

# Оценка показателей качества экспериментальных серий вакцины чумной живой, полученных методом глубинного культивирования

А.В.Костроминов, С.Е.Гостищева, Н.В.Абзаева, Г.Ф.Иванова, А.А.Фисун, М.А.Иванова

ФКУЗ «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора, Ставрополь, Российская Федерация

Проведены исследования экспериментальных серий препарата вакцины чумной живой, полученных методом глубинного культивирования, на предмет соответствия основным показателям качества, а также оценка стабильности в течение срока годности (3 года). В работе использовали жидкую питательную среду на основе панкреатического гидролизата казеина и пептона сухого ферментативного с добавлением аммония молибденовокислого в качестве ростостимулирующей добавки. Получено 10 экспериментальных серий препарата, при этом среднее содержание живых микробных клеток составило 39,2%, срок термостабильности – 9,2 суток, потери в массе при высушивании – 1,8%. Анализ стабильности показателей при хранении показал, что через год доля живых микробных клеток снизилась на 1,1–1,8%, через два года – на 2,5%, через три – на 3,6%. Проведенные исследования показали, что экспериментальные серии вакцины чумной живой, полученные методом глубинного культивирования, соответствуют требованиям нормативной документации и остаются стабильными в течение регламентированного срока годности (3 года).  
*Ключевые слова:* глубинное культивирование, параметры биомассы, вакцина чумная живая, количество живых микробных клеток, стабильность, иммуногенность

**Для цитирования:** Костроминов А.В., Гостищева С.Е., Абзаева Н.В., Иванова Г.Ф., Фисун А.А., Иванова М.А. Оценка показателей качества экспериментальных серий вакцины чумной живой, полученных методом глубинного культивирования. Бактериология. 2024; 9(1): 30–37. DOI: 10.20953/2500-1027-2024-1-30-37

## The analysis of the quality of experimental batches of live plague vaccine obtained by submerged cultivation method

A.V.Kostrominov, S.E.Gostishcheva, N.V.Abzaeva, G.F.Ivanova, A.A.Fisun, M.A.Ivanova

Stavropol Plague Control Research Institute of Rospotrebnadzor, Stavropol, Russian Federation

We did the research of growing biomass of the vaccine strain of the plague microbe *Yersinia pestis* EV using a liquid nutrient medium. We produced experimental batches of the live plague vaccine using the submerged cultivation method and also examined the main quality indicators and stability during the shelf life (3 years). The composition of the liquid nutrient medium included pancreatic casein hydrolyzate and enzymatic dry peptone with ammonium molybdate as a growth-stimulating additive. We received 10 experimental series of the vaccine. The produced series had the following characteristics: average number of living microbial cells – 39.2%, thermal stability period – 9.2 days, weight loss upon drying – 1.8%. An analysis of vaccine stability showed that after a year the number of living microbial cells decreased by 1.1–1.8%, after two years by 2.5%, after three – by 3.6%. The results showed that experimental series of live plague vaccine obtained by submerged cultivation meet the requirements of regulatory documentation and remain stable during shelf life (3 years).  
*Key words:* submerged cultivation, biomass parameters, live plague vaccine, average number of living microbial cells, stability, immunogenicity

**For citation:** Kostrominov A.V., Gostishcheva S.E., Abzaeva N.V., Ivanova G.F., Fisun A.A., Ivanova M.A. The analysis of the quality of experimental batches of live plague vaccine obtained by submerged cultivation method. Bacteriology. 2024; 9(1): 30–37. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2024-1-30-37

### Для корреспонденции:

Костроминов Артём Валерьевич, младший научный сотрудник научно-производственной лаборатории чумных вакцин ФКУЗ «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора

Адрес: 355035, Ставрополь, ул. Советская, 13-15  
Телефон: (865-2) 26-2050  
ORCID: 0000-0003-2228-5038

Статья поступила 25.10.2023, принята к печати 29.03.2024

### For correspondence:

Artem V. Kostrominov, Junior Researcher of the research and production laboratory of plague vaccines Stavropol Plague Control Research Institute of Rospotrebnadzor

Address: 13-15 Sovetskaya str., Stavropol, 355035, Russian Federation  
Phone: (865-2) 26-2050  
ORCID: 0000-0003-2228-5038

The article was received 25.10.2023, accepted for publication 29.03.2024

**И**з всех этапов промышленного биотехнологического производства медицинских иммунобиологических препаратов этап культивирования биомассы является самым значимым, во многом определяющим количественные и качественные характеристики конечного продукта [1].

В случае, когда культура растет на поверхности питательной среды (жидкой или плотной), потребляя содержащиеся в ней субстраты и выделяя в эту среду продукты метаболизма, способ культивирования называют поверхностным. Когда же микроорганизмы распределяются по всему объему жидкой питательной среды, культивирование называют глубинным (жидкофазным) [2].

Преимущество глубинного культивирования заключается в стандартности условий проведения процесса, высокой производительности, возможностях тонкого управления кинетикой роста популяции, изучения основных закономерностей прохождения во времени микробиологических процессов на клеточном уровне. Именно поэтому глубинное культивирование широко применяется в настоящее время в производстве биологических препаратов [3, 4].

Для препарата «Вакцина чумная живая» накопление биомассы проводится поверхностным методом на аппарате культивирования микроорганизмов Шестеренко. В дальнейшем планируется переход на биотехнологию глубинного культивирования биомассы, поэтому одной из задач является поиск и отработка методик, способствующих получению препарата вакцины чумной, соответствующей требованиям нормативной документации.

Для освоения производства коммерческой вакцины в ферментере необходимо отработать параметры биотехнологии глубинного выращивания [5]. С целью поиска альтернативного и эффективного промышленного метода производства вакцины были проведены исследования в области глубинного выращивания биомассы на жидкой питательной среде, получения экспериментальных серий препарата, их контроля по основным показателям качества, оценки стабильности в течение срока годности (3 года).

**Цель исследования** – оценить качественные показатели экспериментальных серий вакцины чумной живой, полученных методом глубинного культивирования.

Для достижения данной цели были поставлены следующие задачи: отработать оптимальные параметры биотехнологии, изучить кинетику популяции микробных клеток, определить основные показатели качества полученных экспериментальных серий вакцины чумной живой, проанализировать данные о стабильности экспериментального препарата в процессе хранения.

## Материалы и методы

### Штаммы

В работе использовали вакцинный штамм *Yersinia pestis* EV линии НИИЭГ из коллекции патогенных микроорганизмов ФКУЗ «Ставропольский противочумный институт» Роспотребнадзора (депонирован в ГКПМ III–IV групп патогенности ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России под №910301). Для испытания по показателю «Специфическая активность: Иммуногенность» использовали вирулентный штамм чумного микроба *Y. pestis* 231 из коллекции патоген-

ных микроорганизмов ФКУЗ «Ставропольский противочумный институт» Роспотребнадзора (инвентарный номер 52).

### Питательные среды

Питательные среды для культивирования изготовлены в лаборатории питательных сред для культивирования микроорганизмов I–IV групп патогенности ФКУЗ «Ставропольский противочумный институт» Роспотребнадзора.

Для контроля препарата использовали агар Хоттингера pH 7,1 ± 0,1 с добавлением натрия сернистоокислого и pH 7,3 ± 0,1.

Для накопления бактериальной массы использовали экспериментальную питательную среду следующего состава:

панкреатический гидролизат казеина	89,0 мл
пептон сухой ферментативный	20,0 г
натрий хлористый	5,0 г
натрий фосфорнокислый	
двузамещенный 12-водный	4,0 г
аммоний молибденовоокислый 4-водный	0,5 г
дистиллированная вода	до 1 л

### Получение экспериментальных серий препарата

Выращивание проводили в биореакторе BIOSTAT A (SARTORIUS, Германия) объемом 5 л с автоматической регулировкой мешалки. Для засева использовали посевную культуру, изготовленную путем последовательных пересевов на этапах I, II и III генерации вакцинного штамма согласно Промышленному регламенту на производство вакцины чумной живой ПР 01897080-09-16, при этом посевная доза подбиралась так, чтобы концентрация клеток в ферментере была не менее 20•10<sup>6</sup> м.к./мл питательной среды. Культивировали 16–18 ч при 27 ± 1°C, непрерывной аэрации, подкормке 40%-м раствором глюкозы. pH поддерживали на уровне 7,0–7,4 [6]. Через 10 ч выращивания и в последующем каждые 2 ч отбирали пробы для определения количества микробных клеток. При наступлении стационарной фазы (прекращение нарастания оптической концентрации взвеси и сохранение pH на одном уровне) процесс культивирования останавливали.

Вакцину взвесь осаждали, отбирали осадок и разводили его средой высушивания до концентрации (70–80)•10<sup>9</sup> м.к./мл. Разливали в ампулы по 2 мл, лиофилизировали и герметизировали. Всего было получено 10 экспериментальных серий препарата по 300 ампул каждая.

**Определение общей концентрации микробных клеток** проводили визуальным методом с помощью отраслевой стандартный образец (ОСО) мутности бактериальных взвесей 42-28-85-соответствующего года выпуска (10 МЕ).

Вакцину восстанавливали 1,8 мл 0,9%-го раствора натрия хлорида. В стандартную пробирку вносили 0,1 мл восстановленного препарата и добавляли 0,9%-й раствор натрия хлорида до достижения концентрации ОСО мутности бактериальных взвесей.

Концентрацию микробных клеток (ОК) определяли по формуле:

$$OK = \frac{((0,1+V) \times 10^9)}{0,1}, \quad (1)$$

где:

0,1 – объем испытуемого образца, мл;

V – объем 0,9%-го раствора натрия хлорида, использованный при разведении пробы, мл;

$1 \cdot 10^9$  – концентрация чумного микроба, соответствующая ОСО мутности бактериальных взвесей 42-28-85-соответствующего года выпуска (10 ME).

Концентрацию живых микробных клеток в вакцине определяли бактериологическим методом согласно НД ЛСР-005759/08-231120 на вакцину чумную живую, лиофилизат для приготовления суспензии для инъекций, накожного скарификационного нанесения и ингаляций.

Процент содержания живых микробных клеток в препарате вычисляли для каждого образца путем посева на чашки с питательным агаром. Для этого делали последовательные десятикратные разведения 0,9%-м раствором натрия хлорида от  $10^{-1}$  (к 0,5 мл микробной взвеси добавляли 4,5 мл 0,9%-го раствора натрия хлорида) до  $10^{-8}$ . Из двух последних пробирок с разведением  $10^{-7}$  и  $10^{-8}$  высевали пипеткой соответственно по 0,1 мл взвеси на 3 чашки с агаром. Учет результатов проводили через  $48 \pm 2$  ч выдерживания посевов при температуре  $27 \pm 1^\circ\text{C}$ .

Концентрацию живых микробных клеток (% живых м.к.) вычисляли для каждого образца отдельно по формуле:

$$\% \text{ живых м.к.} = \frac{\text{БК} \times 100\%}{\text{ОК}} \quad (2)$$

где:

БК – количество живых микробных клеток в 1 мл;

ОК – общая концентрация.

Значение концентрации живых микробных клеток в серии вакцины приравнивали к среднему арифметическому значению трех образцов, которое должно составлять не менее 25% от общего количества.

#### Определение термостабильности

Показатель термостабильности должен составлять не менее 4 суток, рассчитывали по формуле:

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

где t – показатель термостабильности в сутках;

$\lg A_0$  – логарифм первоначального числа живых микробных клеток в 1 мл;

$\lg A_n$  – логарифм числа живых микробных клеток в 1 мл через 14 суток 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 сутках.

#### Определение потери в массе при высушивании

Потерю в массе при высушивании определяли гравиметрическим методом согласно ОФС.1.2.1.0010.15 ГФ XIII. Показатель не должен превышать 4%.

#### Определение иммуногенности

Имуногенность полученных серий вакцины чумной живой определяли в соответствии с методикой, изложенной

в НД ЛСР-005759/08-231120 на вакцину чумную живую, лиофилизат для приготовления суспензии для инъекций, накожного скарификационного нанесения и ингаляций. Морских свинок и мышей иммунизировали дозами  $8 \cdot 10^2$ ,  $4 \cdot 10^3$ ,  $2 \cdot 10^4$  и  $1 \cdot 10^5$  живых микробных клеток. Морским свинкам вакцину вводили подкожно в объеме 0,5 мл, мышам – в объеме 0,2 мл. Заражение животных проводили на 21-е сутки после вакцинации, вводя подкожно 200 Dcl вирулентных микробов штамма *Y. pestis* 321. Контрольным животным вводили по 1 Dcl вирулентного штамма. Наблюдение за животными вели в течение 21 суток со дня заражения.

Имуногенность вакцин оценивали по методу Кербера в модификации И.П.Ашмарина и А.А.Воробьева (1962) и выражали показателем  $ED_{50}$ , рассчитанным по формуле:

$$\lg ED_{50} = \lg Dn - \delta (\sum Li - 0,5), \quad (4)$$

где Dn – максимальная из используемых доз;

$\delta$  – логарифм кратности использованных разведений;

Li – отношение числа животных, выживших после заражения данной дозой, к общему числу животных, которым эта доза была введена;

0,5 – постоянный коэффициент при сравнении.

$ED_{50}$  – для морских свинок не должна превышать  $1 \cdot 10^4$ , для белых мышей –  $4 \cdot 10^4$  живых микробных клеток.

#### Лабораторные животные

В опытах (иммунизация, заражение) использованы аутбредные белые мыши массой 18–20 г и морские свинки породы агути массой 250–300 г. В опыт брали животных после 5–10-дневного карантина. В процессе содержания животных поддерживали рекомендуемый режим питания согласно приказу МЗ СССР №1179 (1983). Работа с животными проводилась в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных», СП 3.3686-21, «Руководством по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских целях» (2010), Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых в экспериментах и других научных целях (Страсбург, 1986). Количество животных для экспериментов брали с учетом получения статистически достоверных результатов.

#### Статистическая обработка материала

Статистическую обработку полученных данных осуществляли с использованием стандартного пакета компьютерных программ Microsoft Excel. Определяли основные характеристики описательной статистики: среднее ( $M$ ), ошибку среднего ( $m$ ).

Достоверность различия средних рассчитывали по критерию Стьюдента ( $t$ ) для коэффициентов вариации, уровень значимости  $p$  выбран  $< 0,05$ .

При сопоставлении результатов разницу считали достоверной, если максимальное значение доверительного интервала одной сравниваемой величины было меньше минимального значения другой.

## Результаты и обсуждение

В ряде наших экспериментов наиболее перспективной для глубинного культивирования вакцины чумной живой

Таблица 1. Накопление биомассы *Y. pestis* EV при глубинном культивировании  
 Table 1. Accumulation of *Y. pestis* EV biomass during submerged cultivation

Параметры биомассы / Biomass parameters	исх. / ref.	Возраст культуры, ч / Culture age, h					
		10	12	14	16	18	20
Общая концентрация микробных клеток, млн/мл / Total concentration of microbial cells, million m.c./ml	20,0 ± 1,1	58,0 ± 3,4	400,0 ± 7,8	2100,0 ± 12,1	9920,0 ± 11,2	11000,0 ± 6,7	10800,0 ± 13,4
Концентрация живых микробных клеток, млн/мл / Concentration of living microbial cells, million m.c./ml	19,9 ± 3,3	55,4 ± 2,7	359,6 ± 5,7	1730,4 ± 13,6	6596,8 ± 10,4	6611,0 ± 8,2	6393,6 ± 11,7
Доля живых микробных клеток, % / Proportion of living microbial cells, %	99,7 ± 2,1	95,6 ± 3,3	89,9 ± 6,6	82,4 ± 11,0	66,5 ± 9,2	60,1 ± 5,4	59,2 ± 11,5

Таблица 2. Основные показатели качества экспериментальных серий вакцины чумной живой, полученной глубинным методом культивирования  
 Table 2. Main quality indicators of experimental batches of live plague vaccine obtained by submerged cultivation

Серия / Series	Показатели качества / Quality indicators			
	Концентрация микробных клеток, млрд/мл / Microbial cell concentration, billion/ml	Содержание живых микробных клеток / Content of living microbial cells, %	Термостабильность, сутки / Thermal stability, day	Потеря в массе при высушивании / Weight loss on drying, %
1	50	27,8 ± 2,2	14,1	0,9
2	50	39,9 ± 1,4	6,4	1,5
3	55	56,6 ± 3,1	9,8	2,3
4	50	41,0 ± 2,3	9,4	1,3
5	50	43,6 ± 1,1	8,0	2,2
6	55	38,4 ± 3,2	7,4	1,8
7	50	42,1 ± 0,9	9,4	2,0
8	55	34,1 ± 2,2	13,0	1,4
9	50	33,8 ± 2,4	6,6	2,4
10	50	34,6 ± 3,7	7,8	2,2
<i>M ± m</i>	51,5 ± 0,8	39,2 ± 2,6	9,2 ± 0,9	1,8 ± 0,2

Таблица 3. Оценка количества живых микробных клеток в экспериментальных сериях вакцины чумной живой на разных сроках хранения препарата при температуре 4 ± 2°C  
 Table 3. The assessment of number of living microbial cells in experimental batches of live plague vaccine in different periods of the drug storage at temperature of 4 ± 2°C

Серии / № Series	На дату выпуска / As of release date	Содержание живых микробных клеток / Content of living microbial cells, %		
		Срок хранения / Shelf life		
		1 год / 1 year	2 года / 2 years	3 года / 3 years
Экспериментальная вакцина				
1	27,8 ± 2,2	26,7 ± 2,2	26,4 ± 1,1	25,8 ± 3,8
2	39,9 ± 1,4	38,9 ± 1,6	37,3 ± 2,4	35,8 ± 0,2
3	56,6 ± 3,1	55,3 ± 3,1	53,1 ± 2,2	51,7 ± 3,4
<i>M ± m</i> (1–3)	41,4 ± 10,2	40,3 ± 10,5	38,9 ± 9,5	37,8 ± 9,2
4	41,0 ± 2,3	38,5 ± 3,0	-	-
5	43,6 ± 1,1	42,2 ± 2,3	-	-
6	38,4 ± 3,2	36,3 ± 2,4	-	-
7	42,1 ± 0,9	40,8 ± 3,0	-	-
8	34,1 ± 2,2	33,4 ± 2,5	-	-
9	33,8 ± 2,4	31,5 ± 2,5	-	-
10	34,6 ± 3,7	32,4 ± 3,7	-	-
<i>M ± m</i> (4–10)	38,23 ± 1,7	36,4 ± 1,7	-	-

В связи с более поздним сроком изготовления серии 4–10 исследованы только через 1 год хранения. / Due to the later date of manufacture, series 4-10 were investigated only after 1 year of storage.

Таблица 4. Оценка показателя иммуногенности экспериментальных серий вакцины чумной для морских свинок  
 Table 4. The assessment of the immunogenicity index of experimental batches of plague vaccine with guinea pigs

Доза иммунизации (ж.м.к.) / Immunization dose (l.m.c.)	Количество животных в опыте / Number of animals in the experiment	Количество выживших животных / Number of surviving animals	Патологоанатомическая картина / Pathological picture	Бактериологическое исследование / Bacteriological study
800	6	2	У всех павших животных наличие патологоанатомических изменений, характерных для чумы / All dead animals had pathological changes characteristic of plague	В посевах органов павших животных – рост чумного микроба / In crops of organs of dead animals, there is growth of the plague microbe
4000	6	3		
20 000	6	4		
100 000	6	6		
Контроль / Control 1 DCL	6	0		

$\lg ED_{50} = \lg 92400 - 0,699(2,5 - 0,5) = 4,9657 - 0,699 \times 1,5 = 4,9657 - 1,0485 = 3,9172$   
 $ED_{50} = 3696$  живых м.к. / live m.c.

Таблица 5. Оценка показателя иммуногенности экспериментальных серий вакцины чумной для белых мышей  
 Table 5. The assessment of the immunogenicity index of experimental batches of plague vaccine with white mice

Доза иммунизации (ж.м.к.) / Immunization dose (l.m.c.)	Количество животных в опыте / Number of animals in the experiment	Количество выживших животных / Number of surviving animals	Патологоанатомическая картина / Pathological picture	Бактериологическое исследование / Bacteriological study
800	6	1	У всех павших животных наличие патологоанатомических изменений, характерных для чумы / All dead animals had pathological changes characteristic of plague.	В посевах органов павших животных – рост чумного микроба / In crops of organs of dead animals, there is growth of the plague microbe.
4000	6	4		
20 000	6	3		
100 000	6	4		
Контроль / Control 1 DCL	5	0		

$\lg ED_{50} = \lg 92400 - 0,699(2,01 - 0,5) = 4,9657 - 0,699 \times 1,51 = 4,9657 - 1,0555 = 3,9102$   
 $ED_{50} = 8132$  живых м.к. / live m.c.

признана среда на основе панкреатического гидролизата казеина с пептоном сухим ферментативным. В качестве ростостимулирующей добавки использовался аммоний молибденовокислый [7–9].

Дальнейшие исследования были направлены на изготовление и изучение экспериментальных серий препарата. С целью отработки биотехнологии производства препарата вакцины чумной живой методом глубинного культивирования было изготовлено 10 экспериментальных серий.

Известна технология глубинного культивирования для изготовления препарата вакцины чумной живой [10, 11]. Для оптимизации биотехнологического процесса культивирования биомассы на разработанной питательной среде были скорректированы параметры биотехнологии. Через 2 ч после засева реактора включали барботирование, аэрацию осуществляли в объеме 0,5–0,8 м<sup>3</sup>/ч. Перемешивание осуществлялось в автоматическом режиме периодически на скорости 200–250 об./мин. Культивировали 16–20 ч при 27°C и непрерывной аэрации. Через 10 ч выращивания и последующие каждые 2 ч отбирали пробы для определения количества микробных клеток. При наступлении стационарной фазы процесс культивирования останавливали.

На этапе культивирования вакцинного штамма важное значение имеет информация о физиологическом состоянии культуры микроорганизмов, в частности общее количество микробных клеток и количество живых микробных клеток [12]. Определение этих показателей позволяет точно определить время наступления стационарной фазы и прекращения процесса культивирования.

В отдельные сроки исследования накопление живых микробных клеток претерпевает различные изменения, зависящие от параметров культивирования (табл. 1). После фазы приспособления, длящейся 6–9 ч, наступает логарифмическая фаза, характеризующаяся максимальным увеличением количества микробных клеток. Так, через 10 ч роста отмечается увеличение количества живых микробных клеток почти в 2,8 раза по сравнению с засеянным. Еще через 2 ч количество живых микробов возрастает до 359,6 млн/мл, а по достижении 18 ч – 6611,0 млн/мл. В следующие 2 ч как общее количество, так и количество живых микробных клеток практически не претерпевают изменений, что говорит об окончании логарифмической фазы и наступлении стационарной.

Очевидно, что в течение логарифмической фазы происходит накопление как общего числа, так и количества жизнеспособных микробных клеток. Однако доля жизнеспособности ближе к наступлению стационарной фазы снижается, особенно при замедлении роста на 16–18 ч культивирования, что не противоречит кинетике роста микроорганизмов [13].

Полученную микробную взвесь выдерживали при 2–8°C не менее 24 ч до полной седиментации. Отбирали осадок, разводили его стабилизатором до концентрации 70–80 млрд м.к./мл, разливали в ампулы по 2 мл и лиофилизировали.

Экспериментальные серии вакцины были проконтролированы согласно спецификации НД ЛСР-005759/08-231120 по показателям качества, а именно: описание, подлинность, время растворения, седиментационная устойчивость, про-



ходимость через иглу, рН, потеря массы при высушивании, средняя масса и отклонение от средней массы, отсутствие посторонних бактерий и грибов, специфическая безопасность, специфическая активность (концентрация микробных клеток и количество живых микробных клеток), термостабильность [14].

На момент выпуска экспериментальных серий вакцины, выращенной глубинным методом, препарат имел следующие параметры (табл. 2).

Показано, что все полученные образцы по основным показателям качества соответствовали нормативной документации.

Средний процент количества живых микробных клеток составил 39,2%, срок термостабильности – 9,2 суток, потери массы при высушивании – 1,8%.

Остальные показатели соответствовали нормам, отраженным в спецификации НД и промышленном регламенте на производство [15].

Срок годности вакцины определяет процесс частичной гибели живых микробных клеток в процессе хранения [16]. Остальные свойства препарата в течение установленного срока годности, который составляет 3 года, практически не претерпевают изменений [17]. Поэтому для изучения стабильности полученных экспериментальных серий, был проведен мониторинг показателя содержания живых микробных клеток во времени (1, 2 и 3 года хранения). Полученные данные представлены в табл. 3.

Анализ результатов показал, что через год количество живых микробных клеток снизилось на 1,1–1,8%, через два года - на 2,5%, через три – на 3,6% (различия статистически не значимы,  $p \leq 0,05$ ). Таким образом, несмотря на некоторое снижение количества живых микробных клеток в препарате, данный показатель оставался в пределах нормы, и ни в одном случае не произошло уменьшения ниже регламентированного уровня (25%).

Проведенные исследования доказывают, что препарат вакцины чумной живой, полученный методом глубинного культивирования, сохраняет стабильность показателя концентрации живых микробных клеток в течение всего срока годности.

Важнейшим критерием качества препарата вакцины чумной живой и одновременно показателем ее эффективности является иммуногенная активность [18–20].

Определение иммуногенности проводили на белых мышах и морских свинках. Животных иммунизировали, через 21 сутки заражали 200 Dcl вирулентного штамма *Y. pestis* 231. Для контрольного заражения неиммунизированных животных использовали дозу в 1 Dcl этого же штамма. Наблюдение за зараженными животными вели в течение 21 суток. Контрольные животные пали от чумы в течение 10 суток после заражения. Органы павших животных исследовали бактериологически, высевая их методом отпечатков на пластинки с агаром Хоттингера рН  $7,1 \pm 0,1$ . Положительным на чуму результатом считали выделение культуры *Y. pestis*. Данные по иммуногенности представлены в табл. 4, 5.

Из приведенных данных видно, что показатель ED<sub>50</sub> в экспериментальных сериях был не выше допустимого, что свидетельствует об иммунологической эффективности экспериментального препарата [21, 22].

Таким образом, проведенные исследования показали, что экспериментальные серии вакцины чумной живой, полученные методом глубинного культивирования на питательной среде на основе панкреатического гидролизата казеина и пептона сухого ферментативного с добавлением аммония молибденовокислого, соответствуют требованиям нормативной документации и остаются стабильными в процессе хранения. Данные разработки показали возможность внедрения биотехнологии производства препарата глубинным методом после проведения работ по масштабированию процесса для возможности перевода его из лабораторного в промышленный.

### **Информация о финансировании**

*Работа выполнена в рамках бюджетного финансирования.*

### **Financial support**

*The work was carried out within the framework of budget funding.*

### **Конфликт интересов**

*Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.*

### **Conflict of interest**

*The authors declare that there is no conflict of interest.*

### **Литература**

1. Еремин СА, Волох ОА, Шепелев ИА, Дальвадянец СМ, Дятлов ИА. Разработка новых технологических схем и масштабирование процессов получения антигенов чумного и туляреминого микробов. Проблемы особо опасных инфекций. 2006;2:58-61.
2. Карпов АА. Масштабирование процессов глубинного культивирования микроорганизмов в биореакторах. Автореф. дисс ... канд. биол. наук. Щелково, 2004.
3. Волох ОА, Шепелёв ИА, Заднова СП, Крепостнова ИМ, Еремин СА. Изучение биокинетических особенностей и оптимизация условий культивирования штаммов холерного вибриона – продуцентов протективных антигенов, перспективных для внедрения в производство. Проблемы особо опасных инфекций. 2008;1(95):52-55. DOI: 10.21055/0370-1069-2008-1(95)-52-55
4. Еремин СА, Алешина ЮА, Комиссаров АВ, Громова ОВ, Васин ЮГ, Никифоров АК, и др. Методы и технологии культивирования холерного вибриона (обзор). Проблемы особо опасных инфекций. 2013;4:95-101. DOI: 10.21055/0370-1069-2013-4-95-101
5. Дудукалова ТН, Гончарова МН, Тинкер АИ, Быкова ЗА, Верховцева ГН, Печникова ИВ, и др. Использование автоматизированной реакторной установки для выращивания штамма ЕВ чумного микроба. Микробиология. Эпидемиология и профилактика инфекционных заболеваний. Часть II. 1971;37-144.
6. Дроздовская ФК, Муравьева НК, Глушко ЛИ, Филиппов АФ. Изменение интенсивности дыхания чумного микроба при глубинном выращивании и в процессе хранения его в высушенном состоянии. Проблемы особо опасных инфекций. 1969;1:186-188.
7. Василенко ЕИ, Курилова АА, Ковтун ЮС, Катунина ЛС. К вопросу о питательных средах для непрерывного культивирования микроорганизмов. Современные технологии в эпидемиологическом надзоре за актуальными инфекциями. Материалы Всероссийской научно-практической конференции. 2016;140-144.
8. Терентьева ЛИ, Аптасарова РА, Орел ЛЛ. Молибденовокислый аммоний как фактор повышения чувствительности жидких питательных сред для диа-

- гностики чумного микроба. Современные аспекты эпиднадзора за особо опасными инфекциями: Тезисы XIII конф. противочумных учреждений Средней Азии и Казахстана. Алма-Ата, 1990;91-93.
9. Абзаева НВ, Катунина ЛС, Иванова ГФ, Гостищева СЕ, Ростовцева ДВ, Костроминов АВ, и др. Питательная среда жидкая для выращивания и сброса биомассы вакцинного штамма чумного микроба *Yersinia pestis* EV. Патент №2745504, дата регистр. 17.07.2020.
10. Тетерин ВВ, Ежов АВ, Бирюков ВВ, Мохов ДА, Багин СВ, Хонин АЗ, и др. Способ получения препарата на основе вакцинного штамма чумного микроба. Патент №0002510825, опубл. 04.10.2014.
11. Ковтун АЛ, Рогожин АЗ, Неprанов ВП, Нестеров ЮЕ, Черкасов НА. Способ получения биомассы чумного микроба. Патент №2102472, опубл. 20.01.1998.
12. Медведев АП, Кошнерова ЛА, Юдашин АМ, Жаков ВМ. Оптимизация глубинного культивирования производственных штаммов сальмонелл в реакторах. Ученые записки УО «Витебская ордена "Знак Почета" государственная академия ветеринарной медицины». 2011;47(1):94-97.
13. Попова ПЮ, Микшис НИ, Тучков ИВ, и др. Базовые методы и универсальные конструкции в создании и усовершенствовании чумных вакцин: практические решения. Современные проблемы эпидемиологии и гигиены. Материалы VII Всерос. науч.-практ. конф. молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора. СПб.: ЭЛБИ-СПб, 2015;173-174.
14. Основные требования к вакцинным штаммам чумного микроба. Методические указания. МУ 3.3.1.1113-02.
15. Нормативная документация НД ЛСР-005759/08-2311020. Вакцина чумная живая (Вакцина для профилактики чумы), лиофилизат для приготовления суспензии для инъекций, накожного scarificationного нанесения и ингаляций. Ставрополь, 2020;21.
16. Тинкер АИ. Выживаемость микробов в производственных сериях чумной вакцины EV, приготовленных на плотных и жидких питательных средах. Проблемы особо опасных инфекций. 1971;4(20):71-76.
17. Файбич ММ. Стабилизация вакцинных препаратов в процессе высушивания и хранения. Успехи микробиологии. 1983;18:193-215.
18. Будыка ДА. Изучение иммуногенности противочумных профилактических препаратов в феномене «переживания». Проблемы особо опасных инфекций. 2001;1(81):128-133.
19. Дальвадянец СМ, Дятлов ИА, Еремин СА, Щуковская ТН, Саяпина ЛВ, Сергеева ГМ, и др. Исследования по иммунизации против чумы. Сообщение 4. Опыт ревакцинации волонтеров «химической» и живой чумной вакцинами. Проблемы особо опасных инфекций. 2006;1(91):57-61.
20. Ефременко АА, Будыка ДА, Абзаева НВ. Иммуногенные свойства экспериментальных серий вакцины чумной живой сухой. Естествознание и гуманизм: сборник научных работ. 2005;2(1):38.
21. Анисимова ТИ. Анализ качества чумной живой сухой вакцины по жизнеспособности и ЕД<sub>50</sub> для морских свинок и белых мышей. Профилактика особо опасных инфекций. Эпизоотология, микробиология и специфика профилактики чумы. 1976;1:84-89.
22. Коновалова ЖА, Атлас АГ, Дубровина ВИ. Некоторые пути оптимизации процесса производства вакцины чумной живой и способы оценки ее иммуногенности. Acta Biomedica Scientifica. 2013;2(2):192-196.
3. Volokh OA, Shepelev IA, Zadnova SP, Krepostnova IM, Yeremin SA. A Study of Biokinetic Peculiarities and Optimization of the Conditions for Culturing *Vibrio cholerae* Strains Overproducing Protective Antigens Suitable for Use in the Production. Problems of Particularly Dangerous Infections. 2008;1(95):52-55. DOI: 10.21055/0370-1069-2008-1(95)-52-55 (In Russian).
4. Eremin SA, Aleshina YuA, Komissarov AV, Gromova OV, Vasin YuG, Nikiforov AK, et al. Methods and Technologies of Cholera *Vibrio* Cultivation (Scientific Review). Problems of Particularly Dangerous Infections. 2013;4:95-101. DOI: 10.21055/0370-1069-2013-4-95-101 (In Russian).
5. Dudukalova TN, Goncharova MN, Tinker AI, Bykova ZA, Verkhovtseva GN, Pechnikova IV, et al. Ispol'zovanie avtomatizirovannoi reaktornoj ustanovki dlya vyrashchivaniya shtamma EV chumnogo mикроба. Mikrobiologiya. Epidemiologiya i profilaktika infektsionnykh zabolovani. Chast' II. 1971;37-144. (In Russian).
6. Drozdovskaya FK, Murav'eva NK, Glushko LI, Filippov AF. Izmenenie intensivnosti dykhaniya chumnogo mикроба pri glubinnom vyrashchivanii i v protsesse khraneniya ego v vysushennom sostoyanii. Problems of Particularly Dangerous Infection. 1969;1:186-88. (In Russian).
7. Vasilenko EI, Kurilova AA, Kovtun YuS, Katunina LS. K voprosu o pitatel'nykh sredakh dlya nepreryvnogo kul'tivirovaniya mikroorganizmov. Sovremennye tekhnologii v epidemiologicheskom nadzore za aktual'nymi infektsiyami. Materialy Vserossiiskoi nauchno-prakticheskoi konferentsii. 2016;140-144. (In Russian).
8. Terent'eva LI, Aptasrova RA, Orel LL. Moliбdenovo-kislyi ammonii kak faktor povysheniya chuvstvitel'nosti zhidkikh pitatel'nykh sred dlya diagnostiki chumnogo mикроба. Sovremennye aspekty epidnadzora za osobo opasnymi infektsiyami: Tezisy. XIII конф. protivochumnykh uchrezhdenii Srednei Azii i Kazakhstana. Alma-Ata, 1990;91-93. (In Russian).
9. Abzaeva NV, Katunina LS, Ivanova GF, Gostishcheva SE, Rostovtseva DV, Kostrominov AV, i dr. Pitatel'naya sreda zhidkaya dlya vyrashchivaniya i sbrosa biomassy vaksinnogo shtamma chumnogo mикроба *Yersinia pestis* EV. Patent №2745504, data registr. 17.07.2020. (In Russian).
10. Teterin VV, Ezhov AV, Biryukov VV, Mokhov DA, Bagin SV, Khonin AZ, et al. Sposob polucheniya preparata na osnove vaksinnogo shtamma chumnogo mикроба. Patent №0002510825, opubl. 04.10.2014. (In Russian).
11. Kovtun AL, Rogozhin AZ, Nepranov VP, Nesterov YuE, Cherkasov NA. Sposob polucheniya biomassy chumnogo mикроба. Patent №2102472, opubl. 20.01.1998. (In Russian).
12. Medvedev AP, Koshnerova LA, Yudasin AM, Zhakov VM. Optimizatsiya glubinnogo kul'tivirovaniya proizvodstvennykh shtammov sal'monell v reaktorah. Transactions of the educational establishment "Vitebsk the Order of 'the Badge of Honor' State Academy of Veterinary Medicine". 2011;47(1):94-97. (In Russian).
13. Popova PYu, Mikshis NI, Tuchkov IV, et al. Bazovye metody i universal'nye konstruktii v sozdanii i usovershenstvovanii chumnykh vaksin: prakticheskie resheniya. Sovremennye problemy epidemiologii i gigieny: materialy VII Vseros. nauch.-prakt. конф. molodykh uchenykh i spetsialistov Rospotrebnadzora. Saint Petersburg: ELBI-SPb, 2015;173-174. (In Russian).
14. Osnovnye trebovaniya k vaksinnym shtammam chumnogo mикроба. Metodicheskie ukazaniya. MU 3.3.1.1113-02. (In Russian).
15. Normativnaya dokumentatsiya ND LSR-005759/08-2311020. Vaksina chumnaya zhivaya (Vaksina dlya profilaktiki chumy), liofilizat dlya prigotovleniya suspensii dlya in'ektsii, nakozhnogo skarifikatsionnogo naneseniya i ingalyatsii. Stavropol', 2020;21. (In Russian).
16. Tinker AI. Vyzhivaemost' mикробов v proizvodstvennykh seriyakh chumnoi vaksiny EV, prigotovlennykh na plotnykh i zhidkikh pitatel'nykh sredakh. Problems of Particularly Dangerous Infections. 1971;4(20):71-76. (In Russian).
17. Faibich MM. Stabilizatsiya vaksinnyykh preparatov v protsesse vysushivaniya i khraneniya. Uspekhi mikrobiologii. 1983;18:193-215. (In Russian).
18. Budyka DA. Izuchenie immunogenosti protivochumnykh profilakticheskikh preparatov v fenomene «perezhivaniya». Problems of Particularly Dangerous Infections. 2001;1(81):128-133. (In Russian).

## References

19. Dalvadyants SM, Dyatlov IA, Yeremin SA, Schukovskaya TN, Sayapina LV, Sergheeva GM, et al. Plague immunization studies. Communication 4. An experience of volunteer revaccination with the "chemical" and live plague vaccines. *Problems of Particularly Dangerous Infections*. 2006;1(91):57-61. (In Russian).
20. Efremenko AA, Budyka DA, Abzaeva NV. Immunogenные свойства экспериментальной серии вакцин чумной живой сухой. *Estestvoznaniye i gumanizm: sbornik nauchnykh rabot*. 2005;2(1):38. (In Russian).
21. Anisimova TI. Analiz kachestva chumnoi zhivoi sukhoi vaksiny po zhiznesposobnosti i ED<sub>50</sub> dlya morskikh svinok i belykh myshei. *Profilaktika osobno opasnykh infektsii. Epizootologiya, mikrobiologiya i spetsifika profilaktiki chumy*. 1976;1:84-89. (In Russian).
22. Konovalova ZA, Atlas AG, Dubrovina VI. Some ways of production process of live plague vaccine and techniques of evaluation the immunogenicity (review). *Acta Biomedica Scientifica*. 2013;2(2):192-196. (In Russian).

#### Информация о соавторах:

Гостищева Светлана Евгеньевна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник научно-производственной лаборатории чумных вакцин ФКУЗ «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора  
ORCID: 0000-0001-9891-3665

Абзаева Наталья Вячеславовна, кандидат биологических наук, заведующая научно-производственной лабораторией чумных вакцин ФКУЗ «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора  
ORCID: 0000-0002-7418-9673

Иванова Галина Филипповна, кандидат медицинских наук, врач-бактериолог научно-производственной лаборатории чумных вакцин ФКУЗ «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора  
ORCID: 0000-0001-6127-6738

Фисун Алиса Анатольевна, научный сотрудник научно-производственной лаборатории чумных вакцин ФКУЗ «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора  
ORCID: 0000-0003-3400-9989

Иванова Марина Алексеевна, лаборант-исследователь научно-производственной лаборатории чумных вакцин ФКУЗ «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора  
ORCID: 0000-0001-9199-3885

#### Information about co-authors:

Svetlana E. Gostischeva, PhD in Biological Sciences, senior researcher of scientific and production laboratory of plague vaccines, Stavropol Plague Control Research Institute of Rospotrebnadzor  
ORCID: 0000-0001-9891-3665

Natalia V. Abzaeva, PhD in Biological Sciences, head of the production laboratory of plague vaccine research and production, Stavropol Plague Control Research Institute of Rospotrebnadzor  
ORCID: 0000-0002-7418-9673

Galina F. Ivanova, PhD, MD, bacteriologist of the research and production laboratory of plague vaccines, Stavropol Plague Control Research Institute of Rospotrebnadzor  
ORCID: 0000-0001-6127-6738

Alice A. Fisun, researcher at the research and production laboratory of plague vaccines, Stavropol Plague Control Research Institute of Rospotrebnadzor  
ORCID: 0000-0003-3400-9989

Marina A. Ivanova, laboratory research assistant at the research and production laboratory of plague vaccines, Stavropol Plague Control Research Institute of Rospotrebnadzor  
ORCID: 0000-0001-9199-3885

## Антибактериальные свойства эвкалиптового масла против двух основных возбудителей заболеваний полости рта

В медицине и стоматологии существуют серьезные опасения по поводу появления устойчивых к антибиотикам патогенов, поскольку они представляют значительную угрозу глобальному здоровью, особенно здоровью полости рта. Растущая обеспокоенность тем, что патогены полости рта могут развить устойчивость к стандартным профилактическим мерам, вызывает необходимость в альтернативных мерах по предотвращению роста этих патогенов без индукции микробной устойчивости. Данное исследование направлено на оценку антибактериальных свойств эвкалиптового масла (ЭМ) против двух основных возбудителей заболеваний полости рта: *Streptococcus mutans* и *Enterococci faecalis*.

Разведенное ЭМ выявило значительное снижение общей абсорбции против *S. mutans* и *E. faecalis* по сравнению с контролем ( $p \leq 0,001$ ). При измерении биопленок биопленки *S. mutans* и *E. faecalis* были уменьшены примерно в 60 и 30 раз соответственно по сравнению с группой без ЭМ ( $p \leq 0,001$ ).

Основываясь на результатах этого исследования, использование ЭМ в качестве органического соединения можно рассматривать как дополнительный инструмент для предотвращения роста патогенов в полости рта, вызывающих кариес зубов и эндодонтическую инфекцию.



Balhaddad AA, AlSheikh RN.

*Effect of eucalyptus oil on Streptococcus mutans and Enterococcus faecalis growth.*  
*BDJ Open*. 2023 Jul 6;9(1):26. DOI: 10.1038/s41405-023-00154-8