

С.Е.Гостищева, Л.С.Катунина, А.А.Курилова, Н.В.Абзаева, Ю.С.Ковтун, Н.В.Жаринова, О.А.Коняева, Е.Б.Жилченко, А.Н.Куличенко

ПРИМЕНЕНИЕ ПЛОТНОЙ ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ НА ОСНОВЕ ГИДРОЛИЗАТА КУКУРУЗНОГО ЭКСТРАКТА СГУЩЕННОГО В ПРОИЗВОДСТВЕ ВАКЦИНЫ ЧУМНОЙ ЖИВОЙ И ДЛЯ ХРАНЕНИЯ ШТАММОВ ЧУМНОГО МИКРОБА

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

Цель исследования – разработка плотной питательной среды на основе ферментативного гидролизата кукурузного экстракта для использования в производстве вакцины чумной живой и хранения на ней штаммов возбудителя чумы. **Материалы и методы.** Вакцинные и вирулентные штаммы *Yersinia pestis*, питательные среды для накопления и хранения. Исследуемые параметры изучались согласно нормативной документации. **Результаты и выводы.** Разработана питательная среда на основе ферментативного гидролизата кукурузного экстракта сгущенного с ростостимулирующими добавками – солью Мора и натрием сернистокислым. Изучены ее физико-химические и биологические свойства. Апробация среды в производственной лаборатории показала ее высокую продуктивность и возможность применения в промышленном выпуске вакцины чумной живой – получены серии препарата с оптической концентрацией 100 млрд/мл и жизнеспособностью (68,2±0,9)%. Применение данной среды позволяет повысить выход биомассы и снизить себестоимость конечной продукции. Подтверждена возможность хранения на разработанной среде вирулентных штаммов возбудителя чумы при температуре (4±2) °C в течение 18 месяцев без снижения жизнеспособности культуры.

Ключевые слова: питательные среды, чумной микроб, гидролизат кукурузного экстракта сгущенного.

Корреспондирующий автор: Гостищева Светлана Евгеньевна, e-mail: chumnpl@yandex.ru.

S.E.Gostishcheva, L.S.Katunina, A.A.Kurilova, N.V.Abzaeva, Yu.S.Kovtun, N.V.Zharinova, O.A.Konyaeva, E.B.Zhilchenko, A.N.Kulichenko

Usage of Solid Medium on the Basis of Corn-Steep Extract Hydrolysate in Manufacturing of Live Plague Vaccine and for Plague Agent Strain Preservation

Stavropol Research Anti-Plague Institute, Stavropol, Russian Federation

Objective of the study was to develop a solid medium on the basis of enzyme digest of corn-steep extract for manufacturing of live plague vaccine and storage of plague agent strains. **Materials and methods.** Vaccine strain and virulent strains of *Yersinia pestis*, nutrient media for accumulation and storage. Investigated parameters were assessed according to regulatory documentation. **Results and conclusions.** Developed has been nutrient medium based on enzyme digest of corn-steep extract with growth stimulation additives – Mohr's salt and sodium sulphite. Studied have been its physical-chemical and biological properties. Approbation of the medium in manufacturing laboratory has revealed its high efficiency and possibility of usage in industrial production of live plague vaccine. Batches of preparation with optical concentration of 100 mlrd/ml and (68.2±0.9) % viability have been manufactured. Application of the stated medium allows for increase in biomass output and decrease in prime cost of final product. Confirmed has been the possibility to store the virulent plague agent strains on the medium at (4±2) °C for 18 months without reduction of the culture viability.

Key words: nutrient media, plague microbe, hydrolysate of corn-steep extract.

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

Corresponding author: Svetlana E. Gostishcheva, e-mail: chumnpl@yandex.ru.

Citation: Gostishcheva S.E., Katunina L.S., Kurilova A.A., Abzaeva N.V., Kovtun Yu.S., Zharinova N.V., Konyaeva O.A., Zhilchenko E.B., Kulichenko A.N. Usage of Solid Medium on the Basis of Corn-Steep Extract Hydrolysate in Manufacturing of Live Plague Vaccine and for Plague Agent Strain Preservation. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2018; 1:75–78. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2018-1-75-78

Периодическая активизация природных очагов чумы на территории Российской Федерации создает риск возникновения эпизоотий, что может способствовать осложнению эпидемиологической ситуации. Основа специфической профилактики чумы в нашей стране – иммунизация живой вакциной из штамма *Yersinia pestis* EV линии НИИЭГ. В настоящее время эта вакцина остается наиболее эффективным и единственным лицензированным профилактическим противочумным препаратом в России. Важным ее преимуществом является способность после однократной прививки относительно быстро индуцировать специфический иммунитет против

основных форм (бубонная и легочная) чумной инфекции. Вакцина обеспечивает у привитых развитие иммунитета продолжительностью до 1 года, иммунизацию проводят по эпидемическим показаниям.

Препарат вакцины чумной живой выпускается на базе Ставропольского противочумного института Роспотребнадзора согласно Промышленному регламенту ПР 01897080-09-16, в соответствии с его технологическими этапами (стадии). Сохраняемая актуальность совершенствования различных этапов изготовления препарата при неизменности основных биотехнологических стадий. Одна из главных задач – повышение выхода биомассы вакцинного штамма.

В производстве вакцины чумной живой велико значение качества питательных сред, их ростовых свойств, зависящих от используемых компонентов и состава используемого сырья. В настоящее время в качестве основы питательных сред для культивирования чумного микроба применяют гидролизат Хоттингера из говяжьего мяса, при этом отмечается снижение ростовых свойств этих сред. Возможной причиной может быть негативное влияние антибиотиков и гормонов в мясе. При культивировании бактерий на средах, приготовленных из таких питательных основ, наблюдается снижение скорости роста биомассы. Кроме того, мясо является относительно дорогим сырьем. Таким образом, проблема совершенствования питательных основ и сред, используемых в производстве чумной вакцины, сохраняет свое значение.

Актуальность работ в данном направлении обусловлена также очевидной заинтересованностью как производителя, так и потребителя в снижении себестоимости готового препарата с сохранением или даже улучшением регламентированных параметров качества.

По данным литературы, для получения биомассы в процессе производства экспериментальных и коммерческих серий чумной вакцины предлагались различные среды, приготовленные на питательных основах из мяса, рыбы, казеина, кровяных сгустков, кукурузного экстракта и т.д. [3, 4]. Однако, в связи с высокой себестоимостью одних и нестандартностью других, остается востребованным поиск и апробация подходящего для этой цели стандартного и недорогого сырья. Первые данные о возможности использования питательных сред из кукурузного экстракта в производстве чумной вакцины получены А.А.Канчух еще в 1960–1980 гг. [1]. Однако, несмотря на доступность растительных субстратов, они не получили широкого распространения в производстве бакпрепаратов вследствие недостаточных ростовых свойств получаемых из них сред.

На данный момент в промышленном выпуске вакцины чумной живой предусмотрено применение двух сред: агаровой из гидролизата говяжьего мяса по Хоттингеру и кукурузно-казеинового агара, при этом недостатками первой среды являются ее дороговизна и нестабильность ростовых свойств, а второй, состоящей из смеси гидролизатов кукурузного экстракта и казеина в отношении 1:2, сложность и громоздкость приготовления.

В ряде экспериментов показано, что добавление в питательную среду, состоящую из моноосновы (ферментативный гидролизат кукурузного экстракта сгущенного, включающий соль Мора в сочетании с натрием сернистокислым) повышает ее ростовые свойства [2]. Применение данной композиции стимулирующих рост возбудителя чумы добавок позволит исключить гидролизат казеина из состава среды, что приведет к значительному упрощению технологии изготовления и существенно снизит себестоимость

как самой среды, так и препарата чумной вакцины.

Цель исследования – разработка плотной питательной среды на основе ферментативного гидролизата кукурузного экстракта сгущенного для использования в производстве вакцины чумной живой и изучение возможности хранения на ней штаммов возбудителя чумы.

Материалы и методы

В работе использованы: вакцинный штамм чумного микроба *Yersinia pestis* EV линии НИИЭГ, девять вирулентных штаммов возбудителя чумы из коллекции института – семь штаммов *Y. pestis* subsp. *pestis* из Центрально-Кавказского высокогорного и Прикаспийского песчаного природных очагов чумы и два штамма *Y. pestis* subsp. *caucasica* из Восточно-Кавказского высокогорного природного очага. Штаммы проявляли биологические свойства, типичные для основного подвида.

При работе с вирулентными штаммами руководствовались СП 1.3.3118-13 «Безопасность работы с микроорганизмами I–II групп патогенности (опасности)».

Экспериментальной питательной средой для выращивания биомассы в процессе производства вакцины чумной живой служила плотная среда на основе ферментативного гидролизата кукурузного экстракта сгущенного – питательный агар (ГКЭС), включающий соль Мора и натрий сернистокислый. При изучении возможности использования среды для хранения вирулентных штаммов чумы готовили «голодный» вариант среды – без вышеуказанных стимуляторов роста.

Питательные основы получали при помощи реактора гидролиза животных белков, рабочий объем 0,25 м³ (ООО «ЮВС», Обнинск).

Физико-химические свойства гидролизатов и сред определяли согласно МУК 4.2.2316-08 «Методы контроля бактериологических питательных сред». Биологические показатели качества питательных сред (чувствительность, скорость роста колоний, стабильность культурально-морфологических свойств микроорганизмов) изучали при помощи тест-штамма *Y. pestis* EV в соответствии с МУ 3.3.2.2124-06 «Контроль диагностических питательных сред по биологическим показателям для возбудителей чумы, холеры, сибирской язвы, туляремии, бруцеллеза, легионеллеза».

Из выращенной на экспериментальной питательной среде и средах сравнения в аппарате для культивирования микроорганизмов Шестеренко (АКМ-Ш) (Технолог, Россия) биомассы вакцинного штамма готовили экспериментальные серии вакцины чумной. После смыва с агара биомассу фасовали по 2 мл в ампулы и лиофилизировали на сублимационной установке LP-30 R (IIShin, Южная Корея).

Качество экспериментальных серий вакцины исследовано по основным показателям: жизнеспособности

Сравнительный анализ свойств питательных сред для культивирования *Y. pestis* EV

Основные показатели	Питательные среды / основа питательной среды		
	Кукурузно-казеиновый агар/ ферментативные гидролизаты кукурузного экстракта и казеина (1:2)	Агар Хоттингера/ ферментативный гидролизат говяжьего мяса	Питательный агар (ГКЭС)/ ферментативный гидролизат кукурузного экстракта сгущенного
pH в среде	7,1±0,1	7,1±0,1	7,1±0,1
Аминный азот в гидролизате, %	0,794±0,05	0,928±0,04	1,123±0,03
Аминный азот в питательной среде, %	0,119±0,04	0,120±0,01	0,124±0,05
Сухой остаток в гидролизате, %	13,7±1,6	14,1±1,3	25,5±1,4
Сухой остаток в питательной среде, %	4,0±0,5	4,3±0,5	4,3±0,6
Хлориды (в пересчете на натрий хлорид), %	0,5±0,1	0,5±0,1	0,5±0,1
Прочность геля, г	360,0±10,0	350,0±25,0	350,0±20,0
Температура плавления, °C	85±2,0	85±2,0	85±2,0
Температура застудневания, °C	36±0,5	35±0,5	35±0,5
Продолжительность плавления, мин	53±2,0	55±2,0	52±5,0

способности и термостабильности (бактериологический метод); потере в массе при высушивании (весовой метод) согласно ФСП 42-8654-07. Для сравнения использовали серии препарата, полученные при тех же условиях на агаре Хоттингера и кукурузно-казеиновом агаре.

Статистический анализ проводили с использованием пакета прикладных программ Statistica 6.0. Для выявления статистической значимости различий результатов использовали t-критерий Стьюдента. Различия считались достоверными при $p \leq 0,05$.

Результаты и обсуждение

Авторами подобран и отработан оптимальный состав питательной среды для выращивания биомассы в процессе производства вакцины чумной живой. В качестве исходного сырья для питательной основы использовали кукурузный экстракт (сгущенный), характеризующийся наличием, в среднем, 9,4 % белка и высоким содержанием азотистых веществ (до 45 %) и углеводов (до 25 %) в сухом остатке. Экстракт богат минеральными веществами, витаминами и аминокислотами. В качестве стимуляторов роста чумного микроба добавляли соль Мора и натрий сернистокислый, а в качестве буферного соединения в состав среды вводили натрий фосфорнокислый 2-замещенный 12-водный – малотоксичные

неорганические соединения, обладающие буферным действием в физиологически важном диапазоне pH [3]. Аминный азот в гидролизате кукурузного экстракта (сгущенного) составил (1,123±0,03) %, сухой остаток – (25,5±1,4) %. Результаты исследования физико-химических показателей разработанной экспериментальной среды в сравнении с регламентированными средами для выращивания биомассы вакцинного штамма чумного микроба представлены в табл. 1.

Проведено комплексное изучение регламентированных показателей качества вакцины чумной, приготовленной из биомассы, выращенной на разработанной среде в условиях производственной лаборатории. Показано, что полученный препарат по всем тестам соответствовал требованиям нормативно-технической документации (табл. 2).

Питательная среда на ферментативной основе кукурузного экстракта сгущенного обеспечивала сбор биомассы вакцинного штамма *Y. pestis* EV в количестве 110 млрд м.к. в 1 мл взвеси, что в 1,4 раза выше выхода биомассы по сравнению с контрольными средами. Процент живых микробных клеток после смыва составил (96,7±2,8) %. После лиофилизации оптическая концентрация снизилась до 100 млрд/мл, а жизнеспособность до (68,2±0,9) %, что выше по сравнению с контрольными сериями. Показатели термостабильности и потери в массе при

Таблица 2

Сравнительная оценка серий вакцины чумной живой, полученных при использовании изучаемых питательных сред

Основные показатели	Питательные среды			
	Регламентированные параметры	Агар Хоттингера	Кукурузно-казеиновый агар	Питательный агар (ГКЭС)
Оптическая концентрация, млрд/мл	50–100	80	80	100
Жизнеспособность, %	не менее 25,0	38,1±2,3	36,3±2,2	68,2±0,9
Термостабильность, сут	не менее 4	6,8	7,4	13,5
Потеря в массе при высушивании, %	не более 4,0	1,5	1,8	1,3
Себестоимость среды (1 л), руб	-	875	580	250

Таблица 3

Сравнительный контроль ростовых свойств питательных сред для хранения вирулентных штаммов чумного микроба

Основные показатели	Питательные среды	
	Агар Хоттингера	Питательный агар (ГКЭС)
Срок сохранения жизнеспособности испытуемых штаммов в пробирках со скошенным агаром при (4±2) °С, мес	12	18
Размер колоний, мм	1,3±0,2	1,5±0,3
Стабильность культурально-морфологических свойств микроорганизмов (число атипичных колоний), %	0,15±0,03	0,14±0,02
Показатель прорастания, %	64±2,3	67±1,4
Культурально-морфологические и биохимические свойства	Без изменений	Без изменений

высушивании во всех исследуемых образцах соответствовали регламентированным параметрам.

Таким образом, сконструированная плотная питательная среда на основе ГКЭС обеспечивала высокий сбор биомассы вакцинного штамма чумного микроба и, следовательно, может быть рекомендована для его культивирования при изготовлении препарата вакцины чумной живой.

В дальнейших исследованиях изучена возможность использования среды для хранения штаммов возбудителя чумы. В настоящее время для сохранения жизнеспособности микроорганизмов используют агар Хоттингера, приготовленный на ферментативной основе из говяжьего мяса. Пересевы культур при этом проводят не менее 1 раза в 3 месяца.

Для сравнения длительности хранения вирулентных и авирулентных штаммов чумного микроба на плотной питательной среде в пробирки со скошенным агаром ГКЭС и агаром Хоттингера (по 20 пробирок каждой) засеивали двухсуточные культуры штаммов *Y. pestis*. Пробирки с посевами запаивали и хранили при температуре (4±2) °С в течение 18 месяцев.

Результаты ежемесячного контроля показали, что по ростовым свойствам агар ГКЭС не уступал агару Хоттингера, и все испытуемые штаммы оставались жизнеспособными в течение срока наблюдения, что нельзя сказать о контрольной среде (табл. 3).

Следовательно, предложенная питательная среда может быть использована для хранения рабочих и исследовательских коллекций чумного микроба в лабораториях.

Таким образом, показано, что разработанная среда может успешно использоваться как для культивирования вакцинных и вирулентных штаммов *Y. pestis* с присущими им питательными потребностями, так и при их непродолжительном хранении (1–1,5 года) в коллекциях лабораторий. Использование данной питательной среды в промышленном выпуске чумной

вакцины позволит снизить себестоимость конечной продукции.

По результатам проведенной работы составлен пусковой регламент на производство «Питательный агар для культивирования микроорганизмов (ГКЭС)» ПУР № 01897080-34-17, получен патент РФ № 2626568 на изобретение «Питательная среда плотная для культивирования и сбора биомассы чумного микроба вакцинного штамма *Yersinia pestis* EV». На заявку на изобретение «Питательная среда плотная для хранения микроба чумы», приоритет от 28.06.17 г., получено уведомление о положительном решении формальной экспертизы от 24.07.17 г.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Канчух А.А., Сагатовский В.Н., Сурнина Н.С., Мелехина А.Ф. Изучение живой противочумной вакцины, приготовленной на средах с кукурузным экстрактом. В кн.: Микробиология и иммунология особо опасных инфекций. Саратов; 1964. С. 131–7.
2. Катунина Л.С., Куличенко А.Н., Курилова А.А., Будыка Д.А., Абзаева Н.В., Гостищева С.Е., Ковтун Ю.С., Коготкова О.И., Василенко Е.И., Зуенко А.А., Зимин С.И. Питательная среда плотная для культивирования и сбора биомассы чумного микроба вакцинного штамма *Yersinia pestis* EV. Патент РФ № 2626568, опублик. 28.07.2017 г. Бюл. № 22.
3. Курилова А.А., Таран Т.В., Катунина Л.С., Головнева С.И. Разработка питательных сред из растительного сырья для культивирования возбудителей особо опасных инфекций. *Пробл. особо опасных инф.* 2009; 3(101):66–8.
4. Поляк М.С., Сухаревич В.И., Сухаревич М.Э. Питательные среды для медицинской и санитарной микробиологии. СПб: «Элби-СПб»; 2008. 352 с.

References

1. Kanchukh A. A., Sagatovsky V. N., Surnina N.S., Melekhina A. F. [Study of live plague vaccine prepared on the media with corn extract]. In: [Microbiology and Immunology of Particularly Dangerous Infections]. Saratov; 1964; P. 131–7.
2. Katunina L.S., Kulichenko A.N., Kurilova A.A., Budyka D.A., Abzaeva N.V., Gostishcheva S.E., Kovtun Yu.S., Kogotkova O.I., Vasilenko E.I., Zuenko A.A., Zimin S.I. [Solid medium for plague microbe biomass cultivation and collection of *Yersinia pestis* EV vaccine strain]. RF Patent No 2626568, publ. July 28, 2017.
3. Kurilova A.A., Taran T.V., Katunina L.S., Golovneva S.I. [Development of nutrient media from plant material for cultivation of pathogens of particularly dangerous infections]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2009; 3(101):66–8.
4. Polyak M.S., Sukharevich V.I., Sukharevich M.E. [Nutrient Media for Medical and Sanitary Microbiology]. St. Petersburg: "Elbi-SPb"; 2008. 352 p.

Authors:

Gostishcheva S.E., Katunina L.S., Kurilova A.A., Abzaeva N.V., Kovtun Yu.S., Zharinova N.V., Konyaeva O.A., Zhilchenko E.B., Kulichenko A.N. Stavropol Research Anti-Plague Institute. 13–15, Sovetskaya St., Stavropol, 355035, Russian Federation. E-mail: stavnipchi@mail.ru.

Об авторах:

Гостищева С.Е., Катунина Л.С., Курилова А.А., Абзаева Н.В., Ковтун Ю.С., Жаринова Н.В., Коняева О.А., Жилченко Е.Б., Куличенко А.Н. Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт. Российская Федерация, 355035, Ставрополь, ул. Советская, 13–15. E-mail: stavnipchi@mail.ru.

Поступила 30.11.17.

Отправлена на доработку 07.12.17.

Принята к публ. 05.02.18.