорганизмов.....	35
Заключение по обзору литературы.....	41
СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	43
ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	43
2.1 Оборудование и приборы.....	43
2.2 Материалы.....	44
2.2.1 Штаммы микроорганизмов.....	44
2.2.2 Лабораторные животные.....	45
2.2.3 Питательные среды и реактивы.....	45
2.3 Методы исследований.....	46
2.3.1 Физико-химические методы.....	47
2.3.2 Микробиологические методы.....	49
2.3.3 Иммунохимические методы.....	51
2.3.4 Биологические методы.....	52
2.3.5 Молекулярно-генетические методы.....	53
2.2.6 Статистическая обработка результатов.....	54
РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ.....	56
ГЛАВА 3 СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ ПОЛУЧЕНИЯ БИОМАССЫ ВАКЦИННОГО ШТАММА <i>FRANCISELLA TULARENSIS</i> 15 НИИЭГ.....	56
3.1 Оптимизация условий глубинного культивирования штамма-продуцента живой туляремийной вакцины <i>Francisella tularensis</i> 15 НИИЭГ для увеличения жизнеспособности и максимального выхода биомассы.....	56
3.1.1 Экспериментальное обоснование состава жидкой питательной среды на основе непищевого сырья (гидролизата фибрина) для культивирования <i>Francisella tularensis</i> 15 НИИЭГ.....	56
3.1.2 Аппаратное культивирование <i>Francisella tularensis</i> 15 НИИЭГ в питательной среде на основе гидролизата фибрина.....	62
3.2 Разработка экспериментальной технологии концентрирования биомассы вакцинного штамма <i>Francisella tularensis</i> 15 НИИЭГ методом тангенциальной фильтрации.....	66
3.3 Сравнительное изучение седиментационного, центробежного и фильтрационного методов концентрирования.....	75
3.4 Определение условий и времени хранения концентратов биомассы вакцинного штамма.....	77
3.5 Исследование свойств живой сухой туляремийной вакцины, полученной с применением новых биотехнологических подходов.....	80

Заключение по главе.....	83
ГЛАВА 4 ЛИОФИЛИЗАЦИЯ БАКТЕРИЙ ВАКЦИННОГО ШТАММА <i>FRANCISELLA TULARENSIS</i> 15 НИИЭГ.....	84
4.1 Определение эвтектических температур живой туляремийной вакцины.....	84
4.2 Совершенствование технологии лиофилизации живой туляремийной вакцины.....	85
4.2.1 Разработка нового биофармацевтического состава живой туляремийной вакцины.....	85
4.2.2 Определение эвтектических температур живой туляремийной вакцины с новым биофармацевтическим составом.....	91
4.2.3 Изучение влияния условий замораживания на жизнеспособность туляремийного микроба вакцинного штамма 15 НИИЭГ.....	92
Заключение по главе.....	95
ГЛАВА 5 РАЗРАБОТКА АЛЬТЕРНАТИВНЫХ ПОДХОДОВ К КОНТРОЛЮ КАЧЕСТВА ПРЕПАРАТА НА ЭТАПАХ ПОЛУЧЕНИЯ ЛИОФИЛИЗАТА ВАКЦИННОГО ШТАММА <i>FRANCISELLA TULARENSIS</i> 15 НИИЭГ.....	97
5.1 Оценка возможности использования новых инструментальных методов контроля туляремийного микроба на этапах получения экспериментальной туляремийной вакцины.....	97
5.2 Иммунохимические и молекулярно-генетические методы контроля культуры вакцинного штамма.....	104
Заключение по главе.....	111
ГЛАВА 6 ИЗУЧЕНИЕ СВОЙСТВ ГОТОВОЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ ФОРМЫ ЖИВОЙ ТУЛЯРЕМИЙНОЙ ВАКЦИНЫ, ПОЛУЧЕННОЙ ПО ЛАБОРАТОРНОЙ ТЕХНОЛОГИИ И СОПОСТАВЛЕНИЕ ТЕХНОЛОГИЧЕСКОЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНО ОБОСНОВАННЫХ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ЭТАПОВ ПОЛУЧЕНИЯ ЖИВОЙ ТУЛЯРЕМИЙНОЙ ВАКЦИНЫ В СРАВНЕНИИ С ДЕЙСТВУЮЩЕЙ ТЕХНОЛОГИЕЙ.....	112
6.1 Физико-химические и микробиологические свойства лабораторных серий живой туляремийной вакцины с новым биофармацевтическим составом.....	112
6.2 Иммунобиологические свойства лабораторных серий живой сухой туляремийной вакцины.....	114
6.3 Сопоставление технологической эффективности экспериментально обоснованных биотехнологических этапов получения живой туляремийной вакцины в сравнении с действующей технологией.....	120
Заключение по главе.....	124
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	125
ВЫВОДЫ.....	141
ПРЕДЛОЖЕНИЯ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ РЕЗУЛЬТАТОВ ДИССЕРТАЦИОННОГО ИССЛЕДОВАНИЯ.....	143
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	144
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	146

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования и степень ее разработанности.

В настоящее время в Российской Федерации заболеваемость туляремией носит спорадический характер, однако настораживает тенденция к увеличению заболеваемости и повышению количества выделяемых штаммов *Francisella tularensis*, циркулирующих в природных очагах. В 2019 г. эпизоотические проявления туляремийной инфекции выявлены в 51 субъекте Российской Федерации [52].

Вакцинация является мощным средством управления эпидемическим процессом и позволила с середины прошлого века в тысячу раз сократить количество заболевших туляремией людей в России при распространенности инфекции практически на всей территории страны. На сегодняшний день единственной зарегистрированной и разрешенной к применению в России вакциной является вакцина живая туляремийная сухая производства акционерного общества «Научно-производственное объединение по медицинским иммунобиологическим препаратам «Микроген» (НПО «Микроген»), созданная на основе вакцинного штамма 15 в научно-исследовательском институте эпидемиологии и гигиены (НИИЭГ) [76]. Вакцинация против туляремии включена в Национальный календарь профилактических прививок по эпидемическим показаниям. Ежегодно в России вакцинируют и ревакцинируют около 1 млн человек [71,76].

Несмотря на формирование стойкого иммунитета у привитых, данная вакцина не лишена недостатков, среди которых выдвигается ее повышенная, в ряде случаев, реактогенность. В направлении поиска новых штаммов-кандидатов для живой туляремийной вакцины ведется большая работа как отечественными [41,70,76,90,107], так и зарубежными исследователями [129,137,141,154,161]. Однако в настоящее время новая живая туляремийная вакцина не зарегистрирована как на территории Российской Федерации, так и за рубежом.

Эксперты ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Минздрава России (НЦЭСМП) при анализе современного состояния вакцинопрофилактики особо опасных инфекций указывают на ряд проблем и вопросов, требующих решения, среди которых – вопрос производства туляремийной вакцины: «...рассматривается возможность закрытия производства туляремийной и

бруцеллезной вакцин в НПО «Микроген» (филиал в Омске) и введение новой производственной площадки на базе НПО «Вирион» (филиал в Томске), в котором отсутствуют специалисты, имеющие опыт работы с туляремийным и бруцеллезным микробами...» [100]. В то же время РосНИПЧИ «Микроб», имеющий многолетний практический опыт производства профилактических вакцинных препаратов, располагает специалистами, обладающими необходимыми компетенциями в области работы с возбудителем туляремии. Подтверждением этому являются научные публикации, посвященные биотехнологическим, микробиологическим и другим процедурам, необходимым для производства живой туляремийной вакцины (ЖТВ) [13,14,25,30,53-55,123-125]. В связи с вышеназванным, проведение комплекса мероприятий (научных, организационных и так далее) по организации на базе РосНИПЧИ «Микроб», по крайней мере, резервного производства данного иммунобиологического лекарственного препарата является актуальным.

Основным компонентом вакцины туляремийной живой сухой являются клетки вакцинного штамма *F. tularensis* 15 линии НИИЭГ.

В технологии производства ЖТВ получение биомассы осуществляют в полужидких питательных средах в культуральных флаконах с аэрацией [83]. Выращивание культуры производят глубинным методом. Аэрацию осуществляют либо непрерывным пропусканием через толщу среды мелкораспыленного воздуха [43], либо непрерывным встряхиванием [109]. Посевная доза составляет от 0,5 до 1,0 млрд м.к./мл питательной среды. Эффективность полужидких сред, применяемых для производства вакцины, невелика – после 18 ч выращивания концентрация микроорганизмов увеличивается в 5-6 раз [43,83].

Недостатком культивирования возбудителя туляремии в полужидких средах является неравномерное распределение микроорганизмов и питательной среды по объему сосуда. Выращиваемая культура гетерогенна в физиологическом отношении. В условиях глубинного культивирования в биореакторе эффективно применение жидких питательных сред, использование которых даже без перемешивания позволяет увеличить выход биомассы, добиться большей однородности популяции микроорганизмов [9].

Питательные среды, используемые при выращивании микроорганизмов в производстве вакцин, наряду с основной задачей – обеспечение максимального

накопления биомассы, не должны приводить к увеличению стоимости готового препарата. В институте «Микроб» проведены экспериментальные исследования по конструированию питательных сред на основе гидролизата фибрина, являющегося побочным продуктом производства гетерологичного антирабического иммуноглобулина, и показана их эффективность при культивировании холерных вибрионов [5,33,34]. В связи с этим, исследования по созданию питательной среды на основе гидролизата фибрина для выращивания *F. tularensis* 15 НИИЭГ, имеют под собой определенную научно-практическую базу.

Технология производства туляремийной вакцины предусматривает получение посевных культур I, II и III генерации штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ, процесса накопления биомассы, необходимой для приготовления микробной взвеси определенной концентрации, 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 [116].

Отсутствие стадии концентрирования туляремийного микроба в технологии производства вакцины обладает рядом отрицательных моментов:

потенциальность 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.

Одним из перспективных направлений, применяемых в технологиях производства вакцин, является концентрирование целевых препаратов тангенциальной фильтрацией. Применение фильтрующих элементов с разным размером пор дает возможность концентрировать биологические препараты с различной молекулярной массой, практически без потерь целевого продукта. Использование химической стерилизации для текущей и заключительной обработки фильтрационного оборудования не требует использования пара, что должно существенно снизить энергоемкость производства [11]. Рядом ученых подтверждена возможность применения вышеназванного метода для концентрирования бактериальных культур [4,17,42,64,93,94]. Таким образом, актуальность научных исследований по разра-

ботке экспериментальной технологии концентрирования бактерий *F. tularensis* 15 НИИЭГ тангенциальной фильтрацией является очевидной.

По данным Государственного реестра лекарственных средств по состоянию на конец 2020 г. более 600 препаратов производятся в форме лиофилизата, из них на живые вакцины приходится 16 наименований [19].

Биофармацевтическая композиция туляремийной вакцины представляет собой многокомпонентную смесь, состоящую из клеток вакцинного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ, а также вспомогательных веществ (сахароза, натрия глутамата моногидрат, тиомочевина, желатин) [37].

Отсутствие научной литературы по обоснованию параметров процесса лиофилизации ЖТВ, а также выбору качественно-количественного состава среды высушивания диктует необходимость проведения исследований по возможности применения новых криопротекторов и оптимизации процесса сублимационной сушки, которые должны повысить качество готовой лекарственной формы вакцины с одновременным снижением затрат на проведение ее лиофилизации. Актуальным является совершенствование технологии производства ЖТВ, в частности разработки условий концентрирования жизнеспособной биомассы и поиску оптимальных параметров лиофильного высушивания препарата.

На этапах производства живых вакцин, в особенности культивирования биомассы, важное значение имеет информация о физиологическом состоянии культуры микроорганизмов, в частности о ее жизнеспособности. Традиционные методы оценки, как правило, являются длительными процедурами из-за необходимости пересева микроорганизмов и выполнения ряда других операций, не позволяющих технологу получать информацию в режиме реального времени с целью оперативного воздействия на технологический процесс. Данного недостатка лишен электрооптический (ЭО) способ анализа, в принцип которого положен постулат о том, что микроорганизмы являются электрофизическими объектами со слоистыми структурами и применения факта изменения оптических характеристик культуральной среды при ориентации бактерий в электрическом поле, функционально связанной со значением индуцированных зарядов. Данное явление было успешно использовано рядом исследователей при оценке физиологического состояния выращиваемой культуры микроорганизмов [15,23,36,60,132].

Определенными перспективами обладает и другой достаточно оперативный метод исследования механических и морфологических свойств бактериальных клеток в ответ на различные воздействия биогенных и абиогенных факторов на них [82] – атомно-силовая микроскопия (АСМ), успешно примененный для изучения морфогенеза поверхности спор бацилл [133], поверхностной вязкоупругости грамотрицательных бактериальных клеток [169]. Методом АСМ проводились исследования терморезистентности *Azotobacter chroococcum* [84], ростовых и морфологических характеристик производственных штаммов *Bifidobacterium* и *Lactobacillus* при использовании гидролизатно-молочной и гидролизатно-соевой питательных сред [119].

В связи с этим, оценка возможности использования новых инструментальных методов контроля – ЭО мониторинга и АСМ для анализа клеток *F. tularensis* вакцинного штамма 15 НИИЭГ имеет под собой определенную научно-практическую базу.

Современные иммунохимические и молекулярно-генетические методы контроля культур микроорганизмов обладают повышенной чувствительностью и презентативностью. Между тем, отсутствие научной литературы по их использованию в производственных процессах получения туляремийной вакцины ставит вопрос по экспериментальной оценке возможности их применения.

На основании вышеизложенного сформулированы цель и основные задачи исследования.

Цель и задачи исследования.

Цель работы – разработка и совершенствование биотехнологических этапов получения живой туляремийной вакцины.

Для достижения цели исследования были поставлены следующие задачи:

1. Экспериментально обосновать состав жидкой питательной среды на основе гидролизата фибрина для культивирования вакцинного штамма *Francisella tularensis* 15 НИИЭГ с целью получения биомассы и определить технологические параметры процесса.
2. Разработать технологию концентрирования клеточной массы вакцинного штамма *Francisella tularensis* 15 НИИЭГ методом тангенциальной фильтрации.

3. Разработать технологию сублимационного высушивания бактерий вакцинного штамма *Francisella tularensis* 15 НИИЭГ.

4. Экспериментально обосновать возможность применения новых методов контроля биомассы вакцинного штамма туляремийного микроба на этапах культивирования, подготовки биомассы и получения лиофилизата.

5. Изучить физико-химические, микробиологические и иммунобиологические особенности туляремийного микроба на разрабатываемых биотехнологических этапах и оценить качество готовой лекарственной формы живой туляремийной вакцины.

Научная новизна.

Экспериментально обоснованы качественный и количественный состав жидкой питательной среды на основе гидролизата фибрина для глубинного аппаратного культивирования клеток вакцинного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ (сухой гидролизат фибрина 5 %, глюкоза 1 %, пантотенат кальция 0,005 %, хлорид натрия 0,5 %, цистеин 0,1 %, рН (7,2±0,1), а также технологические параметры (температура, продолжительность, степень аэрации и скорость перемешивания) реализации данного процесса, дающие возможность обеспечивать увеличение биомассы в 17-24 раза.

Впервые для производства живой туляремийной вакцины разработана технологическая процедура концентрирования клеток вакцинного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ методом тангенциальной микрофльтрации.

Разработана технология сублимационного высушивания биомассы вакцинного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ во флаконах, защищенная патентом на изобретение РФ № 2716505 «Способ получения лиофилизата вакцины туляремийной живой». Экспериментально обоснован новый биофармацевтический состав живой туляремийной вакцины (состав приведен на 1 мл): клетки штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ – (10±5) млрд клеток; и вспомогательные вещества: трегалоза – 0,1 г; декстран – 0,01 г; хитозан – 0,02 г.

Впервые показана применимость электрооптического метода для определения показателя «жизнеспособность» бактерий вакцинного штамма туляремийного микроба. Выявлено, что метод электрооптического анализа позволяет оперативнее детектировать изменения жизненных показателей культуры клеток в процессе вы-

ращивания, чем показатели концентрации биомассы, а динамика показателя «анизотропия поляризуемости» соответствует изменению показателя «жизнеспособность».

Для определения показателя «подлинность» экспериментальной живой туляремийной вакцины показана эффективность применения иммунохимических и молекулярно-генетических методов контроля.

Теоретическая и практическая значимость.

Исследования, проведенные в рамках выполнения диссертационной работы, обладают прикладным характером и посвящены разработке и совершенствованию биотехнологических этапов получения живой туляремийной вакцины.

Разработаны состав жидкой питательной среды и технологические параметры глубинного аппаратного культивирования штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ, а также методические приемы концентрирования туляремийного микроба тангенциальной микрофльтрацией.

Обоснованы и внедрены в практику лабораторного производства состав среды высушивания и технологические характеристики лиофилизации бактерий вакцинного штамма туляремийного микроба во флаконах.

Показана оперативность оценки показателя «жизнеспособность» штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ при использовании электрооптического метода. Время, затраченное на проведение микробиологического анализа, составляет 5-6 сут, электрооптического мониторинга – 30-60 мин.

Предложен алгоритм использования молекулярно-генетических и иммунохимических методов для определения показателя «подлинность» в образцах лабораторных серий живой туляремийной вакцины и на стадиях ее получения. Выявлена информативность методов – полимеразная цепная реакция с электрофоретическим учетом результатов и дот-иммуноанализ с белком А, конъюгированным с золотыми наночастицами.

Основным практически значимым итогом диссертации является создание лабораторной технологической линии по выпуску вакцины туляремийной живой сухой. Предложенные решения нашли свое отражение в лабораторном регламенте на производство «Вакцина туляремийная живая сухая, лиофилизат для приготовления суспензии для внутрикожного введения и накожного скарификационного нане-

сения», утвержденном директором ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» 17 января 2019 г. По экспериментально обоснованным биотехнологическим процедурам, изложенным в регламенте, произведены 3 лабораторные серии живой туляремийной вакцины, полностью соответствующие требованиям нормативных документов, что позволяет перейти к этапу доклинических исследований.

Результаты экспериментов послужили научной основой для подготовки следующих нормативно-методических документов:

методические рекомендации «Концентрирование туляремийного микроба методом тангенциальной фильтрации», одобренные Учёным советом РосНИПЧИ «Микроб» (протокол № 1 от 7 марта 2017 г.) и утверждённые директором института 7 марта 2017 г.;

методические рекомендации «Лиофилизация живой туляремийной вакцины», одобренные Учёным советом РосНИПЧИ «Микроб» (протокол № 3 от 27 апреля 2018 г.) и утверждённые директором института 28 апреля 2018 г.

методические рекомендации «Электрооптический мониторинг жизнеспособности вакцинного штамма туляремийного микроба», одобренные Учёным советом РосНИПЧИ «Микроб» (протокол № 3 от 5 ноября 2020 г.) и утвержденные директором института 5 ноября 2020 г.

Теоретическая значимость исследования обоснована тем, что научно подтверждена необходимость использования в производстве живой туляремийной вакцины новых биотехнологических процедур и методических приемов контроля качества, имеющих целью увеличение стабильности технологии приготовления названного иммунобиологического лекарственного препарата. Изложенные в диссертации результаты изысканий служат теоретической основой для исследований в сфере развития технологических процессов приготовления живых бактериальных вакцин.

Материалы диссертации используются при проведении занятий со студентами, обучающимися по направлению подготовки 19.04.01 «Биотехнология» в Саратовском государственном аграрном университете имени Н.И. Вавилова.

Методология и методы исследования.

Предметом исследования являлась технология производства туляремийной живой вакцины. Объектом исследования служили биотехнологические процедуры приготовления вакцины: культивирование вакцинного штамма *F. tularensis* 15

НИИЭГ, концентрирование микробной биомассы, лиофилизация биофармацевтической композиции вакцины; процедуры ЭО мониторинга физиологического состояния бактерий, а также иммунохимические и молекулярно-генетические методы контроля культуры туляремийного микроба. Теоретической основой проведенных исследований являлись научные работы российских и иностранных ученых и сведения из нормативных документов по аспектам, освещаемым в диссертации.

В ходе экспериментов использовали следующие основные методы:

физико-химические – определение рН, времени растворения лиофилированного препарата и седиментационной устойчивости, показателя «проходимость через иглу», остаточной влажности, точности розлива, наличия вакуума в первичной упаковке осуществляли по стандартным методикам. Определение аминокислот проводили методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). При установлении температуры замерзания и эвтектических температур применяли метод определения удельного электрического сопротивления, разработанный Rey L. [162];

микробиологические – определение чистоты микробной культуры (наличие посторонних микроорганизмов), концентрации клеток в микробных взвесах, жизнеспособности (процент живых микробных клеток), степени диссоциации культуры, обсемененности бактериями органов животных-биомоделей. Морфологию туляремийного микроба исследовали, применяя световую и атомно-силовую микроскопию. Для оценки физиологического состояния бактерий штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ использовали ЭО способ анализа;

иммунохимические методы – применяли реакцию непрямой гемагглютинации (РНГА), иммунохроматографический анализ (ИХ), иммуноблоттинг, иммуноферментный анализ (ИФА) и дот-иммуноанализ (ДИА);

биологические методы – проведение исследований на мышах и морских свинках, определение веса животных, оценка общего состояния на установление специфической безопасности, прививаемости и иммуногенности вакцины;

иммунологические методы – определение титра антител к возбудителю туляремии, постановка реакции лейкоцитолита (РЛ);

молекулярно-генетические методы – постановка полимеразной цепной реакции (ПЦР);

статистическую обработку результатов экспериментов осуществляли по стандартной методике определения грубых ошибок, а также с вычислением средней арифметической (M); средней ошибки средней арифметической (m). Расчеты осуществляли с помощью Microsoft Office Excel 2010.

Положения, выносимые на защиту.

1. Проведение процесса глубинного аппаратного культивирования клеток вакцинного штамма *Francisella tularensis* 15 НИИЭГ в разработанной жидкой питательной среде обеспечивают увеличение биомассы в 17-24 раза.

2. Концентрирование биомассы вакцинного штамма *Francisella tularensis* 15 НИИЭГ методом тангенциальной микрофльтрации дает возможность получать суспензию туляремийного микроба с характеристиками, позволяющими ее использование для получения готовой лекарственной формы вакцины.

3. Разработанная биофармацевтическая композиция живой туляремийной вакцины и экспериментально обоснованные параметры ее сублимационного высушивания дают возможность производить лиофилизат препарата, соответствующий нормируемым характеристикам.

4. Электрооптический метод мониторинга физиологического состояния микробной популяции туляремийного микроба дает возможность оперативно анализировать показатели «жизнеспособность» и «концентрация» клеток *Francisella tularensis* 15 НИИЭГ на этапах культивирования, подготовки биомассы и получения лиофилизата.

5. Полученные лабораторные серии живой туляремийной вакцины, произведенные по разработанным технологическим процедурам, отвечают нормируемым характеристикам.

Степень достоверности итогов исследований базируется на достаточном количестве полученных опытных результатов, их согласованности с теоретическими данными, статистическом анализе итогов экспериментов и проведении измерений на оборудовании прошедшем метрологическую поверку и калибровку. Выводы диссертации теоретически и экспериментально обоснованы и согласуются с целью и задачами работы.

Апробация результатов.

Результаты экспериментов отражены в докладах на ежегодных научно-практических конференциях РосНИПЧИ «Микроб» (Саратов, 2016-2020) и представлены на научных конференциях и съездах различного уровня: «Биология – наука XXI века» (Пушино, 2017), «Актуальные проблемы болезней, общих для человека и животных» (Ставрополь, 2017), «Обеспечение эпидемиологического благополучия: вызовы и решения» (Санкт-Петербург, 2017), «Современные проблемы биофизики, генетики, электроники и приборостроения» (Саратов, 2018), «Обеспечение санитарно-эпидемиологического благополучия в государствах-участниках СНГ» (Саратов, 2018), V международной конференции молодых ученых: биотехнологов, молекулярных биологов и вирусологов (Новосибирск, 2018).

Тема и план диссертации одобрены Учёным советом ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» (протокол № 4 от 6 апреля 2018 г.).

Личный вклад автора заключается в определении цели и задач работы, непосредственном участии в нахождении эффективных решений поставленных задач, постановке экспериментов и интерпретации результатов, оформлении научных статей, патента на изобретение, разработке нормативных и методических документов. Некоторые экспериментальные исследования проведены совместно с к.б.н. Кузнецовой Е.М., к.б.н. Уткиным Д.В., к.ф.-м.н. Ерохиным П.Н., к.б.н. Ульяновым А.Ю., Мироновой Н.П., Авдеевой Н.Г., Борисовой С.В., Холматовым К.И. Аминокислотный анализ сухого ферментативного гидролизата фибрина был проведен к.б.н. Н.Ю. Селивановым в ИБФРМ РАН. Автор выносит всем огромную благодарность.

Связь работы с научными программами.

Работа выполнена в ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» в рамках научно-исследовательских тем 48-2-14 «Разработка и внедрение в производство МИБП новых решений, направленных на повышение качества препаратов и эффективности технологических процессов», 70-2-17 «Разработка и совершенствование биотехнологий промышленного выпуска иммунобиологических средств профилактики и диагностики инфекционных заболеваний бактериальной и вирусной природы», 83-2-20 «Совершенствование

этапов производства и методов контроля лечебно-профилактических и диагностических препаратов в РосНИПЧИ «Микроб».

Публикации.

По теме диссертации опубликовано 15 работ, из них 4 статьи в журналах из «Перечня изданий, которые входят в международные реферативные базы данных и системы цитирования и в соответствии с пунктом 5 правил формирования перечня рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук», 4 статьи в журналах из «Перечня ведущих рецензируемых научных журналов и изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени доктора и кандидата наук», 6 публикаций в сборниках и материалах конференций, патент на изобретение РФ № 2716505 «Способ получения лиофилизата вакцины туляремийной живой».

Структура и объем диссертации.

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, собственных исследований, включающих в себя материалы и методы исследований, результаты исследований и их обсуждение, а также заключения, выводов, списка используемых литературных источников, включающего 173 наименования. Работа изложена на 160 страницах и иллюстрирована 24 рисунками, 30 таблицами.

ГЛАВА 1 БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ И МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ПОЛУЧЕНИЯ ВАКЦИННЫХ ПРЕПАРАТОВ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

1.1 Методы и технологии процессов культивирования, концентрирования и высушивания живых микробных культур

1.1.1 Методы и технологии процессов культивирования микробных культур

Применение конкретного метода культивирования микроорганизма определяется не только его питательными потребностями, но и целями получения биомассы. Процессы культивирования микроорганизмов группируются по ряду признаков, предложенных Баснакьян И.А. (таблица 1) [9].

Таблица 1 – Классификация процессов культивирования микроорганизмов

Признак группирования	Характеристика процесса
Вид питательной среды	Поверхностные и глубинные
Способ функционирования	Периодические, полунепрерывные, непрерывные
Перемешивание культуральной жидкости	Гомогенные, гетерогенные и смешанные; динамические и статические
Рециркуляция культуральной жидкости	Частичная, полная рециркуляция, отсутствие рециркуляции
Способ воздействия на процесс	Хемостатные, оксигенные, турбидостатные, рН-статные, СО ₂ -статные, люминостатные и т.д.
Физическое состояние вещества внутри биореактора	Однофазные и многофазные
Тип биореактора	Идеального смешивания и идеального вытеснения
Питание кислородом	Аэробные и анаэробные
Количество стадий процесса	Одно-, двух- и многостадийные

Культивирование микроорганизмов в целях получения биомассы для производства вакцин на плотных питательных средах производилось, по имеющимся у нас сведениям, до начала XXI века. При этом использовались аппараты АКМ-Ш, которые позволяли производить принудительную аэрацию. На данных культиваторах производили процессы выращивания холерных вибрионов, чумного и сибире-

язвенного микробов [1,29,85]. Среди очевидных недостатков используемого метода можно выделить практически полное отсутствие возможности управления процессом, «малый» выход биомассы, дороговизну плотных питательных сред, возможность контаминации в ходе выращивания [30].

Для культивирования микроорганизмов с целью производства вакцин наиболее часто используется периодический способ культивирования. Так, он реализован в технологиях производства живых вакцин для людей: чумной [64], сибиреязвенной [4] и ветеринарных: бруцеллезной [95] и сибиреязвенной [8]. Недостатком данного способа является практически полное отсутствие возможности воздействия на протекание технологического процесса в силу того, что все компоненты (при этом не всегда в оптимальных количествах), необходимые для развития микробной популяции, вводятся в культуральную среду в самом начале процесса.

Более совершенным является культивирование микроорганизмов с дополнительным введением в ходе процесса выращивания в культуральную среду веществ, способствующих росту культуры (процесс с «подпиткой»). Названная технология применяется при выращивании холерных вибрионов в производстве холерной химической вакцины [29]. Исследователями отмечено, что применение оптимального алгоритма введения глюкозы в ходе культивирования *Vibrio cholerae* наиболее полно отвечает физиологическим потребностям микроорганизма [46,47]. Авторами одной из работ было отмечено, что схема культивирования штамма *Yersinia pestis EV* для получения фракции 1 чумного микроба с дробной подкормкой глюкозой является более совершенной в сравнении с обычным периодическим культивированием [30].

Одним из вариантов культивирования микроорганизмов с подпиткой служит отъемно-доливной метод (полунепрерывное культивирование), при котором определенная доля культуральной жидкости отбирается на переработку, а такое же количество питательной среды добавляется в биореактор. Использование этой процедуры позволило увеличить количество биомассы *F. tularensis* до 14 дм³ с исходных 4 дм³ [30]. Имеются сведения об успешном использовании данной методики культивирования при выращивании *V. cholerae* [81]. В результате сравнительного анализа периодического и полунепрерывного культивирования *Shigella flexneri* выявлено, что общее количество биомассы увеличивается при использовании последне-

го способа, при этом выделенные антигены обладают повышенной иммунологической активностью [102].

Основным отличием процесса непрерывного культивирования, основанном на постоянном добавлении питательной среды в культуральную жидкость, является практически постоянное нахождение культуры микроорганизмов в экспоненциальной стадии развития.

Диализное культивирование является частным случаем непрерывного метода. Его основной характеристикой является непрерывное внесение в культуральную среду питательных компонентов сквозь непроницаемую для микроорганизмов мембрану, а также отвод через нее продуктов жизнедеятельности. Для приготовления профилактических препаратов данный способ в экспериментальных целях использовался для выращивания клостридий ботулизма [80], возбудителей чумы и холеры [49].

В институте «Микроб» были проведены исследования по использованию непрерывного культивирования *V. cholerae* для получения иммуногенов холерной химической вакцины [12]. Специалистами ВНИТИБП показана возможность непрерывного культивирования *Pasteurella multocida* для получения ветеринарных вакцин [117]. Во всех случаях исследователями констатировалось увеличение абсолютного количества биомассы в сравнении с периодическим способом.

Однако мы не нашли подтверждения применения непрерывных методов культивирования в производстве бактериальных вакцин. На наш взгляд, это связано со следующими обстоятельствами: трудность соблюдения однородности питательной среды, вносимой в ходе процесса; существенные дополнительные капиталовложения, возникающие за счет необходимости использования большего количества производственных площадей, емкостного и сепарирующего оборудования и ряд других.

1.1.2 Концентрирование микроорганизмов

Применение конкретного метода с целью концентрирования микроорганизмов, в особенности в производственных условиях, лимитируется, в первую очередь, свойствами микроорганизмов, а также имеющейся аппаратурно-технологической базой для проведения процесса.

Принято выделять следующие методы концентрирования, нашедшие наиболее широкое применение для сгущения бактериальной массы: седиментация; центрифугирование; фильтрование.

В основе процесса седиментации (оседания взвешенных (в жидкости или газе) твёрдых частиц в гравитационном поле) лежит разность плотностей этих частиц и дисперсной среды.

В качестве основного недостатка использования метода седиментации для концентрирования бактериальных культур подавляющим числом исследователей выделяется большая длительность процесса. Так, 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» [8]. Отделение культуральной жидкости микробной культуры штамма *Y. pestis* EV в производстве живой чумной вакцины от биомассы осуществляется седиментацией в течение 48 ч при температуре от 4 до 8 °C [42,64]. Данный способ применялся в Тбилисском НИИВС при производстве живой сибиреязвенной вакцины, продолжительность процесса составляла до 10 сут [4].

Разновидностью «простого» способа седиментации для концентрирования микроорганизмов является добавление в культуральную жидкость вспомогательных веществ, способствующих повышению скорости осаждения бактериальной массы и более полному ее отделению. В основе процесса лежат, как правило, методы коагуляции (агрегация частиц за счет воздействия электролитов) и флокуляции (формирование агрегатов частиц за счет воздействия поверхностно-активных веществ). Авторами показано, что использование белкового щелочного экстракта клеток в качестве коагулянта позволяет достичь более высокой степени концентрирования таких микроорганизмов, как *Candida guilliermondii*, *Candida utilis*, *Candida lipolytica* [38]. Аналогичный прием применялся в США, где в качестве коагулянта использовался щелочной гидролизат казеина или сои [167].

Имеются сведения о возможности концентрирования микроорганизмов с применением метода флокуляции. Так, Кулагиной Е.М. показана возможность использования полиакриламидных полимеров для агрегации дрожжевых клеток *Saccharomyces cerevisiae* [56]. Авторы констатируют, что после предварительной

агрегации биомассы флокуляцией ее целесообразно подвергнуть концентрированию фильтрацией или сепарированием. Для этого же вида микроорганизмов в качестве флокулянта были использованы полиэтиленимин и полидиметилдиаллил-аммония хлорид [108]. Куренковым В.Ф. делается вывод о возможности концентрирования дрожжей *Candida scotti* и клеток *Escherichia coli*, применяя их флокуляцию полиакриламидными полимерами [57]. Метод флокуляции применялся для концентрирования кормовой биомассы при использовании в качестве флокулянта предварительно этерифицированную низшими одноатомными спиртами водорастворимой белковой фракции биомассы микроорганизмов [51], водную вытяжку дрожжевого плазмолизата [121]. Фроловой М.А. был сделан вывод о возможности применения хитозана в качестве флокулянта для концентрирования бактерий *P. multocida* [115]. Хитозан также был применен для сгущения бактериальной массы *E. coli*, которую далее отделяли от культуральной жидкости в неоднородном магнитном поле [68]. Без сомнения, скорость концентрирования с использованием седиментации флокуляцией и коагуляцией повышается, однако это процесс занимает значительное количество времени – от 1 до 3 сут. Кроме того, в составе готовой формы препаратов вводимых людям неизбежно будут присутствовать дополнительные вещества, используемые в качестве коагулянтов и флокулянтов. Это, в свою очередь, может привести к повышению реактогенности препаратов.

Существенно снизить продолжительность процесса концентрирования микробной биомассы позволяют центробежные методы (осаждение микроорганизмов под воздействием центробежной силы) с применением центрифуг или сепараторов.

Центробежные методы разделения используют как для отделения биомассы микроорганизмов от культуральной жидкости для последующего выделения находящихся в ней целевых продуктов, так и непосредственно для концентрирования биомассы. Так, экзотоксин, продуцируемый *Fusobacterium necrophorum* штамма «0-1»(ВИЭВ) и используемый далее для изготовления вакцины против некробактериоза животных, отделяют центрифугированием культуральной бактериальной суспензии [62].

В авторском свидетельстве на изобретение СССР 1792969 делается вывод о нецелесообразности использования сепарирования для концентрирования бактериальных спор из-за трудности создания условий, гарантирующих незагрязнение ма-

териала посторонней микрофлорой и возможности выброса микроорганизмов в окружающую среду [8]. Если в случае отделения биомассы от культуральной жидкости с целью последующей ее переработки возможная контаминация посторонней микрофлорой концентрируемых микроорганизмов не является критической, то в случае, если биомасса является целевым продуктом, это недопустимо. Тем не менее, концентрирование сепарированием микроорганизмов достаточно широко применялось при производстве бактериальных вакцин. В качестве примера можно привести производства живых сибиреязвенной вакцины для людей и бруцеллезной ветеринарной вакцины [4,93].

В настоящее время все более широкое применение находят фильтрационные методы концентрирования микроорганизмов, которые, как правило, лишены недостатков, присущих седиментационным и центробежным методам.

Пиковым А.В. [93] определены ряд недостатков применяемых методов концентрирования клеток *Brucella melitensis REV-1*, а именно седиментации и сепарирования в технологическом процессе производства противобруцеллезной вакцины. Так, по мнению автора, для седиментации характерны малая скорость процесса (от 1 до 3 сут); процесс осуществляется при пониженной температуре (от 6 до 8 °С), что влечет за собой применение охлаждающих агентов и, соответственно, удорожание стоимости вакцины; применение химических реагентов, способствующих увеличению скорости седиментации, что может вызвать повышение реактогенности препарата; недостижение, в ряде случаев, необходимой концентрации микроорганизмов. В качестве недостатков сепарирования выделяются: 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 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 плоскорамных мембранных модулей с порогом отсечки 0,2 мкм, при этом полученные концентраты полностью удовлетворяли требованиям нормативных документов [94,95].

Аналогичные недостатки были выявлены и устранены за счет использования микрофльтрации в тангенциальном потоке жидкости с применением плоскорамных мембранных модулей, при производстве живых сибиреязвенной [4] и чумной вакцин [42,64].

Гавриловым В.А. после проведения аналитического обзора методов концентрирования бактериальных культур было отдано предпочтение методу тангенциальной фильтрации для сгущения биомассы в технологии производства нативного симбиотического препарата из штамма *E. coli* VL-613 [17].

В научной литературе также имеются сведения об использовании микрофльтрации для отделения клеточной биомассы после процесса ее выращивания. Данный технологический прием применяется в том случае, когда целевым продуктом являются продукты жизнедеятельности микроорганизмов. По сути, этот процесс также является концентрированием, только концентрированная биомасса далее не используется для получения целевых продуктов.

При получении холерного токсина была предложена технологическая процедура отделения холерного вибриона после его культивирования тангенциальной фильтрацией на плоскорамных элементах с порогом отсечки 0,2 мкм [149]. Аналогичный технологический прием применен для получения протективных антигенов, продуцируемых штаммами *Bacillus anthracis* 55ΔТПА-1Spo- [72], *B. anthracis* СТИ-1 [122], *B. anthracis* 55-ВНИИВВиМ [110], токсина, продуцируемого штаммом *Pseudomonas aeruginosa* [73], антигенов штаммов *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris*, *E. coli* и *Staphylococcus aureus* [27], токсина ArpI, продуцируемого бактерией *Actinobacillus pleuropneumoniae* [61].

Имеются сведения о применении ультразвука для концентрирования клеточных суспензий. Так, исследователями показана возможность концентрирования дрожжей, применяя поле стоячей ультразвуковой волны [3,92,97,98].

Между тем, использование данного метода, по крайней мере, на сегодняшний момент, вряд ли найдет применение в условиях производства, связанных с использованием живых микроорганизмов. Определяется это, в первую очередь, с недостаточной изученностью влияния данного процесса на физиологическое состояние живых микроорганизмов и отсутствием промышленно производимого оборудования для реализации процесса концентрирования. Так, Садикова Д.Г. в диссер-

тационном исследовании, посвященном действию сил на клетки в суспензии в поле стоячей ультразвуковой волны констатирует, что «результаты данного исследования могут быть использованы для разработки и оптимизации ультразвуковых методов быстрого выделения, сепарации и концентрирования клеток различного типа в суспензиях» [98].

1.1.3 Лиофилизация микроорганизмов

Лиофилизация живых культур микроорганизмов является одним из основных методов их сохранения при продолжительном хранении в коллекционных центрах [96]. Однако не всегда технологические приемы, применяемые в сублимационном высушивании данных препаратов, могут быть применены для высушивания бактериальных вакцин в связи с тем, что по нормативной документации данные препараты должны сохранять определенное количество жизнеспособных клеток. Так, к примеру, для ЖТВ данный показатель составляет не менее 40 %. В коллекционных культурах, как правило, задачей ставится следующее – «...Даже единичные живые клетки, сохранившиеся в сухих препаратах, после подтверждения их аутентичности могут быть использованы для получения следующей генерации штамма» [20].

В качестве первичной упаковки лиофилизированных лекарственных препаратов используют, в основном, ампулы и флаконы. При этом следует отметить, что в последнее время предпочтение отдается последним [35,50]. На наш взгляд, это, в первую очередь, объясняется следующими причинами. Технология герметизации ампул с препаратом после лиофилизации предусматривает их выгрузку из сушильного аппарата, с последующим запаиванием. Во время выполнения этих операций может произойти контаминация образцов. Предотвратить появление подобных ситуаций представляется возможным разработкой технологии лиофилизации во флаконах на сублимационном сушильном оборудовании, позволяющем производить операции герметизации первичной упаковки непосредственно в камере лиофилизатора.

Так, анализ данных Государственного реестра лекарственных средств показал, что порядка 90 % лиофилизированных лекарственных препаратов (по состоянию на конец 2020 г.) выпускаются во флаконах. Ряд исследователей констатиру-

ют, что при переходе производства лиофилизатов от ампул к флаконам существенно снижается количество брака препаратов по критерию герметичность [50].

Следует отметить, что имеются работы по приготовлению сублимационно высушенных препаратов в шприцах [35,155,173]. Без сомнения, что данная форма выпуска является наиболее удобной для практического использования в здравоохранении, но лишь только в том случае, если все количество препарата является одной человеко-дозой.

Принято процедуру лиофилизации разделять по следующим основным стадиям: заморозка, первичное высушивание (сублимация) и вторичное высушивание (десорбция).

Процессы, протекающие на стадии заморозки, устанавливают структуру продукта. Она, в свою очередь, определяет ход остальных этапов сушки, а, в ряде случаев, требуемые свойства полученного вещества [24,159,166]. На данный момент определено, что заморозка протекает по двум путям отвердевания: кристаллизация, основной особенностью которой служит организованность молекул, и аморфизация, которая характеризуется пространственной дезориентацией молекул. Следует заметить, что иногда для вещества характерны все перечисленные пути отвердевания [144,159,166]. Структура замороженного продукта напрямую определяет интенсивность сушки при сублимации и десорбции [163].

В промышленных технологиях сублимационного высушивания заморозка препарата производится, в основном, установкой емкостей с продуктом на полку лиофилизационной камеры с дальнейшим доведением температуры полки, а значит и продукта до требуемой, используя линейное уменьшение температуры [135,147]. Общепринято, что кристаллизация протекает по двум фазам: образование кристаллов, а также их увеличение. Образование кристаллов определяется, в основном, количеством твердой субстанции в жидкости и начинается при установлении криоскопической температуры, являющейся характерной у отдельного продукта [144]. Вследствие большего уменьшения температуры происходит вымораживание жидкости и увеличение ледяных кристаллов. Это приводит к сгущению имеющихся твердых компонентов и уменьшает температуру плавления неотвердевшей жидкости [143,162].

В криобиологии, для процессов заморозки, происходящих по пути кристаллизации, существует понятие температуры эвтектики. Под ней подразумевают наименьшее значение данного параметра, при котором определенная доля замораживаемого продукта еще находится в жидком состоянии. Последующее уменьшение, в основном, на 2-10 °С, дает абсолютную кристаллизацию несвязанной влаги [144,166]. Для процессов замерзания продукта, протекающих по механизму аморфизации, введено понятие температуры стеклования, которое характеризуется наибольшим сгущением твердой фракции [147]. Аналогично вышеназванному факту последующее уменьшение, также в основном, на 2-10 °С, дает полную заморозку несвязанной влаги. В любом случае в отвердевшем веществе имеется порядка 5-20 % неотвердевшей влаги, которая прочно связана с твердыми компонентами раствора различными силами [24,166].

Первичное высушивание, при котором основное количество отвердевшей влаги выводится из вещества сублимацией, начинается за счет создания давления разрежения в сушильной установке. Его побудительной силой служит отличие значений давления паров влаги отвердевшего вещества и сушильной установки. Показано, что вакуум в сушильной установке следует создавать ниже давления насыщенных паров отвердевшего вещества. Это является условием обеспечения операции перемещения несвязанной жидкости из замороженного положения в пар, без жидкой стадии. Обратная процедура происходит в конденсаторе сушильной установки, температура которого лежит в пределах от минус 60-80 °С, что на 20-40 °С меньше аналогичного показателя в отсеке лиофилизации [138,143,166]. Интенсивность сублимации определяется рядом факторов, к основным из которых можно отнести:

высота лиофилизируемого продукта, при этом имеется обратная зависимость между этими характеристиками [166];

пористость отвердевшего вещества, зависящая, как правило, от температурно-временных характеристик процедуры замораживания [144];

площадь лиофилизируемого вещества, при этом зависимость является практически прямопорциональной [24];

температура греющих полок, а соответственно, и продукта. При увеличении данной характеристики интенсивность сублимации повышается [78].

Что касается последнего фактора, то необходимо учитывать следующее обстоятельство: необходимо, чтобы температура продукта не превышала значений температуры его эвтектики или стеклования. Невыполнение этого условия может привести к полному или частичному оттаиванию лиофилизируемого вещества и возникновению эффекта коллапса. Это, в свою очередь, по мнению Tang X. et al., приводит к увеличению остаточной влажности и ухудшению целевых характеристик лиофилизатов [166]. Однако, по данным многих ученых, сублимация в области эвтектики или стеклования дает возможность получать лиофилизаты, удовлетворяющие предъявляемым требованиям [78,79,130,136,153,165]. Следует сказать о том, что область эвтектики или стеклования является индивидуальной для каждого продукта.

При отборе всей отвердевшей несвязанной влаги сублимация прекращается. Для десорбции связанной влаги прибегают к увеличению температуры продукта, до установления требуемого уровня остаточной влаги. Интенсивность десорбции зависит от интенсивности диффузии влаги. Исследователями выявлено, что уровень остаточной влаги определяется температурой процедуры десорбции и площадью продукта, а также не определяется величиной вакуума в сушильной установке и высотой лиофилизируемого вещества [138]. Можно сказать, что задача выбора температурно-временных параметров лиофилизации имеет важное значение. Недостаточный нагрев продукта приводит к удлинению лиофилизации, а избыточный может привести к оттайке вещества и возможной порче продукта.

В статье Грачевой И.В. и Осина А.В., по материалам научной литературы дан обзор по существующим на данный момент механизмам повреждений бактерий при лиофилизации, а также основным веществам, снижающим этот негативный аспект [20]. Авторы группируют пути повреждения микроорганизмов по трем технологическим процедурам: при замораживании, при высушивании и при хранении. Мы позволили себе тезисно показать ряд важных фактов, которые, на основании проведенного анализа литературы, показаны исследователями: для снижения отрицательного воздействия замораживания целесообразно осуществлять его с максимально возможной скоростью; выживаемости клеток способствует заморозка до температуры меньше температуры эвтектики или стеклования; сохраняемость бактерий после высушивания определяется составом защитной среды, остаточной

влажностью бактериального продукта, способом его герметизации и условиями хранения.

Имеются противоречивые сведения о зависимости концентрации клеток на их выживаемость после сублимационного высушивания. Так, Похиленко В.Д. [96], с ссылкой на ряд авторов, констатирует: «При изучении корреляции между плотностью популяции и выживанием после лиофилизации *Streptococcus cremoris* было установлено, что с увеличением концентрации с 10^6 до 10^9 клеток/мл процент выживаемости также увеличивается. С другой стороны, увеличивающаяся концентрация приводит к межклеточным контактам, продукции токсических метаболитов и т.д., что уменьшает жизнеспособность». Также в этой статье заслуживает внимание следующее положение: «К основным факторам, влияющим на результаты консервации микробных культур перед сохранением, относят метод культивирования (поверхностный или глубинный), температурный режим, состав и рН питательной среды, аэрацию. Также большое значение имеют возраст, физиологическое состояние и концентрация клеток культуры».

Что касается условий хранения, то они жестко регламентированы нормативными документами, в частности, СП 3.3.2.3332-16 [106], и этот факт не должен составлять предмет исследования.

Признано, что хранение лиофилизированных микроорганизмов в условиях вакуума обеспечивает их большую выживаемость в сравнении с теми препаратами, которые были загерметизированы в первичной упаковке в условиях доступа атмосферного воздуха, а оптимальная остаточная влажность для хранения лиофилизатов бактерий составляет от 1 до 5 % [67,96].

Могилюк В. в обзорной статье, посвященной ряду аспектов лиофилизации, все вспомогательные вещества, используемые при сублимационном высушивании, делит на несколько групп: наполнители – создание матрицы для основного вещества; буферные растворы – для контроля рН; регуляторы тоничности – для контроля осмотического давления; модификаторы структуры – для улучшения характеристик матрицы с целью лучшего преодоления сопротивления потоку пара; стабилизаторы – для защиты основного вещества от пересушивания и воздействия низких температур; ингибиторы разрушения – для повышения температуры, при которой может произойти разрушение структуры высушиваемого продукта [74].

Спектр применяемых вспомогательных веществ, а также их количественно-качественных соотношений достаточно широк. Мы позволили себе представить в таблице 2 наиболее употребительные, по данным Constantino H.R. и Pikal M.J. [138], вспомогательные вещества используемые в процессах лиофилизации, а также на основании данных Государственного реестра лекарственных средств России, обобщить эти данные для живых вакцин (таблица 3).

Таблица 2 – Вспомогательные вещества, используемые в процессах лиофилизации

Группа вспомогательных веществ	Наименование вспомогательных веществ
Наполнители	Сахара (маннитол, сахароза, глюкоза, трегалоза, лактоза, сорбитол, рафиноза) Аминокислоты (глицин, аргинин, гистидин) Полимеры (декстран, полиэтиленгликоль)
Буферные растворы	Лимонная кислота, натрий лимоннокислый, калий лимоннокислый, винная кислота, натрий фосфорнокислый, трис-НСI, трис-ацетатный буфер, хлорид цинка, ацетат натрия, ацетат калия, аргинин
Регуляторы pH	Соляная кислота, гидроксид натрия
Регуляторы тоничности	Хлорид натрия, глицерол, маннитол, сахароза, глицин
Модификаторы структуры	Маннитол, поливинилпирролидон
Стабилизаторы	Сахароза, глюкоза, трегалоза, маннит, манноза, лактоза, декстран, гидроксиэтилкрахмал, полиэтиленгликоль, как полисорбаты (полисорбат-20, полисорбат-80), глицин, аргинин, лейцин, серин, натрия глутамата моногидрат
Ингибиторы разрушения	Декстран, желатин, гидроксиэтилкрахмал, фиколл (полисахароза)

Таблица 3 – Вспомогательные вещества, применяемые при лиофилизации живых вакцин

Наименование вакцины	Вспомогательные вещества
1	2
Вакцина гриппозная живая моновалентная «Инфлювир»	Сахароза, лактоза, глицин, (гидроксиметил)-аминометан, натрия хлорид, желатин
Вакцина желтой лихорадки живая	Лактоза, сорбитол, L-гистидин, L-аланин

1	2
Вакцина клещевого энцефалита культуральная очищенная концентрированная	Альбумин человека донорский (стабилизатор), сахароза (стабилизатор), желатин (формообразователь), бычий сывороточный альбумин, протамин-сульфат
Вакцина против краснухи культуральная живая аттенуированная	Сорбитол, желатин, L-аргинина гидрохлорид, натрия хлорид, лактальбумина гидролизат, L-аланин, неомицина сульфат
Вакцина оспенная живая	Пептон
Вакцина коревая культуральная живая	Гентамицина сульфат: стабилизатор – смесь 0,01 мл 10 % раствора желатины и 0,04 мл водного раствора ЛС-18 (сахароза – 250 мкг, лактоза – 50 мг, глицин – 25 мг, L-пролин – 25 мг, Хенкса сухая смесь с феноловым красным – 7,15 мг, вода для инъекций – до 1 мл
Вакцина паротитная культуральная живая	Гентамицина сульфат – не более 20 мкг: стабилизатор – смесь 0,01 мл 10 % раствора желатины и 0,04 мл водного раствора ЛС-18
Вакцина паротитно-коревая культуральная живая	Гентамицина сульфат – не более 20 мкг: стабилизатор – смесь 0,01 мл 10 % раствора желатины и 0,04 мл водного раствора ЛС-18
Вакцина Е сыпно-тифозная комбинированная живая	Молоко коровье обезжиренное
Вакцина туберкулезная живая для щадящей первичной иммунизации (БЦЖ-М)	Натрия глутамата моногидрат
Вакцина чумная живая (вариант 1)	Лактоза, декстрин, тиомочевина, аскорбиновая кислота
Вакцина чумная живая (вариант 2)	Сахароза, желатин, тиомочевина
Вакцина против кори, паротита и краснухи живая культуральная «Приорикс»	Лактоза, сорбитол, маннитол, аминокислоты, неомицина сульфат
Вакцина бруцеллезная живая	Сахароза, натрия глутамат моногидрат, тиомочевина, желатин
Вакцина сибиреязвенная живая	Сахароза – 10 % раствор
Вакцина туляремийная живая	Сахароза, натрия глутамата моногидрат, тиомочевина, желатин (агар-агар)

Анализ таблицы 3 свидетельствует о том, что из шестнадцати наименований имеется полное совпадение вспомогательных веществ у следующих вакцин – вакцина паротитная культуральная живая и вакцина паротитно-коревая культуральная живая, а также вакцина бруцеллезная живая и вакцина туляремийная живая. Первые две производятся филиалом НПО «Микроген» в г. Москва, а последние – филиалом НПО «Микроген» в г. Омск. Наверное, именно этим объясняется идентичность вспомогательных веществ.

1.2 Культивирование туляремийного микроба

Представлялось целесообразным проанализировать данные научной литературы по особенностям процесса выращивания *F. tularensis*.

Поскольку питательные потребности туляремийного микроба являются основой для разработки производственных сред и технологических параметров процесса культивирования клеток вакцинного штамма *F. tularensis*, мы провели анализ соответствующих литературных данных. Как правило, первым шагом в конструировании оптимальной композиции питательной среды служит качественный выбор требуемых для роста и развития микроорганизмов химических форм биогенных элементов. К сожалению, проведенный поиск литературы по данному вопросу показал на практически полное отсутствие данных. В монографии Олсуфьева Н.Г. [83], имеется небольшой подраздел, посвященный химическому составу *F. tularensis*. В нем констатируется следующее «... содержание белка, нуклеиновых кислот и нуклеопротеида в клетках *F. tularensis* близко к тому, что обнаруживается у других грамотрицательных бактерий». Также им приведены следующие данные по количественному составу ряда веществ, в %: общий азот – 11,0-12,45, общий фосфор – 1,58-1,75, редуцирующие вещества (на глюкозу) – 9,19-9,94, глюкозамин – 1,11-2,01, нуклеиновые кислоты (по фосфору) 16,27-18,03, белок – 61,54-50,72, нуклеопротеид – 68,75-77,81.

Морозова Т.П. с соавт., с ссылкой на работу Олсуфьева Н.Г., констатируют, что «в процессе эволюции он (туляремийный микроб) приспособился к существованию в организме теплокровных животных, где полностью удовлетворяет свои пищевые потребности» [77]. Они же, ссылаясь на работу Francis E., свидетельствуют, что «характерной особенностью возбудителя туляремии является высокая потребность в цистине и тиамине».

Еще в начале 60-х годов прошлого столетия исследованиями Анциферова М.И. было показано влияние концентрации аминного азота в питательной среде на рост туляремийного микроба. Им был сделан вывод: «при концентрации в среде 50 мг% аминного азота микроб не растет: с повышением содержания аминного азота до 150 мг% чувствительностью среды возрастает; дальнейшее повышение концентрации аминного азота не улучшает ростовых качеств среды» [6].

Исследованиями Майского В.Г. с соавт. [66] показана потребность туляремийного микроба в определенном наборе аминокислот: Arg, Cys, His, Ile, Leu, Lys, Met, Pro, Thr, Tyr, Val. Также выявлено, что для размножения *F. tularensis* целесообразно присутствие в питательной среде витаминов В₅ и В₁, ионов магния. При конструировании синтетической питательной среды для обеспечения максимального роста *F. tularensis* исследователями было показано необходимость присутствия в ней пантотената кальция, урацила, аденина и гуанина [156].

В монографии Павлова В.М. и Дятлова И.А. [90] представлены современные данные молекулярно-генетических и биохимических особенностей разных подвигов туляремийного микроба. Отмечена, в частности, чувствительность к содержанию в среде ионов железа и ряда аминокислот.

Лещенко А.А. с соавт. делает вывод, что для улучшения ростовых свойств питательной среды в ней необходимо присутствие стимуляторов роста *F. tularensis*, к которым они отнесли кровь или субстанции, приготовленные из нее [63], что согласуется с данными других исследователей [145,158].

подавляющим числом исследователей делается вывод, что для полноценного развития туляремийного микроба ему требуется источник энергетического питания, в качестве которого используется, как правило, глюкоза [30,43,63,65,83,118,124,125].

Проведенный анализ литературы по питательным потребностям туляремийного микроба выявил, что он достаточно строг к качественно-количественному составу компонентов, необходимых для его развития. В связи с этим, для выращивания *F. tularensis* применяли и применяют, как правило, питательные среды, обладающие сложным составом.

Культивирование туляремийного микроба осуществляют на плотных, в полужидких и жидких питательных средах. Мы посчитали целесообразным рассмотреть особенности выращивания *F. tularensis* именно в этой последовательности.

Первые упоминания по технологическим приемам культивирования *F. tularensis* относятся к 40-м годам прошлого столетия. Так, Гайским Н.А. получение вакцинной эмульсии осуществлялось на желточной среде Мак-Коя или цистинном агаре при температуре 37 °С в течение 24-48 ч, после чего микробная биомасса смывалась физиологическим раствором и использовалась для получения

вакцины. Необходимо отметить, что продуктивность данного способа не превышала 3 млрд м.к. [18]. Авторским коллективом Всесоюзного научно-исследовательского института прикладной микробиологии разработана плотная питательная среда и предложены методические приемы культивирования туляремийного микроба [65]. Состав питательной среды был следующим: забуференный гидролизат рыбной кормовой муки, ферментализат черного альбумина, дрожжевой экстракт или смесь витаминов группы В, сернокислый магний, сернокислый натрий, цистеин, глюкоза, агар. Концентрация инокулята составляла 5×10^6 м.к./мл, выращивание осуществлялось при температуре 37 °С в течение 48 ч. Авторы, на основе экспериментов по выращиванию *F. tularensis* 15 НИИЭГ, задекларировали увеличение выхода биомассы при производстве диагностикумов в 1,5 раза в сравнении с известной питательной средой (в описании патента на изобретение не раскрыт состав «известной» среды).

В диагностических целях широкое применение нашла кровяная рыбно-дрожжевая-глюкозо-цистиновая среда, состоящая из следующих компонентов: гидролизаты свежей рыбы (рыбной муки), желатины – 20 и 10 мл; аутолизат дрожжей – 2,5 мл; хлористый натрий – 0,5 г; глюкоза – 1 г; цистин – 0,1 г; агар – 1-2 г; дистиллированная вода – 100 мл; рН 7,2-7,4; 10% дефибрированной крови кролика или лошади, обладающая достаточно хорошей чувствительностью [28].

В результате исследований проведенных в Иркутском противочумном институте разработаны кровяная и желточная плотные питательные среды (агар Хоттингера, 5 % куриного желтка в 0,9 % растворе хлорида натрия, а также 1 % дефибрированной крови). Данные среды были эффективны в бактериологической диагностике туляремии [6].

Широко применяется среда (FT-агар) содержащая по 10 г/л сердечно-мозгового настоя, бактотриптона, дрожжевого экстракта, казаминовых кислот. Кроме того, в данную среду перед применением вносят раствор, содержащий сульфат магния, сульфат железа (II), хлорид калия, гидрофосфат калия, глюкозу, цистеин, цитрат натрия [91]. Исследованиями специалистов ГНЦ ПМБ доказана эффективность зарегистрированного «Набора реагентов для бактериологических исследований «Питательная среда для культивирования и выделения туляремийного микроба, сухая (FT-агар) по ТУ 9398-028-78095326-2007» (ФСР 2007/00899) для

культивирования и выделения *F. tularensis* при полевых испытаниях [77]. Показано успешное применение FT-агара для выращивания музейных штаммов туляремийного микроба [91].

В российском патенте на изобретение 2333948 [63] описана питательная среда для выращивания возбудителя туляремии следующего состава, г/л: магний сернокислый – 0,5; натрий сернокислый – 0,7; железо сернокислое – 0,03; цистин – 0,5; тиамин хлорид – 0,005; глюкоза – 10,0; кислота никотиновая – 0,008; экстракт (автолизат) пекарских дрожжей – 3,5; агар-агар – 20; ферментативный гидролизат крови крупного рогатого скота, разведенный дистиллированной водой до содержания аминного азота 160-180 мг % – остальное. Авторы декларируют в качестве технического результата – повышение скорости роста и эффективности питательной среды в отношении *F. tularensis*.

За пределами России для выращивания *F. tularensis* применяют плотные питательные среды с кровью. Наиболее известная из них – разработанный Francis E. шоколадный агар, в составе которого мясопептонный агар, цистин, глюкоза, соль и 5-10 % дефибринированной кроличьей крови. В настоящее время является коммерческой питательной средой (Becton Dickinson, BD), широко используется для накопления чистой культуры туляремийного микроба [157,160]. Для выделения туляремийного микроба, согласно рекомендациям ВОЗ, применяется сердечно-цистиновый агар с 9% бараньей кровью, прогретый до лизиса эритроцитов (СНАВ) [128,134,158,164,171]. Подробно питательные среды, используемые при диагностике туляремии в нашей стране, изложены в коллективных монографиях [26,76].

Использование плотных питательных сред для накопления биомассы туляремийного микроба обладает теми же недостатками, которые были нами показаны в предыдущем подразделе обзора литературы.

Более целесообразным, по крайней мере, для накопления туляремийного микроба, является его выращивание в полужидких и жидких средах. Первое упоминание об использовании жидкой питательной среды для выращивания туляремийного микроба датировано 1923 г. Francis E. предложил сывороточно-глюкозо-цистиновый бульон [142]. Накопление биомассы происходило пленкой на поверхности среды, при этом если количество инокулята было менее чем 10^9 м.к./мл, то роста не наблюдалось. Применение сред с белковой основой (различных вариаций)

приводил, в ряде случаев, при аэрировании культуральной жидкости в течение 24 ч, к конечному выходу биомассы до 10^{10} м.к./мл [83].

Для приготовления ЖТВ, по имеющимся у нас данным, используется культивирование *F. tularensis* в полужидких средах в следующей композиции: гидролизаты свежей рыбы, печени или мяса – 20-30 %, гидролизат желатины – 10 %, желатин – 1,5 %, хлористый натрий – 0,5 %, глюкоза – 1 %, цистин – 0,1 %. рН культуральной жидкости составляет 7,2-7,3 [43]. Количество инокулята – 0,5-1,0 млрд м.к./мл. Снабжение микробной культуры кислородом осуществляется либо за счет подачи воздуха, либо за счет встряхивания. Констатируется, что конечная концентрация спустя 18-20 ч после проведения процесса составляет от $3,0 \times 10^9$ до $6,0 \times 10^9$ м.к./мл.

При изучении биохимических, антигенных и протективных свойств внешней мембраны возбудителя туляремии культивирование *F. tularensis* проводили в биореакторе с применением среды следующего качественного состава: серноокислый гидролизат рыбкостной муки, минеральные соли, витамины, цистин, глюкоза. Процесс проводили от 16 до 18 ч при температуре 37 °С [118].

В монографии Олсуфьева Н.Г. описана жидкая синтетическая среда, разработанная Traub R. et al., состоящая из ряда аминокислот (Arg, Asp, Cys, His, Ile, Leu, Lys, Met, Pro, Ser, Thr, Tyr, Val), а также тиамин, спермин, минеральные соли, глюкоза. Культивирование туляремийного микроба осуществлялось с аэрацией. Продуктивность процесса составляла от 16×10^9 до 40×10^9 м.к./мл [83].

Специалистами ГНЦ ПМБ предложена простая жидкая питательная среда (Д-бульон) для наработки биомассы туляремийного микроба с целью выделения ДНК и антигенов из бактериальных клеток, а также для культивирования трансформантов *F. tularensis* (состав приведен на 1 л): дрожжевой экстракт – 5 г, калия фосфат однозамещенный – 12 г; калия гидроксид – 3,9 г; натрий хлористый – 10 г; цистеина гидрохлорида моногидрат – 0,1 г, сульфат железа (II) 7-водного – 6 мг, глюкоза – 2 г; рН среды 7,2) [59].

Анализ доступной литературы также выявил, на наш взгляд два важных обстоятельства: исследования, посвященные конструированию питательных сред и параметров выращивания туляремийного микроба, датируются, в подавляющем большинстве, прошлым столетием; практически полностью отсутствуют научные

работы, посвященные разработке и исследованию процесса управляемого глубинного культивирования *F. tularensis*. Для последнего случая можно выделить цикл исследований Шепелева И.А. с соавт. по разработке процесса выращивания туляремийного микроба с целью получения протективных антигенов. Так, в результате выполнения эксперимента по культивированию *F. tularensis* 15 НИИЭГ в колбах на термостатируемой качалке с использованием FT-бульона были выявлены временные интервалы фаз развития туляремийного микроба. Авторами показано, что «Лог-фаза длилась 8 ч. Экспоненциальная продолжалась 16 ч. Стационарная фаза наступила спустя сутки от начала выращивания. Максимальное количество биомассы (10×10^9 м.к./мл) отмечено в 24-часовых пробах» [124]. При выращивании *F. tularensis* 15 НИИЭГ с применением FT-бульона в биореакторе вместимостью 10 дм³ были определены условия проведения технологического процесса, способствующие накоплению биомассы. Показано, что требуется ввод воздуха в культуральную среду в количестве 2,0...3,5 дм³/мин при частоте вращения мешалки 63 рад/с; оптимально поддержание рН культуральной среды в интервале 6,8...7,0. Также, с целью поддержания требуемого значения рН, выявлена необходимость введения в питательную среду дигидрофосфата калия из расчета 1,0 г на 1,0 дм³ среды выращивания [123]. Также в ходе исследований выяснено, что введение глюкозо-витаминной (витамины В₁ и В₃) добавки культуральную среду в начале экспоненциальной стадии развития микробной популяции позволяет увеличить концентрацию туляремийного микроба на 50 % (до 18×10^9 м.к./мл) [30,125]. Авторами также исследована возможность применения отъёмно-доливного метода культивирования *F. tularensis* 15 НИИЭГ. Для этого исследователи в начале экспоненциальной стадии развития микробной популяции отбирали половину культуральной жидкости и вносили такое же количество питательной среды с глюкозо-витаминной добавкой. Пятикратное выполнение данной процедуры дало возможность увеличить количество биомассы [30,125].

1.3 Методы контроля физиологического состояния микроорганизмов

В процессе культивирования микроорганизмов важное значение имеет информация о физиологическом состоянии выращиваемой культуры. К примеру,

можно получить «выход» биомассы туляремийного микроба 100 млрд м.к./мл, а жизнеспособность не будет превышать 40 %. В данном случае весь полученный полупродукт подлежит выбраковке из-за несоответствия последнего показателя нормативным требованиям. Между тем, в ходе процесса выращивания жизнеспособность микробной популяции варьируется во времени [97]. В связи с этим целесообразно было провести анализ литературных данных о разработанных методических подходах, позволяющих оперативно анализировать состояние бактериальной культуры.

Характеристики физиологического состояния микроорганизмов дают представление о ряде процессов, протекающих при росте как единичного микроорганизма, так и всей культуры. К основным физиологическим параметрам развития микроорганизмов принято относить следующие: концентрация микроорганизмов, период удвоения и средний возраст популяции, а также ее гетерогенность. В свою очередь, последний параметр характеризуется рядом показателей: возрастная градация микроорганизмов, их распределение по размеру, пропорция между микроорганизмами, обладающими и не обладающими способностью к делению (жизнеспособность) [10].

Концентрация микроорганизмов определяется как прямым визуальным подсчетом, так и инструментальными методами. Методика измерения первыми методами подробно описана в Государственной фармакопее РФ (ОФС.1.7.2.0008.15 Определение концентрации микробных клеток).

Широкое применение нашли следующие методы:

подсчет под микроскопом с использованием счетной камеры. Существует несколько видов счетных камер, принципиальное устройство которых одинаково: Тома-Цейсса, Бюркера, Горяева, камера подсчета с сеткой Нейбауэра;

подсчет клеток на мембранных фильтрах с их предварительным окрашиванием карболовым эритрозином или акридиновым оранжевым (при использовании люминесцентного микроскопа);

визуальное сравнение мутности исследуемой взвеси со стандартным образцом мутности, для которого известен числовой микробный эквивалент.

Для всех названных выше методов характерно обязательное, как правило, наличие подготовительных операций, не позволяющих получать данные в режиме

реального времени. Кроме того, для туляремийного микроба использование методов подсчета микробных клеток в счетных камерах затруднительно, в связи с малым размером клетки и способностью к агрегации при высоких концентрациях.

Имеются сведения о возможности определения концентрации микроорганизмов по содержанию ряда веществ. Так, Ignatov S.G. et al. декларируют корреляцию между концентрацией клеток и лактатом [148]. Наиболее распространенными прямыми измерениями данного параметра является определение с использованием оптических и электрических методов. Среди электрических наибольшее распространение нашел метод разработанный американцем Coulter W.H., который также применяется для определения размера клеток [140]. Базисным положением метода является возможность измерения импульса напряжения в момент протекания суспендированной клетки сквозь микроотверстие, при этом его амплитуда коррелирует с объемом клетки. Сам автор изобретения к одним из недостатков метода относит необходимость разбавления исследуемой суспензии при больших концентрациях клеток [139]. Для инструментального измерения концентрации микроорганизмов по оптической плотности суспензии применяется спектрофотометрия. Однако, как правило, началу измерения предшествуют такие операции, как отбор культуры и ее разбавление до рабочей концентрации. Следует сказать о том, что в последнее время используются датчики оптической плотности, позволяющие измерять данный параметр в режиме «он-лайн». Проведя корреляцию с измеренными значениями оптической плотности и концентрации микроорганизмов (измеренной другим методом) можно контролировать содержание микроорганизмов в режиме реального времени [131].

Распределение микроорганизмов по размеру определяется многими факторами: условия выращивания, нахождение популяции в той или иной стадии развития [10], наличия в культуральной среде неорганических соединений [151] и т.д. Основным методом определения распределения микроорганизмов по размеру являются микроскопические. В настоящее время применяются автоматизированные системы, дающие возможность существенно повысить производительность выполнения измерений. Для осуществления измерений применяются оптикомеханические, телевизионные, зондовые и другие сканирующие устройства [120].

Ключевым параметром гетерогенности клеточной популяции служит пропорция между микроорганизмами, обладающими и не обладающими способностью к делению. Как правило, он определяется по результатам высева взвеси микроорганизмов на плотную питательную среду с последующим подсчетом колоний. Процесс определения занимает иногда до нескольких суток.

В настоящее время все более широкое применение для анализа физиологических параметров культуры микроорганизмов достаточно широко применяется ЭО способ, в принцип которого положен постулат о том, что микроорганизмы являются электрофизическими объектами со слоистыми структурами и применения факта изменения оптических характеристик культуральной среды при ориентации бактерий в электрическом поле, функционально связанной со значением индуцированных зарядов.

Спектр использования ЭО метода достаточно широк. Мы позволили себе привести лишь несколько примеров, характерных для биотехнологических и микробиологических процессов. Так, на примере клеток *E. coli* и *Bacillus thuringiensis* ЭО метод успешно был использован для оценки жизнеспособности микроорганизмов при проведении технологических процедур их культивирования, концентрирования и лиофилизации [15,36,60]. При этом констатировалось: «На получение и обработку электрооптических данных уходит не более 20 мин» [36]. Исследованиями Гулий О.И. показана возможность применения этого метода для определения метаболической активности микробных клеток при катаболизме низкомолекулярных соединений и определения чувствительности микроорганизмов к действию антибиотиков [23,132,146]. Исследователями показана возможность использования метода ЭО анализа клеточных суспензий для определения специфичности бактериофага, выделенного из клеток *Azospirillum brasilense* Sp7, в отношении клеток хозяина и близкородственных штаммов [22,39,89]. Одним из перспективных направлений использования ЭО метода является, как утверждают авторы: «Определение точки прекращения культивирования, соответствующей моменту максимальной концентрации жизнеспособных клеток» [21].

В микробиологии все большее распространение для исследования механических и морфологических свойств бактериальных клеток, в том числе в ответ на различные воздействия биогенных и абиогенных факторов на них, находит АСМ.

Точкой отсчета использования АСМ принято считать 1981 г. В этом году был изобретен сканирующий зондовый микроскоп, в основе работы которого лежит регистрация взаимодействия, возникающего между сенсором (зондом) и поверхностью образца при сканировании. Результатом сканирования является цифровое трехмерное изображение поверхности изучаемых структур с нанометровым латеральным и пространственным разрешением [82].

АСМ является одним из методов изучения поверхностной структуры клеток возбудителей особо опасных инфекционных болезней и проведения морфометрического анализа [113].

Спектр использования АСМ в микробиологии достаточно широк и имеется значительное количество экспериментальных работ по его применению. Не претендуя на полное освещение этой проблемы, а это, на наш взгляд, можно было изложить в не одной монографии, мы позволили себе привести ряд примеров.

Исследованиями Chada V.G.R. et al. при изучении морфогенеза поверхности спор бацилл *B. anthracis*, *Bacillus subtilis* и *Bacillus cereus* методом АСМ получены следующие результаты. Ими выявлены различия в поверхностях оболочек отдельных штаммов. Это, по мнению авторов, указывает на то, что АСМ может быть полезным инструментом для идентификации спорных видов в условиях, когда традиционные методы неуместны, например, для характеристики биологического оружия. Также определена роль белков оболочки CotA, CotB и CotE в морфологии поверхности спор [133].

Vadillo-Rodriguez V. et al. при исследовании поверхностной вязкоупругости грамотрицательных бактериальных клеток анонсированы следующие результаты. Выявлено, что механические свойства клеточных стенок бактерий могут играть важную роль в правильном росте и делении клеток, при этом относительная упругость и вязкость клеток зависит от химического состава клеточной стенки бактерий и взаимодействия между различными структурными компонентами. Продемонстрировано, что изменения механических свойств клеток в ответ на внешние воздействия, таких как обработка глутаровым альдегидом, можно контролировать, что может дать важное представление о механизме действия антибиотиков [169].

Олюниной Л.Н. с соавт. исследована возможность использования АСМ для сравнительного анализа терморезистентности клеток *A. chroococcum* бб. Показано,

что размеры бактериальных клеток и структурированность их клеточных стенок изменяются в зависимости от дозы гипертермического воздействия, состава сред нагревания и последующего культивирования. Выявлено, что термоиндуцированное увеличение стандартного параметра шероховатости поверхности (R_a) и размеров клеток отражает повышенный уровень их устойчивости к гипертермии [84].

Исследователями проведен сравнительный анализ ростовых и морфологических характеристик производственных штаммов *Bifidobacterium adolescentis* МС-42, *Bifidobacterium bifidum* 1, *Bifidobacterium longum* В-379, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* 8-79 и *Lactobacillus plantarum* 8РАЗ при их культивировании на гидролизатно-молочной и гидролизатно-соевой средах с последующей морфометрией полученных бактериальных клеток с использованием АСМ. Установлено, что морфологические характеристики выращенных бактериальных клеток мало зависят от среды культивирования и определяются преимущественно родовой принадлежностью изученных производственных штаммов. Авторами подчеркивается, что именно использование АСМ позволило получить данные результаты [119].

Методом АСМ проведены исследования клеточной поверхности исходного родительского штамма *E. coli* К12 J62 his{-} Ra-хемотипа и трансдуктанта *E. coli* К12 J62 his{+}, который приобрел способность синтезировать первичные S-специфические боковые цепи липополисахарида O-антигена *S. flexneri* (группоспецифический фактор 3,4) и может быть использован в качестве штамма-носителя при изготовлении живых векторных вакцин. Сравнительный анализ изображений генетически связанной пары штаммов *E. coli* К12 J62 выявил существенные отличия в топографии поверхностных структур сравниваемых бактериальных клеток, отличающихся по способности синтезировать фактор 3,4 *S. flexneri*, представленный повторяющимися цепями L-рамнозы и N-ацетил-D-глюкозамина [127].

Игнатовым С.Г. разработана и реализована методология специфической визуализации прокариотических клеток и их фрагментов для сверхчувствительной идентификации микроорганизмов с помощью АСМ на основе аффинных поверхностей. Показано, что использованные приемы повышают чувствительность выявления микроорганизмов и их идентификации [36].

В диссертационной работе Ерохина П.С., посвященной изучению морфофункциональных характеристик микроорганизмов и их сообществ (биопленок) при воздействии различных факторов биотической и абиотической природы с использованием методов АСМ были представлены следующие основные результаты. Показано, что под влиянием антибиотика Цефазолин-АКОС формируется гетерогенность морфологических свойств популяций *E. coli* и дезорганизация поверхностных клеточных структур. Дозы антибиотика, не вызывающие глубоких нарушений, способствуют образованию микробных биопленок. Комплекс трех количественных показателей (индекса I, определяющего защиту бактериальной клетки, шероховатости, силы адгезии) позволяет оценивать различия в биофизических показателях бактерий организованного сообщества микроорганизмов (биопленки). Автор декларирует, что результаты работы дают возможность тестирования новых химических соединений в качестве антибактериальных, антисептических и дезинфицирующих средств на основе широкого спектра биофизических показателей [31].

Заключение по обзору литературы

Изложенные в обзоре литературы сведения по основным биотехнологическим и микробиологическим аспектам получения вакцинных препаратов дают возможность резюмировать следующее.

Представленные способы культивирования микроорганизмов разнятся по эффективности получения целевого вещества, материальным и другим затратам, что в конечном итоге оказывает влияние на конечную цену продукции. Для выращивания штаммов-продуцентов в производстве вакцин, используется, как правило, периодический способ.

Что касается имеющихся сведений по выращиванию туляремийного микроба, то возможно сделать вывод о том, что до настоящего времени, по крайней мере, в России, для накопления *F. tularensis* отсутствуют методические подходы по реализации управляемого глубинного культивирования. Представленные данные по питательным потребностям туляремийного микроба позволяют заключить, что для полноценного развития *F. tularensis* необходима достаточно сложная по качественно-количественному составу компонентов питательная среда, в состав которой

должны входить аминокислоты, белки, пептоны, глюкоза, ряд минеральных солей, субстанции крови и витамин В₁ и В₃.

Анализ данных литературы по применяемым технологическим приемам для концентрирования микроорганизмов выявил применимость седиментационных, центробежных и фильтрационных методов для выполнения данной процедуры. Первый метод имеет ограничения для его использования из-за большой длительности процесса. Для второго метода характерны ряд недостатков, которые могут оказаться критическими в производстве ЖТВ: контаминация биомассы посторонней микрофлорой и гибель клеток при проведении процесса. Показано, что метод тангенциальной фильтрации обладает потенциалом для его использования с целью сгущения биомассы микроорганизмов.

Проведенный обзор литературы по аспектам лиофилизации микроорганизмов выявил целесообразность применения флаконов в качестве первичной упаковки в силу того, что их герметизацию возможно осуществлять непосредственно в камере лиофилизатора. Показано, что на выживаемость бактерий при сублимационной сушке оказывает влияние ряд параметров: скорость замораживания, а также температурно-временные параметры процессов первичной сушки и десорбции. Установлено, что правильный подбор качественно-количественных характеристик среды высушивания способствует сохранению целевых свойств лиофилизируемых препаратов.

Анализ научной и нормативной литературы показал отсутствие комплексных данных об особенностях получения жизнеспособной иммуногенной биомассы вакцинного штамма туляремийного микроба, знание и применение которых способствует повышению эффективности производственных процессов. Это является еще одним аргументом для выполнения данного исследования.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Все работы с ПБА проводились в соответствии с требованиями СП 1.3.3118-13 [104] и СП 1.3.2322-08 [103]. Свойства штамма *F.tularensis* 15 НИИЭГ и лабораторных серий ЖТВ оценивались в соответствии с МУ 3.3.1.2161-07 и ФС.3.3.1.0019.15 [86,116].

2.1 Оборудование и приборы

Выращивание клеток вакцинного штамма *F.tularensis* 15 НИИЭГ осуществляли в лабораторном и пилотном F3-50 Bionet (Bionet, Испания) ферментерах с рабочими объемами 0,2-1,0 л и 10-50 л (общие объемы 1,5 и 70 л, соответственно), на термостатируемом шейкер-инкубаторе Infors Multitron II (Infors, Швейцария) при 37 °С в колбах Эрленмейера разного объема (от 250 мл до 2000 мл).

Световую и атомно-силовую микроскопию клеток туляремийного микроба проводили на световом микроскопе Axio Scope A1 (Zeiss, Германия) и атомно-силовом микроскопе Solver P47-PRO (NT-MDT, Россия).

Для концентрирования биомассы *F.tularensis* 15 НИИЭГ использовали установку для микрофльтрации Vivaflow-200 (Sartorius, Германия) с мембранным модулем 0,22 мкм, с площадью фильтрации, равной 0,02 м².

Центрифугирование проводили на высокоскоростной центрифуге Avanti J-30I (Beckman, США) при 10000 g, настольной центрифуге Eppendorf MiniSpin (Германия).

Стерилизацию термолabileльных веществ осуществляли с использованием стерилизующих (0,22 мкм) микрофльтрационных фильтров Sartolab (Sartorius, Германия).

Сублимационное высушивание препаратов проводили в сушильной установке Epsilon 2-6D (Martin Christ, Германия) и FreeZone 2,5 L (Labconco, США).

Стерилизацию термостабильных веществ выполняли в паровом стерилизационном аппарате MLS-3781L (Sanyo, Япония) и сухожаровом стерилизаторе ГП-80 СПУ (Смоленское СКТБ СПУ, Россия).

Определение оптической плотности биомассы и белковых растворов проводили на спектрофотометре Biowave (Biochrom, Великобритания). Для анализа кон-

центрации биомассы при глубинном культивировании использовали денситометр DEN-18 (Biosan, Латвия).

Измерение концентрации ионов водорода в растворах осуществляли на рН-метре Oakton (Oakton Instruments, США).

Прозрачность питательных сред измеряли по оптической плотности фотокolorиметрическим методом на фотокolorиметре КФК-2 (Россия) при длине волны $\lambda=540$ нм в 10 мм кюветах, за стандарт брали 0,3 % раствор метанитрофенола.

Содержание аминного азота определяли методом формольного титрования с использованием рН-метра рН 150М (Гомельский завод измерительных приборов, Беларусь).

Потерю в массе при высушивании (остаточную влажность) препаратов определяли на влагомере Sartorius MA 150 (Sartorius, Германия).

Исследования клеток методом АСМ проводили с помощью сканирующего зондового микроскопа Solver P47-PRO (NT-MDT, Россия). При этом использовали полуконтактные кремниевые зонды серии NSG01 (NT-MDT, Россия).

Учет и оценку результатов ИФА проводили с использованием планшетного фотометра I-Mark (Bio-Rad, США), рабочая длина волны 405 нм.

Определение аминокислотного состава ферментативного гидролизата фибрина (ФГФ) осуществляли на хроматографе Knauer Smartline 5000 (Knauer, Германия) с использованием обратнофазовой хроматографии на колонке Kromasil-100 C18, 5 мкм, 2×150 мм.

В работе использовалось общелабораторное оборудование: термостаты Binder BD 400 (Binder, Германия) и ТСО-1/80 СПУ (Смоленское СКТБ СПУ, Россия), холодильники фармацевтические Pozis ХФ-250 и ХФ-340 (Pozis, Россия), весы Ohaus Pioneer PA-114 C (Ohaus, США), электрофоретическая камера Mini protean II (Bio-Rad, США).

2.2 Материалы

2.2.1 Штаммы микроорганизмов

В работе использовали штаммы *F. tularensis* 15 НИИЭГ (вакцинный из коллекции НЦСЭМП, находится на гарантийном хранении в ГКПБ ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» (Саратов, Россия), *F. tularensis* subsp. *holarctica* 503/840, которые получали из ГКПБ ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб».

Характеристика штаммов.

F. tularensis 15 НИИЭГ subsp. *holarctica*, eryR, получен Н.А.Гайским, III группа патогенности, не вирулентен для морских свинок в дозе 5×10^9 м.к., остаточная вирулентность для белых мышей 10^2 - 2×10^6 м.к. Используется в качестве штамма-продуцента ЖТВ [116].

F. tularensis 503/840 subsp. *holarctica*, eryR, II группа патогенности, выделен от клещей в 1949 г. в Московской области. Вирулентен, для морских свинок Dcl составляет 1-5 м.к. Используется в качестве заражающего тест-штамма при контроле свойств ЖТВ.

2.2.2 Лабораторные животные

В качестве биомоделей в работе использовали белых мышей (*Mus musculus*) беспородных и линии BALB/c обоего пола (масса 18-20 г), беспородных морских свинок (*Cavia porcellus*) обоего пола (масса (350 ± 50) г и (475 ± 25) г). Применялись здоровые животные, не подвергавшиеся ранее испытаниям. Животных содержали в соответствии с СП 2.2.1.3218-14 [105]. Все работы с животными проводили в соответствии с протоколом исследования, утвержденным биоэтической комиссией института «Микроб» в условиях вивария, с уровнем биологической безопасности BCL 3.

2.2.3 Питательные среды и реактивы

В качестве плотной питательной среды на этапах подготовки культуры и анализа свойств использовали FT-агар (ГНЦ ПМБ, Оболенск). Стандартные суспензии клеток штаммов *F. tularensis* готовили в стерильном 0,9% растворе натрия хлорида с использованием ОСО мутности бактериальных взвесей 10 МЕ, что эквивалентно 5×10^9 м.к./мл.

Подготовка экспериментальных питательных сред на основе фибрина: фибрин получали на этапе дефибринации иммунной плазмы крови лошадей-продуцентов антирабической сыворотки, гидролизат фибрина получали с применением ферментов поджелудочной железы крупного рогатого скота [32].

Определение качественных и количественных показателей питательной среды проводили в соответствии с МУК 4.2.2316-08 [69].

Постановку ПЦР с электрофоретическим учетом проводили с помощью «Набора реагентов для выявления ДНК *Francisella tularensis* методом полимеразной цепной реакции с электрофоретическим учетом результатов (Ген *Francisella tularensis* – РЭФ)» (ФСР 2011/12108 производства ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора). Выделение ДНК осуществляли с помощью «Комплекта реагентов для выделения ДНК из клинического материала «ДНК-сорб-В» по ТУ 9398-003-01897593-2009» (ФСР 2009/05220 производства ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора).

При проведении исследований по обоснованию новой биофармацевтической композиции применяли следующие вещества: водорастворимый хитозан пищевой низкомолекулярный с молекулярной массой 30 кДа (ООО «Биопрогресс», Щелково), трегалоза фармопейного качества (Biochem, Франция), декстран с молекулярной массой 50-70 кДа (реополиглукин) в виде раствора для инфузий 10% (ОАО «Биохимик», Саранск), агар-агар (ФСР 2009/03707 производства HiMedia Laboratories, Индия).

Для приготовления рабочих растворов использовали реактивы отечественного и зарубежного производства, соответствующие квалификации чистоты «хч» или «чда».

2.3 Методы исследований

Экспериментальные препараты ЖТВ на этапах ее приготовления анализировали по следующим показателям: описание, время растворения, время седиментационной устойчивости, проходимость через иглу, рН, потеря в массе при высушивании (остаточная влажность), средняя масса и отклонение от средней массы (точность розлива), наличие вакуума в первичной упаковке, отсутствие посторонних микроорганизмов и грибов, специфическая безопасность, специфическая активность (концентрация микробных клеток, количество живых микробных клеток (жизнеспособность), степень диссоциации, количество накожных доз, прививаемость, иммуногенность), термостабильность. Применяли методы, изложенные в ФС.3.3.1.0019.15 [116].

2.3.1 Физико-химические методы

Показатель «описание» контролировали визуально. Лиофилизированный препарат должен представлять пористую массу белого с желтоватым оттенком цвета. Восстановленный препарат – гомогенная мутная суспензия белого с желтоватым оттенком цвета без посторонних примесей, осадка или хлопьев.

Время растворения устанавливали визуально, для чего добавляли в первичную упаковку 1 мл воды для инъекций. Если препарат полностью растворялся при встряхивании в течение 3 мин и в растворенном виде представлял собой гомогенную мутную суспензию желтовато-белого цвета без посторонних примесей, осадка или хлопьев, то его считали прошедшим испытания.

Время седиментационной устойчивости устанавливали визуально, для чего добавляли в первичную упаковку 1 мл воды для инъекций, встряхивали в течение 3 мин. Если суспензия вакцины, образующаяся при встряхивании, не расслаивалась в течение 5 мин, то препарат считали прошедшим испытания.

Показатель «проходимость через иглу» считали соответствующим требованиям нормативной документации, если суспензия вакцины, полученная после растворения лиофилизата препарата в воде для инъекций, свободно проходила в шприц через иглу № 0840.

pH определяли потенциометрически с использованием pH-метра. Нормируемое значение составляло $(7,2 \pm 0,2)$.

Потерю в массе при высушивании препаратов определяли из пяти первичных упаковок. Нормируемое значение составляет не более 4 %.

Показатель «средняя масса и отклонение от средней массы» определяли по коэффициенту вариации массы вакцины в первичной упаковке, который должен быть не более 5 %. Определение проводили весовым методом. 10 образцов обрабатывали смесью спирта с эфиром и помещали в эксикатор на 3 ч. Первичные упаковки вскрывали, взвешивали вместе с препаратом, затем удаляли содержимое и промывали водой. После этого первичные упаковки выдерживали в сушильном шкафу при температуре 100-105 °С до постоянной массы. По разности масс первичных упаковок с содержимым и без него находили массу вещества и рассчитывали коэффициент вариации (V) в процентах по формуле (1):

$$V = \frac{S \times 100}{\bar{x}} \quad S = \sqrt{\frac{\sum (X - \bar{x})^2}{n-1}}, \quad (1)$$

где S – стандартное отклонение;

\bar{x} – среднее арифметическое значение массы вещества в ампуле;

X – масса вещества в каждой ампуле;

n – число первичных упаковок.

Наличие вакуума в первичной упаковке определяли визуально по цвету свечения газовой среды (определение цвета свечения газовой среды ампул с препаратом при возбуждении её высокочастотным электрическим полем с помощью аппарата типа д'Арсонваль). Если газовая среда давала бледно-голубое свечение, то препарат считали прошедшим испытания.

Температуру замерзания и эвтектические температуры определяли методом определения удельного электрического сопротивления, разработанным Rey L. [162]. Метод основан на параллельном замере температуры материала и величины удельного электрического сопротивления исследуемого объекта при его замораживании-оттаивании.

Для определения содержания аминокислот навеску сухого ФГФ (10-20 мг), подвергали кислотному гидролизу в 1,5 мл 6N HCl с добавлением 3 мкл меркаптоэтанола при 110 °С в течение 24 ч под азотом. После гидролиза образцы нейтрализовали 12,5 М NaOH и доводили объем до 20 мл водой (MilliQ). Анализ проводили методом ВЭЖХ на хроматографе Knauer Smartline 5000 с использованием обратнофазовой хроматографии на колонке Kromasil-100 C18, 5 мкм, 2×150 мм с предколоночной модификацией аминокислот 6-аминоквинолин гидроксисукцинамидил карбаматом по методу Waters WAT 052880. Для анализа брали 10 мкл образца, добавляли 80 мкл буфера для модификации и 10 мкл модифицирующего реактива, согласно рекомендациям производителя (Waters WAT 052880). Выдерживали 10 мин при 55 °С. Объем инъекции – 20 мкл. Детекция фотометрическая при λ 248 нм. Количественный расчет содержания аминокислот в гидролизатах образцов проводили с использованием внешнего стандарта – 250 пмоль аналитического стандарта аминокислот (AAS18 Sigma).

2.3.2 Микробиологические методы

Чистоту культуры контролировали бактериоскопически в мазках с окраской по Граму, высевам на пластинки с FT-агаром, а также в реакции агглютинации (РА) с коммерческой туляремийной сывороткой (КТС, Иркутский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока). Определение чистоты вакцины проводили по оценке отсутствия посторонних микроорганизмов и грибов в препаратах высевами в тиогликолевую среду. Через 14 сут выращивания из всех пробирок с посевами и пересевами готовили мазки, окрашивали их по Граму и микроскопировали. В случае обнаружения хотя бы в одном из 10 просмотренных полей зрения кокков или грамположительных палочек – этот образец считали загрязненным посторонней микрофлорой.

Концентрацию клеток в микробных взвесах культур определяли по отраслевому стандартному образцу мутности (ОСО мутности 42-28-85-П) 10 единиц ФГБУ НЦЭСМП Минздрава России соответствующего года выпуска, эквивалентных концентрации 5×10^9 м.к./мл *F. tularensis*, и турбидиметрическим методом при OD 600 нм. В готовом препарате должно содержаться $(2 \pm 1) \times 10^{10}$ м.к. в 1 мл. Для расчета общей концентрации (OK) использовали формулу (2):

$$OK = \frac{(0,5 + V) \times 5 \times 10^9}{0,5}, \quad (2)$$

где V – объём 0,9 % раствора натрия хлорида, взятого на разведение пробы, мл;

0,5 – объём испытуемого образца, мл;

5×10^9 – эквивалент туляремийного микроба, соответствующий стандарту мутности (10 ME), м.к./мл.

Количество живых микробных клеток определяли высевам на пластинки с FT-агаром, учет проводили через 5 сут выдерживания посевов при температуре $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$. 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. Нормируемое значение для готового препарата составляет не менее 40 %. Содержание живых микробных клеток в процентах (% живых м.к.)

рассчитывали по формуле (3):

$$\% \text{ живых м.к.} = \frac{БК}{ОК} \times 100\%, \quad (3)$$

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 $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течение 5 сут их помещали на 24 ч в холодильник при температуре от 2 до 8°C . После этого подсчитывали число иммуногенных «белых» и неиммуногенных «серых» колоний и вычисляли их процентное соотношение. Нормируемое значение SR (белых) колоний для готового препарата составляет не менее 80 %.

Количество накожных доз устанавливали путем деления количества живых м.к. на 2×10^8 м.к., составляющих одну прививочную дозу. В готовом препарате должно содержаться от 15 до 50 накожных доз.

Термостабильность. Определение проводили через 14 сут хранения 6 первичных упаковок с препаратом при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$. Определяли в трех образцах (для каждого объединяли содержимое двух первичных упаковок). Показатель термостабильности рассчитывали по формуле (4):

$$t = \frac{0,3 \times 14}{\lg A_0 - \lg A_n}, \quad (4)$$

где t – показатель термостабильности в сут;

$\lg A_0$ – логарифм первоначального числа живых м.к./мл;

$\lg A_n$ – логарифм числа живых м.к./мл через 14 сут хранения вакцины при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$;

0,3 – постоянная величина;

14 – срок хранения вакцины при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ в сут.

Для исследования методом АСМ готовили бактериальную взвесь по стандарту мутности, соответствующей концентрации микроорганизмов 10^9 м.к./мл. Фиксацию и обеззараживание материала проводили с использованием 2,5 % раствора глутаральдегида с экспозицией 2 ч при температуре 4°C , после чего приготовленный препарат тщательно отмывали дистиллированной водой: для очистки суспензии от остатков питательной среды и глутаральдегида культуру дважды цен-

трифугировали при 6000 об/мин в течение 15 мин с последующим удалением надосадка. На следующем этапе 5 мкл полученной суспензии помещали на покрывное стекло и высушивали при температуре (22 ± 2) °С.

Исследования клеток проводили с помощью сканирующего зондового микроскопа методом полуконтактной АСМ в воздушной среде. При этом использовали полуконтактные кремниевые зонды жесткостью 5,1 Н/м, с радиусом кривизны 10 нм и резонансной частотой 150 кГц. Обработку и анализ изображений проводили с использованием программы Image Analysis (NT-MDT, Россия).

2.3.3 Иммунохимические методы

Уровень туляремийных антител в сыворотке крови иммунизированных лабораторных животных оценивали в РНГА макрометодом с набором реагентов – диагностиком эритроцитарный туляремийный антигенный жидкий (РНГА-Тул-Аг-СтавНИПЧИ, Россия), а также в непрямом ИФА с использованием препарата протективного антигенного комплекса туляремийного микроба (ПАК) в концентрации 10 мкг/мл в качестве сенситина. Конъюгатом служили соответствующие антивидовые антитела, меченные пероксидазой в рабочем разведении, субстратный раствор – АВТС (Sigma-Aldrich, США).

Иммуноблоттинг проводили по методу Towbin Н. [168] с предварительным разделением образцов методом SDS-PAGE по Laemmli U.K. [152] в 12%-ном разделительном геле. Использовали экспериментальные поликлональные кроличьи антитела к ПАК в разведении 1:100, а в качестве конъюгата – антивидовые антитела, меченные пероксидазой (ФГБУ НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, Москва). Для обнаружения белков в SDS-PAGE использовали окраску Кумасси синим R-250 (ДиаэМ, Германия) и азотнокислым серебром с помощью набора реактивов «Silver Stain» (Bio-Rad).

В работе также использовали иммунохроматографическую тест-систему для экспресс-выявления и идентификации возбудителя туляремии «ИХ тест-система *F.tularensis*» (производство ГНЦ ПБМ г. Оболенск) и набор реагентов «Диагностикум эритроцитарный туляремийный иммуноглобулиновый жидкий «РНГА-Тул-Иг-СтавНИПЧИ» (производство ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора, Ставрополь).

2.3.4 Биологические методы

Для определения специфической безопасности препарат растворяли в 1 мл воды для инъекций, затем 0,9 % раствором хлористого натрия доводили до концентрации 5×10^9 м.к./мл по стандартному образцу мутности ОСО 42-28-85П 10 единиц и по 1,0 мл вводили подкожно десяти морским свинкам массой (475 ± 25) г. Наблюдение за животными проводили в течение 15 сут. В случае если животные оставались живыми или наступала гибель одной морской свинки в течение 15 сут, препарат считали безвредным.

Прививаемость. Вакцина в дозе 2×10^7 живых м.к. при накожной иммунизации морских свинок должна вызывать через 2-5 сут реакцию в виде инфильтрата и гиперемии диаметром от 5 до 15 мм вокруг насечек. Для определения содержимое одной первичной упаковки разводили водой для инъекций в объеме, который рассчитан для накожного применения данной серии вакцины (0,1 мл на 1 накожную дозу). Далее микробную взвесь разводили в 10 раз 0,9 % раствором натрия хлорида до концентрации 2×10^8 живых м.к./мл, и прививали накожно в объеме 0,1 мл трех морских свинок массой (400 ± 25) г. На участок депилированной кожи, предварительно обработанной спиртом и эфиром, после испарения эфира наносили пипеткой 2 капли микробной взвеси на расстоянии 20-30 мм одну за другой. Через каждую каплю оспопрививательным пером делали по две параллельные некровотокающие насечки длиной 8-12 мм. Нанесенную на кожу взвесь тщательно втирали в течение 1 мин плоской стороной пера.

Иммуногенность. При накожной иммунизации морских свинок дозой 2×10^7 живых м.к. в объеме 0,1 мл, не менее 8 из 10 животных должны быть предохранены от гибели при подкожном заражении 1000 Dcl тест-заражающего штамма туляремийного микроба, 1 Dcl которого не должна превышать 5 м.к. Для определения иммуногенности 10 морских свинок массой (350 ± 50) г иммунизировали дозой 2×10^7 живых м.к. в объеме 0,1 мл накожно по методике, изложенной для показателя «Прививаемость». Заражение животных проводили через 25-30 сут после иммунизации штаммом *F.tularensis* 503/840 в дозе, равной 1000 Dcl. Наблюдение за зараженными животными вели в течение 30 сут. Все контрольные животные должны погибнуть от туляремии в срок до 15 сут при типичных патологоанатомических изменениях (плотный инфильтрат в месте введения, гиперемия сосудов подкожной

клетчатки и паховых лимфатических узлов, увеличение и уплотнение селезенки и печени). Всех павших животных вскрывали, органы и ткани подвергали бактериологическому исследованию, высевая их методом отпечатков на чашки с FT-агаром.

Для выявления и оценки гиперчувствительности *in vitro* использовали РЛ, основанную на учете разрушения лейкоцитов сенсibilизированного организма под влиянием специфического аллергена (антигена). Постановку и учет РЛ осуществляли по методу, разработанному для оценки приобретенного противотуляремийного иммунитета (тест лейкоцитолита с тулярином) [58]. В качестве аллергена при иммунизации препаратом экспериментальной туляремийной химической вакцины использовался коммерческий препарат тулярина накожного, содержащего 1×10^{10} м.к./мл (НПО «Микроген», Россия). В качестве контроля использовали физиологический раствор. Для оценки результатов использовали следующую шкалу показателей коэффициента лейкоцитолита: 15 % – отрицательный или сомнительный результат, 16-20 % – слабоположительный результат, 21-30 % – положительный результат, 31 % и выше – резкоположительный результат.

Для моделирования экспериментальной туляремийной инфекции у лабораторных мышей двухсуточную агаровую культуру второго пассажа заражающего штамма *F.tularensis* 503/840, суспендированную в 0,9%-ном растворе натрия хлористого, рН $7,0 \pm 0,2$, вводили однократно, подкожно, в дозе 100 м.к. в 0,2 мл ($LD_{50} = 2(1 \div 3)$ м.к.). Титрация заражающей культуры проводилась по стандартному образцу мутности ОСО 42-28-85П 10 единиц с контрольным высевам на пластинки с FT-агаром. Количество КОЕ учитывали через 72 ч. Специфичность экспериментальной туляремийной инфекции подтверждали данными контрольного вскрытия павших животных, микроскопией мазков-отпечатков и высевами на питательные среды.

2.3.5 Молекулярно-генетические методы

Постановку ПЦР проводили с помощью «Набора реагентов для выявления ДНК *F. tularensis* методом полимеразной цепной реакции с электрофоретическим учетом результатов (Ген *F. tularensis* – РЭФ) производства ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб». Детекция ДНК туляремийного микроба с помощью данного набора основана на выявлении фрагмента *ig-IVC* генов *F. tularensis* методом ПЦР с электрофоретическим учетом результатов.

2.3.6 Статистическая обработка результатов

Среднюю иммунизирующую дозу (ED_{50}) рассчитывали по методу Г. Кербера в модификации Ашмарина И.П. и Воробьева А.А. [7]. Статистическую обработку результатов экспериментов осуществляли по стандартной методике определения грубых ошибок, с вычислением средней арифметической (M); средней ошибки средней арифметической (m). Расчеты осуществляли с помощью Microsoft Office Excel 2010.

Остальные методические приемы описаны в результатах исследований.

Блок-схема комплексного подхода к решению задачи разработки и совершенствования биотехнологических этапов получения ЖТВ, позволяющая достичь цели работы, представлена на рисунке 1.



Рисунок 1 – Блок-схема комплексного подхода к решению задачи разработки и совершенствования биотехнологических этапов получения ЖТВ

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

ГЛАВА 3 СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ УСЛОВИЙ ПОЛУЧЕНИЯ БИОМАССЫ ВАКЦИННОГО ШТАММА

FRANCISELLA TULARENSIS 15 НИИЭГ

3.1 Оптимизация условий глубинного культивирования штамма-продуцента живой туляремийной вакцины *Francisella tularensis* 15 НИИЭГ для увеличения жизнеспособности и максимального выхода биомассы

3.1.1 Экспериментальное обоснование состава жидкой питательной среды на основе непищевого сырья (гидролизата фибрина) для культивирования *Francisella tularensis* 15 НИИЭГ

В институте «Микроб» в промышленных масштабах производится гетерологичный антирабический иммуноглобулин, изготавливаемый из сыворотки крови лошадей. Одним из отходов производства является высокомолекулярный неглобулярный белок фибрин, годовое количество которого оценивается в 250 кг. В результате исследований по направлению развития малоотходных технологий учеными института разработана технология его переработки. Получены жидкая и сухая формы гидролизата фибрина, на их основе сконструированы плотные и жидкие питательные среды и показана их применимость для культивирования чумного микроба и холерного вибриона с целью получения диагностических и лечебно-профилактических препаратов [34]. Логичным шагом было экспериментальная оценка возможности использования полученных гидролизатов фибрина для конструирования питательных сред, предназначенных для выращивания *F. tularensis* 15 НИИЭГ.

Использовали ФГФ, характеристики и методические приемы приготовления которого изложены в методических рекомендациях «Приготовление гидролизата фибрина и конструирование на его основе питательных микробиологических сред для культивирования микроорганизмов», утвержденных директором ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» 21 апреля 2010 г. Применяли сухой гидролизат, полученный

выпариванием в 6-7 раз на вакуум-выпарной установке УВВ-50 с последующим высушиванием конвекционным способом на сушильной установке распылительного типа КЯУЛ 101325.002 в «псевдокипящем слое». По агрегатному состоянию высушенный ФГФ представлял собой мелкодисперсный порошок с нежно-желтым оттенком. При анализе его физико-химических показателей определено: содержание общего азота – $(14,76 \pm 0,03)$ %; аминного азота – $(7,39 \pm 0,03)$ %; процент расщепления белка – $(50,7 \pm 1,7)$ %; содержание пептона (по шкале Дифко) – $(53,7 \pm 1,5)$ %; следы непереваренного белка отсутствовали; сухой остаток – $(8,78 \pm 0,2)$ %; хлориды – $(0,22 \pm 0,01)$ %; влажность – $(2,4 \pm 0,2)$ %; рН – $(6,9 \pm 0,2)$. Аминокислотный состав представлен в таблице 4. Следует сказать о том, что на ФГФ разработаны и утверждены директором ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» технические условия ТУ 20.59.52-060-01898109-2021 «Ферментативный гидролизат фибрина сухой».

Таблица 4 – Аминокислотный состав ФГФ, г/100г воздушно-сухого веса

Аминокислота	Значение характеристики
Аспарагиновая кислота	6,34±1,21
Треонин	3,86±0,36
Серин	4,27±0,87
Глутаминовая кислота	10,35±2,31
Глицин	2,92±0,24
Аланин	3,60±0,36
Валин	4,65±0,83
Метионин	1,06±0,05
Изолейцин	3,19±0,27
Лейцин	7,20±1,33
Тирозин	0,52±0,02
Фенилаланин	3,60±0,51
Лизин	7,22±1,24
Гистидин	1,84±0,12
Аргинин	3,58±0,44
Пролин	4,11±0,71
Цистеин	0,11±0,02
Сумма аминокислот	68,42

Анализ данных аминокислотного состава ФГФ показывает, что полученный нами гидролизат содержит необходимый набор аминокислот. Поэтому первым шагом при экспериментальном обосновании состава жидкой питательной среды на основе ФГФ было принято решение об отказе от введения состав среды стимуляторов роста.

Для сравнения эффективности выращивания туляремийного микроба в питательной среде на основе ФГФ использовали питательные среды на основе панкреатического гидролизата рыбкостной муки (ПГРМ) (ГНЦ ПМБ, Оболенск) и экстракта пекарских дрожжей (ЭПД) (Serva). В качестве источника углеводов применяли глюкозу в конечной концентрации 1%.

Эффективность жидких экспериментальных питательных сред определяли в условиях малообъемного культивирования в колбах Эрленмейера (250 мл) на термостатируемом шейкер-инкубаторе. Объем питательной среды составлял (25 ± 1) мл, температура культивирования (37 ± 1) °С, скорость вращения платформы – (200 ± 5) об/мин, время культивирования (24 ± 1) ч, посевная доза составляла не менее $(0,5 \pm 0,1) \times 10^9$ м.к./мл среды, имела коэффициент жизнеспособности – $(50 \pm 0,5)$ %. Концентрацию биомассы и стабильность биологических свойств туляремийного микроба, в том числе коэффициент жизнеспособности (К %) и степень диссоциации оценивали по стандартной методике. Прирост биомассы рассчитывали по отношению полученной в ходе 24-х ч выращивания концентрации к исходной концентрации (в начальный момент времени).

На первом этапе исследований (таблица 5) было установлено, что лимитирующим фактором ростовых свойств экспериментальных сред является содержание аминного азота. Оптимальное значение этого показателя должно быть в пределах от $(0,320 \pm 0,1)$ % до $(0,420 \pm 0,1)$ %. При более высоком или низком содержании аминного азота рост туляремийного микроба резко ограничивается, что согласуется с литературными данными [59]. Питательная среда на основе ПГРМ оказалась менее эффективной по показателям жизнеспособности культуры и прироста биомассы.

Таблица 5 – Эффективность экспериментальных питательных сред (n=3)

Основа питательной среды	Аминный азот, %	Концентрация биомассы, $\times 10^9$ м.к./мл	Прирост биомассы* за (24 ± 1) ч	К, %
1	2	3	4	5
ПГРМ	$0,700 \pm 0,2$	$6,3 \pm 0,5$	$10,5 \pm 0,2$	0
	$0,350 \pm 0,1$	$24,3 \pm 1,5$	$60,0 \pm 0,5$	$57,0 \pm 2,5$
	$0,1 \pm 0,05^{**}$	$10,0 \pm 0,8^{**}$	$30,3 \pm 0,3^{**}$	Не определяли**

1	2	3	4	5
ЭПД	0,415±0,15	80,5±2,5	134,5±1,1	54,5±2,5
	0,320±0,1	21,5±1,0	107,5±0,9	46,8±2,2
	0,210±0,1	15±1,0	37,5±0,4	96,7±
ФГФ	0,330±0,1	86±1,0	143,3±1,1	67,7±2,7
	0,320±0,1	80±1,0	400,0±2,9	92,3±3,1
	0,155±0,05	19±1,5	47,5±0,5	94,0±3,3

Примечания. *Прирост биомассы указан в относительных единицах, за единицу взята концентрация исходной культуры, точность измерения 5%.
** Данные из дис... канд.биол. наук Шепелева И.А., 2005.

На следующем этапе оценивали влияние питательной основы сред на рост клеток *F. tularensis* 15 НИИЭГ и жизнеспособность субпопуляций. Использовали среду 1 (на основе ЭПД) и среду 2 (на основе ФГФ). В качестве источника углеводов в обоих случаях применяли глюкозу в конечной концентрации 1%. Результаты данного этапа исследований представлены на рисунках 2 и 3.

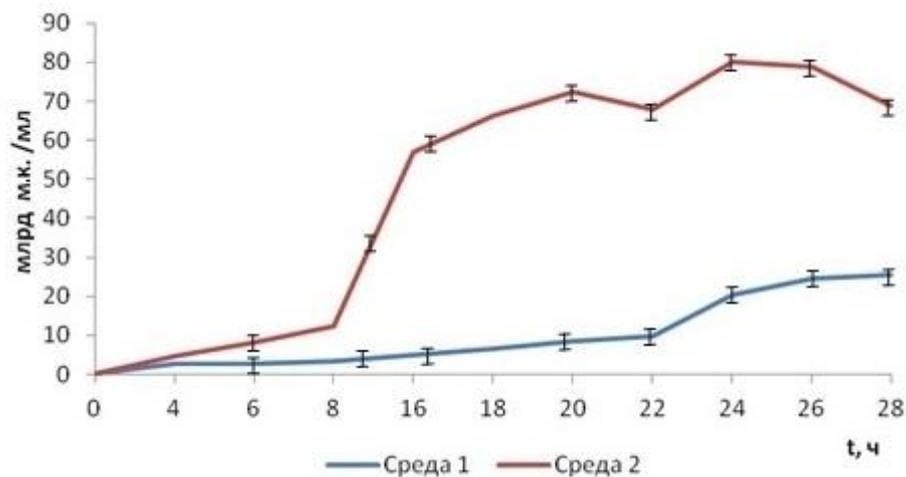


Рисунок 2 – Кривые роста клеток штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ в экспериментальных питательных средах при малообъемном культивировании
Среда 1 – на основе ЭПД с глюкозой 1%, содержание аминного азота 0,320 %
Среда 2 – на основе ФГФ с глюкозой 1%, содержание аминного азота 0,320 %

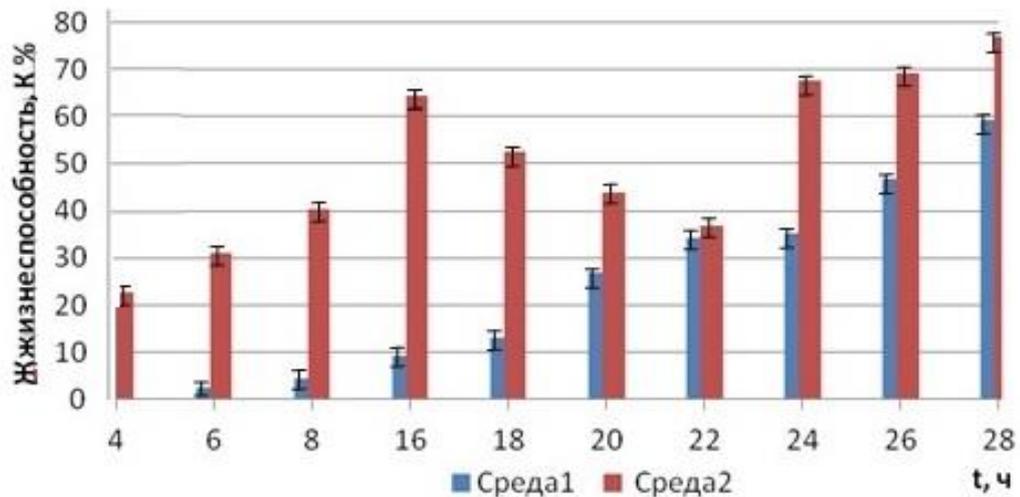


Рисунок 3 – Динамика показателя «жизнеспособность» (К %) субпопуляций штамма *F.tularensis* 15 НИИЭГ при культивировании в экспериментальных питательных средах

Среда 1 – на основе ЭПД с глюкозой 1%, содержание аминного азота 0,320 %
 Среда 2 – на основе ФГФ с глюкозой 1%, содержание аминного азота 0,320 %

При культивировании в экспериментальной среде 1 было отмечено значительное удлинение лаг-фазы до 18 ч и уменьшение урожайности культуры. Для среды 2 была отмечена высокая скорость накопления биомассы в экспоненциальной фазе в сочетании с высоким ($72 \pm 3,5$) % коэффициентом жизнеспособности. Два пика в стационарной фазе роста (20 ч и 24 ч культивирования) на этой среде могут быть связаны с исчерпанием одного лимитирующего субстрата и адаптацией ферментных систем клеток к другому субстрату.

Согласно литературным данным, для туляремиального микроба в качестве стимуляторов роста широко используют соли кальция, натрия, аминокислоты [59]. Поэтому на следующем этапе работы для исследования влияние вышеназванных компонентов на рост и характеристики биомассы *F. tularensis* 15 НИИЭГ использовали среду на основе сухого ФГФ (среда 2). Основные компоненты среды: гидролизат фибрина 5 %, глюкоза 1 %, рН 7,2. В качестве дополнительных компонентов применяли – соли кальция (глюконат 100 мг/л и пантотенат 50 мг/л), цистеин 0,1 г/л, хлорид натрия 0,5 %. Полученные данные представлены в таблице 6.

Таблица 6 – Влияние компонентов питательной среды на рост и характеристики биомассы *F. tularensis* 15 НИИЭГ (n=3)

Аминный азот, %	Стимулирующая добавка	Концентрация биомассы, $\times 10^9$ м.к./мл	Прирост биомассы* за (24 \pm 1) ч	К, %
0,330 \pm 0,1	глюкоза+пантотенат кальция	70,0 \pm 1,0	291,2 \pm 1,8	68,0 \pm 3,3
	глюкоза+цистеин	81,3 \pm 1,5	338,5 \pm 2,5	53,6 \pm 2,7
	глюкоза+пантотенат кальция+цистеин	133,5 \pm 2,5	556,3 \pm 3,2	44,0 \pm 2,2
	глюкоза+глюконат кальция	94,0 \pm 1,0	86,7 \pm 0,8	48,2 \pm 2,2
0,155 \pm 0,5	глюкоза+глюконат кальция	20,8 \pm 0,5	51,2 \pm 0,5	48,2 \pm 2,3
	глюкоза+пантотенат кальция	20,0 \pm 0,5	50,0 \pm 0,5	84,3 \pm 3,7
	глюкоза+пантотенат кальция+цистеин	32,5 \pm 1,0	81,3 \pm 0,8	87,6 \pm 3,7
0,320 \pm 0,1	глюкоза+пантотенат кальция+хлорид натрия	61,3 \pm 1,5	185,5 \pm 1,1	96,8 \pm 3,75
	глюкоза+пантотенат кальция+цистеин+хлорид натрия	100,0 \pm 2,0	268,3 \pm 1,3	94,6 \pm 3,7
	глюкоза+глюконат кальция	52,0 \pm 1,0	86,7 \pm 0,8	31,5 \pm 1,5
Примечание. *Прирост биомассы указан в относительных единицах, за единицу взята концентрация исходной культуры, точность измерения 5 %.				

При добавлении солей кальция более эффективным оказался пантотенат кальция. В частности, показатель прироста биомассы при введении 0,005 % раствора пантотената кальция составил (291,2 \pm 1,8) %, а при добавлении глюконата кальция – (86,7 \pm 0,8) %, жизнеспособность выращенной культуры была также выше в первом случае. Добавление цистеина резко увеличивало прирост биомассы и урожайность – до (133,5 \pm 3) $\times 10^9$ м.к./мл, но значительно снижало жизнеспособность – до (44 \pm 2,2) %.

На варианте среды, содержащей 0,005 % пантотената кальция, оценивали влияние хлорида натрия на эффективность экспериментальной питательной среды. При добавлении хлорида натрия жизнеспособность культуры увеличивалась до (96,8 \pm 3,7) %, прирост биомассы составлял (185,5 \pm 1,1) %. При добавлении и цистеина и хлорида натрия прирост биомассы увеличивался до (268,3 \pm 1,3) %, жизнеспособность – (94,6 \pm 3,7) %.

способность оставалась высокой ($94,6 \pm 3,72$) %, при этом степень диссоциации оставалась на низком уровне: количество иммуногенных (белых) колоний составляло (96 ± 2) %.

3.1.2 Аппаратное культивирование

Francisella tularensis 15 НИИЭГ

в питательной среде на основе гидролизата фибрина

Сконструированная жидкая питательная среда следующего состава: сухой гидролизат фибрина 5 %, глюкоза 1%, пантотенат кальция 0,005 %, хлорид натрия 0,5 %, цистеин 0,1 %, рН ($7,2 \pm 0,1$), была апробирована при аппаратном культивировании штамма *F.tularensis* 15 НИИЭГ. В качестве подкормки использовали 40 % раствор глюкозы. Аппаратное культивирование штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ проводили в модифицированной жидкой питательной среде на основе сухого гидролизата фибрина с добавлением глюкозы, цистеина, солей кальция и натрия, рН ($7,2 \pm 0,1$) в лабораторном и пилотном ферментерах с рабочими объемами 1,0 и 50 л соответственно.

Параметры культивирования в лабораторном биореакторе с рабочим объемом 1,0 л: скорость перемешивания (250 ± 50) об/мин, температура ($37 \pm 0,5$) °С. Аэрацию проводили воздухом в количестве (0,7-1,0) л на 1 л питательной среды в течение всего времени культивирования, за исключением первых 4-х ч и последнего часа, когда ее значения были 0,5 л на 1,0 л среды. Регулирование объема подачи воздуха осуществляли по показателю «насыщение кислородом», измеряемому в режиме «реального времени» погружным автоклавируемым датчиком растворенного кислорода. На всех этапах выращивания, начиная с 4 ч, этот показатель насыщения питательной среды кислородом составлял (50 ± 1) % от исходного (за 100 % брали концентрацию кислорода в питательной среде до инокуляции культуры). Уровень рН культуральной среды также контролировали в режиме «реального времени» с помощью погружного автоклавируемого рН-зонда. Показатель рН среды на первых этапах роста составлял ($7,2 \pm 0,1$), начиная с 15 ч, он снижался и принимал значения ($6,8 \pm 0,1$). Коррекцию рН не проводили, поскольку наблюдаемый диапазон соответствовал оптимуму роста туляремийного микроба. Концентрацию выращиваемой культуры определяли турбидометрически в периодических пробах:

до 8 ч – каждые 2 ч, начиная с 15 ч – каждый час.

В качестве посевного материала использовали 48-часовую агаровую культуру со следующими характеристиками: начальная концентрация клеток – $(0,8 \pm 0,1) \times 10^9$ м.к./мл среды, коэффициент жизнеспособности – $(51 \pm 0,5) \%$. При культивировании без подкормки (Рисунок 4, график А) время культивирования составило (22 ± 1) ч. Максимальная концентрация наблюдалась на 20 ч выращивания и составила $(14,5 \pm 0,5) \times 10^9$ м.к./мл. Эффективность культивирования по приросту биомассы составила 17 раз.

При культивировании с подкормкой (Рисунок 4, график Б) использовали 40% раствор глюкозы путем ее дробного введения на 8 ч однократно и с 16 по 20 ч ежечасно в количестве 1/100 об объема среды в течение 10 мин. Время культивирования было аналогично предыдущему эксперименту, но максимум концентрации наблюдался раньше – на 18 ч и составил $(30 \pm 0,5) \times 10^9$ м.к./мл при коэффициенте жизнеспособности $(89 \pm 1) \%$. Несмотря на подкормку до 20 ч, увеличить данный показатель не удалось. Можно отметить, что при культивировании вакцинного штамма туляремийного микроба с подкормкой выход биомассы увеличился на $(100,0 \pm 1,0) \%$, время достижения максимума концентрации уменьшилось на 2 ч. Эффективность культивирования по приросту биомассы составила 24 раза.

Полученные результаты соответствуют литературным данным об использовании подкормки глюкозосодержащими растворами при аппаратном культивировании вакцинного штамма туляремийного микроба. В то же время полученные данные позволяют сделать вывод о перспективности использования питательной среды на основе гидролизата фибрина в предложенной модификации для глубокого культивирования штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ, что перспективно с точки зрения развития малоотходных технологий в производстве иммунобиологических лекарственных препаратов.

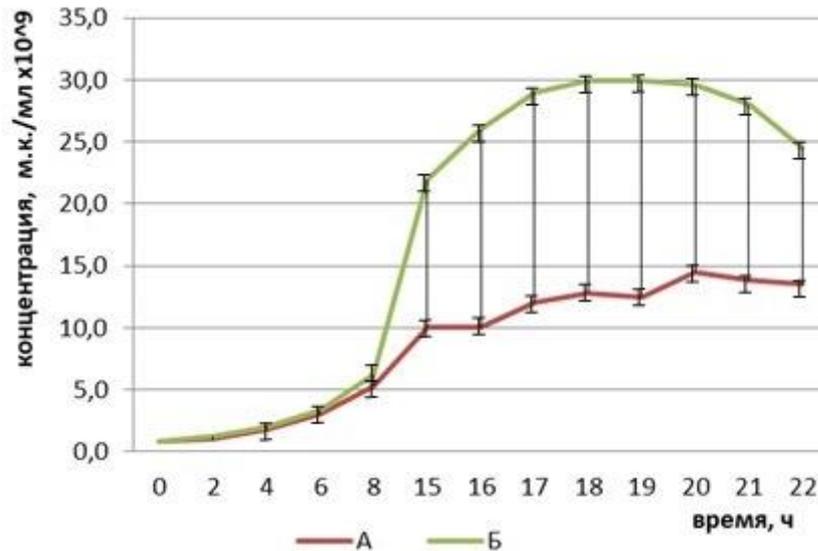


Рисунок 4 – Кривая роста *F.tularensis* 15 НИИЭГ в лабораторном ферментере
 А – без подкормки, Б – с подкормкой 40 % глюкозой

После окончания процесса культивирования в биореакторе с рабочим объемом 1,0 л нативная культура вакцинного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ имела следующие характеристики: рН ($6,8 \pm 0,1$), концентрация микробных клеток $(30 \pm 0,5) \times 10^9$ м.к./мл, коэффициент жизнеспособности составил $(96 \pm 0,5) \%$. Была отмечена низкая степень диссоциации – $(92 \pm 1) \%$ SR (белых) иммуногенных колоний от общего количества выросших.

На следующем этапе проводили культивирование вакцинного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ в пилотном биореакторе F3-50 Bionet, со следующими техническими характеристиками: общий объем – 70 л, система автоматического поддержания параметров стерилизации Steam-in-place, система автоматического поддержания установленных параметров культивирования микроорганизмов (рН, температура, давление, уровень пены, концентрация растворенного кислорода, число оборотов мешалки, аэрация, подача корректирующих и буферных растворов, пеногасителя).

Подготовку посевного материала проводили на агаре FT при температуре $(37 \pm 0,5) ^\circ\text{C}$: 48 часовую культуру *F. tularensis* 15 НИИЭГ I генерации пересекали во флаконы со скошенным FT-агаром, инкубировали при температуре $37 ^\circ\text{C}$ в течение 48-72 ч. Затем культуру II генерации стерильно смывали с поверхности FT-агара 5 мл охлаждённого 0,9 % раствора хлористого натрия и засекали в 2000 мл колбы Эрленмейера с жидкой питательной средой на основе ФГФ рН $(7,1 \pm 0,1)$ в

объеме (500 ± 50) мл. Выращивание в колбах посевной культуры (культуры III генерации) проводили в условиях термостатируемого шейкер-инкубатора при температуре ($37\pm 0,5$) °C и перемешивании со скоростью (150 ± 20) об/мин в течение (17 ± 1) ч.

Данный методический прием был основан на собственных результатах малообъемных экспериментов (высокая жизнеспособность 16-18 ч культуры туляремийного микроба) и на имеющихся литературных данных об эффективности отъемно-доливного метода при культивировании вакцинного штамма туляремийного микроба [125]. Этот подход позволил получить посевную культуру со следующими характеристиками: начальная концентрация клеток – $(2\pm 0,2)\times 10^9$ м.к./мл среды, коэффициент жизнеспособности – (72 ± 2) %, степень диссоциации – (98 ± 1) % SR (белых) иммуногенных колоний от общего количества выросших.

Наибольший выход биомассы был достигнут при следующих параметрах культивирования: pH среды ($7,1\pm 1,0$), температура ($37\pm 0,5$) °C, аэрация среды ($0,65\pm 0,15$) л/мин, скорость вращения мешалки (400 ± 100) об/мин. Содержание растворенного кислорода в среде поддерживали на уровне (45 ± 5) %. Длительность процесса культивирования составляла (10 ± 1) ч. Подкормку осуществляли с четвертого часа и прекращали за один час до прекращения культивирования. Подкормку вносили дозированно со скоростью (100 ± 10) мл/ч. Корректирующий раствор для поддержания оптимальных значений pH вносили в виде 10 % раствора аммиака по мере закисления среды. Динамика накопления биомассы *F.tularensis* 15 НИИЭГ при глубинном культивировании в пилотном биореакторе F3-50 Bionet представлена на рисунке 5.

После окончания процесса культивирования в биореакторе с рабочим объемом 50 л, содержащим (45 ± 5) л питательной среды, нативная культура вакцинного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ имела следующие характеристики: pH ($6,8\pm 0,1$), концентрация микробных клеток $(33\pm 0,5)\times 10^9$ м.к./мл, коэффициент жизнеспособности составил $(94\pm 0,5)$ %, степень диссоциации – (89 ± 1) % SR (белых) иммуногенных колоний от общего количества выросших. Прирост биомассы составил 17 раз.

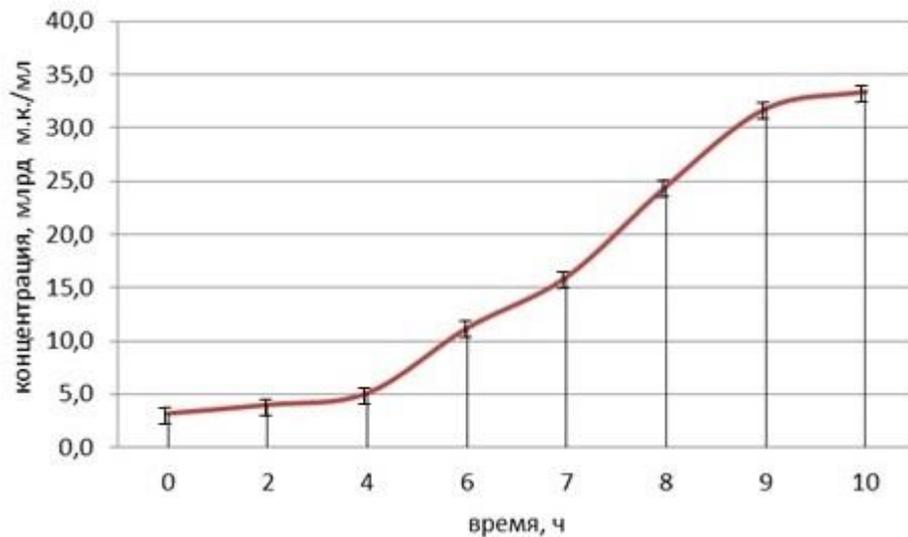


Рисунок 5 – Кривая роста *F. tularensis* 15 НИИЭГ при глубинном культивировании в пилотном биореакторе F3-50 Bionet

3.2. Разработка экспериментальной технологии концентрирования биомассы вакцинного штамма *Francisella tularensis* 15 НИИЭГ методом тангенциальной фильтрации

Проведенный обзор литературы (подраздел 1.1.2) выявил применимость для концентрирования живых бактериальных культур метода тангенциальной фильтрации с использованием микрофильтрационных мембран с порогом отсечки 0,2 мкм. Из достаточно широкого спектра данных мембран мы остановили свой выбор на Vivaflow 200.

Схема подготовленной к применению установки тангенциальной фильтрации на базе микрофильтрационной мембраны Vivaflow 200 показана на рисунке 6.

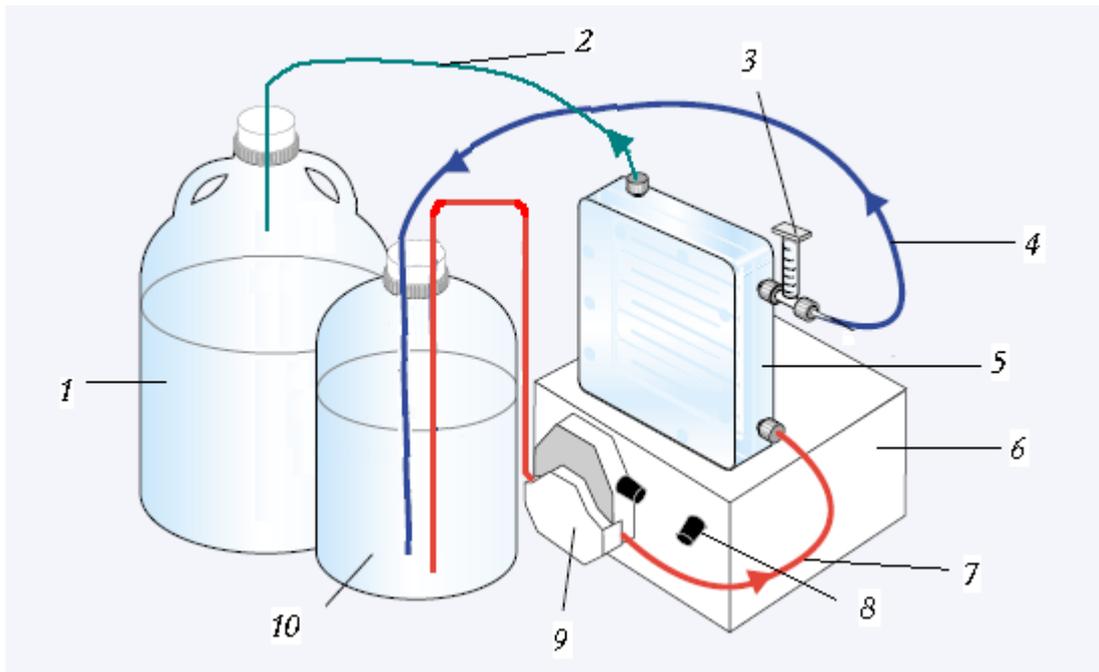


Рисунок 6 – Схема фильтрационной установки:

- 1 – емкость для сбора фильтрата; 2 – линия отвода фильтрата;
- 3 – индикатор давления; 4 – линия возврата концентрируемого продукта;
- 5 – мембрана Vivaflow 200; 6 – перистальтический насос;
- 7 – линия подачи концентрируемого продукта;
- 8 – устройство для регулирования давления;
- 9 – головка перистальтического насоса;
- 10 – емкость с концентрируемым продуктом

Нами предложена следующая последовательность выполнения операций технологического процесса концентрирования биомассы вакцинного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ, представленная на рисунке 7.

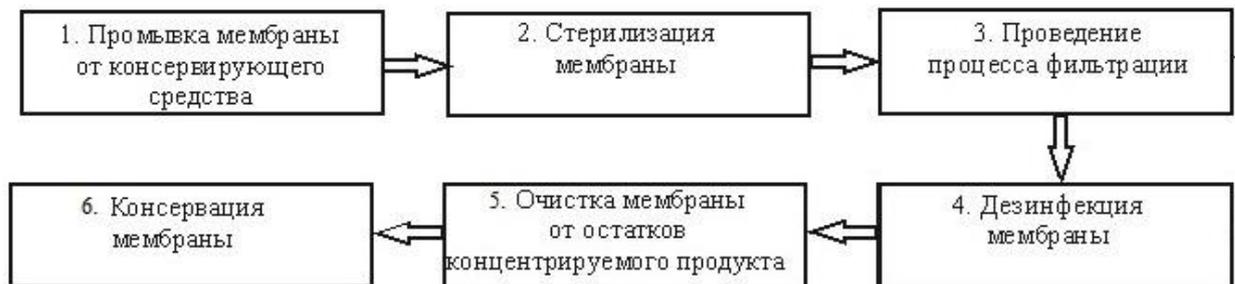


Рисунок 7 – Блок-схема технологического процесса концентрирования

Первая и последняя операции подробно описаны в эксплуатационной документации на фильтрационное оборудование и, на наш взгляд, не требуют проведения специальных исследований. При этом следует упомянуть, что промывка производится в следующих случаях: перед первым использованием мембраны; после очистки и дезинфекции мембраны и осуществляется с помощью циркуляции на

проток очищенной воды (из расчёта не менее $10,0 \text{ дм}^3$ на $0,1 \text{ м}^2$ фильтрующей поверхности при условии полного заполнения системы). Процесс консервации мембраны проводится циркуляцией 5 % раствора этилового спирта через установку следующим образом: приготовить $1,0 \text{ дм}^3$ раствора; поместить все шланги – линии концентрата и линии фильтрата в ёмкость с раствором; произвести циркуляцию раствора через мембрану в течение 1 часа; отсоединить от мембраны все коммуникации, заглушить входные отверстия и поместить ее в холодильник при температуре $(6\pm 2) \text{ }^\circ\text{C}$.

С целью стерилизации установки для концентрирования биомассы вакцинного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ мы применили методические приемы, обоснованные в исследованиях Алешиной Ю.А., посвященных разработке технологии ультрафильтрационного концентрирования О-антигена *V. cholerae* [2]. Автором было показано, что стерилизация фильтрационной установки раствором перекиси водорода путем его рециркуляции в течение 0,5 ч гарантирует стерильность. Как показали наши дальнейшие исследования, данные приемы были применимы и технологии концентрирования туляреминого микроба.

Для оценки возможности применения метода тангенциальной фильтрации туляреминого микроба использовали культуру вакцинного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ, полученную при ее глубинном культивировании в колбах Эрленмейера (2000 мл) на термостатируемом шейкер-инкубаторе. Объем питательной среды составлял (500 ± 10) мл, температура культивирования $(37\pm 1) \text{ }^\circ\text{C}$, скорость вращения платформы – (150 ± 10) об/мин, время культивирования (24 ± 1) ч, посевная доза составляла $(0,8\pm 0,1)\times 10^9$ м.к./мл среды, имела коэффициент жизнеспособности – $(53\pm 0,5) \%$. Процесс концентрирования осуществляли с применением микрофильтрационного модуля с порогом отсечки 0,2 мкм. Процедуру прекращали при четырехкратном уменьшении объема нативной культуры *F. tularensis*.

Качественно-количественные характеристики туляреминого микроба до и после процесса концентрирования изложены в таблице 7. Анализ данных таблицы показывает, что в полученном концентрате не происходило ухудшения характеристик (в сравнении с нативной культурой вакцинного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ после глубинного культивирования). В частности, рН и коэффициент жизнеспособности остаются на прежнем уровне, не происходит контаминации пост-

ронней микрофлорой, а также увеличивается в 4 раза концентрация микробных клеток.

Таблица 7 – Результаты концентрирования биомассы туляремийного вакцинного штамма 15 НИИЭГ (n=3)

Показатели качества	Культура вакцинного штамма <i>F. tularensis</i> 15 НИИЭГ	
	До концентрирования	После концентрирования
рН	7,0±0,1	7,2±0,1
Концентрация микробных клеток, ×10 ⁹ м.к./мл	35±0,5	135±1,0
Жизнеспособность, % живых м.к.	64±0,1	60±0,1
Степень диссоциации, % SR (белых) иммуногенных колоний от общего количества выросших	98±1	98±1
Посторонняя микрофлора	отсутствует	отсутствует

Следует отметить, что контроль специфической стерильности фильтрата свидетельствовал об отсутствии в нем туляремийного микроба, что говорит о правильном подборе размера пор мембран.

Таким образом, представленные данные подтверждают возможность применения сконцентрированной фильтрацией в тангенциальном потоке суспензии культуры вакцинного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ в качестве полуфабриката для изготовления живой туляремийной вакцины. Поскольку кратность концентрирования – регулируемый параметр, то возможно использование данного технологического приема для стандартизации биомассы по показателю «концентрация» микробных клеток независимо от эффективности этапа культивирования.

Для получения лабораторных серий вакцины 005, 006, 009, 010 по вышеназванным приемам осуществляли концентрирование суспензии культуры вакцинного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ. Качественно-количественные характеристики туляремийного микроба до и после процесса концентрирования изложены в таблице 8. Анализ данных таблицы показывает, что в полученном концентрате не происходило ухудшения характеристик (в сравнении с нативной культурой вакцинного

штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ после глубинного культивирования), при увеличении в 4 раза концентрации микробных клеток.

Таблица 8 – Результаты концентрирования биомассы туляремийного вакцинного штамма 15 НИИЭГ в производственном процессе получения лабораторных серий вакцины 005, 006, 009, 010

Показатели качества	Культура вакцинного штамма <i>F. tularensis</i> 15 НИИЭГ							
	До концентрирования				После концентрирования			
	Номера серий							
	005	006	009	010	005	006	009	010
рН	7,0							
Концентрация микробных клеток, $\times 10^9$ м.к./мл	35	33	30	33	138	135	124	134
Жизнеспособность, % живых м.к.	62	60	63	61	61	60	62	60
Степень диссоциации, % SR (белых) иммуногенных колоний от общего количества выросших	97	97	94	90	96	97	93	89
Посторонняя микрофлора	отсутствует							

Для получения концентратов биомассы туляремийного вакцинного штамма 15 НИИЭГ с целью производства лабораторных серий вакцины 01/Э, 02/Э, 03/Э использовали культуру туляремийного микроба, полученную в результате культивирования в пилотном биореакторе F3-50 Bionet. Полученные данные представлены в таблице 9 и свидетельствуют о пригодности полученного концентрата в качестве полуфабриката для изготовления живой туляремийной вакцины.

Таблица 9 – Результаты концентрирования биомассы туляремийного вакцинного штамма 15 НИИЭГ в производственном процессе получения лабораторных серий вакцины 01/Э, 02/Э, 03/Э

Показатели качества	Культура вакцинного штамма <i>F. tularensis</i> 15 НИИЭГ					
	До концентрирования			После концентрирования		
	Номера серий					
	01/Э	02/Э	03/Э	01/Э	02/Э	03/Э
1	2	3	4	5	6	7
рН	6,8	6,7	6,9	6,9	6,8	7,0

1	2	3	4	5	6	7
Концентрация микробных клеток, $\times 10^9$ м.к./мл	31	33	31	125	135	128
Жизнеспособность, % живых м.к.	91	94	93	90	94	92
Степень диссоциации, % SR (белых) иммуногенных колоний от общего количества выросших	89	88	90	89	87	89
Посторонняя микрофлора	отсутствует					

С целью возможного снижения реактогенных свойств готового препарата туляремийной вакцины нами проводилась работа по получению микробной суспензии *F. tularensis* 15 НИИЭГ, очищенной от культуральной среды. Для этого в 4-х кратный концентрат клеточной массы, полученный по описанной выше технологии, добавляли стерильный 0,9 % раствор хлористого натрия рН (7,2±0,1) до восстановления исходного объема нативной культуры. Затем повторно проводили процесс концентрирования тангенциальной микрофльтрацией на микрофльтрационной установке Vivaflow-200 через мембраны с размером пор 0,2 мкм до сокращения объема микробного осадка в четыре раза. Полученный концентрат микробных клеток имел следующие характеристики: рН (7,2±0,1), концентрация микробных клеток $(130\pm 1,0)\times 10^9$ м.к./мл, коэффициент жизнеспособности (60±0,1) %, посторонняя микрофлора отсутствовала. Полученный концентрат «отмытых» микробных клеток туляремийного микроба был пригоден по показателю «жизнеспособность» для получения ЖТВ.

При интенсификации режима проведения фильтрации мы применили ряд методических приемов, обоснованных Алешиной Ю.А. и Ульяновым А.Ю. [2,111]. Авторами было показано, что производительность процесса концентрирования тангенциальной ультрафльтрацией холерных антигенов увеличивается при повышении температуры максимально до 37 °С и создании следующих барометрических параметров – давления на подаче продукта в микрофльтрационную мембрану и выходе из нее – 2,5 и 0,5 кгс/см². Что касается проведения процесса концентрирования *F. tularensis* 15 НИИЭГ, то температура культуральной жидкости по

окончании выращивания данного микроба составляет именно эту величину. Поскольку установка Vivaflow 200 не позволяет регулировать давление на выходе фильтруемого продукта, то нами проведены исследования с вариацией давления только в точке подачи продукта (таблица 10). Количество культуральной жидкости составляло 5 л. Полученный объем концентрата составлял 0,5 л.

Таблица 10 – Производительность процесса концентрирования *F. tularensis* 15 НИИЭГ в зависимости от давления в точке подачи продукта на микрофильтрационную мембрану (n=3)

Давление, кгс/см ²	Удельная производительность, концентрирования, л/м ² /ч
0,5±0,1	15,2±1,3
1,0±0,1	19,6±1,1
1,5±0,1	23,15±1,2
2,0±0,1	29,1±0,9
2,5±0,1	37,5±1,5
3,0±0,1	21,7±0,8

Анализ данных таблицы 10 дает основания утверждать о максимальной производительности процесса при давлении равным (2,5±0,1) кгс/см². При этом следует отметить, что начало проведения процесса (первые 0,5 ч) при давлении (3,0±0,1) кгс/см² характеризовалось наибольшей производительностью, которая постепенно снижалась. Это, на наш взгляд, можно объяснить явлением концентрационной поляризации [11].

Немаловажную роль при разработке технологии концентрирования *F. tularensis* 15 НИИЭГ играет обеспечение биологической безопасности. Следует сказать о том, что основные моменты безопасного проведения работ с микроорганизмами III-IV групп патогенности прописаны в СП 1.3.2322-08 [103]. В данном документе для жидких отходов бактерий, не образующих спор, применяются следующие методы дезинфекции: автоклавирование и кипячение. Указанные методы неприменимы для дезинфекции микрофильтрационной мембраны. СП 1.3.3118-13 [104] для дезинфекции объектов, содержащих бактерии, не образующих спор, разрешают использовать растворы хлорактивных, кислородактивных дезинфицирующих средств, средств на основе катионных поверхностно-активных веществ и глутарового альдегида. Мы апробировали перекись водорода. Процесс дезинфекции осуществляли рециркуляцией дезинфектанта с содержанием основного вещества 3,

6 и 9 % через фильтрационную установку в течение промежутков времени, указанных в таблице 8, после чего установку оставляли заполненной перекисью водорода на (17 ± 1) ч и проводили контроль специфической стерильности фильтрата и концентрата в соответствии с методическими указаниями МУ 3.1.2007-05 [126]. Данные экспериментов показаны в таблице 11. Анализ данных позволяет говорить о рациональности применения 3 % раствора перекиси водорода с часовой его рециркуляцией через фильтрационную установку или 6 % раствора с рециркуляцией в течение 0,5 ч.

Таблица 11 – Результаты экспериментов по отработке режимов дезинфекции (n=3)

Содержание перекиси водорода в дезинфектанте, %	Время рециркуляции дезинфектанта, ч	Результаты контроля специфической стерильности
3	0,5	+
	1,0	–
	1,5	–
6	0,5	–
	1,0	–
	1,5	–
9	0,5	–
	1,0	–
	1,5	–

Примечания. «+» – обнаружение клеток *F. tularensis*, «–» – отсутствие клеток *F. tularensis*

Производитель [170] для очистки мембраны Vivaflow 200 от остатков продукта рекомендует применение следующих санаторов: 1М раствор гидроксида натрия и 2,5 г/л раствор лимонной кислоты. При этом показателем чистоты мембраны после каждой очистки является скорость потока очищенной воды через санированную мембрану не ниже чем 70 % данной характеристики при использовании новой мембраны. Основной задачей являлось определение времени проведения процесса очистки, гарантирующей указанную скорость потока воды. Кроме веществ, рекомендуемых производителем, мы также предприняли попытку применить 1 % раствор санатора «Р-3 ультрасил 11». Следует отметить, что на данное вещество имеется Свидетельство о государственной регистрации № RU.77.01.34.015.Е.001610.11.10. «Р-3 ультрасил 11» успешно применяется для очистки стерилизующего фильтрационного оборудования в промышленной техно-

логии производства химической холерной химической вакцины [48]. Санацию микрофильтрационной мембраны осуществляли рециркуляцией 1,0 дм³ чистящего раствора через установку. Выявлено, что проведение данной операции в течение 0,5 ч обеспечивает ее очистку (таблица 12), при этом последующее увеличение времени санации практически не дает повышения степени очистки мембраны.

Таблица 12 – Результаты исследований по санации мембраны Vivaflow 200 (n=3)

Вещество	Продолжительность операции, ч	Производительность отведения воды по линии фильтрата после очистки, дм ³ /ч
1М раствор гидроксида натрия	0,25	11,3±0,9
	0,5	17,1±1,5
	0,75	17,5±1,5
	1,0	17,6±1,5
2,5 г/л раствор лимонной кислоты	0,25	11,4±0,9
	0,5	16,9±1,3
	0,75	17,2±1,6
	1,0	17,7±1,5
1 % раствор «Р-3 ультрасил 11»	0,25	12,5±1,0
	0,5	17,7±1,7
	0,75	17,9±1,7
	1,0	18,0±1,8
Примечание. Производительность отведения воды по линии фильтрата новой мембраной составляла 24,0 дм ³ /ч.		

Промывка очищенной водой в количестве не менее 2,0 дм³ гарантирует удаление санатора (таблица 13).

Таблица 13 – Результаты исследований по отмывке мембраны Vivaflow 200 после ее санации (n=3)

Вещество	Количество отмывочной воды, дм ³	Значение рН воды в ходе проведения отмывки
1	2	3
1М раствор гидроксида натрия	0	13,0
	0,5	10,5
	1,0	8,0
	1,5	6,4
	2,0	6,1
	2,5	6,2
	3,0	6,1

1	2	3
2,5 г/л раствор лимонной кислоты	0	4,0
	0,5	4,7
	1,0	5,2
	1,5	5,9
	2,0	6,3
	2,5	6,3
	3,0	6,2
1 % раствор «Р-3 ультрасил 11»	0	12,2
	0,5	9,9
	1,0	7,8
	1,5	6,5
	2,0	6,0
	2,5	6,1
	3,0	5,9
Примечание. При проведении исследований показатель рН воды очищенной составлял (6,1±0,2).		

3.3 Сравнительное изучение седиментационного, центробежного и фильтрационного методов концентрирования

Для оценки применимости седиментационных, центробежных и фильтрационных методов концентрирования испытаниям подвергалась нативная культура *F. tularensis* 15 НИИЭГ, выращенная методом глубинного культивирования в течение (22±1) ч при температуре (37±0,5) °С в жидкой питательной среде на основе ФГФ (рН 7,2±0,1). В качестве критерия технологического применения методов концентрирования было принято 10-кратное увеличение концентрации микроорганизмов. Седиментацию суспензии туляремийного микроба проводили при температуре от 2 до 10 °С с периодическим отбором проб. Сгущение биомассы центрифугированием осуществляли на центрифуге Avanti J-301 при числе оборотов ротора, равным 12000 в течение 25 мин. Для оценки возможности применения фильтрационных методов использовали тангенциальную микрофильтрацию на микрофильтрационной установке Vivaflow 200 через мембраны с размером пор 0,2 мкм.

Полученные концентраты анализировали по следующим показателям: концентрация микробных клеток, процент живых микробных клеток, степень диссоциации. Исходные показатели полученной биомассы (микробной суспензии) составляли: концентрация микробных клеток – $(26,8 \pm 1,1) \times 10^9$ м.к./мл, жизнеспособность – (98±1) %, степень диссоциации – (81±2) %.

Результаты исследований по сравнению методов концентрирования бактерий *F. tularensis* 15 НИИЭГ представлены в таблице 14.

Таблица 14 – Результаты исследований по сравнению методов концентрирования бактерий *F. tularensis* 15 НИИЭГ (n=3)

Метод концентрирования	После концентрирования		
	Концентрация, $\times 10^9$ м.к./мл	Жизнеспособность, % живых м.к.	Степень диссоциации,% (количество SR (белых) колоний)
Центрифугирование	270,9 \pm 0,9	58,9 \pm 2,2	87,2 \pm 2,2
Тангенциальная фильтрация	315,9 \pm 0,9	98,2 \pm 0,2	81,3 \pm 0,5
Седиментация (до 1/2 объема)	27,2 \pm 0,5	85,5 \pm 0,5	50 \pm 1

Исходя из данных, представленных в таблице 14, можно сделать вывод о том, что использование микрофильтрации позволяет достигнуть 10-кратное увеличение концентрации микробов в суспензии, при этом продолжительность технологического процесса при объеме исходного материала 1,0 дм³ составило не более 1 ч. Данный метод более предпочтителен по сравнению с седиментацией, 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-колонии) 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 (микрофильтрацией), не происходило ухудшения характеристик в сравнении с нативной культурой *F. tularensis* 15 НИИЭГ, полученной в результате глубинного культивирования.

Что касается использования центробежного метода для концентрирования туляремиального микроба, то 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 обеспе-

чения защиты от контаминации суспензии вакцинного штамма и обеспечения биологической безопасности производственного процесса. Также к недостаткам технологии концентрирования как центробежным, так и седиментационным способами, следует отнести наличие в надосадочной жидкости клеток *F. tularensis*, которые были выявлены при определении специфической стерильности.

Следует сказать о том, что полученные данные коррелируют с данными других исследователей. Так в авторском свидетельстве на изобретение СССР 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» [8]. Также уместно привести исследования, проведенные Пиковым А.В., в результате которых был определен ряд недостатков сепарирования для концентрирования клеток *B. 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 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* микрофльтрацией в тангенциальном потоке жидкости с применением плоскорамных мембранных модулей с порогом отсечки 0,2 мкм. При этом полученные концентраты полностью удовлетворяли требованиям нормативных документов [93].

3.4 Определение условий и времени хранения концентратов биомассы вакцинного штамма

Готовая лекарственная форма ЖТВ 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. В связи с этим, следующим этапом нашей работы было определение условий и времени хранения концентратов биомассы вакцинного штамма. Результаты исследований представлены в таблице 15.

Для исследований изменений характеристик концентрированной культуры *F. tularensis* 15 НИИЭГ в процессе хранения были выбраны 2 температурных интервала хранения – от 2 до 8 °С и от 18 до 24 °С. Полученные концентраты анализировали по следующим показателям: концентрация микробных клеток, процент живых микробных клеток, степень диссоциации. Применяли методы, изложенные в ФС.3.3.1.0019.15 [116].

Анализ данных таблицы 15 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.

Таблица 15 – Результаты исследований по определению условий и времени хранения концентратов биомассы *F. tularensis* 15 НИИЭГ (n=3)

Время хранения, сут	Показатели					
	Концентрация, $\times 10^9$ м.к./мл		Жизнеспособность, % живых м.к.		Степень диссоциации,%	
	Условия хранения					
	от 2 до 8 °С	от 18 до 24 °С	от 2 до 8 °С	от 18 до 24 °С	от 2 до 8 °С	от 18 до 24 °С
1	315,9±0,9	315,9±0,9	98,2±0,2	97,5±0,5	80,7±0,5	80,8±0,5
2	н.о.*	н.о.*	95,6±0,4	92,8±0,8	83,8±2,5	80,5±0,5
3	н.о.*	н.о.*	92,4±0,4	84,5±7,5	82,5±1,5	80,4±1,2
6	н.о.*	н.о.*	87,3±4,5	18,2±4,5	81,3±6,2	65,5±1,5
7	н.о.*	н.о.*	68,5±0,5	3,2	79,5±4,9	50
21	224±5	200±5	65,0±0,5	0	61,5±1,5	0
31	232±5	н.о.	63,5±0,5	0	63±0,5	0
54	241±5	н.о.	54,5±6,4	н.о.	47,5±0,5	н.о.

Примечание: *для титрации использовали значения концентрации, определенные на первые сутки $(315,9\pm 0,9)\times 10^9$ м.к./мл)

3.5 Исследование свойств живой сухой туляремийной вакцины, полученной с применением новых биотехнологических подходов

В ходе исследований, описание и результаты которых изложены в предыдущих подразделах главы, были разработаны новые биотехнологические подходы к проведению этапов глубинного аппаратного культивирования *F. tularensis* 15 НИИЭГ в питательной среде на основе ФГФ и концентрирования биомассы туляремийного микроба методом тангенциальной микрофльтрации. По названным технологическим приемам получено 4 лабораторные серии лиофилизатов экспериментальной живой туляремийной вакцины (ЭЖТВ) и проверены их нормируемые показатели на соответствие требованиям ФС.3.3.1.0019.15 [116] (таблица 16).

Сублимационное высушивание проводили в сушильной установке FreeZone 2,5 L, функционал которой практически не позволяет управлять процессом лиофилизации.

Таблица 16 – Показатели качества лабораторных серий лиофилизатов ЭЖТВ

Показатели	Значение показателя по ФС.3.3.1.0019.15	Сер. 005	Сер. 006	Сер. 009	Сер. 010
1	2	3	4	5	6
Описание	Пористая масса белого с желтоватым оттенком цвета. Восстановленный препарат – гомогенная мутная суспензия белого с желтоватым оттенком цвета без посторонних примесей, осадка или хлопьев	<u>н/о</u> +	<u>н/о</u> +	<u>н/о</u> +	<u>н/о</u> +
Время растворения	Должна полностью растворяться в течение 3 мин при добавлении 1 мл воды для инъекций при встряхивании	<u>н/о</u> 0,5 мин	<u>н/о</u> 0,5 мин	<u>н/о</u> 0,5 мин	<u>н/о</u> 0,5 мин
Время седиментационной устойчивости	Суспензия не должна расслаиваться в течение 5 мин	<u>н/о</u> более 30 мин			

Продолжение таблицы 16

1	2	3	4	5	6
Проходимость через иглу	Суспензия должна свободно проходить в шприц через иглу № 0840	$\frac{\text{н/о}}{+}$	$\frac{\text{н/о}}{+}$	$\frac{\text{н/о}}{+}$	$\frac{\text{н/о}}{+}$
pH	От 6,8 до 7,2	$\frac{7,0}{7,1}$	$\frac{7,0}{7,2}$	$\frac{7,0}{7,2}$	$\frac{7,0}{7,1}$
Потеря в массе при высушивании	Не более 4,0 %	$\frac{\text{н/о}}{3,2}$	$\frac{\text{н/о}}{3,1}$	$\frac{\text{н/о}}{2,9}$	$\frac{\text{н/о}}{3,2}$
Средняя масса и отклонение от средней массы	Коэффициент вариации массы вакцины должен быть не более 5 %	$\frac{\text{н/о}}{2,8}$	$\frac{\text{н/о}}{3,3}$	$\frac{\text{н/о}}{3,1}$	$\frac{\text{н/о}}{2,7}$
Отсутствие посторонних микроорганизмов и грибов	Вакцина не должна содержать посторонних микроорганизмов и грибов. Препарат должен представлять чистую живую культуру вакцинного штамма туляремийного микроба	$\frac{+}{+}$	$\frac{+}{+}$	$\frac{+}{+}$	$\frac{+}{+}$
<p>Специфическая активность</p> <p>1. Концентрация микробных клеток</p> <p>2. Количество живых микробных клеток</p> <p>3. Степень диссоциации</p> <p>4. Количество накожных доз</p>	<p>В препарате должно содержаться $(2\pm 1)\times 10^{10}$ м.к. в 1 мл</p> <p>Количество живых микробных клеток должно составлять не менее 40 % от общего количества микробных клеток</p> <p>Число SR иммуногенных «белых» колоний должно составлять не менее 80 % от общего количества выросших колоний</p> <p>Должно содержаться от 15 до 50 накожных доз</p>	$\frac{1,1\times 10^{10}}{1,2\times 10^{10}}$ $\frac{61\%}{40\%}$ $\frac{96\%}{96\%}$ $\frac{33}{24}$	$\frac{1,2\times 10^{10}}{1,2\times 10^{10}}$ $\frac{60\%}{42\%}$ $\frac{97\%}{99\%}$ $\frac{36}{25}$	$\frac{2,9\times 10^{10}}{3,0\times 10^{10}}$ $\frac{62\%}{47\%}$ $\frac{93\%}{92\%}$ $\frac{90}{70}$	$\frac{3,1\times 10^{10}}{3,0\times 10^{10}}$ $\frac{60\%}{48\%}$ $\frac{89\%}{97\%}$ $\frac{93}{73}$

5. Прививаемость	При накожной иммунизации морских свинок дозой 2×10^7 живых м.к. в объеме 0,1 мл у всех животных через 2-5 сут вокруг насечек должны образоваться инфильтрат и гиперемия диаметром от 5 до 15 мм	$\frac{\text{н/о}}{5 \text{ мм}}$	$\frac{\text{н/о}}{5 \text{ мм}}$	$\frac{\text{н/о}}{9 \text{ мм}}$	$\frac{\text{н/о}}{10 \text{ мм}}$
6. Иммуногенность	Не менее 8 из 10 морских свинок, привитых накожно дозой 2×10^7 живых м.к. в объеме 0,1 мл, должны быть предохранены от гибели при подкожном заражении 1000 Dс1 вирулентного штамма туляремийных бактерий голарктической расы, 1 Dс1 которого не должна превышать 5 м.к.	$\frac{\text{н/о}}{10 \text{ живы}}$	$\frac{\text{н/о}}{8 \text{ живы}}$	$\frac{\text{н/о}}{10 \text{ живы}}$	$\frac{\text{н/о}}{9 \text{ живы}}$
Термостабильность	Не менее 7 сут	$\frac{\text{н/о}}{4 \text{ сут}}$	$\frac{\text{н/о}}{4 \text{ сут}}$	$\frac{\text{н/о}}{4 \text{ сут}}$	$\frac{\text{н/о}}{5 \text{ сут}}$
Примечания. 1. «+» – соответствие нормативным показателям. 2. н/о – не определяли. 3. В числителе – значение показателей до высушивания, в знаменателе – после высушивания.					

Большинство проверенных показателей отвечали требованиям фармакопейной статьи. Однако следует сказать о том, что после лиофилизации произошло снижение показателя «жизнеспособность», в среднем, на 30 %. Кроме того, не соответствовали нормируемым требованиям параметр «Термостабильность» во всех сериях, а в сериях 009 и 010 – «Количество накожных доз». По последней характеристике это объясняется, на наш взгляд, методическими ошибками при подготовке полуфабриката вакцины к лиофилизации.

В течение 2 лет проводили анализ стабильности препарата по показателю «жизнеспособность». Было установлено его снижение до 30-35 % к концу первого года и до 10-15 % к концу второго года хранения при температуре от 2 до 8 °С. На

наш взгляд, это может быть связано с неоптимальным составом среды высушивания и условиями сушки препарата, полученного по новым технологическим приемам культивирования и концентрирования, а также запайки ампул (без вакуума).

Заключение по главе

Результатом исследований, представленных в главе 3, явилась разработка современных эффективных биотехнологических приемов получения жизнеспособной клеточной массы вакцинного штамма туляремийного микроба на этапах культивирования, концентрирования и хранения. В частности, представлено экспериментальное обоснование возможности применения жидкой питательной среды на основе ФГФ для глубинного культивирования бактерий вакцинного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ. В результате проведения исследований обоснован качественный и количественный состав среды. Апробирована методика глубинного культивирования клеток вакцинного штамма туляремийного микроба аппаратным методом. Осуществлен подбор оптимальных условий для получения наибольшего количества клеточной биомассы.

Итогом экспериментов, изложенных в разделе 3.2, явилась разработка экспериментальной технологии концентрирования бактерий вакцинного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ методом тангенциальной фильтрации. Экспериментально обоснованы основные и вспомогательные операции данного технологического процесса и выявлены оптимальные барометрические параметры фильтрации. Показано, что процесс целесообразно проводить с применением мембран 0,2 мкм.

Сравнительное изучение седиментационных, центробежных и фильтрационных методов концентрирования выявило преимущество последнего метода. Также было показано, что концентрат туляремийного микроба целесообразно хранить до процесса лиофилизации не более 6 сут при температуре от 2 до 8 °С.

По экспериментально обоснованным технологическим приемам получено 4 лабораторные серии ЭЖТВ, в основном отвечающие нормируемым требованиям. В результате анализа стабильности препарата в процессе длительного хранения установлено снижение жизнеспособности лиофилизированных клеток штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ ниже значения, установленного нормативными документами.

ГЛАВА 4 ЛИОФИЛИЗАЦИЯ БАКТЕРИЙ *FRANCISELLA TULARENSIS* ВАКЦИННОГО ШТАММА 15 НИИЭГ

4.1 Определение эвтектических температур живой туляремийной вакцины

В технологии лиофилизации препаратов первой процедурой является их замораживание, от правильного проведения которого зависит качество готового продукта. Основными характеристиками, позволяющими оценить рациональные температурные режимы процедур замораживания и последующей сублимации, являются температуры полного замерзания, а также нижняя и верхняя эвтектическая температуры [79].

На первом этапе исследованиям подвергался прототип ЖТВ с качественно-количественным составом, определенным ФС.3.3.1.0019.15 (состав приведен на 1 мл): клетки *F. tularensis* вакцинного штамма 15 НИИЭГ – 22×10^9 м.к., вспомогательные вещества: сахароза – 0,099 г, натрия глутамата моногидрат – 0,1485 г, тио-мочевина – 0,0495 г, желатин – 0,099 г [116].

Для определения вышеназванных тепловых характеристик ЖТВ использовали метод, предложенный Rey L. [162], основанный на параллельном измерении температур материала и его электрического сопротивления при замораживании-оттаивании образца. Замораживание-оттаивание осуществляли в установке Epsilon 2-6D, где электрическое сопротивление измеряется датчиком LyoRx, показания которого выводятся на вторичный прибор в процентах.

Результаты определения теплофизических характеристик туляремийной вакцины представлены на рисунке 8. Анализ данных рисунка 8 показывает, что температура полного замерзания составляет минус 40 °С (точка А), нижняя и верхняя эвтектическая температуры – минус 30 °С (точка В) и минус 22 °С (точка D) соответственно.

На основании полученных данных можно сделать вывод о том, что в составе туляремийной вакцины присутствуют компоненты с отличающимися друг от друга теплофизическими характеристиками, так как на рисунке 8 присутствует еще одна точка перегиба линии – точка С. Следует сказать о том, что наличие нескольких точек перегиба линии было ожидаемым результатом в силу того, что в составе ис-

следуемого образца присутствуют, наряду с клетками *F. tularensis*, и ряд вспомогательных веществ. В практическом плане знание этих температур позволяет сделать вывод о целесообразности замораживания препарата до минус 40 °С, а также проведения процесса первичной сублимации при температуре от минус 30 °С до минус 22 °С, как рекомендовано рядом исследователей [24,79].

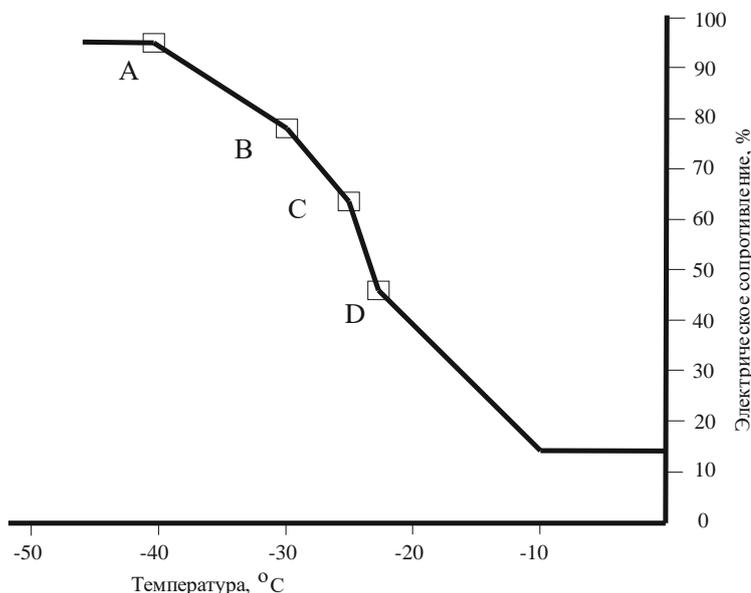


Рисунок 8 – График зависимости величины электрического сопротивления от температуры ЖТВ

4.2 Совершенствование технологии лиофилизации живой туляремийной вакцины

4.2.1 Разработка нового биофармацевтического состава живой туляремийной вакцины

Исходя из результатов оценки качества 4-х лабораторных серий ЭЖТВ (подраздел 3.5) первым шагом экспериментов, описанных в данном подразделе, было осуществление подбора защитных сред высушивания. Полуфабрикат вакцины (концентрат штамма *F. tularensis* 15 линии НИИЭГ, полученный методом тангенциальной микрофльтрации), разводили до необходимой концентрации микробных клеток 25 мМ калий-фосфатным буфером, добавляли компоненты среды высушивания таким образом, чтобы в 1 мл полученной суспензии было $(20 \pm 10) \times 10^9$ м.к. и вспомогательных веществ в количестве, представленным в таблице 17. Препарат разливали по 1 мл в стеклянные флаконы вместимостью 10 мл. В качестве контроля применяли существующий биофармацевтический состав вакцины в количе-

стве 1 мл, разлитый в ампулы вместимостью 5 мл. Все вспомогательные вещества, как показал проведенный анализ литературы (подраздел 1.1.3), используются в технологиях лиофилизации. Кроме того, агар-агар разрешен для применения в России в качестве пищевой добавки, трегалоза описана в качестве вспомогательного вещества в Европейской, Японской Фармакопеях, а декстран зарегистрирован в РФ в качестве активной фармацевтической субстанции.

Таблица 17 – Варианты защитных сред высушивания

Номер варианта	Состав среды высушивания, г		
	трегалоза	декстран	агар-агар
1	0,3	0,0002	0,0025
2	0,3		отсутствует
3	0,1		0,0025
4	0,1		отсутствует
5	0,3		0,005

По окончании розлива флаконы и ампулы с препаратом устанавливали на полки сублимационной сушильной установки Epsilon 2-6D, замораживали материал до температуры минус (40 ± 5) °C и выдерживали в течение 2 ч. Конденсатор-вымораживатель охлаждали до температуры минус (65 ± 5) °C. Во флаконы вставляли специальные пробки для лиофилизации таким образом, чтобы боковые прорезы в пробках не перекрывались полностью горлышком флакона. Затем создавали остаточное давление в сушильной установке $(0,1\pm 0,01)$ мбар. Процесс сублимации вели от температуры полок минус (40 ± 5) °C до (30 ± 2) °C со скоростью повышения температуры полок не более 5 °C в час. Названные температурно-временные режимы замораживания и лиофилизации позволили в течение всего технологического процесса высушивания поддерживать эвтектические температуры в оптимальной области. Кроме того, параметр $Ly\alpha R_x$, измеряемый в контроле и характеризующий электрическое сопротивление материала, в процессе высушивания находился в пределах от 96 до 97 %, что по результатам наших предыдущих исследований по совершенствованию процесса сублимационного высушивания иммуногенов холерной химической вакцины является оптимальным [45]. При достижении температуры материала (25 ± 2) °C флаконы герметизировали непосредственно в камере сушильной установки, используя винтовой прижиматель пробок, являющийся конструктивным элементом сушильной установки. После герметизации флаконов дав-

ление в установке выравнивали с атмосферным и производили выгрузку флаконов и обкатку их алюминиевыми колпачками.

График высушивания представлен на рисунке 9.

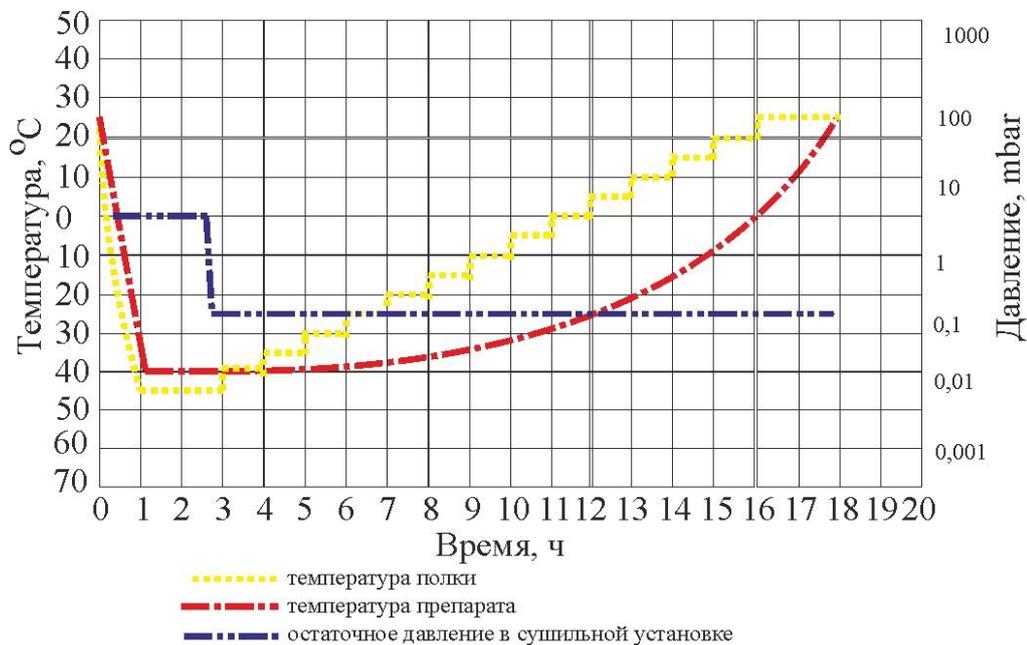


Рисунок 9 – График высушивания ЖТВ

Полученные лиофилизаты контролировали по следующим показателям: описание, время растворения, остаточная влажность, время седиментационной устойчивости, потеря в массе при высушивании, рН. Кроме того, флаконы проверяли на наличие вакуума. Данные представлены в таблице 18.

Таблица 18 – Показатели качества лиофилизатов

Показатели	Значение показателя по ФС.3.3.1.0019.15	Определенное значение показателя у препаратов с вариантами защитных сред высушивания				
		1	2	3	4	5
1	2	3	4	5	6	7
Описание	Пористая масса белого с желтоватым оттенком цвета. Восстановленный препарат – гомогенная мутная суспензия белого с желтоватым оттенком цвета без посторонних примесей, осадка или хлопьев	+	–	–	–	+

1	2	3	4	5	6	7
Время растворения	Должна полностью растворяться в течение 3 мин при добавлении 1 мл воды для инъекций при встряхивании	> 30 мин	менее 1 мин			> 30 мин
Время седиментационной устойчивости	Суспензия не должна расслаиваться в течение 5 мин	н/о	25 мин	13 мин	17 мин	н/о
pH	От 6,8 до 7,2	7,1	6,9	7,1	7,1	7,0
Потеря в массе при высушивании	Не более 4,0 %	2,2	2,5	2,1	2,2	2,4
Вакуум, герметизация	Бледно-голубое свечение газовой среды вторичной упаковки с препаратом при возбуждении её высокочастотным электрическим полем с помощью аппарата типа д'Арсонваль	бледно-голубое свечение				
Примечания. 1. «+» – соответствие нормативным показателям, «-» – несоответствие нормативным показателям, н/о – не определено.						

Во всех флаконах имелся вакуум, значения pH и потери в массе при высушивании находились в нормируемых пределах. В препарате с вариантом защитной среды № 2 произошло «вспенивание» препарата и, соответственно, он был отбракован по показателю «описание». Лиофилизаты с вариантами среды высушивания №№ 1 и 5 не прошли испытания по показателям «Время растворения» (в течение более 30 мин (время наблюдения) растворения не произошло) и «Время седиментационной устойчивости», что, по нашему мнению, связано с избыточным содержанием в составе среды высушивания трегалозы и агар-агара. У препаратов №№ 3 и 4 зафиксировано уменьшение объема таблетки лиофилизата и отслоение ее от стенок флакона (рисунок 10). Нами было высказано предположение о том, что данный эффект может наблюдаться по следующим причинам: недостаточные высота высушиваемого материала и (или) количество декстрана. Положительным итогом данного этапа исследований являлась успешная попытка герметизации флаконов

непосредственно в камере лиофилизатора с сохранением вакуума в первичной упаковке.



Рисунок 10 – Внешний вид препаратов с вариантами сред высушивания №№ 3 и 4

На дальнейшем этапе исследований мы применили следующие варианты сред высушивания, представленные в таблице 19. Отличиями методических подходов данного шага исследований были: в 1 мл суспензии было (10 ± 5) млрд клеток туляремийного микроба, препарат разливали по 2 мл во флаконы вместимостью 10 мл. Кроме того, была предпринята попытка использования нового компонента среды высушивания – хитозана, разрешенного для применения в России в качестве пищевой добавки и широко используемого в фармацевтике и медицине [101].

Таблица 19 – Варианты защитных сред высушивания

Номер варианта	Состав среды высушивания, г			
	трегалоза	декстран	агар-агар	хитозан
А	0,1	0,0002	0,0025	отсутствует
В	0,1	0,0002	отсутствует	отсутствует
С	0,1	0,01	0,0025	отсутствует
Д	0,1	0,02	отсутствует	отсутствует
Е	0,1	0,01	отсутствует	0,02

Полученные лиофилизаты контролировали по следующим показателям: описание, время растворения, остаточная влажность, время седиментационной устойчивости, потеря в массе при высушивании, рН. Кроме того, флаконы проверяли на наличие вакуума. Данные представлены в таблице 20.

Таблица 20 – Показатели качества лиофилизатов

Показатели	Значение показателя по ФС.3.3.1.0019.15	Определенное значение показателя у препаратов с вариантами защитных сред высушивания				
		А	В	С	Д	Е
Описание	Пористая масса белого с желтоватым оттенком цвета. Восстановленный препарат – гомогенная мутная суспензия белого с желтоватым оттенком цвета без посторонних примесей, осадка или хлопьев	+	–	+	+	+
Время растворения	Должна полностью растворяться в течение 3 мин при добавлении 1 мл воды для инъекций при встряхивании	90 с	120 с	150 с	130 с	20 с
Время седиментационной устойчивости	Суспензия не должна расслаиваться в течение 5 мин	10 мин	15 мин	30 мин	20 мин	> 1 ч
рН	От 6,8 до 7,2	6,9	7,1	7,1	7,0	7,1
Потеря в массе при высушивании	Не более 4,0 %	2,7	2,2	2,5	2,5	2,4
Вакуум, герметизация	Бледно-голубое свечение газовой среды вторичной упаковки с препаратом при возбуждении её высокочастотным электрическим полем с помощью аппарата типа д'Арсонваль	бледно-голубое свечение				
Примечания. 1. «+» – соответствие нормативным показателям, «–» – несоответствие нормативным показателям, н/о – не определено.						

По внешнему виду полученные лиофилизаты представляли собой сухую массу белого с желтоватым оттенком цвета в виде хорошо сформированной таблетки (рисунок 11). Характеристики полученных продуктов (время растворения, время седиментационной устойчивости, рН, потеря в массе при высушивании,

наличие вакуума) соответствовали нормируемым требованиям. У препарата с защитной средой В зафиксировано уменьшение объема таблетки лиофилизата и отслоение ее от стенок флакона. В препарате с защитной средой Е показатель «Время растворения» обладал более лучшими значениями – 20 с. У других лиофилизатов он лежал в пределах от 90 до 150 с. Кроме того в препарате с защитной средой Е не зафиксировано расслоения в течение более 1 ч (время наблюдения). У других образцов данный эффект наблюдался в промежуток времени от 10 до 30 мин. Основываясь на полученных результатах, мы отдали предпочтение следующей биофармацевтической композиции (состав приведен на 1 мл): клетки штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ – $(10 \pm 5) \times 10^9$ м.к. и вспомогательные вещества: трегалоза – 0,1 г; декстран – 0,01 г; хитозан – 0,02 г.

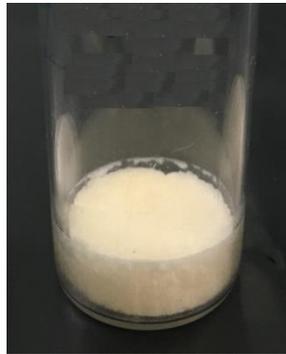


Рисунок 11 – Внешний экспериментальной вакцины

4.2.2 Определение эвтектических температур живой туляремийной вакцины с новым биофармацевтическим составом

Изменение биофармацевтического состава прототипа ЖТВ потребовало определения ее эвтектических температур, которое проводили в соответствии с методическими приемами, изложенными в подразделе 4.1.

Результаты определения температурных характеристик туляремийной вакцины представлены на рисунке 12. Анализ данных рисунка 12 показывает, что значения определяемых характеристик являются следующими: температура полного замерзания – минус 40 °С (точка А), нижняя и верхняя эвтектическая температуры – минус 35 °С (точка В) и минус 25 °С (точка С) соответственно. Следует сказать о том, что температура полного замерзания была одинаковой как для традиционного, так и разработанного биофармацевтических составов вакцины. Небольшие расхождения (от 2 до 5 °С) зафиксированы для значений нижней и верхней эвтектических температур.

В практическом плане знание этих температур позволяет сделать вывод о целесообразности замораживания препарата до минус 40 °С, а также проведения процесса первичной сублимации при значениях температуры, лежащих в интервале от минус 35 °С до минус 25 °С, как рекомендовано рядом исследователей [24,79].

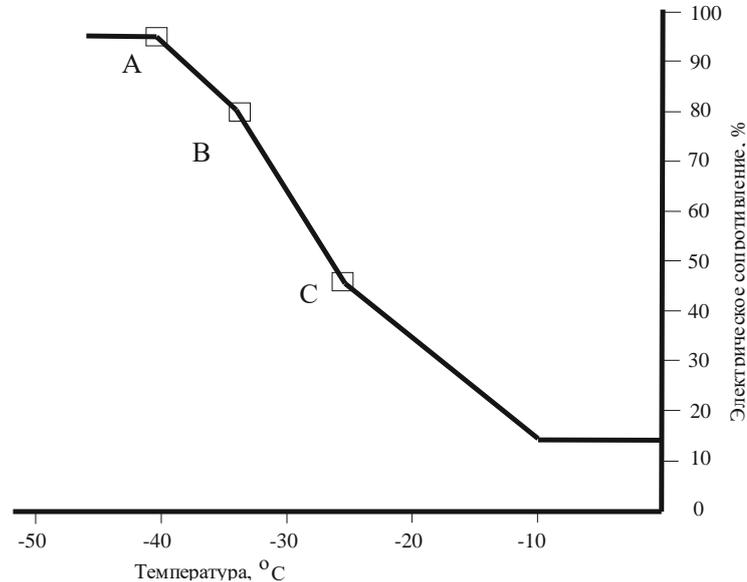


Рисунок 12 – График зависимости величины электрического сопротивления от температуры ЖТВ

4.2.3 Изучение влияния условий замораживания на жизнеспособность туляремийного микроба вакцинного штамма 15 НИИЭГ

Представляло определенный научно-практический интерес изучение влияния продолжительности замораживания на качество лиофилизатов туляремийной вакцины. Флаконы с препаратом замораживали до температуры материала минус (40 ± 5) °С на полках сублимационной сушильной установки. При этой температуре материал выдерживали в течение следующих промежутков времени: 2-3 ч, 5-6 ч, 10-11 ч, 15-16 ч, 23-24 ч. Далее высушивали в соответствии с технологическими приемами описанными ранее.

Оценку влияния времени замораживания на качество лиофилизатов проводили по следующим показателям: внешний вид препарата, потеря в массе при высушивании, время растворения, рН, время седиментационной устойчивости, количество живых микробных клеток.

Результаты исследований представлены в таблице 21. По внешнему виду полученные лиофилизаты представляли собой сухую массу белого с желтоватым от-

тенком цвета в виде хорошо сформированной таблетки. Потеря в массе при высушивании для препаратов была практически одинаковой и составляла от 0,8 % до 1,1 %. Значение рН растворов, полученных после растворения лиофилизатов, было от 6,9 до 7,1. Полученные лиофилизаты легко растворялись в 1 мл воды в течение, в среднем, 30 с. Расплаивание препаратов в течение более 60 мин обнаружить не удалось. Количество живых микробных клеток в образцах после их лиофилизации практически не менялась в сравнении с жидкими препаратами. Значения всех показателей соответствовали нормируемым требованиям. Полученные экспериментальные данные позволяют сделать вывод об одинаковом влиянии времени замораживания на показатели лиофилизатов. В практическом плане это дает возможность варьировать временем начала сублимационного высушивания.

Таблица 21 – Результаты исследований влияния времени замораживания на качество лиофилизатов (n=3)

Время замораживания, ч	Потеря в массе при высушивании, %		Время растворения, с		рН		Время седиментационной устойчивости, мин		Количество живых микробных клеток, %	
	I	II	I	II	I	II	I	II	I	II
2-3	н/о	0,8	н/о	30	6,9	7,0	н/о	более 60	62	60
5-6		0,8		35	7,0	7,1			58	55
10-11		1,1		25	7,1	7,1			69	69
15-16	н/о	1,0		30	6,9	6,9	н/о	более 60	54	53
23-24		0,9		30	7,0	7,0			70	68

Примечание. I – значение показателя жидкого препарата, II – значение показателя лиофилизата, н/о – не определяли. Приведены средние значения.

По предложенным методическим приемам лиофилизации получена лабораторная серия туляремийной вакцины и исследованы ее нормируемые показатели (таблица 22), из анализа данных которой следует, что препарат полностью соответствует предъявляемым требованиям.

Таблица 22 – Показатели качества сухой ЖТВ

Показатели	Значение показателя по ФС.3.3.1.0019.15	Значение показателя
1	2	3
Описание	Пористая масса белого с желтоватым оттенком цвета. Восстановленный препарат – гомогенная мутная суспензия белого с желтоватым оттенком цвета без посторонних примесей, осадка или хлопьев	$\frac{н/о}{+}$
Время растворения	Должна полностью растворяться в течение 3 мин при добавлении 1 мл воды для инъекций при встряхивании	$\frac{н/о}{0,5 \text{ мин}}$
Время седиментационной устойчивости	Суспензия не должна расслаиваться в течение 5 мин	$\frac{н/о}{\text{более } 30 \text{ мин}}$
Проходимость через иглу	Суспензия должна свободно проходить в шприц через иглу № 0840	$\frac{н/о}{+}$
pH	От 6,8 до 7,2	$\frac{7,0}{7,1}$
Потеря в массе при высушивании	Не более 4,0 %	$\frac{н/о}{1,5}$
Средняя масса и отклонение от средней массы	Коэффициент вариации массы вакцины должен быть не более 5 %	$\frac{н/о}{3,3}$
Вакуум, герметизация	Бледно-голубое свечение газовой среды вторичной упаковки с препаратом при возбуждении её высокочастотным электрическим полем с помощью аппарата типа д'Арсонваль	$\frac{н/о}{\text{бледно – голубое свечение}}$
Отсутствие посторонних микроорганизмов и грибов	Вакцина не должна содержать посторонних микроорганизмов и грибов. Препарат должен представлять чистую живую культуру вакцинного штамма туляремиального микроба	$\frac{+}{+}$

1	2	3
Специфическая активность 1. Концентрация микробных клеток 2. Количество живых микробных клеток 3. Степень диссоциации 4. Количество накожных доз 5. Прививаемость 6. Иммуногенность	В препарате должно содержаться $(2\pm 1)\times 10^{10}$ м.к. в 1 мл Количество живых микробных клеток должно составлять не менее 40 % от общего количества микробных клеток Число SR иммуногенных «белых» колоний должно составлять не менее 80 % от общего количества выросших колоний Должно содержаться от 15 до 50 накожных доз При накожной иммунизации морских свинок дозой 2×10^7 живых м.к. в объеме 0,1 мл у всех животных через 2-5 сут вокруг насечек должны образоваться инфильтрат и гиперемия диаметром от 5 до 15 мм Не менее 8 из 10 морских свинок, привитых накожно дозой 2×10^7 живых м.к. в объеме 0,1 мл, должны быть предохранены от гибели при подкожном заражении 1000 Dcl вирулентного штамма туляремийных бактерий голарктической расы, 1 Dcl которого не должна превышать 5 м.к.	$\frac{1,1\times 10^{10}}{1,2\times 10^{10}}$ $\frac{74\%}{73\%}$ $\frac{98\%}{98\%}$ $\frac{40}{40}$ $\frac{\text{н/о}}{5\text{ мм}}$ $\frac{\text{н/о}}{10\text{ живы}}$
Термостабильность	Не менее 7 сут	$\frac{\text{н/о}}{12}$
Примечания. 1. «+» – соответствие нормативным показателям. 2. н/о – не определяли. 3. В числителе – значение показателей до высушивания, в знаменателе – после высушивания.		

Заключение по главе

В результате проведенных исследований, представленных в главе 4, усовершенствована технология лиофилизации клеток туляремийного микроба вакцинного штамма 15 НИИЭГ, позволяющая получать новую форму выпуска туляремийной вакцины – лиофилизат во флаконах.

Экспериментально обоснован новый биофармацевтический состав ЖТВ (состав приведен на 1 мл): клетки штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ – $(10\pm 5)\times 10^9$ м.к. и вспомогательные вещества: трегалоза – 0,1 г; декстран – 0,01 г; хитозан – 0,02 г.

Без сомнения, использование такого компонента среды высушивания, как хитозан, ранее не использовавшегося при приготовлении готовых лекарственных форм вакцинных препаратов, требует более углубленного изучения его влияния на организм человека, что будет исследовано в ходе доклинических и клинических испытаний ЭЖТВ.

Для новой композиции вакцины выявлены значения эвтектических температур. Определенные характеристики позволили определить необходимые интервалы температуры замораживания и первичной сублимации препарата.

Изучено влияния условий замораживания на жизнеспособность туляремийного микроба вакцинного штамма 15 НИИЭГ. Выявлено, что хранение материала при температуре минус (40 ± 5) °С в течение от 2 до 24 ч не влияет на качество лиофилизатов вакцины.

**ГЛАВА 5 РАЗРАБОТКА АЛЬТЕРНАТИВНЫХ ПОДХОДОВ
К КОНТРОЛЮ КАЧЕСТВА ПРЕПАРАТА НА ЭТАПАХ ПОЛУЧЕНИЯ
ЛИОФИЛИЗАТА ВАКЦИННОГО ШТАММА
FRANCISELLA TULARENSIS 15 НИИЭГ**

Производство вакцины представляет собой сложный многоступенчатый процесс, основные этапы которого – получение жизнеспособных иммуногенных бактерий вакцинного штамма и приготовление из них готовой лекарственной формы – лиофилизата. Качество препарата на стадиях его производства контролируется в соответствии с технической документацией, используются стандартные микробиологические и биологические методы. Недостатком данных методов является длительное время получения результата, а также невозможность контролировать состояние бактериальной клетки.

В связи с этим апробация новых инструментальных методов контроля, позволяющих оценивать основные параметры и физиологическое состояние бактериальной клетки на промежуточных этапах производства туляремийной вакцины и в ее готовой лекарственной форме, является перспективным направлением исследований.

**5.1 Оценка возможности использования новых инструментальных
методов контроля туляремийного микроба на этапах получения
экспериментальной туляремийной вакцины**

На данном этапе работы была проведена экспериментальная оценка возможности использования новых инструментальных методов – АСМ и ЭО мониторинга для анализа клеток вакцинного штамма туляремийного микроба на этапах культивирования, подготовки биомассы и получения лиофилизата.

ЭО мониторинг физиологического состояния бактериальных клеток проводили на полностью автоматизированной аналитической установке EloTrase. Измерения проводили на всех стадиях получения ЭЖТВ. Пробоподготовка осуществлялась автоматически по стандартному протоколу аналитической установки: клетки автоматически отделялись от культурального бульона фильтрованием через целлюлозный фильтр с размером пор 0,45 мкм, концентрат клеток разбавлялся водой

MilliQ с электропроводимостью $5 \text{ мкСм} \times \text{см}^{-1}$ до конечной оптической плотности $\text{OD}_{600} = (0,1 \pm 5) \%$ перед ЭО измерением. В основе ЭО метода лежит поляризация частиц, суспендированных в низкопроводящей жидкости под воздействием переменного электромагнитного поля. Регистрируемым параметром является изменение оптических свойств суспензии бактериальных клеток под воздействием переменного электромагнитного поля в широком диапазоне частот. Основным измеряемым параметром являлась анизотропия поляризуемости (АП), измеряемая в условных единицах. EloTrase позволяет регистрировать АП в диапазоне частот электрического поля от 10 кГц до 40 МГц. Для измерения АП клеток были использованы частоты 900 кГц и 2100 кГц. Данные частоты отражают состояние цитоплазмы и цитоплазматической мембраны, соответственно [16,150].

Для измерения тесноты связи между жизнеспособностью и АП использовался линейный коэффициент корреляции Пирсона. Корреляционная связь между показателями считается сильной, если коэффициент Пирсона $\geq 0,7$ [112].

АСМ бактериальных клеток проводили с помощью сканирующего зондового микроскопа Solver P47-PRO методом полуконтактной АСМ в воздушной среде. При этом использовали полуконтактные кремниевые зонды серии NSG01 жесткостью 5,1 Н/м, с радиусом кривизны 10 нм и резонансной частотой 150 кГц. Обработку и анализ изображений проводили с использованием программы Image Analysis.

В ходе проведенного эксперимента было изучено изменение размера клеток, показатели «анизотропии поляризуемости» и «жизнеспособность» клеток *F. tularensis* в культуре в зависимости от технологической стадии подготовки клеточной массы и лиофилизации.

ЭО мониторинг показал, что размер клеток составляет в среднем $(1,2 \pm 0,1)$ мкм. Отмечена высокая степень корреляции между показателями анизотропии поляризуемости клетки при частотах 900 кГц и 2100 кГц, отражающих состояние цитоплазмы и цитоплазматической мембраны, соответственно. Коэффициент корреляции Пирсона составил 0,98. Использование агаровой или бульонной культуры, замена питательной среды в клеточной суспензии на 0,9 % раствор хлористого натрия, добавление сред высушивания (в т.ч. экспериментальных) не оказывали значительного влияния на данный показатель.

Были определены критерии применимости ЭО мониторинга для клеток туляремийного микроба (Таблица 23). Рабочие частоты для проведения ЭО мониторинга – 900 и 2100 кГц. Рабочий диапазон показателя АП составил от 0 до 200 условных единиц. В то же время можно отметить, что клетки туляремийного микроба с высокой жизнеспособностью (≥ 70 % живых м.к.) обладали большим показателем АП, при снижении жизнеспособности клеток значение их показателя АП уменьшалось, что согласуется с литературными данными [133].

Таблица 23 – Корреляция показателей АП клеток и «жизнеспособность» культуры *F. tularensis* 15 НИИЭГ (n=3)

Диапазон АП, усл. ед.		Жизнеспособность, %	Коэффициент корреляции Пирсона
900 кГц	2100 кГц		
0-20	0-20	0-10	0,82
21-80	21-80	25-70	0,94
81-200	81-200	71-100	0,96
>201	>201	0-10	0,8

ЭО мониторинг процесса глубинного культивирования *F. tularensis* 15 НИИЭГ в питательных средах № 1 – на основе ФГФ [14] и № 2 – на основе ПГРМ [125] показал, что показатель АП в обоих случаях свидетельствовал о высокой жизнеспособности культуры, ее стандартности (таблица 24).

Таблица 24 – Электрооптический мониторинг процесса культивирования *F. tularensis* 15 НИИЭГ в разных питательных средах в колбах «качалочным методом» (n=3)

Почасовые пробы	OD ₆₅₀₋₇₀₀ nm	АП, усл.ед 2100 кГц	Средний размер клеток, мкм
Среда № 1 18ч	2,147	170,09	1,221
Среда № 1 24ч	1,67	135,57	1,101
Среда № 2 18ч	0,626	176,88	1,101
Среда № 2 24ч	0,724	167,4	1,101

Возможность учета в режиме «реального времени» по показателю «оптическая плотность» динамики накопления биомассы, наряду с данными АП и размера клеток, свидетельствуют о перспективности данного метода для экспериментальных исследований по оптимизации условий культивирования туляремийного микроба.

На следующем этапе проводили ЭО мониторинг процесса глубинного культивирования *F. tularensis* 15НИИЭГ в среде на основе ФГФ. На рисунке 13 можно заметить, что показатель АП цитоплазмы более лабилен, чем АП цитоплазматической мембраны, хотя динамика изменений обоих показателей соответствует кривой роста культуры. Спустя 6 ч АП достигает своего пика, а спустя 8 ч жизнеспособность культуры снижается, после чего снова происходит скачок (18 ч), а затем окончательное угнетение жизнеспособности. На рисунке 14, где отображена оптическая плотность среды, так же заметны изменения, но с опозданием в 2 ч. Так, плотность среды достигает своего максимума лишь к 8 часу культивирования, после чего происходит уменьшение плотности, а затем снова рост. Через 22 ч снова наступает снижение оптической плотности, достигая своего минимума к 24 ч. Таким образом, можно говорить о том, что ЭО мониторинг «предсказывает» снижение клеточной массы, связанное, скорее всего, с недостатком питательных веществ.

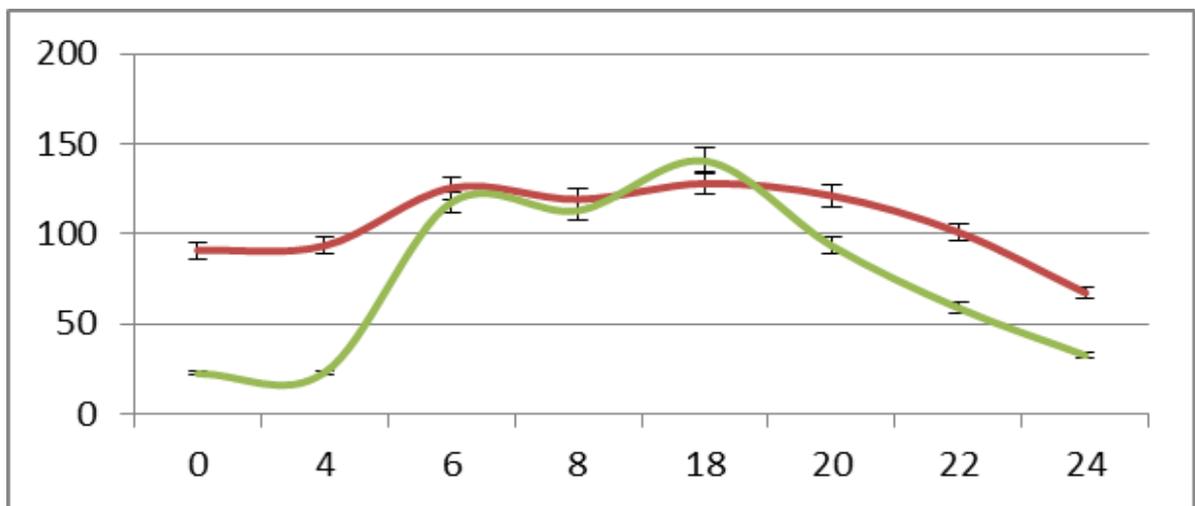


Рисунок 13 – Изменение АП клеток *F. tularensis* 15 НИИЭГ в процессе глубинного культивирования на частоте 2100 кГц (красная линия) и 900 кГц (зеленая линия).
Ось ординат – показатель АП, ось абсцисс – время, ч.

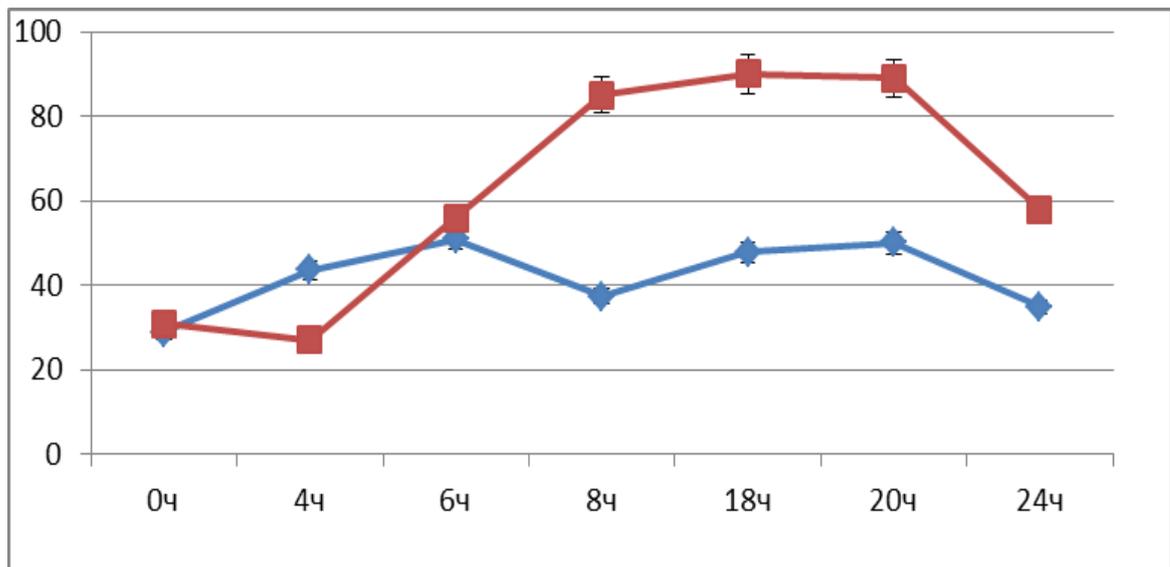


Рисунок 14 – Динамика показателей «концентрация» и «жизнеспособность» клеток вакцинного штамма в процессе глубинного культивирования
Синяя линия – оптическая плотность при 650 нм ($\times 10^{-3}$),
красная – жизнеспособность (%)

На следующем этапе исследовали влияние условий концентрирования и лиофилизации на физиологическое состояние клеток туляремийного микроба. В таблице 25 отображены анализируемые показатели культуры *F. tularensis* на основных этапах получения ЭЖТВ.

Таблица 25 – Показатели физиологического состояния клеток вакцинного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ на этапах культивирования, концентрирования и сведения со средами высушивания (n=3)

Проба	Концентрация, $\times 10^9$ м.к./мл	Жизнеспособность, %	Показатель АП		Средний размер клеток, мкм
			900 кГц	2100 кГц	
1	2	3	4	5	6
Агаровая культура	4,8 \pm 0,5	30 \pm 1	22,4	90,83	1,1 \pm 0,01
Бульонная культура (лаг-фаза)	6,2 \pm 0,5	27 \pm 1	23,07	93,39	1,3 \pm 0,03
Бульонная культура (лог-фаза)	26 \pm 1	85 \pm 1	112,95	119,17	1,9 \pm 0,04

1	2	3	4	5	6
Бульонная культура (стационарная фаза)	30±1	89±1	93,31	121,16	1,2±0,01
Бульонная культура (фаза отмирания)	20±1	58±1	32,41	67,25	1,3±0,03
Концентрат биомассы	100±1	98±1	50,34	32,46	1,2±0,01
Биомасса + среда высушивания*	25±1	89±1	57,57	35,8	1,9±0,07
Примечание: * – в качестве среды высушивания использовали экспериментальную среду высушивания с хитозаном.					

Как известно, сведение со средой высушивания биомассы микроорганизмов нужно для предотвращения разрушения клеток при замораживании, лиофилизации и длительном хранении за счет стабилизации конформационного состояния белковых молекул [162]. В то же время, показатели АП в концентрированной и сведенной со средой высушивания биомассе уменьшались, несмотря на высокую жизнеспособность клеток. Это может быть связано со снижением поляризуемости бактериальной клетки при увеличении ионной силы раствора (соли в концентратах и в средах высушивания), что согласуется с литературными данными [172].

Изменение размера клеток *F. tularensis* изучали также методом АСМ. Результаты морфометрического анализа клеток методом АСМ представлены в таблице 26 и на рисунке 15. Размер клеток составлял в среднем (1,0±0,1) мкм для всех исследованных образцов, что согласуется с данными ЭО мониторинга. Расхождение в линейных размерах (16-20%) связано с пробоподготовкой при проведении АСМ – измерения проводятся на высушенных препаратах. Кроме того, анализ образца биомассы после добавления среды высушивания провести не удалось в связи с вязкостью образца. После лиофилизации лабораторные серии экспериментальной вакцины также были проанализированы методом АСМ. В последнем случае образцы разводили водой для инъекций до концентрации 5×10^9 м.к./мл.

Таблица 26 – Результаты морфометрического анализа клеток *F. tularensis* 15 НИИЭГ методом АСМ (n=3)

Обра- ра- зец	Характеристика образца	Длина клеток L, мкм	Шерохова- тость по- верхности клеток, нм	Ригидность клеточной стенки W/H	Коэффици- ент вытяну- тости L/W
1.	Агаровая культура	0,91±0,07	14±2	5,19±0,8	1,73±0,1
2.	Бульонная культура	0,89±0,08	12±1	8,02±0,6	1,91±0,1
3.	Концентрат биомассы	1,04±0,08	15±2	8,62±1,9	1,49±0,2
4.	Лабораторная се- рия ЭЖТВ 01/Э	1,07±0,07	15±1	4,74±0,4	1,32±0,1
5.	Лабораторная се- рия ЭЖТВ 03/Э	0,98±0,1	18±2	4,56±0,5	1,36±0,1

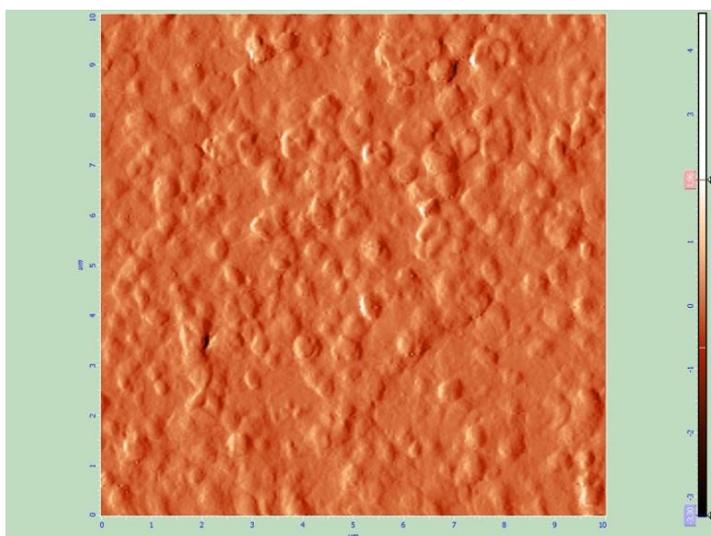


Рисунок 15 – Результаты АСМ образца лабораторной серии 03/Э ЭЖТВ, метод рассогласования

Интерес представляли также показатели ригидности и шероховатости клеточной стенки, по которым экспериментальные образцы вакцины были сопоставимы со значениями, полученными для нелиофилизированных образцов, что свидетельствует об отсутствии повреждающего действия на бактериальные клетки экспериментальной среды высушивания и используемых технологических параметров процесса сушки.

В ходе эксперимента было показано, что метод ЭО анализа раньше детектирует изменения жизненных показателей культуры клеток в процессе выращивания, чем показатели концентрации биомассы, а динамика показателя АП соответствует

изменению показателя «жизнеспособность». В частности, снижение жизнеспособности клеток *F. tularensis* происходило гораздо раньше, чем снижение оптической плотности среды. Кроме того, время, затраченное на проведение микробиологического анализа, составляет 5-6 сут, АСМ – 2-4 ч, ЭО мониторинга – 30-60 мин.

Таким образом, ЭО анализ успешно регистрирует различные изменения жизненных показателей клеток микроорганизма в режиме реального времени на этапах культивирования, подготовки биомассы и получения лиофилизата. Проведенные исследования показали перспективность использования методов, как альтернативных, ЭО мониторинга и АСМ для оценки состояния клеток вакцинного штамма туляремийного микроба.

5.2 Иммунохимические и молекулярно-генетические методы контроля культуры вакцинного штамма

Показатель «подлинность» является одним из основных показателей качества препарата. В соответствии с ОФС.1.7.1.0018.18 [87] подлинность «подтверждают различными лабораторными методами, позволяющими специфически идентифицировать лекарственный препарат: биологическими, иммунобиологическими, молекулярными, химическими или физико-химическими». Показатель «подлинность» ЖТВ определяется, согласно ФС.3.3.1.0019.15 [116], методом флуоресцирующих антител (МФА). Данный метод основан на окраске клеток туляремийного микроба специфическими иммуноглобулинами, мечеными флуоресцентным красителем. Учет результатов проводится визуально. В настоящее время в России зарегистрировано два иммуноглобулиновых препарата для постановки МФА: 1) набор реагентов «Иммуноглобулины диагностические флуоресцирующие туляремийные сухие» (ФСР 2010/08923 производства филиал «Медгамал» ФГБУ «НИИЭМ им. Н.Ф.Гамалеи» Минздрава России, Москва); 2) иммуноглобулины диагностические флуоресцирующие туляремийные сухие («РИФ-Тул-СтавНИПЧИ» (РЗН 2019/8209 производства ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора, Ставрополь). При анализе образцов ЖТВ МФА Касиной И.В. с соавт. [40] было отмечено, что образование конгломератов микробных клеток «...затрудняет учет результатов». В связи с этим возникла необходимость проведе-

ния исследований по поиску альтернативных подходов для определения показателя «подлинность» вакцинного штамма на этапах получения и в готовом препарате.

Мы рассматривали два подхода, основанных на иммунохимических и молекулярно-генетических методах.

Для проведения молекулярно-генетического анализа подлинности туляремийного микроба использовали ПЦР с электрофоретическим учетом результатов с коммерческим набором реагентов для выделения ДНК и для постановки ПЦР. Для исследования была взята культура *F. tularensis* 15 НИИЭГ с разных этапов получения ЭЖТВ: агаровая и бульонная культура, концентрат биомассы, образцы лабораторных серий ЭЖТВ. Все исследуемые образцы разводили 0,9 % раствором хлористого натрия до концентрации 10^{10} м.к./мл, контроль осуществляли на денситометре при длине волны 600 нм.

Постановку ПЦР с электрофоретическим учетом проводили с помощью «Набора реагентов для выявления ДНК *Francisella tularensis* методом полимеразной цепной реакции с электрофоретическим учетом результатов (Ген *Francisella tularensis* – РЭФ)» согласно инструкции по применению. Выделение ДНК осуществляли с помощью «Комплекта реагентов для выделения ДНК из клинического материала «ДНК-сорб-В».

В результате было установлено, что исследуемые образцы имели положительный результат ПЦР (Рисунок 16), что свидетельствует о подлинности культуры туляремийного микроба и ее стабильности на всех стадиях получения ЭЖТВ.

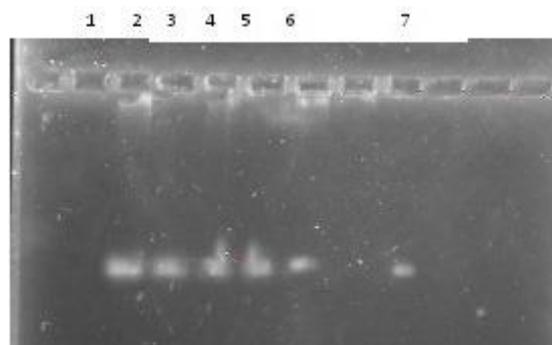


Рисунок 16 – Результаты ПЦР с набором реагентов «Ген *Francisella tularensis* – РЭФ» образцов клеток *F. tularensis* 15 НИИЭГ на стадиях получения ЭЖТВ
1 – отрицательный контроль; 2, 3, 4 – образцы лабораторных серий ЭЖТВ;
5 – бульонная культура *F.tularensis* 15 НИИЭГ; 6 – агаровая культура *F.tularensis* 15 НИИЭГ; 7 – положительный контроль

В качестве иммунохимических методов были апробированы следующие:

1. с использованием диагностических препаратов для детекции туляреимийного микроба, которые выпускаются и зарегистрированы на территории Российской Федерации: ИХ-тест и набор для постановки РНГА: «ИХ тест-система *F.tularensis*» и «РНГА-Тул-Иг-СтавНИПЧИ».

2. с использованием экспериментальных иммуноглобулинов к антигенам туляреимийного микроба: твердофазный ИФА и иммуноблоттинг с коммерческими антивидовыми антителами, мечеными пероксидазой хрена; дот-иммуноанализ с белком А, конъюгированным с золотыми наночастицами (ДИА-ЗНЧ).

Ранее специалистами ФГБУ НЦЭСМП была показана возможность применения «ИХ тест-система *F.tularensis*» для оценки качества ЖТВ по показателю «подлинность» [40]. Специфической мишенью в данном тесте является липополисахарид туляреимийного микроба. В нашей работе с помощью набора «ИХ тест-система *F.tularensis*» были исследованы образцы лабораторных серий вакцины.

Согласно литературным данным [40], предварительное культивирование для образцов ЖТВ не требовалось, а рабочая концентрация составила 10^8 м.к./мл.

В нашей работе пробоподготовку проводили следующим образом. Исследуемые образцы разводили в 0,01М растворе ФСБ (фосфатно-солевой буфер), pH 7,4. Вся работа проводилась в боксе безопасности. Для анализа в ИХ-тесте использовали концентрацию экспериментальной туляреимийной вакцины 10^8 м.к./мл. В результате все исследованные образцы имели положительную реакцию в ИХ-тесте (Рисунок 17). Время постановки реакции составило около 30 мин.

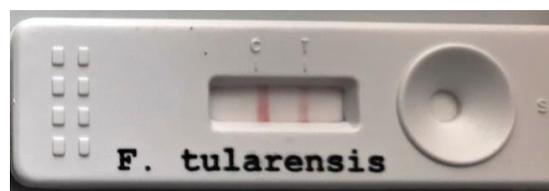


Рисунок 17 – Результаты ИХ-теста лабораторной серии вакцины с.03/Э с набором реагентов иммунохроматографической тест-системы для экспресс-выявления и идентификации возбудителя туляремии «ИХ тест-система *F.tularensis*»

РНГА проводили с помощью набора реагентов «РНГА-Тул-Иг-СтавНИПЧИ» макро и микрометодом. Постановку реакции осуществляли согласно инструкции по применению». Положительный контроль – взвесь убитой культуры *F.tularensis*

15 НИИЭГ, прилагаемая в наборе, в концентрации $5,0 \times 10^7$ м.к./мл, отрицательный контроль – разводящая жидкость (раствор твин-80 в разведении 1:50000). Диагностикум эритроцитарный иммуноглобулиновый жидкий использовали в концентрации 2,5 % для макрометода и 0,9 % для микрометода. Учет результатов реакции проводили визуально через $(2,5 \pm 0,5)$ ч для микрометода и (23 ± 1) ч для макрометода. Было установлено, что во всех образцах отмечена специфическая положительная реакция. Отмечен высокий уровень специфической активности в образцах лабораторных серий вакцины. Вариант РНГА микрометодом оказался предпочтительнее макрометода в связи с большей экспрессностью, меньшим расходом материала и наглядностью. На рисунке 18 представлен вариант РНГА микрометодом.

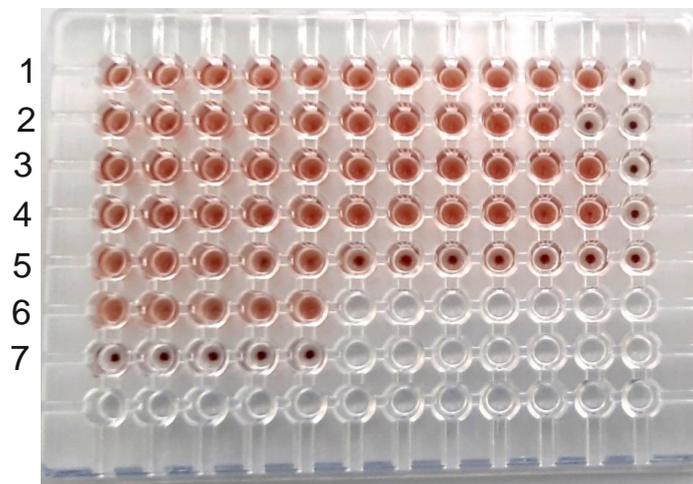


Рисунок 18 – Результаты РНГА образцов культуры *F.tularensis* 15 НИИЭГ на стадиях получения ЭЖТВ

Ряды сверху вниз:

- 1, 2, 3 – образцы лабораторных серий ЖТВ;
 - 4 – концентрат бульонной культуры *F.tularensis* 15 НИИЭГ
 - 5 – бульонная культура *F.tularensis* 15 НИИЭГ;
 - 6 – положительный контроль; 7 – отрицательный контроль
- Титрация в рядах 1-5 с 10^9 м.к./мл с шагом 2

При постановке ИФА и ДИА-ЗНЧ в качестве специфических антител использовали экспериментальные кроличьи иммуноглобулины к протективному антигенному комплексу туляреминого микроба, любезно предоставленные сотрудниками отдела профилактических препаратов института «Микроб». Ранее было показано, что этот иммуноглобулин может эффективно использоваться для детекции туляреминого микроба, отличается высокой чувствительностью и специфичностью [13,25,53].

Рабочее разведение экспериментального кроличьего иммуноглобулина к ПАК при постановке ИФА составляло 1:1000. Анализируемые образцы титровали двукратно с начальной концентрации 10^9 м.к./мл. Для визуализации реакции использовали антикроличьи антитела, меченые пероксидазой, рабочее разведение 1:10000. В качестве субстрата использовали АВТС. Учет результатов реакции проводили с помощью планшетного фотометра I-Mark при длине волны 405 нм. В качестве положительного контроля использовали взвесь убитой культуры *F.tularensis* 15 НИИЭГ в концентрации $5,0 \times 10^7$ м.к./мл (положительный контроль из набора для постановки РНГА). Проводили контроль разводящей жидкости (отрицательный контроль).

На рисунке 19 представлены результаты ИФА образцов вакцинного штамма туляремийного микроба: лабораторных серий вакцины, бульонной культуры и концентрата биомассы.

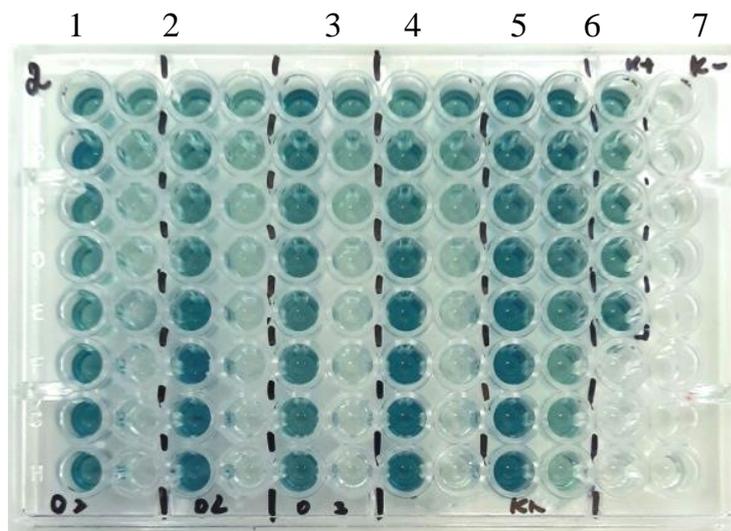


Рисунок 19 – Результаты ИФА образцов *F.tularensis* 15 НИИЭГ на стадиях получения ЭЖТВ

- 1, 2, 3 – образцы лабораторных серий ЭЖТВ;
 - 4 – бульонная культура *F.tularensis* 15 НИИЭГ;
 - 5 – концентрат бульонной культуры *F.tularensis* 15 НИИЭГ;
 - 6 – положительный контроль;
 - 7 – отрицательный контроль
- Титрация в 2-х рядах сверху вниз с 10^9 м.к./мл с шагом 2

Было установлено, что все исследованные образцы обладали высокой активностью – культура *F.tularensis* 15 НИИЭГ выявлялась в концентрации 10^6 - 5×10^5 м.к./мл для лиофилизатов лабораторных серий, до 3×10^4 м.к./мл для концентратов биомассы. Преимуществами данного метода является возможность ана-

лиза нескольких проб одновременно и инструментальный учет результатов, который дает возможность количественного определения специфической активности биомассы по уровню протективного антигенного комплекса.

В качестве варианта твердофазного ИФА использовали дот-иммуноанализ с иммуноглобулином к ПАК в рабочем разведении 1:100. Для визуализации реакции применяли белок А (Sigma), конъюгированный с золотыми наночастицами. Конъюгат белка А с коллоидным золотом был получен и любезно предоставлен к.м.н. Киреевым М.Н. Постановку реакции проводили по общепринятой методике на нитроцеллюлозной мембране с размером пор 0,22 мкм. В качестве положительного контроля использовали взвесь убитой культуры *F.tularensis* 15 НИИЭГ в концентрации $5,0 \times 10^7$ м.к./мл (положительный контроль из набора для постановки РНГА). Проводили контроль разводящей жидкости (отрицательный контроль). Образцы наносили в объеме 1 мкл, титрация образцов с начальной концентрации 10^9 м.к./мл с шагом 10. Учет результатов проводили визуально. Результаты реакции ДИА-ЗНЧ представлены на рисунке 20.

Была отмечена положительная реакция у всех образцов в концентрации 10^8 - 10^7 м.к./мл, что сопоставимо с результатами ИХ-теста. ДИА-ЗНЧ также характеризуется простотой постановки и экспрессностью. В отличие от ИХ-теста, при постановке ДИА возможна одновременная обработка нескольких образцов, а требуемый объем анализируемых образцов в 100 раз меньше (1 мкл для ДИА и 0,1 мл для ИХ-теста).

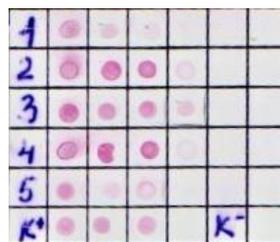


Рисунок 20 – Результаты ДИА-ЗНЧ

1,2, 3 – образцы лабораторных серий ЭЖТВ;

4 – концентрат бульонной культуры *F.tularensis* 15 НИИЭГ;

5 – бульонная культура *F.tularensis* 15 НИИЭГ;

K⁺ – положительный контроль;

последний столбик – отрицательный контроль

Согласно ОФС.1.7.2.0022.15 [88], метод иммуноблоттинга используется для оценки подлинности и чистоты иммунобиологических лекарственных препаратов

на основе высокоочищенных белков, в том числе, полученных по технологии рекомбинантной ДНК. В этом случае при проведении реакции используют антитела к рекомбинантным белкам.

Нами было сделано предположение, что использование гипериммунных специфических сывороток к маркерным антигенам туляремийного микроба позволит применять метод иммуноблоттинга (в варианте «вестерн-блот») для «классических» живых вакцин на основе аттенуированных штаммов. Ранее Кузнецовой Е.М. с соавт. было показано, что в состав протективного антигенного комплекса входят иммуногенные белки туляремийного микроба [54], а метод иммуноблоттинга с иммуноглобулинами к ПАК может использоваться для идентификации туляремийного микроба по маркерным антигенам [55].

Нами был также апробирован метод иммуноблоттинга образцов лабораторных серий ЖТВ. В качестве специфических антител использовали экспериментальные кроличьи иммуноглобулины к ПАК. Иммуноблоттинг проводили по методу Towbin H. [168] с предварительным разделением образцов методом SDS-PAGE по Laemmli U.K. [152] в 12%-ном разделительном геле. В качестве специфических антител использовали экспериментальные кроличьи иммуноглобулины к ПАК (рабочее разведение 1:100). Для проявления нитроцеллюлозных реплик использовались конъюгаты антикроличьих иммуноглобулинов, меченные пероксидазой. Субстратом являлся О-дианизидин.

Результат иммуноблоттинга представлен на рисунке 21.

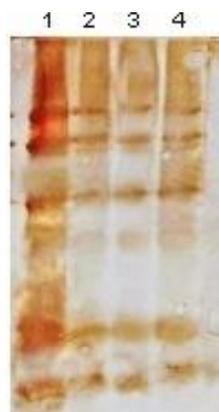


Рисунок 21 – Результаты иммуноблоттинга образцов лабораторных серий ЭЖТВ
Дорожки: 1 – клетки *F.tularensis* 15 НИИЭГ;
2, 3, 4 – серии ЭЖТВ 01,02,03 соответственно

Анализ рисунка 21 показывает, что во всех образцах лабораторных серий было отмечено наличие основных иммуногенных белков протективного антиген-

ного комплекса. Профиль образцов лабораторных серий соответствовал иммуноблоттингу клеток вакцинного штамма с иммуноглобулином к ПАК. Полученные результаты свидетельствуют об идентичности использованных образцов, а также об их специфической активности, что делает данный методический подход перспективным для контроля живых вакцин, в т.ч. «классических» аттенуированных.

В результате проведенных исследований было показано, что для определения показателя «подлинность» в образцах ЭЖТВ и на стадиях ее получения информативны все апробированные методы. С учетом простоты постановки и экспрессности метод ДИА-ЗНЧ является наиболее удобным для контроля подлинности вакцинного штамма *F.tularensis* 15 НИИЭГ на этапах получения вакцины, в комплексе с методом ПЦР ДИА-ЗНЧ может использоваться для контроля готовой лекарственной формы. Метод иммуноблота оптимален для паспортизации СОП и/или ОСО ЖТВ.

Заключение по главе

Проведенные нами исследования показали перспективность применения метода ЭО мониторинга для изучения особенностей физиологического состояния культуры клеток на разных стадиях роста бактериальной популяции в целом, для определения взаимодействия микроорганизмов с различными изменениями условий: отмывание, концентрирование, сведение со средами высушивания, длительное хранение. Разработка алгоритма проведения ЭО мониторинга клеток штаммов-продуцентов вакцинных препаратов против опасных инфекционных заболеваний на модели туляремийного микроба является перспективной задачей дальнейшего исследования в данном направлении.

Комплексный подход к использованию новых методов в сочетании со стандартными микробиологическими методическими приемами позволит упростить и ускорить этапы контроля состояния бактериальной культуры при внедрении новых технологических приемов культивирования, концентрирования и лиофилизации вакцинных штаммов.

**ГЛАВА 6 ИЗУЧЕНИЕ СВОЙСТВ ГОТОВОЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ
ФОРМЫ ЖИВОЙ ТУЛЯРЕМИЙНОЙ ВАКЦИНЫ, ПОЛУЧЕННОЙ ПО
ЛАБОРАТОРНОЙ ТЕХНОЛОГИИ И СОПОСТАВЛЕНИЕ
ТЕХНОЛОГИЧЕСКОЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНО
ОБОСНОВАННЫХ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ЭТАПОВ ПОЛУЧЕНИЯ
ЖИВОЙ ТУЛЯРЕМИЙНОЙ ВАКЦИНЫ
В СРАВНЕНИИ С ДЕЙСТВУЮЩЕЙ ТЕХНОЛОГИЕЙ**

С целью перехода на этап доклинических испытаний, по разработанным методическим приемам: глубинное аппаратное культивирование *F. tularensis* 15 НИИЭГ в модифицированной питательной среде на основе гидролизата фибрина, концентрирование биомассы тангенциальной ультрафильтрацией, лиофилизация препарата со новым биофармацевтическим составом были произведены 3 лабораторные серии ЭЖТВ (01/Э, 02/Э, 03/Э) и исследованы их свойства.

**6.1 Физико-химические и микробиологические свойства
лабораторных серий живой туляреминой вакцины с новым
биофармацевтическим составом**

На первом этапе был проведен анализ физико-химических свойств, определена специфическая активность, отсутствие посторонних микроорганизмов и грибов и термостабильность. Значения показателей качества ЭЖТВ проводили согласно ФС.3.3.1.0019.15 [116]. Полученные данные представлены в таблице 27.

Таблица 27 – Характеристика лабораторных серий сухой ЖТВ, произведенных по усовершенствованной технологии

Показатели	Значение показателя по ФС.3.3.1.0019.15	Значение показателя по сериям		
		01/Э	02/Э	03/Э
1	2	3	4	5
Описание	Пористая масса белого с желтоватым оттенком цвета. Восстановленный препарат – гомогенная мутная суспензия белого с желтоватым оттенком цвета без посторонних примесей, осадка или хлопьев	соответствует		

1	2	3	4	5
Время растворения	Должна полностью растворяться в течение 3 мин при добавлении 1 мл воды для инъекций при встряхивании	0,5		
Время седиментационной устойчивости	Суспензия не должна расслаиваться в течение 5 мин	более 60		
Проходимость через иглу	Суспензия должна свободно проходить в шприц через иглу № 0840	соответствует		
pH	От 6,8 до 7,2	7,2	7,0	7,1
Потеря в массе при высушивании	Не более 4,0 %	0,8	1,1	1,0
Средняя масса и отклонение от средней массы	Коэффициент вариации массы вакцины должен быть не более 5 %	1,3	1,1	1,7
Отсутствие посторонних микроорганизмов и грибов	Вакцина не должна содержать посторонних микроорганизмов и грибов. Препарат должен представлять чистую живую культуру вакцинного штамма туляремийного микроба	отсутствуют		
Специфическая активность				
1. Концентрация микробных клеток	В препарате должно содержаться $(2\pm 1)\times 10^{10}$ м.к. в 1 мл	$1,2\times 10^{10}$	$1,4\times 10^{10}$	$1,4\times 10^{10}$
2. Количество живых микробных клеток	Количество живых микробных клеток должно составлять не менее 40 % от общего количества микробных клеток	68	61	56
3. Степень диссоциации	Число SR иммуногенных «белых» колоний должно составлять не менее 80 % от общего количества выросших колоний	93	96	91
4. Количество накожных доз	Должно содержаться от 15 до 50 накожных доз	41	43	39

1	2	3	4	5
5. Прививаемость	При накожной иммунизации морских свинок дозой 2×10^7 живых м.к. в объеме 0,1 мл у всех животных через 2-5 сут вокруг насечек должны образоваться инфильтрат и гиперемия диаметром от 5 до 15 мм	6	7	7
6. Иммуногенность	Не менее 8 из 10 морских свинок, привитых накожно дозой 2×10^7 живых м.к. в объеме 0,1 мл, должны быть предохранены от гибели при подкожном заражении 1000 Dcl вирулентного штамма туляремийных бактерий голарктической расы, 1 Dcl которого не должна превышать 5 м.к.	10	10	10
Термостабильность	Не менее 7 сут	11	12	11

Анализ данных таблицы 27 показывает, что все серии препарата полностью соответствует требованиям ФС.3.3.1.0019.15 [116], что свидетельствует об эффективности разработанных биотехнологических приемов.

6.2 Иммунобиологические свойства лабораторных серий живой сухой туляремийной вакцины

Дальнейшим этапом работы было изучение свойств лабораторных серий вакцины, полученных в соответствии с новыми технологическими приемами. Проводились исследования следующих показателей препаратов: иммуногенность, реактогенность и остаточная вирулентность с использованием биомоделей, а также специфическая безопасность и прививаемость.

На первом этапе оценивали реактогенность лабораторных серий вакцины по показателю «острая» токсичность на модели беспородных белых мышей. Для этого животных обоего пола вакцинировали однократно подкожно в дозе 5×10^2 м.к., проводили ежедневный осмотр и взвешивание животных. В таблице 28 представлены

усреднённые данные по группам вакцинированных мышей за 10 дней наблюдений. В каждой группе использовали 5 мышей.

Было установлено, что экспериментальный препарат не вызывает гибели животных. Незначительное снижение массы тела на $(8,5 \pm 1,5)$ % наблюдалось на 5-7 сут с последующей нормализацией к 10 сут. Динамика массы тела биомоделей, вакцинированных лабораторными сериями была аналогичной контрольной группе животных, вакцинированных коммерческой вакциной.

Таблица 28 – Динамика массы тела белых мышей, вакцинированных ЖТВ, г (n=3)

Препарат	До вакцинации	Сроки после вакцинации, сут			
		3	5	7	10
Контроль	23,66±1,83	26,07± 1,44	23,88±0,96	22,11±0,59	23,45±1,11
Серия 01/Э	23,02±2,02	26,22±1,31	24,78±1,43	24,32±1,1	25,94±1,29
Серия 02/Э	23,57±2,31	26,46±2,02	24,03±1,95	22,93±1,52	23,43±2,03
Серия 03/Э	23,18±2,48	26,08±,9	24,45±2,02	23,62±2,78	24,82±2,71

Остаточная вирулентность серий вакцины изучалась на белых мышках BALB/c обоего пола (масса 18-20 г). Использование белых мышей для определения остаточной вирулентности связано с их высокой чувствительностью даже к штаммам с ослабленной вирулентностью. По 6 белых мышей иммунизировали подкожно 2-х суточной культурой вакцины после лиофилизации во флаконах по усовершенствованной технологии дозами от 5×10^3 до 5×10^6 м.к. в объеме 0,2 мл. Для подсчета LD_{50} и расчёта вводимых доз проводили высев культур из разведения 10^{-4} м.к. по 0,1 мл на три чашки с FT-агаром. Гибель мышей учитывали в течение 21 сут после введения культуры. Животных, павших до 10 сут, вскрывали, обращали внимание на паталого-анатомическую картину и производили посев органов методом отпечатков на FT-агар с последующей идентификацией культуры. Посевы инкубировали при температуре (37 ± 1) °С в течение 5 сут. Вычисление величин LD_{50} производили по методу Kerber в модификации И.П. Ашмарина и А.А. Воробьева [7].

Для определения персистенции бактерий *F. tularensis* 15 НИИЭГ в организме белых мышей, животных иммунизировали подкожно 2-х суточной культурой лиофилизатов лабораторных серий вакцины в количестве 0,2 мл в дозах 100 м.к. Для расчёта вводимых доз проводили высев культур по 0,1 мл на три чашки Петри с FT-агаром. Посевы инкубировали при температуре (37 ± 1) °С в течение 5 сут. На 7-е, 14-е и 21-е сут после иммунизации проводили эвтаназию животных, селезенки

гомогенизировали и суспендировали в 5 мл стерильного 0,9 % раствора натрия хлорида. Из полученных взвесей готовили ряд десятикратных разведений и производили высевы на FT-агар. Подсчет колоний осуществляли через 72 ч до 5 сут инкубации посевов при температуре (37 ± 1) °С.

Также у иммунизированных белых мышей в те же сроки проводили забор крови для определения титра специфических антител. Для этих целей из крови получали сыворотку, которую исследовали методом непрямого ИФА. Сенситивом служил ПАК из вакцинного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ в концентрации 10 мкг/мл, в качестве конъюгата использовали антитела против иммуноглобулинов мыши, меченные пероксидазой, субстратный раствор – АВТС. Учет и оценку результатов ИФА проводили с использованием планшетного фотометра I-Mark, рабочая длина волны 405 нм.

Определение протективной активности лабораторных серий вакцины проводили на белых мышах BALB/c обоего пола (масса 18-20 г), поскольку мышинная модель экспериментальной туляремии в настоящее время широко используется при проведении иммунологических исследований [44,75,114]. Животных иммунизировали подкожно 2-х суточной культурой лиофилизатов серий ЭЖТВ в количестве 0,2 мл в дозах 100 м.к. (по 10 белых мышей в группе). Для расчёта вводимых доз проводили высевы на FT-агар. Посевы инкубировали при температуре (37 ± 1) °С в течение 5 сут. Через 30 сут после иммунизации мышам подкожно вводили 10^3 м.к. (1Dcl=1 м.к.) тест-заражающего штамма *F. tularensis* 503/840. Наблюдение за животными вели в течение 21 сут. Павших животных вскрывали, обращали внимание на типичную паталого-анатомическую картину и производили посев органов методом отпечатков на FT-агар с последующей идентификацией культуры. Посевы инкубировали при температуре (37 ± 1) °С в течение 5 сут.

На первом этапе работы использовали культуры туляремийного микроба лабораторных серий вакцины сразу после лиофилизации и спустя год после хранения в лиофилизированном состоянии при температуре от 2 до 8 °С для определения остаточной вирулентности на белых мышах BALB/c обоего пола (таблица 29). В качестве контроля был использован исходный штамм *F. tularensis* 15 НИИЭГ, который использовали для производства экспериментальной вакцины. Проведенными исследованиями установлено, что все культуры вакцинного штамма имели

остаточную вирулентность в пределах от $5,1 \times 10^3$ до $1,5 \times 10^5$ м.к. (норма 1×10^2 - 2×10^6 м.к.).

Таблица 29 – Остаточная вирулентность вакцинного штамма для белых мышей (n=3)

Субкультура <i>F. tularensis</i> 15 НИИЭГ		LD ₅₀ после лиофилизации (м.к.)	LD ₅₀ после 1 года хранения (м.к.)
Исходная культура		21815	н/о
Серии вакцины	01/Э	24796	24670
	02/Э	23897	27544
	03/Э	24260	24486
Примечание. н/о – не определяли.			

Группы мышей (10 мышей в группе) были проиммунизированы лабораторными сериями вакцины. По мере развития иммунного процесса из экспериментальной группы забирали по три особи, в селезенках которых определяли количество живых клеток туляремийного микроба, как показано на рисунке 22.

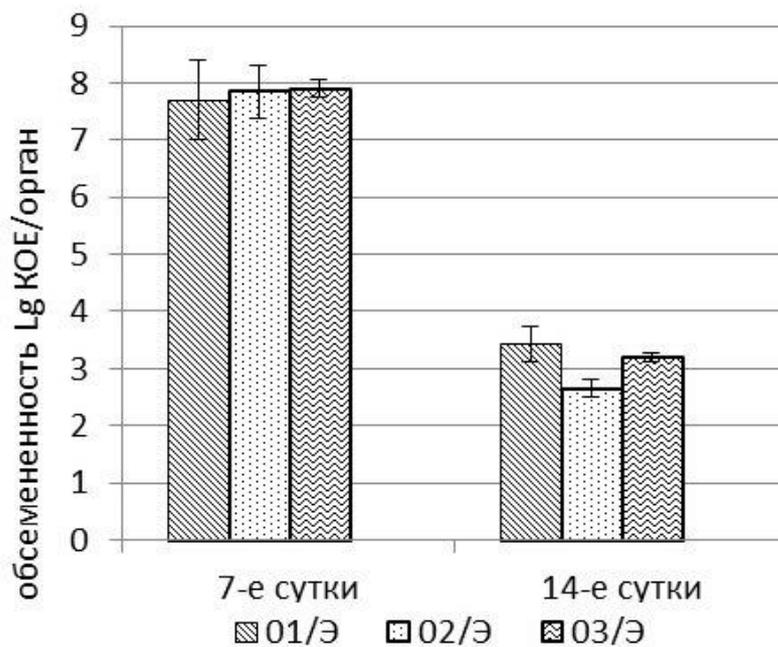


Рисунок 22 – Изменение обсемененности селезенки мышей линии BALB/c после иммунизации лабораторными сериями ЭЖТВ

У белых мышей максимальная обсемененность селезенки наблюдалась на 7-е сут во всех четырех группах без достоверных отличий. На 14-е сут наблюдалось резкое снижение обсемененности в 2 раза, а на 21-е сут после иммунизации лабораторными сериями вакцины бактерии *F. tularensis* уже не обнаруживали (количество бактерий меньше 25 КОЕ в селезенке).

У вакцинированных мышей была определена динамика нарастания концентрации антител к антигенам *F. tularensis*. Сыворотки были получены в период с 7 по 21 сут после начала эксперимента и объединены по группам. Реципрокные титры антител в объединенных сыворотках различных групп мышей приведены на рисунке 23. Титры антител после иммунизации лабораторными сериями вакцины достигали наибольших значений 1/600 только на 21-е сут.

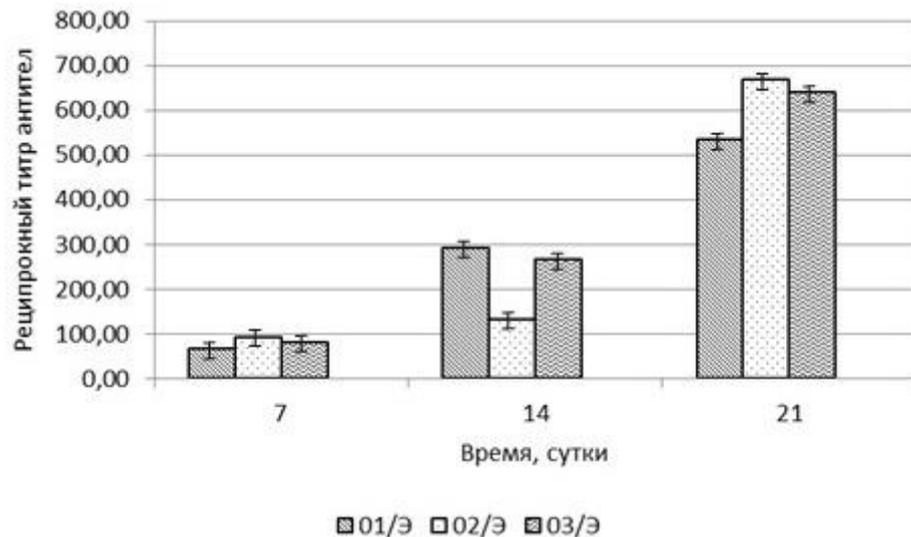


Рисунок 23 – Влияние препарата вакцины на динамику уровня индукции специфических антител у вакцинированных мышей

Протективную активность лабораторных серий вакцины определяли на мышах линии BALB/c на 30-е сутки после иммунизации (таблица 30). Положительный контроль – животные, вакцинированные препаратом ЖТВ серии 019 производства НПО «Микроген» (г. Омск), отрицательный контроль – интактные животные. Данные, приведенные в таблице 30, свидетельствуют о высокой протективной активности всех лабораторных серий вакцины. Следует отметить, что протективная активность серий вакцины была сопоставима в сравнении с зарегистрированной ЖТВ.

О специфической безопасности вакцины судили по 100 %-ной выживаемости морских свинок в течение всего срока наблюдения после введения 0,2 мл вакцины в концентрации 5×10^9 м.к. Осмотр места введения показал незначительную гиперемию на 2-3 сут (допустимая местная реакция), которая не регистрировалась к 7 сут. Гибели животных во всех исследуемых группах не происходило.

Таблица 30 – Иммуногенность лабораторных серий живой туляремийной вакцины для мышей линии BALB’с при экспериментальной туляремии (n=10)

Серия препарата	Иммунизирующая доза, м.к.	Заражающая доза, м.к.	% выживших	Средняя продолжительность жизни, сут
01/Э	1×10^2	1×10^3	100	>21,0
02/Э	1×10^2		100	>21,0
03/Э	1×10^2		100	>21,0
Положительный контроль	1×10^2		60	11,9
Отрицательный контроль	0		0	6,4

При накожной вакцинации морских свинок дозой 2×10^7 живых м.к. через 2-5 сут на коже у животных наблюдалась реакция в виде инфильтрата и гиперемии диаметром от 5 до 10 мм вокруг насечки, что свидетельствовало о «прививаемости» вакцины. При последующем подкожном заражении через 29 сут накожно вакцинированных морских свинок тест-заражающим штаммом *F. tularensis* 503/840 в дозе 5000 м.к. (1Dcl = 5 м.к.) все животные выжили (срок наблюдения 30 сут), тогда как группа контрольных (не вакцинированных) животных пала на 11 сут. Проводили вскрытие павших и выживших животных с высевом методом отпечатков на FT-агар. Патологоанатомическая картина павших животных была характерной для туляремийной инфекции (плотный инфильтрат в месте введения, гиперемия сосудов подкожной клетчатки и паховых лимфатических узлов, увеличение и уплотнение печени и селезенки). В посевах от павших животных был отмечен рост туляремийного микроба, в посевах от выживших специфического роста не регистрировали.

Таким образом, проведенный анализ свойств сухой ЖТВ лабораторных серий, полученных с применением современных биотехнологических приемов, показал соответствие изученных образцов требованиям, предъявляемым нормативным документом на иммунобиологический лекарственный препарат [116].

6.3 Сопоставление технологической эффективности экспериментально обоснованных биотехнологических этапов получения живой туляремийной вакцины в сравнении с действующей технологией

С учетом проведенных исследований предложена следующая технологическая схема производства ЖТВ (рисунок 24а). Для сравнения технологическая схема действующего производства ЖТВ представлена на рисунке 24б.

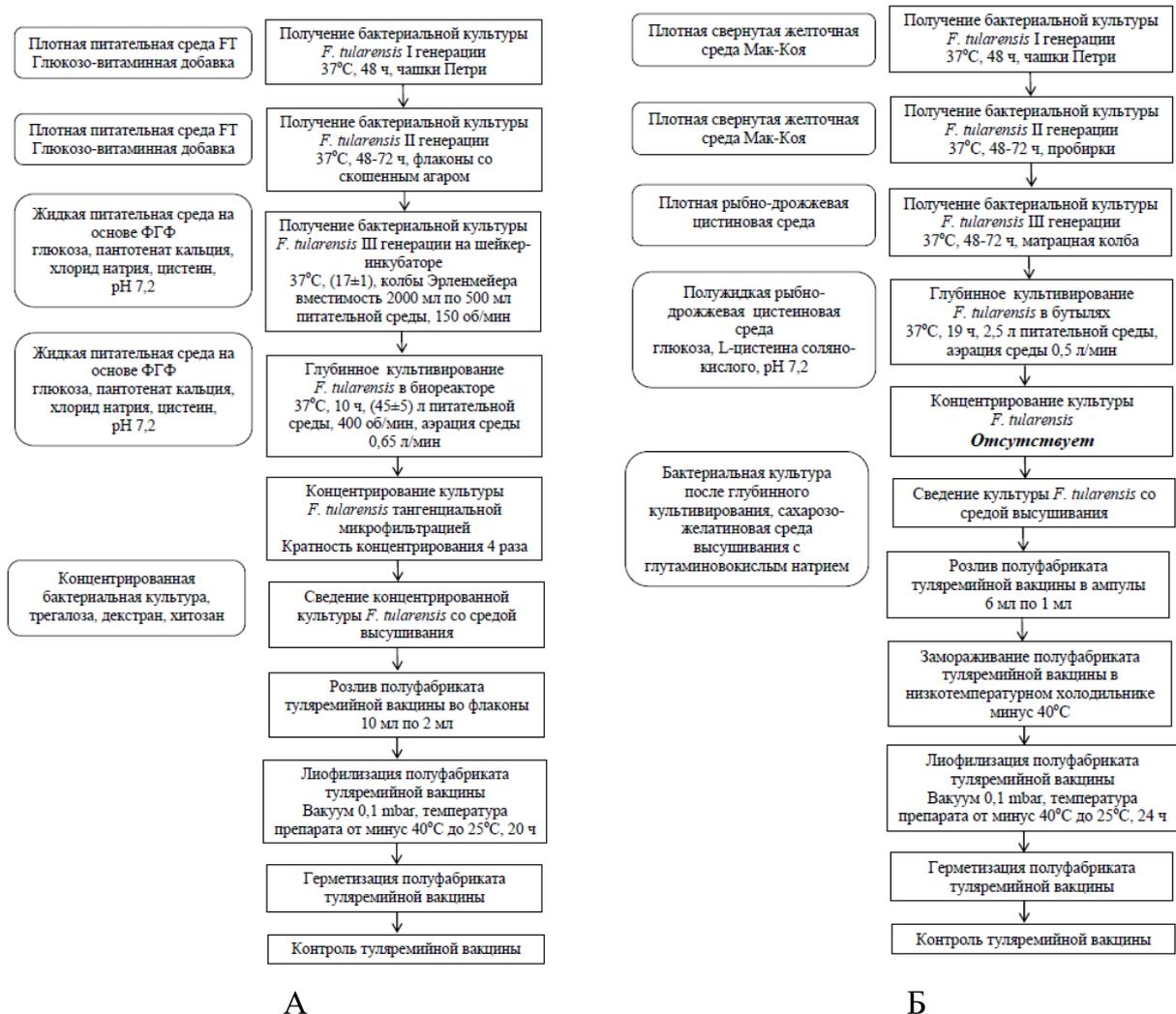


Рисунок 24 – Технологическая схема лабораторного (А) и действующего (Б) производств ЖТВ

Сопоставление технологической эффективности экспериментально обоснованных биотехнологических этапов получения ЖТВ в сравнении с действующей технологией выявило следующее.

Этапы получения бактериальной культуры *F. tularensis* I и II генерации существенных изменений не претерпели. В связи с этим говорить о преимуществах или недостатках не представляется целесообразным.

Получение бактериальной культуры *F. tularensis* III генерации по действующей технологии производится в матрасных колбах на плотной рыбно-дрожжевой цистиновой среде в течение 48 ч. Смытую культуру с каждой матрасной колбы собирают в отдельный флакон емкостью 100 мл. По 2 флакона используют для посева в бутылки емкостью 5 л, в каждой из которых находится стерильная полужидкая рыбно-дрожжевая цистеиновая среда в объеме 2,6 л таким образом, чтобы концентрация микробных клеток в 1 мл микробной взвеси перед выращиванием была равна $(5 \pm 1,5) \times 10^9$ м.к./мл. По экспериментально обоснованной нами технологии данный процесс осуществляется следующим образом. Культуру II генерации стерильно смывали с поверхности ФГ-агара и засекали в 2000 мл колбы Эрленмейера с жидкой питательной средой на основе ФГФ рН $(7,1 \pm 0,1)$ в объеме (500 ± 50) мл. Выращивание в колбах посевной культуры проводили в условиях термостатируемого шейкер-инкубатора при температуре $(37 \pm 0,5)$ °С и перемешивании со скоростью (150 ± 20) об/мин в течение (17 ± 1) ч. Этот подход позволил получить посевную культуру со следующими характеристиками – концентрация клеток $(30 \pm 2) \times 10^9$ м.к./мл, коэффициент жизнеспособности – (72 ± 2) %, степень диссоциации – (98 ± 1) % SR (белых) иммуногенных колоний от общего количества выросших. Для посева в биореактор, содержащий (45 ± 5) л питательной среды использовали содержимое двух колб, что позволило достичь начальной концентрации клеток – $(2 \pm 0,2) \times 10^9$ м.к./мл среды. Из данного описания можно говорить о таком преимуществе наших технологических приемов, как уменьшение времени протекания процесса в 3 раза.

Глубинное культивирование *F. tularensis* по действующей технологии производится в 5 бутылках, содержащих 2,5 л питательной среды с добавлением 50 мл 5 % раствора L-цистеина соляно-кислого и 50 мл 50 % раствора глюкозы, при аэрации воздухом в количестве 0,5 л/мин в течение 19 ч. Выращивание культуры туляремийного микроба заканчивают, если концентрация клеток в микробной взвеси достигла не менее $(13,5 \pm 0,5) \times 10^9$ м.к./мл. Таким образом, эффективность процесса составляет не более 3 раз. Глубинное культивирование *F. tularensis* по разработанной нами технологии производится в пилотном биореакторе F3-50 Bionet, содер-

жащим (45 ± 5) л питательной среды. Параметры процесса были следующие: аэрация среды ($0,65\pm 0,15$) л/мин, скорость вращения мешалки (400 ± 100) об/мин, при контроле содержания растворенного кислорода на уровне (45 ± 5) %. Подкормку глюкозой осуществляли с четвертого часа и прекращали за один час до прекращения культивирования. Подкормку вносили дозированно со скоростью (100 ± 10) мл/ч. Корректирующий раствор для поддержания оптимальных значений pH вносили в виде 10 % раствора аммиака по мере закисления среды. Длительность процесса культивирования составляла (10 ± 1) ч. Концентрация клеток в микробной взвеси достигла $(33\pm 0,5)\times 10^9$ м.к./мл. Таким образом, эффективность процесса составляет 17 раз. Из вышеназванного можно говорить о следующих преимуществах разработанной нами технологии глубинного аппаратного культивирования *F. tularensis*: повышение эффективности процесса более чем в 5 раз, уменьшение времени выращивания в 2 раза, получение за один цикл культивирования 50 л культуры туляремийного микроба с концентрацией $(33\pm 0,5)\times 10^9$ м.к./мл против 12,5 л с концентрацией $(13,5\pm 0,5)\times 10^9$ м.к./мл. Это позволяет в 10 раз увеличить количество культуры *F. tularensis*, пригодной в дальнейшем для ее лиофилизации. Следует также сказать о таких общеизвестных преимуществах глубинного аппаратного культивирования, как: однородность популяции микроорганизмов и возможность управления процессом. Несомненным достоинством нашей технологии является экспериментальное обоснование внедрения ЭО мониторинга для оперативного контроля такой характеристики, как «жизнеспособность» туляремийного микроба. Это дает возможность технологу получать информацию в режиме реального времени с целью оперативного воздействия на технологический процесс.

Внедрение стадии концентрирования культуры *F. tularensis* тангенциальной микрофльтрацией в производственный процесс получения ЖТВ, как нами уже было показано, обладает следующими положительными моментами: возможность использования биомассы после процесса ее накопления в случае недостаточной для приготовления готовой лекарственной формы концентрации микроорганизма; потенциальность применения данного технологического приема для стандартизации биомассы по показателю «концентрация» микробных клеток независимо от эффективности этапа культивирования.

Говорить о преимуществах или недостатках разработанной нами технологии лиофилизации полуфабриката ЖТВ вряд ли представляется целесообразным в силу того, что проведение исследований по экспериментальному обоснованию нового состава среды высушивания и технологических параметров процесса были вызваны неудовлетворительными результатами контроля серий вакцины полученной по новым технологическим приемам культивирования и концентрирования. Это, на наш взгляд, было связано с неоптимальными составом среды высушивания (применялась нормируемая ФС.3.3.1.0019.15 «Вакцина туляремийная живая») и условиями сушки препарата, которые оказались неприменимыми в разработанной нами лабораторной технологии производства.

Также нет смысла рассматривать «плюсы» и «минусы» этапа герметизации полуфабриката ЖТВ в силу того, что в разработанной нами лабораторной технологии эта процедура проводилась на полуавтомате укупорки флаконов с ограниченной производительностью, равной 1000 флаконов/ч. Однако следует отметить, что по действующей технологии герметизация ампул под вакуумом осуществляется ручной запайкой с применением для запайки смеси газа (природного либо пропан-бутана) с кислородом. Не говоря о низкой производительности данной операции, можно также констатировать о следующих недостатках: при выгрузке ампул по окончании сушки и при герметизации не исключена вероятность загрязнения препарата воздушной микрофлорой; при использовании кислорода и пропана (бутана) для запайки ампул вполне возможно отравление персонала, а также возникновение взрыва. Следует отметить, что производительного оборудования, предназначенного для запайки ампул под вакуумом, не производится. Разработанные нами методические подходы герметизации флаконов под вакуумом непосредственно в камере лиофилизатора, при создании промышленной технологии производства ЖТВ, предусматривающей, несомненно, приобретение лиофилизационного и укупорочного оборудования, позволят решить данную проблему.

По действующей технологии на этапе контроля ЖТВ для определения показателя «подлинность» применяется МФА, при проведении которого образуются конгломераты микробных клеток, что «...затрудняет учет результатов» [40]. Нами показана применимость метода ДИА-ЗНЧ для контроля подлинности вакцинного штамма *F.tularensis* 15 НИИЭГ на этапах получения вакцины, а в комплексе с ме-

тодом ПЦР для определения данной характеристики в готовой лекарственной форме.

Заключение по главе

Результатом проведенных исследований, представленных в главе 6, явилось подтверждение свойств готовой лекарственной формы ЖТВ, полученной по лабораторной технологии требованиям документа, определяющим ее качество [116]. Показано, что эффективность вакцины была сопоставима с коммерческим препаратом ЖТВ.

При сопоставлении технологической эффективности экспериментально обоснованных биотехнологических этапов получения ЖТВ в сравнении с действующей технологией выявлены преимущества по таким процедурам, как: получение бактериальной культуры *F. tularensis* III генерации, глубинное культивирование *F. tularensis*, концентрирование культуры *F. tularensis* тангенциальной микрофльтрацией, контроль туляремийной вакцины.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Современный уровень биотехнологии обуславливает необходимость комплексного подхода для развития технологии производства профилактических иммунобиологических препаратов, в частности, ЖТВ. Отсутствие сведений об особенностях получения жизнеспособной иммуногенной биомассы вакцинного штамма туляремийного микроба, знание и применение которых способствует повышению эффективности производственных процессов, определили направление исследования.

Выполнение данной задачи вызвало необходимость проведения работ по совершенствованию ряда биотехнологических операций производства ЖТВ, разработке новых методических приемов ее приготовления, а также экспериментальному обоснованию возможности введения современных методов контроля в технологический процесс.

Экспериментальная часть работы представлена 4 главами диссертации. В главе 3 изложены исследования посвященные совершенствованию одного из важных этапов производства ЖТВ – культивированию клеток вакцинного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ, а также разработке технологической процедуры концентрирования биомассы туляремийного микроба. Первоначальные исследования были посвящены экспериментальному обоснованию состава жидкой питательной среды на основе ФГФ для культивирования клеток *F. tularensis* 15 НИИЭГ.

Проведенный анализ данных аминокислотного состава ФГФ показал на полноценность набора аминокислот. Поэтому первым шагом при экспериментальном обосновании состава жидкой питательной среды на основе ФГФ было принято решение об отказе от введения состав среды стимуляторов роста.

Для сравнения эффективности выращивания туляремийного микроба в условиях малообъемного культивирования в колбах Эрленмейера (250 мл) на термостатируемом шейкер-инкубаторе в питательной среде на основе ФГФ использовали питательные среды на основе ПГРМ и ЭПД с различным содержанием аминного азота. Было установлено, что лимитирующим фактором ростовых свойств экспериментальных сред является содержание аминного азота. Оптимальное значение этого показателя должно быть в пределах от $(0,320 \pm 0,1) \%$ до $(0,420 \pm 0,1) \%$.

При более высоком или низком содержании аминного азота рост туляремийного микроба резко ограничивается.

Продолжением экспериментов явилось культивирование *F. tularensis* 15 НИИЭГ в жидких питательных средах на основе ФГФ и ЭПД с выявленным оптимальным содержанием аминного азота, но с различным содержанием стимулирующих добавок: глюкоза, глюконат кальция, пантотенат кальция. Для жидкой питательной среды на основе ФГФ была отмечена высокая скорость накопления биомассы в экспоненциальную фазу в сочетании с высоким коэффициентом жизнеспособности. При исследовании влияния на рост туляремийного микроба в жидкой питательной среде на основе ФГФ в качестве стимуляторов роста солей кальция, натрия, аминокислот выявлен оптимальный состав среды: сухой гидролизат фибрина 5%, глюкоза 1%, пантотенат кальция 0,005 %, хлорид натрия 0,5%, цистеин 0,1%, рН (7,2±0,1).

Логичным этапом работы была апробация разработанной питательной среды на основе ФГФ при аппаратном глубинном культивировании штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ в ферментерах с рабочими объемами 1,0 и 50 л.

Параметры культивирования в лабораторном биореакторе с рабочим объемом 1,0 л были приняты следующие: скорость перемешивания (250±50) об/мин, температура 37 °С. Аэрацию проводили воздухом в количестве (0,7-1,0) л на 1 л питательной среды в течение всего времени культивирования, за исключением первых 4 ч и последнего часа, когда ее значения были 0,5 л на 1,0 л среды. Регулирование объема подачи воздуха осуществляли по показателю «насыщение кислородом», измеряемому в режиме «реального времени» погружным автоклавируемым датчиком растворенного кислорода. На всех этапах выращивания, начиная с 4 ч, этот показатель насыщения питательной среды кислородом составлял (50±1) % от исходного (за 100 % брали концентрацию кислорода в питательной среде до инокуляции культуры). Уровень рН питательной среды также контролировали в режиме «реального времени» с помощью погружного автоклавируемого рН-зонда. Показатель рН среды на первых этапах роста составлял (7,2±0,1); начиная с 15 ч, он незначительно снижался и достигал значения (6,8±0,1). Коррекцию рН не проводили, поскольку наблюдаемый диапазон соответствовал оптимуму роста туляремийного микроба.

При культивировании без подкормки время культивирования составило (22 ± 1) ч. Максимальная концентрация наблюдалась на 20 ч выращивания и составила $(14,5 \pm 0,5) \times 10^9$ м.к. на 1 мл среды. Эффективность культивирования по приросту биомассы составила 17 раз. При культивировании вакцинного штамма тулярийного микроба с подкормкой выход биомассы увеличился на 100 %, время достижения максимума концентрации уменьшилось на 2 ч. Эффективность культивирования по приросту биомассы составила 24 раза.

После окончания процесса культивирования в биореакторе с рабочим объемом 1,0 л нативная культура вакцинного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ имела следующие характеристики: рН $(6,8 \pm 0,1)$, концентрация микробных клеток $(30 \pm 0,5) \times 10^9$ м.к./мл среды, показатель жизнеспособности составил $(96 \pm 0,5)$ %. Степень диссоциации составляла (92 ± 1) % SR (белых) иммуногенных колоний от общего количества выросших.

Наибольший выход биомассы при культивировании в биореакторе с рабочим объемом 50 л был достигнут при следующих параметрах культивирования: рН среды $(7,1 \pm 1,0)$, температура $(37 \pm 0,5)$ °С, аэрация среды $(0,65 \pm 0,15)$ л/мин, скорость вращения мешалки (400 ± 100) об/мин. Содержание растворенного кислорода в среде поддерживали на уровне (45 ± 5) %. Длительность процесса культивирования составляла (10 ± 1) ч. Подкормку осуществляли с четвертого часа и прекращали за один час до окончания культивирования.

После окончания процесса культивирования в биореакторе с рабочим объемом 50 л нативная культура вакцинного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ имела следующие характеристики: рН $(6,8 \pm 0,1)$, концентрация – $(33 \pm 0,5) \times 10^9$ м.к./мл, жизнеспособность составила $(94 \pm 0,5)$ %, степень диссоциации – (89 ± 1) % SR (белых) иммуногенных колоний от общего количества выросших. Эффективность культивирования по приросту биомассы составила 17 раз.

Таким образом, глубинное аппаратное культивирование *F. tularensis* 15 НИИЭГ в жидкой питательной среды на основе ФГФ с экспериментально обоснованным ее качественным и количественным составом, а также предложенные технологические параметры реализации данного процесса обеспечили увеличение биомассы в 17-24 раза.

Анализ сведений научной литературы выявил применимость для концентрирования живых бактериальных культур метода тангенциальной фильтрации с использованием микрофильтрационных мембран с порогом отсечки 0,2 мкм. Поэтому для разработки технологии концентрирования *F. tularensis* 15 НИИЭГ был апробирован именно данный метод. Из достаточно широкого спектра микрофильтрационных мембран мы остановили свой выбор на Vivaflow 200. Была предложена следующая методика проведения процесса, складывающаяся из ряда последовательно выполняющихся операций: промывка мембраны от консервирующего средства, стерилизация мембраны, проведение процесса фильтрации (непосредственно концентрирование), дезинфекция мембраны, очистка мембраны от остатков концентрируемого продукта, консервация мембраны.

Первая и последняя операции проводилась в соответствии с эксплуатационной документацией на фильтрационное оборудование: промывка с помощью циркуляции на проток очищенной воды (из расчёта не менее 10,0 дм³ на 0,1 м² фильтрующей поверхности при условии полного заполнения системы); консервации мембраны – циркуляцией 1,0 дм³ 5 % раствора этилового спирта через установку в течение 1 часа.

Для стерилизации установки для концентрирования *F. tularensis* 15 НИИЭГ успешно применен следующий методический прием – стерилизация фильтрационной установки 6 % раствором перекиси водорода путем его рециркуляции в течение 0,5 ч.

При концентрировании туляремийного микроба использовали культуру туляремийного микроба штамма 15 НИИЭГ, полученную при ее глубинном культивировании. Процедуру прекращали при четырехкратном уменьшении объема нативной культуры *F. tularensis*. Выявлено, что в полученном концентрате не происходило ухудшения характеристик (в сравнении с нативной культурой вакцинного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ после глубинного культивирования). Так, рН и коэффициент жизнеспособности оставались на прежнем уровне, не происходило контаминации посторонней микрофлорой, а также увеличивалась в 4 раза концентрация микробных клеток. Контроль специфической стерильности фильтрата свидетельствовал об отсутствии в нем туляремийного микроба.

Поскольку кратность концентрирования – регулируемый параметр, то возможно использование данного технологического приема для стандартизации биомассы по показателю «концентрация» микробных клеток независимо от эффективности этапа культивирования.

С целью освобождения от остатков питательной среды в концентрате клеточной массы была проведена работа по получению очищенной микробной суспензии *F. tularensis* 15 НИИЭГ, для чего в полученный концентрат клеточной массы добавляли стерильный 0,9 % раствор хлористого натрия рН ($7,2 \pm 0,1$) до восстановления исходного объема нативной культуры. Затем повторно проводили процесс концентрирования до сокращения объема микробного осадка в четыре раза. Полученный концентрат «отмытых» микробных клеток туляремийного микроба был пригоден по всем показателям качества (рН, концентрация микробных клеток, коэффициент жизнеспособности, отсутствие посторонней микрофлоры) для получения ЖТВ.

Для интенсификации режима проведения фильтрации были проведены исследования с вариацией давления на входе продукта в фильтрационную установку. Выявлена максимальная производительность процесса при давлении, равным ($2,5 \pm 0,1$) кгс/см².

Для обеспечения биологической безопасности при концентрировании *F. tularensis* 15 НИИЭГ были отработаны режимы дезинфекции фильтрационной установки. Показана целесообразность проведения обеззараживания следующим образом: рециркуляция через фильтрационную установку 3 % раствора перекиси водорода в течение 1 ч или 6 % раствора с рециркуляцией в течение 0,5 ч с последующей экспозицией на протяжении (17 ± 1) ч.

Для осуществления процедуры очистки микрофильтрационной мембраны успешно применен 1 % раствор «Р-3 ультрасил 11». Показано, что рециркуляция 1,0 дм³ чистящего раствора через установку в течение 0,5 ч обеспечивает очистку микрофильтрационной мембраны.

Значимый научно-практический интерес представляло сравнительное изучение седиментационного, центробежного и фильтрационного методов концентрирования биомассы *F. tularensis* 15 НИИЭГ. Данные экспериментов позволили сделать вывод о том, что использование микрофильтрации позволяет достигнуть 10-

кратное увеличение концентрации микробов в суспензии, при этом время протекания технологического процесса при объеме исходного материала, равным 1,0 дм³, составило не более 1 ч. При применении седиментации 10-кратная степень концентрирования не была достигнута и через 39 сут (время наблюдения). В полуфабрикате вакцинного препарата, произведенном методом мембранного разделения, не происходило ухудшения характеристик в сравнении с нативной культурой *F. tularensis* 15 НИИЭГ, полученной после ее глубинного культивирования. При использовании центробежного метода 10-кратная степень концентрирования достигалась за то же время, что и при тангенциальной фильтрации. Но жизнеспособность микробной суспензии снижалась на 40 %. Также к недостаткам технологии концентрирования как центробежным, так и седиментационным способами отнесено наличие в надосадочной жидкости клеток *F. tularensis*, что не наблюдалось в фильтрате, полученном после микрофильтрации.

В рамках исследований, представленных в главе 3, нашло свое место определение условий и времени хранения концентратов биомассы туляремийного микроба перед проведением процедуры лиофилизации. Исследованы два температурных интервала хранения – от 2 до 8 °С и от 18 до 24 °С. Показано, что оптимальное время хранения концентрированной культуры *F. tularensis* 15 НИИЭГ при комнатной температуре составляет не более 3-х сут, в условиях холодильника – не более 6 сут.

Исследование свойств полученных лиофилизатов ЖТВ, полученной с применением разработанных технологических приемов культивирования *F. tularensis* 15 НИИЭГ и концентрирования микрофильтрацией, выявило, что после высушивания происходило снижение показателя «жизнеспособность», в среднем, на 30 %. Также параметра «Термостабильность» не соответствовал нормируемым требованиям. Анализ стабильности препарата в течение 2 лет показал, что жизнеспособность снижается до 30-35 % к концу первого года и до 10-15 % к концу второго года хранения при температуре от 2 до 8 °С. Высказано предположение о том, что это может быть связано с неоптимальным составом среды высушивания (применялась нормируемая ФС.3.3.1.0019.15 «Вакцина туляремийная живая») и условиями сушки препарата, полученного по новым технологическим приемам культивирования и концентрирования, а также запайки ампул (без вакуума).

Одним из основных итогов исследований в рамках главы 3 можно считать, что концентрирование биомассы вакцинного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ методом тангенциальной микрофльтрации позволяет получать суспензию туляремийного микроба с характеристиками, позволяющими ее использование для получения готовой лекарственной формы вакцины.

Позволительно, с определенной долей уверенности, утверждать о востребованности экспериментально разработанных технологических решениях культивирования вакцинного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ и концентрирования ее биомассы при производстве других живых вакцин.

Глава 4 посвящена разработке технологии сублимационного высушивания туляремийного микроба *F. tularensis* 15 НИИЭГ. На первоначальном этапе экспериментов были определены эвтектические температуры прототипа ЖТВ.

Было показано, что значения теплофизических характеристик являются следующими: температура полного замерзания – минус 40 °С, нижняя и верхняя эвтектическая температуры – минус 30 °С и минус 22 °С соответственно, что позволило сделать вывод о целесообразности замораживания препарата до минус 40 °С, а также проведения процесса первичной сублимации при температуре от минус 30 °С до минус 22 °С.

Основываясь на неудовлетворительных результатах сублимационной сушки ЖТВ, полученной с применением разработанных технологических приемов культивирования *F. tularensis* 15 НИИЭГ и концентрирования микрофльтрацией были проведены эксперименты по совершенствованию технологии лиофилизации. Первым шагом экспериментов, было осуществление подбора защитных сред высушивания.

Было апробировано 5 вариантов биофармацевтической композиции, содержащих $(20 \pm 10) \times 10^9$ м.к. туляремийного микроба и вспомогательные вещества; трегалоза, декстран, агар-агар в различных концентрациях. Полуфабрикаты вакцины (концентрат вакцинного штамма *F. tularensis* 15 линии НИИЭГ, полученный методом тангенциальной микрофльтрации) разливали по 1 мл в стеклянные флаконы вместимостью 10 мл.

Полученные лиофилизаты были проконтролированы по следующим показателям: внешний вид препарата, остаточная влажность, растворимость, рН, седи-

ментационная устойчивость. Кроме того, флаконы проверяли на наличие вакуума. Во всех флаконах имелся вакуум, значения рН и потери в массе при высушивании находились в нормируемых пределах. Тем не менее, все препараты были отбракованы по следующим показателям: «внешний вид» из-за «вспенивания» лиофилизата и уменьшения объема таблетки, а также отслоения ее от стенок флакона; время растворения и седиментационной устойчивости. Нами было высказано предположение о том, что данный эффект может наблюдаться по следующим причинам: недостаточные высота высушиваемого материала и (или) количество декстрана.

На дальнейшем этапе исследований мы применили следующие варианты сред высушивания: вариант А: трегалоза – 0,1, декстран – 0,0002, агар-агар – 0,0025; вариант В: трегалоза – 0,1, декстран – 0,0002; вариант С: трегалоза – 0,1, декстран – 0,01, агар-агар – 0,0025; вариант D: трегалоза – 0,1, декстран – 0,02; вариант Е: трегалоза – 0,1, декстран – 0,0, хитозан водорастворимый пищевой низкомолекулярный (30 кДа) – 0,02. Отличиями методических подходов данного шага исследований были: в 1 мл суспензии было $(10 \pm 5) \times 10^9$ клеток туляремийного микроба, препарат разливали по 2 мл во флаконы. Кроме того, была предпринята попытка использования нового компонента среды высушивания – хитозана.

Характеристики полученных продуктов (потеря в массе при высушивании, время растворения и седиментационной устойчивости, рН, наличие вакуума) соответствовали нормируемым требованиям. У препарата В зафиксировано уменьшение объема таблетки лиофилизата и отслоение ее от стенок флакона. В препарате Е показатель «растворимость» обладал более лучшими значениями – 20 с. У других лиофилизатов он лежал в пределах от 90 до 150 с. Кроме того, в препарате Е не зафиксировано расслоения в течение более 1 ч (время наблюдения). У других образцов данный эффект наблюдался в промежуток времени от 10 до 30 мин. Основываясь на полученных результатах, было отдано предпочтение для дальнейших исследований следующей биофармацевтической композиции (состав приведен на 1 мл): клетки штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ – $(10 \pm 5) \times 10^9$ м.к.; и вспомогательные вещества: трегалоза – 0,1 г; декстран – 0,01 г; хитозан – 0,02 г.

В результате определения эвтектических температур ЖТВ с новым биофармацевтическим составом были получены следующие результаты: температура полного замерзания – минус 40 °С, нижняя и верхняя эвтектическая температуры –

минус 35 °С и минус 25 °С, что было сопоставимо с биофармацевтическим составом коммерческой вакцины. В практическом плане знание этих температур позволяет сделать вывод о целесообразности замораживания препарата до минус 40 °С, а также проведения процесса первичной сублимации при значениях температуры, лежащих в интервале от минус 35 °С до минус 25 °С.

Одним из этапов исследований в рамках главы 4 было изучение влияния продолжительности замораживания на качество лиофилизатов туляремийной вакцины. Флаконы с препаратом замораживали до температуры материала минус (40 ± 5) °С на полках сублимационной сушильной установки. При этой температуре материал выдерживали в течение следующих промежутков времени: 2-3 ч, 5-6 ч, 10-11 ч, 15-16 ч, 23-24 ч. Далее высушивали в соответствии с технологическими приемами, описанными ранее.

Оценку влияния времени замораживания на качество лиофилизатов проводили по следующим показателям: внешний вид препарата, остаточная влажность, растворимость, рН, седиментационная устойчивость, жизнеспособность. Значения всех показателей соответствовали нормируемым требованиям, что позволило сделать вывод об одинаковом влиянии времени замораживания на показатели лиофилизатов. В практическом плане это дает возможность варьировать временем начала сублимационного высушивания.

По предложенным методическим приемам лиофилизации была получена лабораторная серия туляремийной вакцины и исследованы ее нормируемые показатели, которые соответствовали требованиям ФС.3.3.1.0019.15 «Вакцина туляремийная живая».

Таким образом, позволительно утверждать о том, что разработанная биофармацевтическая композиция ЖТВ и экспериментально обоснованные параметры ее сублимационного высушивания дают возможность производить лиофилизат препарата, соответствующий нормируемым характеристикам.

Результаты, полученные при разработке технологии сублимационного высушивания туляремийного микроба *F. tularensis* 15 НИИЭГ, обладают потенциалом применения при получении лиофилизированных форм бактериальных препаратов.

В главе 5 отражены результаты исследований по обоснованию возможности применения альтернативных методов контроля на этапах получения лиофилизата бактерий вакцинного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ.

Первоначально оценивали возможности использования новых инструментальных методов контроля туляремийного микроба на этапах получения туляремийной вакцины. ЭО мониторинг физиологического состояния бактериальных клеток проводили на полностью автоматизированной аналитической установке EloTrace. Измерения проводили на всех стадиях получения ЭЖТВ. Основным измеряемым параметром являлась АП, измеряемая в условных единицах.

В ходе проведенного нами эксперимента было изучено изменение размера клеток, показатели анизотропии поляризуемости и «жизнеспособность» клеток *F. tularensis* в культуре в зависимости от технологической стадии подготовки клеточной массы и лиофилизации.

ЭО мониторинг показал, что размер клеток составляет в среднем $(1,2 \pm 0,1)$ мкм. Отмечена высокая степень корреляции между показателями анизотропии поляризуемости клетки при частотах 900 кГц и 2100 кГц, отражающих состояние цитоплазмы и цитоплазматической мембраны, соответственно. Коэффициент корреляции Пирсона составил 0,98. Использование агаровой или бульонной культуры, замена питательной среды в клеточной суспензии на 0,9 % раствор хлористого натрия, добавление сред высушивания не оказывали значительного влияния на данный показатель.

Были определены критерии применимости ЭО мониторинга для оценки физиологического состояния клеток туляремийного микроба. Рабочий диапазон показателя АП составил от 0 до 200 условных единиц. В то же время, можно отметить, что клетки туляремийного микроба с высокой жизнеспособностью (≥ 70 % живых м.к.) обладали большим показателем АП, при снижении жизнеспособности клеток значение их показателя АП уменьшалось.

ЭО мониторинг процесса глубинного культивирования *F. tularensis* 15 НИИЭГ на питательных средах на основе ФГФ и ПГРМ показал, что показатель АП в обоих случаях свидетельствовал о высокой жизнеспособности культуры, ее стандартности.

Возможность учета в режиме «реального времени» по показателю «оптическая плотность» динамики накопления биомассы, наряду с данными АП и размера клеток, свидетельствуют о перспективности данного метода для экспериментальных исследований по оптимизации условий культивирования туляремийного микроба.

На следующем этапе проводили ЭО мониторинг процесса глубинного культивирования *F. tularensis* 15 НИИЭГ на среде на основе ФГФ. Было выявлено, что показатель АП цитоплазмы более лабилен, чем АП цитоплазматической мембраны, хотя динамика изменений обоих показателей соответствует кривой роста культуры. Спустя 6 часов АП достигала своего пика, а спустя 8 ч жизнеспособность культуры снижалась, после чего снова происходил скачок (18 ч), а затем окончательное угнетение жизнеспособности. При измерении оптической плотности среды так же были заметны изменения, но с опозданием в 2 ч. Так, плотность среды достигала своего максимума лишь к 8 ч культивирования, после чего происходило уменьшение плотности, а затем снова рост. Через 22 ч снова наступало снижение оптической плотности, достигая своего минимума к 24 ч. Таким образом, можно говорить о том, что ЭО мониторинг «предсказывает» снижение клеточной массы, связанное, скорее всего, с недостатком питательных веществ.

На следующем этапе исследовали влияние условий концентрирования и лиофилизации на физиологическое состояние клеток туляремийного микроба. Известно, что применение среды высушивания нужно для предотвращения разрушения клеток при замораживании, лиофилизации и длительном хранении за счет стабилизации конформационного состояния белковых молекул. В то же время, показатели АП в концентрированной и сведенной со средой высушивания биомассе уменьшались, несмотря на высокую жизнеспособность клеток. Это может быть связано со снижением поляризуемости бактериальной клетки при увеличении ионной силы раствора (соли в концентратах и в средах высушивания).

Изменение размера клеток *F. tularensis* изучали также методом АСМ. Размер клеток составлял в среднем $(1,0 \pm 0,1)$ мкм для всех исследованных образцов, что согласуется с данными ЭО мониторинга. Расхождение в линейных размерах (16-20 %) связано с пробоподготовкой при проведении АСМ – измерения проводятся на высушенных препаратах. Кроме того, анализ образца биомассы после до-

бавления среды высушивания провести не удалось в связи с вязкостью образца. После лиофилизации лабораторные серии вакцины также были проанализированы методом АСМ. В последнем случае образцы разводили водой для инъекций до концентрации 5×10^9 м.к./мл.

Были изучены показатели ригидности и шероховатости клеточной стенки, по которым образцы вакцины были сопоставимы со значениями, полученными для нелиофилизированных образцов, что свидетельствовало об отсутствии повреждающего действия на бактериальные клетки среды высушивания и предложенных технологических параметров процесса сушки.

Было выявлено, что время, затраченное на проведение стандартного микробиологического анализа, составляет 5-6 сут, АСМ – 2-4 ч, ЭО мониторинга – 30-60 мин. Таким образом, ЭО метод мониторинга физиологического состояния микробной популяции туляремийного микроба дает возможность оперативно анализировать показатели «жизнеспособность» и «концентрация» клеток *F. tularensis* 15 НИИЭГ на этапах культивирования, подготовки биомассы и получения лиофилизата.

Последним этапом исследований, проведенных в рамках главы 5, было – экспериментальная оценка возможности использования иммунохимических и молекулярно-генетических методов контроля культуры вакцинного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ, в частности, для определения показателя «подлинность».

Для проведения молекулярно-генетического анализа подлинности туляремийного микроба использовали ПЦР с электрофоретическим учетом результатов с коммерческим набором реагентов для выделения ДНК и для постановки ПЦР. Для исследования были взяты культуры *F. tularensis* 15 НИИЭГ с разных этапов получения ЭЖТВ: агаровая и бульонная культура, концентрат биомассы, образцы лабораторных серий ЖТВ. В результате было установлено, что исследуемые образцы имели положительный результат ПЦР, что свидетельствовало о подлинности культуры туляремийного микроба и ее стабильности на всех стадиях получения ЭЖТВ.

В качестве иммунохимических методов были апробированы следующие: с использованием диагностических препаратов для детекции туляремийного микроба, которые выпускаются и зарегистрированы на территории Российской Федерации: ИХ-тест и набор для постановки РНГА; с использованием эксперименталь-

ных иммуноглобулинов к антигенам туляремиального микроба: твердофазный ИФА и иммуноблоттинг с коммерческими антивидовыми антителами, мечеными пероксидазой хрена; ДИА-ЗНЧ с белком А, конъюгированным с золотыми наночастицами

С помощью набора «ИХ тест-система *F.tularensis*» были исследованы образцы лабораторных серий вакцины. Все исследованные образцы имели положительную реакцию в ИХ-тесте. Более четкие и быстрые результаты были получены с неинaktivированными образцами в концентрации 10^8 м.к./мл.

При постановке РНГА с помощью набора реагентов «РНГА-Тул-Иг-СтавНИПЧИ» макро и микрометодом был отмечен высокий уровень специфической активности в образцах лабораторных серий вакцины. Вариант РНГА микрометодом оказался предпочтительнее макрометода в связи с большей экспрессивностью, меньшим расходом материала и наглядностью.

При постановке ИФА и ДИА-ЗНЧ в качестве специфических антител использовали экспериментальные кроличьи иммуноглобулины к протективному антигенному комплексу туляремиального микроба. По результатам ИФА образцов ЭЖТВ, бульонной культуры и концентрата биомассы туляремиального микроба было установлено, что культура *F.tularensis* 15 НИИЭГ выявлялась в концентрации 10^6 - 5×10^5 м.к./мл для лиофилизатов лабораторных серий, до 3×10^4 м.к./мл для концентратов биомассы. По результатам реакции ДИА-ЗНЧ была отмечена положительная реакция у всех образцов в концентрации 10^8 - 10^7 м.к./мл, что сопоставимо с результатами ИХ-теста.

Также апробирован метод иммуноблоттинга образцов ЭЖТВ, в качестве специфических антител использовали экспериментальные кроличьи иммуноглобулины к ПАК. Во всех образцах было отмечено наличие основных иммуногенных белков протективного антигенного комплекса. Профиль образцов лабораторных серий соответствовал иммуноблоттингу клеток вакцинного штамма с иммуноглобулином к ПАК. Полученные результаты свидетельствуют об идентичности использованных образцов, а также об их специфической активности, что делает данный методический подход перспективным для контроля живых вакцин, в т.ч. «классических» аттенуированных.

Результаты исследований, представленных в главе 5, позволяют, с определенной долей уверенности, утверждать, что разработка комплексного подхода к использованию новых методов в сочетании со стандартными микробиологическими методами позволит упростить и ускорить этапы контроля состояния бактериальной культуры при внедрении новых технологических приемов культивирования, концентрирования и лиофилизации клеток вакцинных штаммов

В заключительной главе собственных исследований изучали свойства 3-х серий готовой лекарственной формы ЖТВ, полученных по лабораторной технологии, а также проводили сопоставление технологической эффективности экспериментально обоснованных биотехнологических этапов получения ЖТВ в сравнении с действующей технологией.

В результате проведенного анализа физико-химических свойств, специфической активности, количества доз и микробиологической чистоты было установлено, что все серии препарата полностью соответствует предъявляемым требованиям ФС.3.3.1.0019.15 «Вакцина туляремиальная живая».

На этапе изучения иммунобиологических свойств лабораторных серий ЖТВ изучались: иммуногенность, реактогенность и остаточная вирулентность с использованием биомоделей, а также специфическая безопасность и прививаемость.

В результате оценки реактогенности лабораторных серий вакцины по показателю «острая» токсичность на модели беспородных белых мышей было установлено, что экспериментальный препарат не вызывает гибели животных. Незначительное снижение массы тела наблюдалось на 5-7 сут с последующей нормализацией к 10 сут. Динамика массы тела биомоделей, вакцинированных лабораторными сериями вакцины была аналогична таковому показателю у контрольной группы животных, вакцинированных коммерческой вакциной.

При изучении показателя «остаточная вирулентность», осуществленного на белых мышах BALB/c обоего пола было установлено, что все культуры вакцинного штамма имели остаточную вирулентность в пределах от $1,7 \times 10^3$ до 10^6 м.к. (норма 1×10^2 - 2×10^6 м.к.).

У вакцинированных мышей была определена динамика нарастания концентрации антител к антигенам *F. tularensis*. Сыворотки были получены в период с 7 по 21 сут после начала эксперимента и объединены по группам. Было показано, что

реципрокные титры антител после иммунизации экспериментальными сериями вакцины достигали наибольших значений на 21-е сут.

Была изучена персистенция бактерий *F. tularensis* 15 НИИЭГ в организме белых мышей, иммунизированных подкожно 2-х суточной культурой лиофилизатов лабораторных серий вакцины в количестве 0,2 мл в дозах 100 м.к. Было выявлено, что максимальная обсемененность селезенок наблюдалась на 7-е сут во всех группах без достоверных отличий. На 14-е сут наблюдалось резкое снижение обсемененности в 2 раза, а на 21-е сут после иммунизации лабораторными сериями вакцины туляремийный микроб уже не обнаруживали, что свидетельствовало о том, что количество бактерий в селезенке меньше 25 КОЕ.

Результаты изучения протективной активности лабораторных серий вакцины, осуществленной на мышах линии BALB/c на 30-е сут после иммунизации, показали, что вакцина лабораторных серий обладала высокой защитной эффективностью. При этом протективная активность лабораторных серий вакцины была сопоставима в сравнении с зарегистрированной ЖТВ.

Также было выявлено, что такие характеристики вакцины, как специфическая безопасность и прививаемость находятся в допустимых пределах.

В результате проведения исследований в рамках главы 6 был сделан вывод о том, что свойства ЖТВ, полученных по лабораторной технологии, соответствуют требованиям, предъявляемым к данному лекарственному препарату.

В результате сопоставления технологической эффективности экспериментально обоснованных биотехнологических этапов получения ЖТВ в сравнении с действующей технологией выявлены следующие преимущества предложенных нами решений:

время получения бактериальной культуры *F. tularensis* III генерации меньше в 3 раза;

для стадии глубинного аппаратного культивирования *F. tularensis*: повышение эффективности процесса более чем в 5 раз, уменьшение времени выращивания в 2 раза, однородность популяции микроорганизмов и возможность управления процессом, получение за один цикл культивирования 50 л культуры туляремийного микроба с концентрацией $(33 \pm 0,5) \times 10^9$ м.к./мл против 12,5 л с концентрацией $(13,5 \pm 0,5) \times 10^9$ м.к./мл. Это позволяет в 10 раз увеличить количество культуры *F.*

tularensis, пригодной в дальнейшем для ее лиофилизации. Несомненным достоинством нашей технологии является экспериментальное обоснование внедрения ЭО мониторинга для оперативного контроля такой характеристики, как «жизнеспособность» туляремийного микроба. Это дает возможность технологу получать информацию в режиме реального времени с целью оперативного воздействия на технологический процесс;

внедрение стадии концентрирования культуры *F. tularensis* тангенциальной микрофльтрацией в производственный процесс получения ЖТВ позволяет: использовать биомассу после процесса ее накопления в случае недостаточной для приготовления готовой лекарственной формы концентрации микроорганизма; дает возможность применения данного технологического приема для стандартизации биомассы по показателю «концентрация» микробных клеток независимо от эффективности этапа культивирования;

выявлена перспективность разработанных методических приемов на этапе герметизации полуфабриката ЖТВ для увеличения мощности производства и устранения таких недостатков как: возможность контаминации препарата при выгрузке ампул после лиофилизации и в процессе их запаивания, а также применения горючих газов при герметизации ампул;

показана возможность замены МФА для определения показателя «подлинность» вакцинного штамма *F.tularensis* 15 НИИЭГ на метод ДИА-ЗНЧ для контроля на этапах получения вакцины, а в комплексе с методом ПЦР для определения данной характеристики в готовой лекарственной форме.

В заключение допустимо сформулировать вывод о том, что в диссертации изложены новые научно обоснованные биотехнологические решения, имеющие существенное значение для современного развития как производства единственного в России препарата для специфической профилактики туляремии, включенного в календарь профилактических прививок по эпидемическим показаниям, так и других бактериальных вакцин.

ВЫВОДЫ

1. Разработана лабораторная технология производства живой туляремийной вакцины, осуществленная на совокупности инновационных биотехнологических подходах и дающая возможность изготавливать иммунобиологический лекарственный препарат, включенный в календарь профилактических прививок по эпидемическим показаниям.

2. Для технологического этапа получения биомассы вакцинного штамма *Francisella tularensis* 15 НИИЭГ экспериментально обоснован состав жидкой питательной среды на основе гидролизата фибрина (сухой гидролизат фибрина 5 %, глюкоза 1 %, пантотенат кальция 0,005 %, хлорид натрия 0,5 %, цистеин 0,1 %, pH $(7,2\pm 0,1)$ и определены технологические параметры процедуры глубинного аппаратного культивирования (температура $(37\pm 0,5)$ °С, продолжительность (10 ± 1) ч, степень аэрации $(0,65\pm 0,15)$ л/мин и скорость перемешивания (400 ± 100) об/мин) реализации данного процесса). Предложенные решения способствовали повышению эффективности процесса выращивания туляремийного микроба по увеличению биомассы в 17-24 раза.

3. Разработана и успешно апробирована в лабораторном производстве современная технология концентрирования клеточной массы вакцинного штамма *Francisella tularensis* 15 НИИЭГ методом тангенциальной фильтрации. Выявлено, что применение мембран 0,2 мкм позволяет проводить процесс без потерь целевого продукта. Установлено, что максимальная производительность процесса обеспечивается при давлении в точке подачи продукта равным $(2,5\pm 0,1)$ кгс/см².

4. Разработана технология сублимационного высушивания бактерий вакцинного штамма *Francisella tularensis* 15 НИИЭГ. При этом экспериментально обоснован новый биофармацевтический состав живой туляремийной вакцины (состав приведен на 1 мл): клетки штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ – (10 ± 5) млрд клеток; и вспомогательные вещества: трегалоза – 0,1 г; декстран – 0,01 г; хитозан – 0,02 г. Установление температуры полного замерзания (минус 40 °С), нижней и верхней эвтектической температуры (минус 35 °С и минус 25 °С соответственно) позволило определить технологические параметры лиофилизации продукта во флаконах. Проведенные исследования способствовали сохранению качества высушенного препарата.

5. Опытным путем установлена возможность применения электрооптического мониторинга для экспрессного анализа показателя «жизнеспособность» клеток вакцинного штамма туляремийного микроба на этапах культивирования, подготовки биомассы и получения лиофилизата. Выявлена возможность получения результата за 30-60 мин. Экспериментально показана применимость иммунохимических и молекулярно-генетических методов контроля культур для определения показателя «подлинность» клеток вакцинного штамма *Francisella tularensis* 15 НИИЭГ. Показана применимость метода дот-иммуноанализа с белком А, конъюгированным с золотыми наночастицами на этапах получения вакцины, а в комплексе с методом полимеразной цепной реакции для определения данной характеристики в готовой лекарственной форме.

6. Выявлено, что разработанные биотехнологические этапы не оказывают отрицательного влияния на физико-химические, микробиологические и иммунобиологические свойства туляремийного микроба. Для лабораторных серий вакцины доказано соответствие характеристик, определенных нормативной документацией.

ПРЕДЛОЖЕНИЯ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ РЕЗУЛЬТАТОВ ДИССЕРТАЦИОННОГО ИССЛЕДОВАНИЯ

В качестве дальнейших перспектив проведенных исследований можно обозначить следующие:

внедрение экспериментально разработанных технологических решений культивирования *F. tularensis* 15 НИИЭГ, концентрирования ее биомассы и получения готовой формы вакцины в форме лиофилизата во флаконах в производственную технологию;

дальнейшую отработку методических приемов проведения новых предложенных методов контроля на этапах получения ЖТВ.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

АП	анизотропия поляризуемости
АСМ	атомно-силовая микроскопия
ВНИТИБП	Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт биологической промышленности
ВЭЖХ	высокоэффективная жидкостная хроматография
ГНЦ ПМБ	Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии
ГКПБ	Государственная коллекция патогенных бактерий
ГРЛС	государственный реестр лекарственных средств
ГФ	Государственная Фармакопея
ДНК	дезоксирибонуклеиновая кислота
ДИА-ЗНЧ	дот-иммуноанализ с белком А, конъюгированным с золотыми наночастицами
ЕД ₅₀	средняя иммунизирующая доза
ЖТВ	живая туляремиальная вакцина
ИБФРМ РАН	Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов Российской академии наук
ИФА	иммуноферментный анализ
ИХ	иммунохроматографический анализ
КОЕ	колониеобразующие единицы
МЕ	международная единица
м.к.	микробные клетки
МУК	методические указания
НИИВС	научно-исследовательский институт вакцин и сывороток
НИИЭГ	научно-исследовательский институт вакцин эпидемиологии и гигиены
НИЦЭМ	национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии
НПО «Микроген»	акционерное общество «Научно-производственное объединение по медицинским иммунобиологическим препаратам «Микроген»

НЦЭСМП	научный центр экспертизы средств медицинского применения
ОСО	отраслевой стандартный образец
ОФС	общая фармакопейная статья
ПАК	протективный антигенный комплекс
ПБА	патогенные биологические агенты
ПГРМ	панкреатический гидролизат рыбोकостной муки
ПМФ	посторонняя микрофлора
ПЦР	полимеразная цепная реакция
РА	реакция агглютинации
РЛ	реакция лейкоцитоза
РНГА	реакция непрямой гемагглютинации
РосНИПЧИ	Российский научно-исследовательский противочумный институт
СОП	стандартный образец предприятия
СП	санитарно-эпидемиологические правила
ФГБУ	федеральное государственное бюджетное учреждение
ФГФ	ферментативный гидролизат фибрина
ФКУЗ	федеральное казенное учреждение здравоохранения
ФС	фармакопейная статья
ЭЖТВ	экспериментальная живая туляремийная вакцина
ЭО	электрооптический
ЭПД	экстракт пекарских дрожжей
D _{с1}	летальная доза для 100 % животных, взятых в опыт
LD ₅₀	летальная доза для 50 % животных, взятых в опыт

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Абзаева, Н.В. Повышение жизнеспособности *Yersinia pestis* EV в биомассе вакцины: автореф. дис. канд. биол. наук: 03.02.03 / Абзаева Наталья Вячеславовна. – Ставрополь, 2010. – 22 с.
2. Алешина, Ю.А. Получение препаратов О-антигенов *Vibrio cholerae* для производства холерных химических вакцин: 03.02.03, 03.01.06: автореф. дис. канд. биол. наук / Алешина Юлия Александровна. – Саратов, 2013. – 22 с.
3. Андреев, А.А. Действие сил на клетки дрожжей (*Saccharomices cerevisiae*) в поле стоячей ультразвуковой волны / А.А. Андреев, Д.Г. Садикова, Т.Н. Пашовкин // Вестник новых медицинских технологий. – 2007. – Том. XIV, № 2. – С. 12-15.
4. Анкер, А.А. Способ концентрирования споровых культур в производстве сибиреязвенных вакцинных препаратов / Анкер А.А., Лещенко А.А., Кожухов В.В. [и др.] // Патент РФ №2151798, МПК А61К39/07; 24.06.1998.
5. Антонычева, М.В. Питательная среда для глубокого культивирования холерного вибриона / М.В. Антонычева, С.А. Нижегородцев, С.А. Еремин [и др.] // Патент РФ № 2425866, МПК С12N1/20, С12R1/63; 27.05.2010.
6. Анциферов, М.И. Сравнительная оценка питательных сред в бактериологической диагностике туляремии: автореф. дис. канд. биол. наук / Анциферов Митрофан Ильич. – Иркутск, 1963. – 23 с.
7. Ашмарин, И.А. Статистические методы в микробиологических исследованиях / Ашмарин И.А., Воробьев А.А. – Л.: Медгиз, 1962. – 180 с.
8. Бакулов, И.А. Способ концентрирования бактериальных спор / И.А. Бакулов, В.А. Гаврилов, Ю.В. Числов [и др.] // Авторское свидетельство 1792969 СССР, кл. С 12 N 1/02; 20.12.1988.
9. Баснакьян, И.А. Культивирование микроорганизмов с заданными свойствами [Текст] / И.А. Баснакьян – М.: Медицина, 1992. – 192 с.
10. Бирюков, В.В. Основы промышленной биотехнологии / В.В. Бирюков. – М.: КолосС, 2004. – 296 с.
11. Брахт, К. Фильтрация кросс-флоу / К. Брахт, Е.Е. Каталевский, С.П. Савельева // Фармацевтические технологии и упаковка. – 2009. – № 6. – С. 47-51.

12. Васин, Ю.Г. Аппаратное обеспечение и оптимизация процессов получения биомассы и протективных антигенов холерного вибриона: 03.00.07: автореф. дис. канд. биол. наук / Васин Юрий Геннадьевич. – Саратов, 1993. – 22 с.
13. Волох, О.А. Оценка возможности использования экспериментальных иммунодиагностических препаратов в лабораторной диагностике чумы и туляремии / О.А. Волох, Е.М. Кузнецова, А.А. Щербаков // Известия Саратовского университета. Серия Химия. Биология. Экология. – 2014. – Том 14(2). – С. 78-82.
14. Волох, О.А. Питательная среда для глубинного культивирования туляремиального микроба / О.А. Волох, М.В. Антонычева, Н.Г. Авдеева [и др.] // Патент РФ № 2518282, МПК C12N1/20, C12R1/01; 10.06.2014.
15. Волошин, А.Г. Использование электрооптического метода для контроля бактериальных препаратов / А.Г. Волошин, М.Е. Лапыш, С.Г. Игнатов, В.Д. Бунин // Прикладная биохимия и микробиология. – 1996. – Т.32, № 6. – С. 669-670.
16. Волошин, А.Г. Электрооптический анализ как средство контроля за внешними воздействиями на клетки / А.Г. Волошин, В.Д. Бунин, В.В. Вережкин, С.Г. Игнатов // Бактериология. – 2017. – № 2(4). – С. 46-49.
17. Гаврилов, В.А. Технология производства нативного симбиотического препарата и оценка его эффективности в свиноводстве: 03.01.06, 06.02.02: автореф. дис. канд. биол. наук / Гаврилов Владимир Андреевич. – Щелково, 2016. – 25 с.
18. Гайский, Н.А. Способ приготовления туляремиальной вакцины / Н.А. Гайский // Авторское свидетельство 66621 СССР, кл. 30 h, 6; 12.10.1943.
19. Государственный реестр лекарственных средств [Государственный реестр лекарственных средств [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.grls.rosminzdrav.ru/GRLS.aspx?RegNumber=&MnnR=&lf=%d0%bb%d0%b8%d0%be%d1%84%d0%b8%d0%bb%d0%b8%d0%b7%d0%b0%d1%82&TradeNmR=&OwnerName=&MnfOrg=&MnfOrgCountry=&isfs=0&isND=-1®type=&pageSize=10&order=RegDate&orderType=desc&pageNum=1> (дата обращения 25.12.2020).
20. Грачева, И.В. Механизмы повреждений бактерий при лиофилизации и протективное действие защитных сред / И.В. Грачева, А.В. Осин // Проблемы особо опасных инфекций. – 2016. – Вып. 3. – С. 5-12.
21. Гулий, О.И. Метод электрооптического анализа клеточных суспензий в прикладной микробиологии [Текст] / О.И. Гулий, В.Д. Бунин, О.С. Ларионова [и др.] – Саратов: ИЦ «Наука», 2017. – 85 с.

22. Гулий, О.И. Определение клеток *Azospirillum brasilense* с помощью бактериофагов методом электрооптического анализа микробных суспензий / О.И. Гулий, О.А. Караваева, С.А. Павлий [и др.] // Прикладная биохимия и микробиология. – 2015. – Т.51, № 3. – С. 313-318.
23. Гулий, О.И. Электрооптический анализ микробных суспензий для определения метаболической активности клеток и их детекции: 03.00.07: автореф. дис. докт. биол. наук / Гулий Ольга Ивановна. – Саратов, 2006. – 49 с.
24. Гусаров, Д.А. Лиофилизация биофармацевтических белков (миниобзор) / Д.А. Гусаров // Биофармацевтический журнал. – 2010. – Том. 2(5). – С. 3-7.
25. Дыкман, Л.А. Иммуногенность конъюгатов протективных антигенных комплексов туляремийного микроба с наночастицами золота / Л.А. Дыкман, О.А. Волох, Е.М. Кузнецова, А.К. Никифоров // Российские нанотехнологии. 2018. – Том13(7-8). – С. 36-43.
26. Дятлов, И.А. Питательные среды для выделения, культивирования и идентификации возбудителей особо опасных инфекций бактериальной природы / И.А. Дятлов, В.В. Кутырев, М.В. Храмов – М.: ООО «ТиРу», 2012. – с. 208-227.
27. Егорова, Н.Б. Поликомпонентная вакцина для иммунопрофилактики и иммунотерапии заболеваний, вызываемых условно-патогенными микроорганизмами / Н.Б. Егорова, Б.Ф. Семенов, Е.А. Курбатова [и др.] // Патент РФ № 2209081, МПК А61К39/116, С12N1/20; 21.06.2000.
28. Емельянова, О.С. Микробиология туляремии / О.С. Емельянова // В кн.: Туляремия – М., 1960. – С. 51-95.
29. Еремин, С.А. Методы и технологии культивирования холерного вибриона (обзор) / С.А. Еремин, Ю.А. Алешина, А.В. Комиссаров [и др.] // Проблемы особо опасных инфекций. – 2013. – Вып. 4. – С. 95-102.
30. Еремин, С.А. Разработка новых технологических схем и масштабирование процессов получения антигенов чумного и туляремийного микробов / С.А. Еремин, О.А. Волох, И.А. Шепелев [и др.] // Проблемы особо опасных инфекций. – 2006. – Вып 92. – С. 58-61.
31. Ерохин, П.С. Атомно-силовая микроскопия как инструмент определения чувствительности бактерий к факторам биотической и абиотической природы: 03.01.02: автореф. дис. канд. физ.-мат. наук / Ерохин Павел Сергеевич. – Саратов, 2015. – 23 с.

32. Жулидов, И.М. Биотехнологические аспекты переработки фибрина – отхода производства гетерологичного антирабического иммуноглобулина / И.М. Жулидов, Е.Г. Абрамова, М.В. Антонычева [и др.] // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова. – 2011. – Том. 7, № 3. – С. 17-23.
33. Жулидов, И.М. Новая питательная среда на основе сухого гидролизата фибрина для культивирования холерных вибрионов / И.М. Жулидов, М.В. Антонычева, О.А. Лобовикова [и др.] // Бюллетень Восточно-Сибирского научного центра СО РАН. – 2012. – № 5(87), Ч. 1. – С. 220-223.
34. Жулидов, И.М. Разработка биотехнологических приемов малоотходных технологий в производстве гетерологичного антирабического иммуноглобулина: 03.01.06: автореф. дис. канд. биол. наук / Жулидов Иван Михайлович. – Саратов, 2013. – 18 с.
35. Жученко, М.А. Лиофилизация препаратов в двухкамерных шприцах / М.А. Жученко, М.А. Пашкова, О.В. Потапенко // Биотехнология. – 2015. – № 4. – С. 79-84.
36. Игнатов, С.В. Разработка и применение современных методов изучения и идентификации микроорганизмов с использованием бионанотехнологических подходов: 03.02.03: автореф. дис. докт. биол. наук / Игнатов Сергей Георгиевич. – Оболенск, 2010. – 49 с.
37. Инструкция по применению лекарственного препарата для медицинского применения. Вакцина туляремийная живая. Государственный реестр лекарственных средств [Электронный ресурс]. – Режим доступа: http://grls.rosminzdrav.ru/Grls_View_v2.aspx?routingGuid=9ba98af5-a6d4-4b6f-afd9-5ff24b64bc65&t= (дата обращения 10.08.2020).
38. Кан, С.В. Способ выделения биомассы микроорганизмов из культуральной жидкости / С.В. Кан, Г.И. Мещанкин, Р.В. Катруш [и др.] // Авторское свидетельство 835170 СССР, кл. С 12 N 1/02.; 10.01.1979.
39. Караваева, О.А. Использование метода электрооптического анализа микробных суспензий для определения специфичности бактериофага / О.А. Караваева, О.И. Гулий, С.А. Павлий [и др.] // Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия Химия. Биология. Экология. – 2011. – Том. 11, Вып. 2. – С. 94-97.
40. Касина, И.В. Перспективы совершенствования экспертизы качества вакцины туляремийной живой / И.В. Касина, С.А. Алексеева, З.Е. Бердникова [и др.] // Биопрепараты. Профилактика, диагностика, лечение. – 2017. – № 17 (4). – С. 240-247.

41. Кисличкин, Н.Н. Живая туляремийная вакцина *Nik-sp. Francisella tularensis* / Н.Н. Кисличкин, О.И. Кисличкина // Патент РФ № 2308969, МПК А61К 39/02; 16.06.2006.
42. Коваленко, В.Н. Способ получения концентрата микробных клеток в производстве чумных вакцин / В.Н. Коваленко, А.А. Асяев, Н.А. Черкасов и [и др.] // Патент РФ № 221503313, МПК А61К39/12; 27.06.2001.
43. Колядицкая, Л.С. Усовершенствование препарата сухой живой туляремийной вакцины / Л.С. Колядицкая, А.А. Шмурыгина // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. – 1957. – № 10. – С. 84-89.
44. Комбарова, Т.И. Сравнительная оценка реактогенности туляремийной вакцины на различных биомоделях / Т.И. Комбарова, В.М. Павлов, Т.Б. Кравченко [и др.] // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. – 2013. – Т.71, №4. – С. 54-62.
45. Комиссаров, А.В. Исследование процесса сублимационного высушивания иммуногенов холерной химической вакцины / А.В. Комиссаров, Н.Н. Кочкалова, Н.В. Синицына [и др.] // Проблемы особо опасных инфекций. – 2016. – Вып. 1. – С. 90-93.
46. Комиссаров, А.В. Математическая модель кинетики накопления антигенов в ходе периодического глубинного культивирования *Vibrio cholerae* 569В Инаба с лимитацией по углеродному субстрату / А.В. Комиссаров, А.К. Никифоров, С.Н. Задохин [и др.] // Проблемы особо опасных инфекций. – 2014. – Вып. 3. – С. 96-99.
47. Комиссаров, А.В. Математическая модель кинетики накопления О-антигена в ходе периодического глубинного культивирования *Vibrio cholerae* М-41 Огава с лимитацией по углеродному субстрату / А.В. Комиссаров, А.К. Никифоров, С.Н. Задохин [и др.] // Проблемы особо опасных инфекций. – 2013. – Вып. 1. – С. 91-93.
48. Комиссаров, А.В. Разработка и совершенствование биотехнологических этапов промышленного производства холерной химической вакцины: 03.01.06: автореф. дис. докт. биол. наук / А.В. Комиссаров. – Саратов, 2016. – 47 с.
49. Космаенко, О.М. Разработка аппаратного метода культивирования чумного микроба и холерного вибриона на полупроницаемых мембранах: 03.00.07: автореф. дис. канд. биол. наук / Космаенко Олег Михайлович. – Саратов, 1981. – 23 с.
50. Кочкалова, Н.Н. Оптимизация формы выпуска и потребительской тары иммуноглобулина антирабического из сыворотки крови лошади / Н.Н. Кочкалова, Е.Г.

Абрамова, А.К. Никифоров [и др.] // Бюллетень ВСНЦ СО РАМН. – 2012. – № 5 (87), Часть 1. – С. 236-238.

51. Крылов, И.А. Способ концентрирования бактериальной биомассы / И.А. Крылов, В.И. Памфилов, М.Н. Манаков, Е.А. Черновёрхская // Авторское свидетельство 1135481 СССР, кл. В 01 D 21/01; 01.02.1983.

52. Кудрявцева, Т.Ю. Эпизоотолого-эпидемиологическая ситуация по туляремии на территории Российской Федерации в 2019 г. и прогноз на 2020 г. / Т.Ю. Кудрявцева, В.П. Попов, А.Н. Мокриевич [и др.] // Проблемы особо опасных инфекций. – 2020. – Вып. 1. – С. 21-32.

53. Кузнецова, Е.М. Иммунобиологические свойства антигенных комплексов туляремийного микроба / Кузнецова Е.М., Волох О.А., Смолькова Е.А. [и др.] // Проблемы особо опасных инфекций. – 2011. – Вып. 109(3). – С.46-49.

54. Кузнецова, Е.М. Компонентный состав протективного антигенного комплекса туляремийного микроба / Е.М. Кузнецова, О.А. Волох, И.А. Шепелёв, А.К. Никифоров // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. 2012. – № 3. – С. 22-25.

55. Кузнецова, Е.М. Оптимизация способов получения антигенных комплексов туляремийного микроба и конструирование на их основе диагностических препаратов: 03.00.07: автореф. дис. канд. биол. наук / Кузнецова Екатерина Михайловна. – Саратов, 2012. – 23 с.

56. Кулагина, Е.М. Флокуляция клеток *Saccharomyces cerevisiae* / Е.М. Кулагина, Р.И. Юсупова, М.В. Потапова // Вестник Казанского технологического университета. – 2014. – № 16(17). – С. 167-169.

57. Куренков, В.Ф. Полиакриламидные флокулянты / В.Ф. Куренков // Саратовский образовательный журнал. – 1997. – № 7. – С. 57-63.

58. Лабораторная диагностика опасных инфекционных болезней: Практическое руководство / под ред. академика РАМН Г.Г. Онищенко, академика РАМН В.В. Кутырева. – М.: ЗАО «Шико», 2013. – 560 с.

59. Лапин, А.А. Простая жидкая питательная среда для молекулярно-генетических исследований *Francisella tularensis* / А.А. Лапин, В.М. Павлов, Л.В. Домотенко [и др.] // Проблемы особо опасных инфекций. – 2009. – Вып. 102. – С. 66-67.

60. Лапыш, М.Е. Использование электрооптического метода для оперативного определения жизнеспособности бактериальных клеток / М.Е. Лапыш, С.Г. Игнатов, В.Н. Брезгунов // Микробиология. – 1989. – Т. 58, № 3. – С. 515-517.

61. Лебедев, Н.В. Получение анатоксинов *Actinobacillus pleuropneumoniae* и изучение их свойств: 06.02.02: автореф. дис. канд. вет. наук / Лебедев Никита Викторович. – Владимир, 2013. – 27 с.
62. Левкович, Н.Г. Совершенствование промышленной технологии производства вакцины против некробактериоза животных: 06.02.02: автореф. дис. канд. вет. наук / Левкович Николай Григорьевич. – Щелково, 2016. – 29 с.
63. Лещенко, А.А. Питательная среда для выращивания возбудителя туляремии / А.А. Лещенко, А.Г. Лазыкин, С.М. Кузнецов [и др.] // Патент РФ № 2333948, МПК С12N1/20; 01.08.2006.
64. Лещенко, А.А. Экспериментальное обоснование возможности получения концентрата микробных клеток штамма *Yersinia pestis EV* методом микрофльтрации / А.А. Лещенко, В.В. Тетерин, А.Г. Лазыкин [и др.] // Биопрепараты. Профилактика, диагностика, лечение. – 2014. – № 1(49). – С. 31-36.
65. Логачева, Л.В. Питательная среда для культивирования *Francisella tularensis* / Л.В. Логачева, Т.П. Морозова, В.А. Кундин [и др.] // Авторское свидетельство 1730143 СССР, С12N 1/20; 27.0.1990.
66. Майский, В.Г. Питательные потребности *Francisella tularensis* / В.Г. Майский, И.Н. Шишов, Г.И. Басилова // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 1984. – № 6. – С. 20-23.
67. Матвеева, Е.В. Сохранение генофонда фитопатогенных бактерий методом лиофилизации / Е.В. Матвеева // АГРО XXI. – 2007. – № 10-12. – С. 28.-30.
68. Медведев, Ю.В. Способ концентрирования бактериальной суспензии / Ю.В. Медведев, Г.В. Попов, А.Н. Русских [и др.] // Авторское свидетельство 1333307 СССР, кл. С 12 N 1/01; 07.06.1985.
69. Методы контроля бактериологических питательных сред: Методические указания МУК 4.2.2316-08. – М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2008. – 67 с.
70. Мещерякова, И.С. Туляремия / И.С. Мещерякова // В кн.: Природная очаговость болезней: исследования института им. Н.И. Гамалеи РАМН – М., 2003. – С. 137-160.
71. Мещерякова, И.С. Туляремия: современная эпидемиология и вакцинопрофилактика (к 80-летию создания первой туляремийной лаборатории в России) / И.С. Мещерякова // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. – 2010. – № 2 (51). – С. 17-22.

72. Микшис, Н.И. Способ получения протективного антигена и белка S-слоя EA1 из аспорогенного рекомбинантного штамма *B. anthracis* 55ΔТПА-1S_{po} / Н.И. Микшис, А.Ю. Гончарова, П.Ю. Попова [и др.] // Патент РФ № 2492241, МПК С12Р 21/00; 10.07.2012.

73. Михайлова, Н.А. Способ получения экзотоксина А *Pseudomonas aeruginosa* / Н.А. Михайлова, Ф.А. Шаймухаметов, Т.Н. Кузнецова // Патент РФ № 1596770, МПК С12Р1/04; 22.02.1989.

74. Могилюк, В. Аспекты лиофилизационной сушки водных растворов / В. Могилюк // Фармацевтическая отрасль. – 2014. – № 5(46). – С. 46-53.

75. Мокриевич, А.Н. Иммуногенность и реактогенность штамма *Francisella tularensis* 15/ 23-1ΔгесА, кандидата для создания новой живой туляремийной вакцины / А.Н. Мокриевич, Г.М. Титарева, Т.И. Комбарова [и др.] // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. – 2015. – Том 85, № 6. – С. 74-86.

76. Мокриевич, А.Н. Туляремия: состояние проблемы и методы исследования / А.Н. Мокриевич, Т.Б. Кравченко, В.В. Фирстова [и др.] / под редакцией академика РАН И.А. Дятлова. – М.: Династия, 2019. – 263 с.

77. Морозова, Т.П. Оценка диагностических свойств прозрачной питательной среды для культивирования и выделения туляремийного микроба (Ft-агара) / Т.П. Морозова, Л.В. Домотенко, М.В. Храмов // Проблемы особо опасных инфекций. – 2010. – Вып. 105. – С. 50-53.

78. Нежута, А.А. Научное обоснование и методика разработки и совершенствования промышленной технологии сублимационного высушивания биопрепаратов: 03.00.23: дис. ... д-ра биол. наук / Нежута Александр Александрович. – Щелково, 2003. – 243 с.

79. Нежута, А.А. Разработка научно-обоснованных режимов сублимационной сушки биопрепаратов / А.А. Нежута, Е.С. Сербис // Биотехнология. – 2001. – № 6. – С. 59-67.

80. Немирович-Данченко, М.М. Диализное культивирование *Clostridium botulinum* типа E: автореф. дис. канд. биол. наук / Немирович-Данченко Михаил Михайлович. – Томск, 1973. – 23 с.

81. Ненков, П.Х. Двухциклическое культивирование холерных вибрионов в ферментере / П.Х. Ненков, И.И. Страшимиров, А.Ч. Поликар // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 1986. – № 7. – С. 21-24.

82. Никиян, А.Н. Успехи и перспективы развития атомно+силовой микроскопии / А.Н. Никиян, Е.Б. Татлыбаева // Вестник ОГУ. – 2014. – №6. – С. 112-119.
83. Олсуфьев, Н.Г. Таксономия, микробиология и лабораторная диагностика возбудителя туляремии / Н.Г. Олсуфьев – М.: Медицина, 1975. – 190 с.
84. Олюнина, Л.Н. Оценка терморезистентности *Azotobacter chroococcum* методом атомно-силовой микроскопии / Л.Н. Олюнина, Ю.А. Мацкова, Т.А. Гончарова, Ю.Ю. Гущина // Прикладная биохимия и микробиология. – 2009. – Т. 45, №1. – С. 45-50.
85. Онищенко, Г.Г. Сибирская язва: Актуальные аспекты микробиологии, эпидемиологии, клиники, диагностики, лечения и профилактики / Г.Г. Онищенко, Н.Т. Васильев, Н.В. Литусов [и др.] – М.: ВУНМЦ МЗ РФ, 1999. – 448 с.
86. Основные требования к вакцинным штаммам туляремиального микроба: Методические указания МУ 3.3.1.2161-07. – М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2007. – 51 с.
87. ОФС.1.7.1.0018.18 Иммунобиологические лекарственные препараты. Общая фармакопейная статья / Государственная Фармакопея XIV издание (Том II). – М.: ФЭМБ. – 2018. – С. 2716-2728.
88. ОФС.1.7.2.0022.15 Определение подлинности и чистоты иммунобиологических лекарственных препаратов методом вестерн-блот. Общая фармакопейная статья / Государственная фармакопея Российской Федерации XIII издание (Том II). – М.: ФЭМБ. – 2015. – С. 323-334.
89. Павлий, С.А. Характеристика бактериофагов азоспирилл и применение методов электрофизического анализа для их иммунодетекции и исследования взаимодействия с бактериальными клетками: 03.02.03, 03.01.06: автореф. дис. канд. биол. наук / Павлий Сергей Александрович. – Саратов, 2016. – 25 с.
90. Павлов, В.М. Молекулярно-генетические исследования бактерий рода *Francisella* и их прикладное значение / В.М. Павлов, И.А. Дятлов – М.: ООО «ТиРу», 2012. – 267 с.
91. Павлович, Н.В. Прозрачная питательная среда для культивирования *Francisella tularensis* / Н.В. Павлович, Б.Н. Мишанькин // Антибиотики и медицинская биотехнология. – 1987. – Вып. 32(2). – С. 133-137.
92. Пашовкин, Т.Н. Применение ультразвуковой стоячей волны в биологических исследованиях и клеточных технологиях / Т.Н. Пашовкин, Д.Г. Садикова, М.С.

Пашовкина, Г.В. Шильников // Клеточные технологии в биологии и медицине. – 2007. – № 3. – С. 133-138.

93. Пиков, А.В. Оценка методов концентрирования клеток *Brucella melitensis* REV-1 для получения полуфабрикатов противобруцеллезной вакцины / А.В. Пиков // Ветеринарная медицина. – 2009. – № 1-2. – С. 14-16.

94. Пиков, А.В. Оценка различных фильтрующих модулей в технологии мембранного концентрирования нативных культур клеток *Brucella melitensis* REV-1 для получения полуфабриката противобруцеллезной вакцины / А.В. Пиков // Ветеринарная медицина. – 2009. – № 4. – С. 4-6.

95. Пиков, А.В. Разработка технологии концентрирования глубинной культуры вакцинного штамма *Brucella melitensis* Rev-1 для приготовления живой сухой вакцины против бруцеллеза овец и коз: 03.01.06: автореф. дис. канд. биол. наук / Пиков Александр Васильевич. – Щелково, 2012. – 25 с.

96. Похиленко, В.Д. Методы длительного хранения коллекционных культур микроорганизмов и тенденции развития / В.Д. Похиленко, А.М. Баранов, К. В. Детушев // Известия высших учебных заведений. Поволжский регион. – 2009. – № 4(12). – С. 99-118.

97. Рыбальченко, О.В. Морфо-физиологические аспекты взаимодействий микроорганизмов в микробных сообществах: 03.00.23: автореф. дис. докт. биол. наук / Рыбальченко Оксана Владимировна. – Санкт-Петербург, 2010. – 40 с.

98. Садикова, Д.Г. Действие сил на клетки в суспензии в поле стоячей ультразвуковой волны: 03.00.02: автореф. дис. канд. физ.-мат. наук / Садикова Диана Габдельфартовна. – Пушино, 2009. – 25 с.

99. Садикова, Д.Г. Динамики концентрирования клеток в поле стоячей ультразвуковой волны / Д.Г. Садикова, А.Л. Андреев, А.Л. Шкидченко, Т.Н. Пашовкин // Биомедицинские технологии и радиоэлектроника. – 2006. – № 8-9. – С.95-99.

100. Саяпина, Л.В. Современное состояние вакцинопрофилактики особо опасных инфекций / Л.В. Саяпина, В.П. Бондарев, Ю.В. Олефир // Проблемы особо опасных инфекций. – 2016. – Вып. 2. – С. 107-110.

101. Сливкин, Д.А. Хитозан для фармации и медицины / Д.А. Сливкин, В.Л. Лапенко, О.А. Сафонова // Вестник ВГУ, серия: химия, биология, фармация. – 2011. – № 2. – С. 214-232.

102. Соколова, Т.В. Создание и изучение поливакцины, состоящей из антигенных комплексов *S. flexneri* 1b и 2a: 03.00.07: автореф. дис. канд. мед. наук / Соколова Татьяна Васильевна. – М., 1995. – 23 с.

103. СП 1.3.2322-08 Безопасность работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней. Санитарно-эпидемиологические правила. – М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2009. – 20 с.

104. СП 1.3.3118-13 Безопасность работы с микроорганизмами I-II групп патогенности (опасности). Санитарно-эпидемиологические правила. – М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2014. – 195 с.

105. СП 2.2.1.3218-14 Санитарно-эпидемиологические требования к устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев). Санитарно-эпидемиологические правила // Бюллетень нормативных и методических документов Госсанэпиднадзора. – 2015. – Вып. 2(60). – С. 3-15.

106. СП 3.3.2.3332-16 Условия транспортирования и хранения иммунологических лекарственных препаратов. Санитарно-эпидемиологические правила. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.garant.ru/products/ipo/prime/doc/71290168/#ixzz4Vovb4kjm> (дата обращения 15.01.2017).

107. Сухова, М.А. Конструирование и изучение свойств вариантов штамма *Francisella tularensis* 15 НИИЭГ со сниженной экспрессией гена *sodB*, кодирующего Fe-супероксиддисмутазу / М.А. Сухова, Г.М. Вахрамеева, Г.Е. Кравченко [и др.] // Биотехнология. – 2015. – № 6. – С. 16-27.

108. Тажибаева, С.М. Влияние катионных полиэлектролитов на устойчивость биодисперсий / С.М. Тажибаева, К.Б. Мусабеков, К.Б. Коржынбаева [и др.] // Известия Национальной Академии наук Республики Казахстан. – 2013. – № 5(401). – С. 64-69.

109. Татомир, Л.Г. Материалы по изучению туляремийной вакцины, изготовленной методом встряхивания культур *B. Tularensis*: автореф. дис. канд. мед. наук / Татомир Л.Г. – Одесса, 1963. – 16 с.

110. Трифан, В.Н. Технология изготовления ассоциированной вакцины для профилактики сибирской язвы и некробактериоза животных и оценка эффективности ее применения: 03.01.06: автореф. дис. канд. биол. наук / Трифан Валерий Никандрович. – Щелково, 2016. – 28 с.

111. Ульянов, А.Ю. Совершенствование производства вакцины холерной бивалентной химической таблетированной: 03.01.06, 03.02.03: дис. канд. биол. наук / Ульянов Александр Юрьевич. – Саратов, 2011. – 140 с.
112. Унгурияну, Т.Н. Корреляционный анализ с использованием пакета статистических программ СТАТА / Т.Н. Унгурияну, А.М. Гржибовский // Экология человека. – 2014. – № 9. – С. 60-64.
113. Уткин, Д.В. Разработка методических подходов изучения возбудителей особо опасных инфекционных болезней методом атомно-силовой микроскопии / Д.В. Уткин, О.С. Кузнецов, П.С. Ерохин [и др.] // Проблемы особо опасных инфекций. – 2012. – Вып. 112. – С.62-64.
114. Фирстова, В.В. Влияние степени воспаления у мышей линии balb/c, индуцированного разными дозами *F. tularensis* 15 НИИЭГ, на формирование антитуляремийного клеточного и гуморального иммунного ответа / В.В. Фирстова, В.М. Павлов, А.А. Горбатов [и др.] // Иммунология. – 2014. – № 35 (3). – С. 147-150.
115. Фролова, М.А. Промышленные технологии производства биологически активных веществ из сырья природного происхождения: 03.01.06: автореф. дис. докт. биол. наук / Фролова Марина Алексеевна. – Щелково, 2012. – 51 с.
116. ФС.3.3.1.0019.15 Вакцина туляремийная живая. Фармакопейная статья / Государственная фармакопея Российской Федерации XIII издание (Том III). – М.: ФЭМБ, 2015. – С. 952-957.
117. Хабаров, А.К. Разработка процесса хеMOSTатного культивирования пастерелл при производстве вакцин: 03.00.23, 16.00.03: автореф. дис. канд. биол. наук / Хабаров Александр Константинович. – Щелково, 2005. – 21 с.
118. Хлебников, В.С. Изучение биохимических, антигенных и протективных свойств внешней мембраны возбудителя туляремии / В.С. Хлебников, И.Р. Головлев, Д.П. Кулевацкий [и др.] // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. – 1991. – №7. – С. 15-20.
119. Цинберг, М.Б. Ростовые и морфологические характеристики производственных штаммов *Bifidobacterium* и *Lactobacillus* при использовании для их культивирования гидролизатно-молочной и гидролизатно-соевой питательных сред / М.Б. Цинберг, Д.Г. Дерябин, И.В. Денисова, А.Н. Никиян // Антибиотики и химиотерапия. – 2003. – Т. 48, №12. – С. 9-13.
120. Чандлер, Д. Оптическая и электронная микроскопия в медицине и биологии / Д. Чандлер, Р. Робертсон – М.: Интеллект, 2009. – 234 с.

121. Шибалова, Н.М. Выделение и концентрирование кормовых дрожжей с помощью поверхностно-активных веществ: 05.21.04: автореф. дис. канд. техн. наук / Шибалова Надежда Михайловна. – Свердловск, 1984. – 25 с.

122. Шевцов, А.Н. Способ получения сибирезвездного протективного антигена / А.Н. Шевцов, В.С. Лобастов, Д.В. Боровской [и др.] // Патент РФ № 2340356, МПК А61К39/07; 10.08.2006.

123. Шепелев, И.А. Оптимизация условий масштабируемого культивирования туляремийного микроба в технологиях получения протективных антигенов: 03.00.07: автореф. дис. канд. биол. наук / Шепелев Иван Анатольевич. – Саратов, 2005. – 25 с.

124. Шепелев, И.А. Оценка биокинетических и морфометрических показателей роста туляремийного микроба в процессе оптимизации получения клеточной массы / И.А. Шепелев, И.А. Дятлов, О.А. Волох [и др.] // Проблемы особо опасных инфекций. – 2003. – Вып 85. – С. 157-163.

125. Шепелев, И.А. Способ получения биомассы туляремийного микроба / И.А. Шепелев, О.А. Волох, С.А. Еремин [и др.] // Патент РФ № 2451743, МПК С12N 1/20; 26.07.2010.

126. Эпидемиологический надзор за туляремией: Методические указания МУ 3.1.2007-05. – М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2005. – 59 с.

127. Яминский, И.В. Различия в клеточной поверхности гибридных бактерий *Escherichia coli* K12, наследующих *rfb* α 3,4 ген *Shigella flexneri*, выявляемые с помощью атомно-силовой микроскопии / И.В. Яминский, В.В. Демин, В.М. Бондаренко // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 1997. – № 6. – С. 15-18.

128. Aloni-Grinstein, R. Isolation of *Francisella tularensis* and *Yersinia pestis* from Blood Cultures by Plasma Purification and Immunomagnetic Separation Accelerates Antibiotic Susceptibility Determination / R. Aloni-Grinstein, O. Schuster, S. Yitzhaki [et al.] // Frontiers in Microbiology. – 2017. – № 8. – P. 312.

129. Barry, E.M. Vaccine against tularemia / E.M. Barry, L.E. Cole, A.E. Santiago // Human Vaccines and Immunotherapeutics. – 2009. – Vol. 5(12). – P. 832-838.

130. Bhatnagar, B.S. Study of the individual contributions of ice formation and freeze-concentration on isothermal stability of lactate dehydrogenase during freezing / B.S. Bhatnagar, M.J. Pikal, R.H. Bogner // Journal of Pharmaceutical Sciences. – 2008. – Vol. 97. – P. 798-814.

131. BIOSTAT Cplus [Electronic resource]. – Режим доступа: http://www.sartogsm.ru/biostat_c_plus.html (дата обращения 12.03.2017).
132. Bunin, V.D. Electro-optical analysis of the *Escherichia coli*-phage interaction [Text] / V.D. Bunin, O.V. Ignatov, O.I. Guliy [et al.] // Analytical Biochemistry. – 2004. – Vol. 328. – P. 181-186.
133. Chada, V.G.R. Morphogenesis of Bacillus Spore Surfaces / V.G.R. Chada, E.A. Sanstad, R. Wang, A. Driks // Journal of Bacteriology. – 2003. – Vol. 185(21). – P. 6255-6561.
134. Chamberlain, R.E. Evaluation of live tularemia vaccine prepared in chemical defined medium / R.E. Chamberlain // Journal of Applied Microbiology. – 1965. – № 13. – P. 232-235.
135. Cochran, T. Ice nucleation temperature influences recovery of activity of a model protein after freeze drying / T. Cochran, S.L. Nail // Journal of Pharmaceutical Sciences. – 2009. – Vol. 98. – P. 3495-3498.
136. Colandene, J.D. Lyophilization cycle development for a high-concentration monoclonal antibody formulation lacking a crystalline bulking agent / J.D. Colandene, L.M. Maldonado, A.T. Creagh [et al.] // Journal of Pharmaceutical Sciences. – 2007. – Vol. 96. – P. 1598-1608.
137. Conlan, J.W. Vaccines against *Francisella tularensis* / J.W. Conlan, P.C.F. Oyston // Annals of the New York Academy of Sciences. – 2007. – № 1105. – P. 325-350.
138. Constantino, H.R. Lyophilization of Biopharmaceuticals / H.R. Constantino, M.J. Pikal – Arlington, VA, USA: AAPS Press, 2004. – 686 p.
139. Coulter, W.H. High speed automatic blood cell counter and cell size analyzer / W.H. Coulter // Proceedings of the Institution of Electrical Engineers. – 1957. – Vol. 12. – P. 1034-1042.
140. Coulter, W.H. Means for counting particles suspended in a fluid / W.H. Coulter // Patent USA № 2656508 A, G01N15/12; 27.09.1949.
141. Forslund, A.L. Direct repeat-mediated deletion of a type IV pilin gene results in major virulence attenuation of *Francisella tularensis* / A.L. Forslund., K. Kuoppa, K. Svensson [et al.] // Molecular Microbiology. – 2006. – № 59. – P. 1818-1830.
142. Francis, E. The amino-acid cistine in the cultivation of tularence / E. Francis // Public Health Reports. – 1923. – Vol. 38(3). – P.324-327.

143. Franks, F. Freeze-drying of bioproducts: putting principles into practice / F. Franks // *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. – 1998. – Vol. 45. – P. 221-229.

144. Franks, F. *Freeze-Drying of Pharmaceuticals and Biopharmaceutics* / F. Franks, T. Auffret – Cambridge, UK: RSCPublishing, 2007. – 220 p.

145. Gaspar, A.J. New solid medium for enhanced growth of *Pasterella tularensis* / A.J. Gaspar, H.B. Tresselt, M.K. Ward // *Journal of Bacteriology*. – 1961. – № 82. – P. 564-569.

146. Guliy, O.I. Electrooptical analysis as sensing system for detection and diagnostics bacterial cells / O.I. Guliy, V.D. Bunin // In book: *Biointerface engineering: prospects in medical diagnostics and drug delivery* – 2020. – Springer., Chapter 11. – P. 233-254.

147. Heller, M.C. Protein formulation and lyophilization cycle design: prevention of damage due to freezeconcentration induced phase separation / M.C. Heller, J.F. Carpenter, T.W. Randolph // *Biotechnology and Bioengineering*. – 1999. – Vol. 63. – P. 166-174.

148. Ignatov, S.G. Bacteria detection – biosensors / S.G. Ignatov, A.G. Voloshin, S.Yu. Filippovich, R.D. Walt // In book: *Sensors for Environment, Health and Security* – Springer Science + Business Media B.V., 2009. – P. 267-276.

149. Jang, H. Improved Purification Process for Cholera Toxin and its Application to the Quantification of Residual Toxin in Cholera Vaccines / H. Jang, S.K. Hyo, A.K. Jeong // *Journal of Microbiology and Biotechnology*. – 2009. – Vol. 19(1). – P. 108-112.

150. Junne, S. Electrooptical monitoring of cell polarizability and cell size in aerobic *Escherichia coli* batch cultivations / S. Junne, M.N. Cruz-Bournazou, A. Angersbach, P. Gotz // *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. – 2010. – Vol. 37. – P. 935-942.

151. Kundu, S. On the change in bacterial size and magnetosome features for *Magnetospirillum magnetotacticum* (MS-1) under high concentrations of zinc and nickel / S. Kundu, A.A. Kale, A.G. Banpurkar [et al.] // *Biomaterials*. – 2009. – Vol. 30(25). – P. 4211-4218.

152. Laemmli U.K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4 // *Nature*. – 1970. – Vol. 227. – P.680-685.

153. Luthra, S. Impact of critical process and formulation parameters affecting in-process stability of lactate dehydrogenase during the secondary drying stage of lyophilization: A mini freeze dryer study / S. Luthra, J.-P. Obert, D.S. Kalonia, M.J. Pikal // *Journal of Pharmaceutical Sciences*. – 2007. – Vol. 96. – P. 2242-2250.

154. Marohn, M.E. Live attenuated tularemia vaccines: recent developments and future goals / Marohn M.E., Barry E.M. // *Vaccine*. – 2013. – Vol. 31(35). – P. 3485-3491.
155. Michael, S.T. Comparison of Product Behavior During Lyophilization When Processed in Dual Chamber Cartridges and Tubing Vials [Electronic resource]. – Режим доступа: <http://www.pharmaedresources.com/brochures/2014PhiladelphiaLyophilizationBrochure.pdf> (дата обращения 23.11.2019).
156. Nagle, S.C.Jr. Chemically defined medium for the growth of *Pasteurella tularensis* / S.C.Jr. Nagle, R.E. Anderson, N.D. Gary // *Journal of Bacteriology*. – 1960. – Vol. 79 – P. 566-571.
157. Nikhiwale, S.D. Isolation of *Francisella tularensis* from blood culture / S.D. Nikhiwale, C.S. Gehlot, A.K. Bandi, A.N. Jasani // *Indian Journal of Medical Microbiology*. – 2015. – № 33(2). – P. 329-331.
158. Petersen, J.M. Methods for enhanced culture recovery of *Francisella tularensis* / J.M. Petersen, M.E. Schriefer, K.L. Gage [et al.] // *Applied and Environmental Microbiology*. – 2004. – №70. – P. 3733-3735.
159. Pikal, M.J. The Impact of the Freezing Stage in Lyophilization: Effects of the Ice Nucleation Temperature on Process Design and Product Quality / M.J. Pikal, S. Rambhatla, R. Ramot // *American Pharmaceutical Review*. – 2002. – Vol. 5. – P. 48-53.
160. Reary, B.W. Enhancing recovery of *Francisella tularensis* from blood / B.W. Reary, S.A. Klotz // *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. – 1988. – № 11(2). – P. 117-119.
161. Reed, D.S. Live attenuated mutants of *Francisella tularensis* protect rabbits against aerosol challenge with a virulent type A strain / D.S. Reed, L'K.P. Smith, K.S. Cole [et al.] // *Infection and Immunity*. – 2014. Vol. 2(5). – P. 2098-2105.
162. Rey, L. Freeze Drying/Lyophilization of Pharmaceutical and Biological Products / L. Rey, J.C. May – London: Informa Healthcare, 2010. – 564 p.
163. Searles, J.A. The ice nucleation temperature determines the primary drying rate of lyophilization for samples frozen on a temperature-controlled shelf / J.A. Searles, J.F. Carpenter, T.W. Randolph // *Journal of Pharmaceutical Sciences*. – 2001. – Vol. 90. – P. 860-871.
164. Simşek, H. Identification of *Francisella tularensis* by both culture and real-time TaqMan PCR methods from environmental water specimens in outbreak areas where tularemia cases were not previously reported / H. Simşek, M. Taner, A. Karadenizli [et al.] //

European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. – 2012. – № 31(9). – P. 2353-2357.

165. Tang X., Measurement of the Kinetics of Protein Unfolding in Viscous Systems and Implications for Protein Stability in Freeze-Drying / X. Tang, M.J. Pikal // *Pharmaceutical Research*. – 2005. – Vol. 22. – P. 1176-1185.

166. Tang, X. Design of Freeze-Drying Processes for Pharmaceuticals: Practical Advice / X. Tang, M. Pikal // *Pharmaceutical Research*. – 2004. – Vol. 21. – P. 191-200.

167. Terui, G. Method for separation of bacteria cells from culture broth / G. Terui, N. Takada, S. Sawada // Patent USA № 4105804 A, C12N1/02; 19.03.1976.

168. Towbin, H. Electrophoretic transfer of proteins from polyacramide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications / H. Towbin, T. Stracbelin, J. Gordon // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 1979. – Vol. 76. – P. 4350-4354.

169. Vadillo-Rodriguez, V. Surface viscoelasticity of individual gram-negative bacterial cells measured using atomic force microscopy / V. Vadillo-Rodriguez, T.J. Beveridge, J.R. Dutcher // *Journal of Bacteriology*. – 2008. – Vol. 190(12). – P. 4225-4232.

170. Vivaflow 50/50R/200: Direction for use. – Sartorius Stedium Biotech GmbH. – 2014. – 33 p.

171. WHO Guidelines on Tularemia. World Health Organization. – Geneva, 2007. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://www.cdc.gov/tularemia/resources/whotularemiamanual.pdf> (дата обращения 15.11.2017).

172. Zhivkov, A.M. High frequency electric polarizability of bacteria *E. coli*: dependence on the medium ionic strength / A.M. Zhivkov, A.Y. Gyurova // *Colloids Surf B: Biointerfaces*. – 2008. – Vol. 66(2). – P. 2051-2055.

173. Zimmermann, J. Comparing Lyophilization in Vials and Dual-Chamber Systems // [Electronic resource]. – Режим доступа: <http://www.pharmtech.com/comparing-lyophilization-viali-and-dual-chamber-systems> (дата обращения 07.12.2016).