



## Оценка жизнеспособности тест-штамма *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Abony NCTC 6017 в ампулах и флаконах методом ускоренного хранения

А.А. Воропаев , О.Ц. Цыдыпова, О.В. Фадейкина, Д.С. Давыдов

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Петровский бульвар, д. 8, стр. 2, Москва, 127051, Российская Федерация

 Воропаев Андрей Андреевич; [voropaev@expmed.ru](mailto:voropaev@expmed.ru)

### РЕЗЮМЕ

**ВВЕДЕНИЕ.** Важными задачами ведения коллекций микроорганизмов являются обеспечение стабильности свойств и поддержание жизнеспособности микробиологических культур во время хранения и при транспортировке. При использовании коллекционных штаммов микроорганизмов в качестве контрольных образцов в ряде случаев необходимы точные данные о количестве живых микробных клеток в каждом образце, в связи с чем актуальна разработка и применение методики прогнозирования гарантийных сроков хранения тест-штаммов.

**ЦЕЛЬ.** Оценить изменение жизнеспособности тест-штаммов для прогнозирования гарантийных сроков их хранения в различной первичной упаковке на примере штамма *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Abony NCTC 6017 методом ускоренного хранения.

**МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.** В работе использовали лиофилизированные образцы культуры штамма *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Abony NCTC 6017, депонированного в Государственной коллекции патогенных микроорганизмов ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России. В качестве первичной упаковки применены ампулы боросиликатные вакуумного наполнения и флаконы для лиофилизации стандарта 2R. Проведена оценка образцов по ряду показателей качества (потеря в массе при высушивании, количество жизнеспособных клеток, выживаемость клеток, морфология колоний, биохимическая идентификация) и смоделировано ускоренное хранение при повышенных температурах (35–65 °С).

**РЕЗУЛЬТАТЫ.** Существенных различий качества лиофилизированных образцов в зависимости от типа первичной упаковки не выявлено. Экспериментально определены константы дезактивации жизнеспособности микробиологических культур при хранении образцов при повышенных температурах. Рассчитаны константы дезактивации для температур транспортировки и хранения в различной первичной упаковке. Прогнозируемое время снижения жизнеспособности клеток до 10% составляет 19 лет при хранении во флаконах и 25 лет – в ампулах. Прогнозируемое время снижения жизнеспособности клеток до 50% составляет 5,8 и 7,6 года – для флаконов и ампул соответственно.

**ВЫВОДЫ.** Анализ результатов исследования подтвердил возможность использования различных типов первичной упаковки (ампулы и флаконы) для лиофильного высушивания и хранения тест-штаммов микроорганизмов. Полученные данные могут быть использованы для дальнейших исследований и разработки рекомендаций по хранению лиофилизированных штаммов в различных типах упаковки.

**Ключевые слова:** лиофилизация; тест-штаммы; тест ускоренного хранения; коллекция микроорганизмов; биологические препараты; лекарственные средства; контроль качества

**Для цитирования:** Воропаев А.А., Цыдыпова О.Ц., Фадейкина О.В., Давыдов Д.С. Оценка жизнеспособности тест-штамма *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Abony NCTC 6017 в ампулах и флаконах методом ускоренного хранения. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2024;24(4):467–475. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2024-24-4-467-475>

**Финансирование.** Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 056-00026-24-01 на проведение прикладных научных исследований (номер государственного учета НИР 124022200103-5).

**Потенциальный конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## Viability assessment of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Abony NCTC 6017 in ampoules and vials by the accelerated shelf-life testing method

Andrey A. Voropaev✉, Olga T. Cidipova, Olga V. Fadeikina, Dmitry S. Davydov

Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products, 8/2 Petrovsky Blvd, Moscow 127051, Russian Federation

✉ Andrey A. Voropaev; [voropaev@expmed.ru](mailto:voropaev@expmed.ru)

### ABSTRACT

**INTRODUCTION.** A key priority in maintaining a collection of microorganisms is to ensure the stability of characteristics and the viability of microbial cultures during their storage and transport. In addition, some applications of collection strains as control samples require accurate data on the number of viable microbial cells in each sample. Therefore, it is necessary to develop and implement an analytical procedure for predicting the guaranteed shelf life of test strains.

**AIM.** This study aimed to predict the guaranteed shelf life for test strains in a variety of primary packaging by assessing changes in microbial viability under accelerated storage conditions, with the *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Abony NCTC 6017 strain as a model organism.

**MATERIALS AND METHODS.** The study used lyophilised samples of the *S. enterica* subsp. *enterica* serovar Abony NCTC 6017 strain deposited in the National Collection of Pathogenic Microorganisms (NCPM) at the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products of the Ministry of Health of the Russian Federation. The studied primary packaging types included vacuum-filled borosilicate glass ampoules and 2R lyophilisation vials. The samples were tested for a number of quality attributes (loss on drying, viable cell count, cell viability, colony morphology, and biochemical identification) and subjected to accelerated shelf-life testing at elevated temperatures (35–65 °C).

**RESULTS.** The study did not show any significant differences in the quality of lyophilised samples depending on the type of primary packaging. The authors experimentally determined rate constants for the loss of viability in microbial cultures during storage at elevated temperatures and calculated the rate constants for the storage and transport temperatures and for different types of primary packaging. The predicted time to viable cell count reduction to 10% of the initial level was 19 years for vials and 25 years for ampoules, and the predicted time to 50% viability was 5.8 years for vials and 7.6 years for ampoules.

**CONCLUSIONS.** The results of this study confirm the applicability of different primary packaging (ampoules and vials) for the lyophilisation and storage of microbial test strains. The data obtained can guide further research and contribute to the development of recommendations for the storage of lyophilised strains in various types of packaging.

**Keywords:** lyophilisation; test strains; accelerated shelf-life testing; collection of microorganisms; biologicals; medicines; quality control

**For citation:** Voropaev A.A., Cidipova O.T., Fadeikina O.V., Davydov D.S. Viability assessment of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Abony NCTC 6017 in ampoules and vials by the accelerated shelf-life testing method. *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2024;24(4):467–475. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2024-24-4-467-475>

**Funding.** This study was conducted by the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products as part of the applied research funded under State Assignment No. 056-00026-24-01 (R&D Registry No. 124022200103-5).

**Disclosure.** The authors declare no conflict of interest.

## ВВЕДЕНИЕ

Задачами ведения коллекций микроорганизмов, особенно государственных коллекций, являются обеспечение сохранения свойств и жизнеспособности микроорганизмов, а также коллекционного фонда и обеспечение лабораторий образцами штаммов микроорганизмов (в том числе тест-штаммы) надлежащего качества для проведения научно-исследовательских и производственных работ, микробиологического контроля, оценки качества лекарственных средств и медицинских изделий [1].

Для решения данных задач применяют различные методы консервации микроорганизмов, среди которых лиофилизация является основным методом для высушивания из замороженного состояния в вакууме. Лиофилизированные образцы тест-штаммов возможно транспортировать в пределах Российской Федерации при температуре окружающей среды. Долгосрочное хранение штаммов осуществляют при температуре плюс 2–8 °С. В герметично запаянных под вакуумом ампулах коллекционные штаммы могут храниться практически неограниченное время, и это основное применение подобного типа емкости. Однако для конечного потребителя предпочтительнее использовать штаммы, расфасованные во флаконы, укупоренные резиновой пробкой и завальцованные. Такую упаковку легче вскрыть, нет опасности перегрева культуры во время вскрытия в пламени горелки или повреждения кожных покровов острыми осколками и, следовательно, отсутствует риск нарушения режима биологической безопасности в лабораторных условиях [2, 3].

Технология изготовления лиофилизатов в ампулах и флаконах также различается: при высушивании в ампулах используют ватные фильтры, создающие барьер для испарения удаляемой влаги; ампулы запаивают вне камеры лиофильного аппарата, что может сказаться на величине остаточной влажности (значение показателя «Потеря в массе при высушивании», важного для последующей сохранности качества лиофилизата и жизнеспособности культуры) [4, 5]. Недостатком использования ампул является трудоемкость процедуры запаивания ампул,

для выполнения которой требуются специальные навыки. Недостаток использования флаконов связан с возможной частичной усушкой пробки при длительном хранении, превышающем срок годности пробки, вследствие чего может быть нарушение герметичности упаковки. Запаянные ампулы являются лучшим выбором для долгосрочного хранения, а флаконы с резиновыми пробками – для снабжения тест-штаммами микробиологических лабораторий.

Поскольку требуется гарантировать сохранение жизнеспособности тест-штаммов независимо от цели их использования, то важно спрогнозировать гарантийное время их хранения как при долгосрочном хранении, так и при транспортировке к конечному потребителю, которая, как правило, осуществляется при температуре окружающей среды. Для такого прогнозирования можно использовать метод ASLT (Accelerated Shelf-Life Testing, метод ускоренного тестирования срока хранения или метод ускоренного хранения), который успешно используется для определения сроков годности биологических препаратов, образцов бактериофагов и микроорганизмов, а также лиофилизированных лекарственных средств [6–9].

Основой метода является выдерживание образцов при нескольких повышенных температурах с последующим расчетом констант дезактивации для различных температур [10]. Исходя из уравнения Аррениуса, логарифмы констант дезактивации линейно зависят от температуры (1):

$$\log k = \log k_0 - \frac{E_a}{2,303R} \times \frac{1}{T}, \quad (1)$$

где  $k_0$  – экспериментально рассчитанная константа дезактивации,  $T$  – абсолютная температура в Кельвинах,  $R$  – газовая постоянная,  $E_a$  – энергия активации,  $\log$  – логарифм с основанием 10.

Таким образом, зная константы дезактивации при повышенных температурах, методом экстраполяции можно определить константу для целевой температуры хранения и прогнозировать гарантийное время хранения штаммов.

Цель работы – оценить изменение жизнеспособности тест-штаммов для прогнозирования гарантийных сроков их хранения в различной первичной упаковке на примере штамма *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Abony NCTC 6017 методом ускоренного хранения.

Для достижения указанной цели были сформулированы следующие задачи: приготовить лиофилизированные образцы тест-штамма в ампулах и флаконах; оценить образцы по показателям качества лиофилизатов; провести хранение образцов при различных повышенных температурах; экспериментально определить константы дезактивации при повышенных температурах и рассчитать константы дезактивации при температурах хранения и транспортировки; определить гарантированное время хранения лиофилизованного тест-штамма *S. enterica* subsp. *enterica* serovar Abony NCTC 6017 в разной первичной упаковке при температурах хранения и транспортировки.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### Материалы

В работе применяли следующие материалы: тест-штамм микроорганизмов, рекомендованный для проведения испытаний в ОФС.1.2.4.0002.15<sup>1</sup> *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Abony NCTC 6017; питательная среда ГРМ-агар (серия О1-К-683, ФБУН «ГНЦ ПМБ» Роспотребнадзора); сахарозо-желатиновая среда (защитная среда), содержащая 20% сахарозы (кат. № 1.07653, серия К48546153, Merck, США) и 2% желатина (кат. № 1.04070, серия VM918570, Merck, США); фармакопейный стандартный образец (ФСО) ГФ РФ мутности бактериальных взвесей 20 МЕ ФСО 3.1.00084 (ОСО 42-28-84), серия S-2/8-010122, ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России); ампулы с внутренним диаметром 8 мм, изготовленные из боросиликатной стеклотрубки (Simax®, Чехия); флаконы для лиофилизации стандарта 2R (кат. № 1637441, серия 6106541118, Schott Pharma, Германия).

### Оборудование

В работе использовали измерительное и испытательное оборудование, прошедшее поверку (квалификацию, аттестацию): сушка лиофильная Epsilon 2-4 LSCplus (Martin Christ, Германия); весы специальные класса 1 ML204T/A00 (Mettler Toledo, Швейцария); морозильник

MDF-193AT (Panasonic Healthcare, Япония); лиофильный аппарат Usifroid M.S.R. 18 (Usifroid, Франция); генератор плазмы PG 1200 (Fergutes, Нидерланды); вакуумно-сушильный шкаф VD 23 (Binder, Германия); термостат ТС-1/80 СПУ (АО «Смоленское СКТБ СПУ», Россия); шкаф ламинарный БАВ п-01-1,2, класс защиты II (ЗАО «Ламинарные системы», Россия);

### Методы

#### Подготовка тест-штаммов к высушиванию.

Культивирование тест-штаммов проводили при температуре  $37 \pm 2$  °С на поверхности агаризованной среды в чашках Петри в течение 20–24 ч. Для лиофильного высушивания использовали 20-часовую культуру. Бактериологической петлей отбирали колонии и готовили суспензию, соответствующую 20 МЕ ФСО мутности бактериальных взвесей. Полученную суспензию объединяли в равном объеме с сахарозо-желатиновой защитной средой и вносили по 0,2 мл в ампулы и по 0,5 мл во флаконы. Для определения концентрации жизнеспособных клеток до высушивания суспензию десятикратно разводили и проводили посев на поверхности агаризованной среды в чашках Петри.

**Лиофилизация.** Замораживание и высушивание проводили в рамках одного цикла лиофилизации. Образцы замораживали до температуры минус 40 °С в течение 4 ч, первичное высушивание проводили под вакуумом 0,1 мбар в течение 12 ч, плавно повышая температуру полки от минус 20 до 0 °С. Досушивание проводили в течение 7 ч при температуре 30 °С. Флаконы укупоривали под вакуумом в камере лиофильной сушки, ампулы доставали из лиофильного аппарата и запаивали под вакуумом на специальном устройстве для запаивания ампул.

**Определение вакуума/герметизации** проводили согласно ОФС.1.8.1.0002.15<sup>2</sup>.

**Определение времени растворения** проводили согласно ОФС.1.4.1.0031.18<sup>3</sup>.

**Определение потери в массе при высушивании** в испытании по способу 1 из ОФС.1.2.1.0010.15<sup>4</sup> использовали 10 ампул и 4 флакона.

**Определение количества жизнеспособных микробных клеток** проводили по методике, описанной в работе А.А. Воропаева с соавт. [5]. Лيوфилизат ресуспендировали стерильной водой, внося 0,2 мл в ампулы и 0,5 мл во флаконы. При определении количества жизнеспособных

<sup>1</sup> ОФС 1.2.4.0001.15 Микробиологическая чистота. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд.; 2018.

<sup>2</sup> ОФС 1.7.1.0018.18 Иммунобиологические лекарственные препараты. Государственная фармакопея Российской Федерации, XIV изд.; 2018.

<sup>3</sup> ОФС 1.4.1.0031.18 Лيوфилизаты. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд.; 2018.

<sup>4</sup> ОФС 1.2.1.0010.15 Потеря в массе при высушивании. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд.; 2018.

микробных клеток для оценки каждого исследуемого параметра (температура и время хранения) использовали по три образца (ампулы или флаконы). Содержимое каждого образца разводили десятикратно, после чего из разведений высевали по 0,1 мл в три чашки с питательной средой и инкубировали в течение 24 ч при температуре  $37 \pm 2$  °С. Для каждой температуры и времени хранения получали результаты ( $n=9$ ) по определению количества жизнеспособных микробных клеток [5].

**Тест ускоренного хранения.** Флаконы и ампулы помещали в вакуумный сушильный шкаф, нагретый до необходимой температуры (35, 45, 55 или 65 °С). Через определенные промежутки времени образцы вынимали и определяли концентрацию жизнеспособных микроорганизмов. Константу дезактивации  $k$  рассчитывали по формуле (2):

$$k = \frac{1}{t} (\log N_0 - \log N), \quad (2)$$

где  $N_0$  – начальная концентрация микроорганизма,  $N$  – концентрация микроорганизма после хранения при повышенной температуре,  $\log$  – логарифм с основанием 10,  $t$  – время хранения при повышенной температуре (ч) [11].

**Статистическая обработка результатов.** Среднее значение, стандартное отклонение, относительное стандартное отклонение и коэффициент корреляции Пирсона рассчитывали с помощью программы Microsoft Excel.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### Подготовка лиофилизированных образцов

Подготовленные образцы штамма *S. enterica* subsp. *enterica* serovar Abony NCTC 6017 после лиофильного высушивания оценивали по параметрам качества, представленным в *таблице 1*: описание (внешний вид); потеря в массе при высушивании; вакуум/герметизация; время растворения лиофилизата. Восстановленную из лиофильного состояния культуру оценивали по количеству жизнеспособных клеток, выживаемости, морфологии колоний и биохимической активности. Концентрация микробных клеток в исходной суспензии до высушивания составила  $(4,16 \pm 0,40) \times 10^8$  КОЕ/мл. После высушивания результаты оценки качества лиофилизированных образцов во флаконах и ампулах оказались сопоставимы. Единственное различие наблюдали для показателя «Потеря в массе при высушивании»: 2,0% – для ампул, 1,3% – для флаконов (*табл. 1*). Вероятно, это связано с наличием ватного фильтра и особенностями процедуры запаивания ампул.

### Проведение теста ускоренного хранения

Испытания проводили при четырех разных повышенных температурах с шагом в 10 °С (35, 45, 55 и 65 °С). Время отбора проб подбирали экспериментально для каждой температуры таким образом, чтобы снижение количества жизнеспособных клеток было статистически значимым. Результаты проведения теста представлены в *таблице 2*.

**Таблица 1.** Влияние первичной упаковки (флаконы/ампулы) на качество лиофилизированных образцов

**Table 1.** Influence of primary packaging (vials/ampoules) on the quality of lyophilised samples

Показатели качества лиофилизированных образцов <i>Quality attributes of lyophilised samples</i>	Ампулы <i>Ampoules</i>	Флаконы для лиофилизации <i>Lyophilisation vials</i>
Описание <i>Appearance</i>	Сухая пористая масса в виде таблетки, цельная <i>Dry, porous, and uniform cake</i>	Сухая пористая масса в виде таблетки, цельная <i>Dry, porous, and uniform cake</i>
Потеря в массе при высушивании, % <i>Loss on drying, %</i>	2,0±0,2	1,3±0,1
Вакуум/герметизация <i>Vacuum/sealing</i>	Вакуум не более 10 гПа <i>Vacuum of ≤10 hPa</i>	Вакуум не более 10 гПа <i>Vacuum of ≤10 hPa</i>
Время растворения лиофилизата, с <i>Reconstitution time, s</i>	<10	<10
Количество жизнеспособных клеток, КОЕ/мл <i>Viable cell count, CFU/mL</i>	$(3,06 \pm 0,02) \times 10^8$	$(3,06 \pm 0,04) \times 10^8$
Выживаемость, % <i>Viability, %</i>	73	73
Морфология колоний <i>Colony morphology</i>	Гладкие круглые колонии <i>Smooth round colonies</i>	Гладкие круглые колонии <i>Smooth round colonies</i>
Биохимическая идентификация <i>Biochemical identification</i>	95,5% ( <i>Salmonella enterica</i> )	95,5% ( <i>Salmonella enterica</i> )

Таблица составлена авторами по собственным данным / The table is prepared by the authors using their own data

**Таблица 2.** Результаты теста ускоренного хранения образцов штамма *S. enterica* subsp. *enterica* serovar Abony NCTC 6017 в разных первичных упаковках

**Table 2.** Results of accelerated shelf-life testing of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Abony NCTC 6017 samples in different primary packaging

Температура хранения, °C <i>Storage temperature, °C</i>	Время, ч <i>Time, h</i>	Количество жизнеспособных микробных клеток, КОЕ/мл <i>Viable cell count, CFU/mL</i>					
		Ампулы <i>Ampoules</i>			Флаконы <i>Vials</i>		
		$\bar{X} \pm S$ (n=9)	RSD, %	$\log_{10} X$	$\bar{X} \pm S$ (n=9)	RSD, %	$\log_{10} X$
35	696	$(6,6 \pm 2,2) \times 10^7$	33	7,82	$(4,6 \pm 0,1) \times 10^7$	2	7,66
	960	$(1,9 \pm 0,2) \times 10^7$	11	7,28	$(7,2 \pm 2,4) \times 10^7$	33	7,86
	1680	$(6,6 \pm 0,2) \times 10^5$	7	5,82	$(3,9 \pm 0,2) \times 10^5$	7	5,82
	2496	$(1,1 \pm 0,3) \times 10^5$	10	4,52	$(1,6 \pm 0,3) \times 10^5$	10	5,52
	3000	$(3,3 \pm 0,3) \times 10^4$	27	5,04	$(2,1 \pm 0,3) \times 10^4$	27	5,04
45	48	$(1,6 \pm 0,3) \times 10^8$	19	8,20	$(2,1 \pm 0,1) \times 10^8$	5	8,32
	168	$(2,7 \pm 0,2) \times 10^7$	9	7,43	$(2,6 \pm 0,1) \times 10^7$	5	7,41
	672	$(2,8 \pm 1,2) \times 10^5$	43	5,45	$(1,1 \pm 0,5) \times 10^6$	44	5,04
	840	$(5,6 \pm 1,5) \times 10^4$	26	4,75	$(3,9 \pm 0,4) \times 10^4$	10	4,59
	1008	$(1,1 \pm 0,2) \times 10^4$	15	4,04	$(2,3 \pm 0,4) \times 10^4$	17	4,36
55	6	$(1,4 \pm 0,3) \times 10^8$	21	8,15	$(2,4 \pm 0,2) \times 10^8$	6	8,38
	24	$(8,8 \pm 0,2) \times 10^7$	19	7,94	$(8,5 \pm 1,1) \times 10^7$	12	7,93
	48	$(2,7 \pm 0,5) \times 10^7$	20	7,43	$(6,0 \pm 0,7) \times 10^7$	12	7,78
	96	$(1,3 \pm 0,4) \times 10^6$	32	6,11	$(4,3 \pm 1,2) \times 10^5$	28	5,63
	144	$(4,5 \pm 1,1) \times 10^4$	25	4,65	$(2,6 \pm 0,9) \times 10^4$	33	4,41
65	3	$(7,0 \pm 5,7) \times 10^7$	82	7,85	$(9,4 \pm 2,4) \times 10^7$	26	7,97
	16	$(6,7 \pm 4,6) \times 10^6$	68	6,83	$(1,6 \pm 0,3) \times 10^7$	45	7,20
	24	$(8,0 \pm 3,1) \times 10^5$	39	5,90	$(1,0 \pm 0,5) \times 10^7$	45	7,00
	48	$(2,8 \pm 3,3) \times 10^4$	118	4,45	$(6,5 \pm 3,1) \times 10^4$	48	4,81
	72	$(5,0 \pm 2,1) \times 10^2$	42	2,70	$(4,6 \pm 4,4) \times 10^3$	94	3,66

Таблица составлена авторами по собственным данным / The table is prepared by the authors using their own data

*Примечание.*  $\bar{X} \pm S$  – среднееарифметическое значение  $\pm$  стандартное отклонение;  $n$  – количество результатов испытаний; *RSD* – относительное стандартное отклонение.

*Note.*  $\bar{X} \pm S$ , arithmetic mean  $\pm$  standard deviation;  $n$ , number of test results; *RSD*, relative standard deviation.

Снижения количества жизнеспособных клеток в зависимости от типа первичной упаковки не наблюдалось. В среднем разница между количеством жизнеспособных клеток в ампулах и флаконах составила от 0,01 до 1,1  $\log_{10}$  КОЕ/мл.

На основании полученных данных рассчитаны коэффициенты корреляции и проведен анализ функции снижения количества жизнеспособных клеток в зависимости от типа первичной упаковки, температуры и времени хранения, имеющей линейный вид (табл. 3).

Значения угловых коэффициентов функции снижения количества жизнеспособных клеток от времени сопоставимы для ампул и флаконов при всех изученных температурах. Значения коэффициентов корреляции зависимости для ампул и флаконов составили более 0,9.

Значения констант дезактивации, рассчитанные по формуле (2), представлены в таблице 4. Используя полученные значения, строили график зависимости константы дезактивации от абсолютной температуры.

Используя уравнения прямой (рис. 1), рассчитали константы дезактивации и время снижения количества жизнеспособных клеток при целевых температурах (табл. 5). Целевыми температурами были выбраны 5 и 25 °C: 5 °C – средняя температура хранения лиофилизированных образцов, а 25 °C – вероятная температура транспортировки образцов конечному потребителю.

В режиме реального времени количество жизнеспособных клеток оценивали через полтора года хранения при темпера-

**Таблица 3.** Характеристики зависимости количества жизнеспособных клеток от времени хранения при повышенных температурах**Table 3.** Viable cell counts depending on the time of storage at elevated temperatures

Температура, °C Temperature, °C	Угловой коэффициент уравнения линейной функции Linear function slope		r*
	Ампулы Ampoules	Флаконы Vials	
35	-0,001	-0,001	0,978
45	-0,004	-0,004	0,988
55	-0,025	-0,030	0,990
65	-0,073	-0,065	0,982

Таблица составлена авторами по собственным данным / The table is prepared by the authors using their own data

Примечание. \* r – коэффициент корреляции Пирсона использовали для анализа взаимосвязи между результатами.

Note. \* Pearson's correlation coefficient, r, was used to analyse the relationship between the results.

**Таблица 4.** Результаты расчетов констант дезактивации**Table 4.** Calculation results for viability loss rate constants

Температура хранения, °C Storage temperature, °C	Константа дезактивации Viability loss rate constant (k)		r*	
	Ампулы Ampoules	Флаконы Vials	Ампулы Ampoules	Флаконы Vials
65	1,18×10 <sup>-1</sup>	0,92×10 <sup>-1</sup>	0,996	0,997
55	3,06×10 <sup>-2</sup>	2,29×10 <sup>-2</sup>		
45	5,15×10 <sup>-3</sup>	4,77×10 <sup>-3</sup>		
35	1,30×10 <sup>-3</sup>	1,26×10 <sup>-3</sup>		

Таблица составлена авторами по собственным данным / The table is prepared by the authors using their own data

Примечание. \* r – значение коэффициента корреляции Пирсона уравнения зависимости log<sub>10</sub>k от обратной абсолютной температуры 1/T.Note. \* Pearson's correlation coefficient, r, for log<sub>10</sub>k values as a function of the inverse absolute temperature, 1/T.**Таблица 5.** Прогнозирование сроков хранения тест-штамма *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Abony NCTC 6017**Table 5.** Predicting the shelf life of the control strain *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Abony NCTC 6017

Температура хранения, °C Storage temperature, °C	Константа дезактивации Viability loss rate constant		Время снижения количества жизнеспособных клеток до 50%, лет Time to viable cell count reduction to 50%, years		Время снижения количества жизнеспособных клеток до 10%, лет Time to viable cell count reduction to 10%, years	
	Ампулы Ampoules	Флаконы Vials	Ампулы Ampoules	Флаконы Vials	Ампулы Ampoules	Флаконы Vials
25	2,12×10 <sup>-4</sup>	1,99×10 <sup>-4</sup>	0,2	0,2	0,5	0,5
5*	4,54×10 <sup>-6</sup>	4,43×10 <sup>-6</sup>	7,6	5,8	25,2	19,3
5**	6,90×10 <sup>-6</sup>	9,50×10 <sup>-6</sup>	–	–	–	–

Таблица составлена авторами по собственным данным / The table is prepared by the authors using their own data

Примечание. \* расчетные данные; \*\* экспериментальные данные; «–» – не применимо.

Note. \*, estimated data; \*\*, experimental data; –, not applicable.

туре 2–8 °C. Концентрация клеток составила (2,3±0,1)×10<sup>8</sup> КОЕ/мл в ампулах и (2,0±0,3)×10<sup>8</sup> КОЕ/мл во флаконах.

Данные исследования указывают на принципиальную возможность использования закона Аррениуса для прогнозирования гарантийного срока хранения лиофилизированных бактериальных штаммов. Влияние эффекта температуры имеет линейный вид, а значения коэффициентов

аппроксимации (R<sup>2</sup>) близки к единице. Отсутствие различий в прогнозируемом времени хранения лиофилизированного тест-штамма, укупоренного во флаконы или ампулы, указывает на возможность использования только одного вида первичной упаковки для проведения теста ускоренного хранения при определении гарантийного срока хранения разных штаммов микроорганизмов. Таким образом, результаты изменения

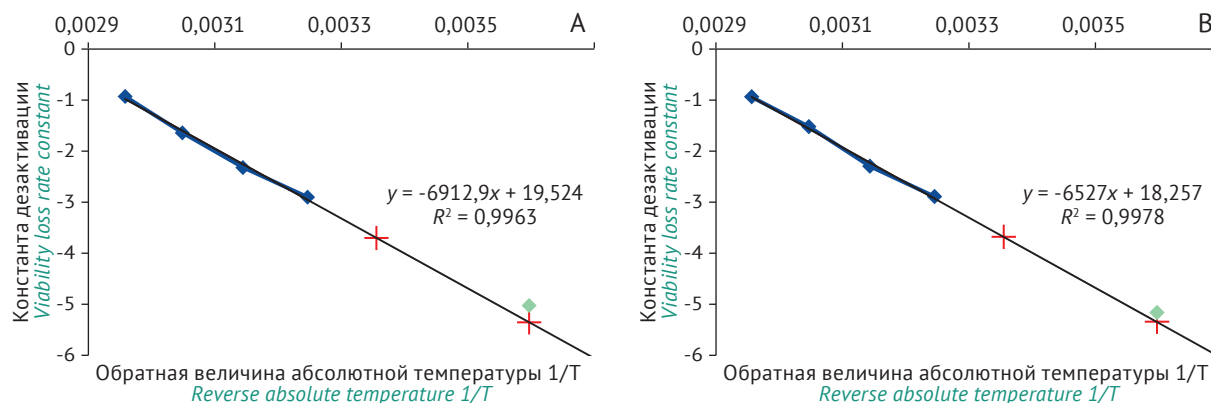


Рисунок подготовлен авторами / The figure is prepared by the authors

**Рис. 1.** Зависимость констант дезактивации от обратной абсолютной температуры: А – ампулы, В – флаконы. Синий цвет – экспериментальные данные, полученные при хранении в условиях повышенных температур; красный цвет (значок перекрестия) – рассчитанные константы при 25 и 5 °С; зеленый цвет (значок ромба) – данные, полученные при хранении в режиме реального времени.

**Fig. 1.** Viability loss rate constants as a function of the inverse absolute temperature: A, ampoules; B, vials. Blue: experimental data obtained in accelerated stability testing at elevated temperatures; red (crosshairs): calculated constants for 25 °C and 5 °C; green (diamonds): data obtained in real-time stability testing.

жизнеспособности штаммов, хранящихся во флаконах, можно экстраполировать на долгосрочное хранение в ампулах. По результатам исследования были выбраны температуры проведения теста ускоренного хранения (35, 45, 55 и 65 °С) и получены ориентировочные скорости снижения количества жизнеспособных клеток. Полученные данные будут использованы для дальнейших исследований. Прогнозируемое время снижения количества жизнеспособных клеток лиофилизированного штамма *S. enterica* subsp. *enterica* serovar Abony NCTC 6017 до 10% составляет 19 лет для флаконов и 25 лет для ампул; до 50% составляет 5,8 года для флаконов и 7,6 года – для ампул.

Данные о сроках хранения штамма *S. enterica* subsp. *enterica* serovar Abony NCTC 6017 целесообразно экстраполировать для прогнозирования сроков хранения других штаммов, поскольку микроорганизмы могут различаться по степени выживаемости после лиофильного высушивания и скорости снижения жизнеспособности со временем. Мы предварительно показали, что снижение жизнеспособности в условиях повышенных температур существенно выше у *S. enterica* subsp. *enterica* serovar Abony NCTC 6017 по сравнению с *Staphylococcus aureus* NCTC 10788 и *Pseudomonas aeruginosa* NCTC 12924 [5]. А.В. Осин и соавт. также получили результаты по прогнозируемым срокам хранения при 4 °С; они выше у *S. aureus* ATCC 6538 (209-P) – 105 лет, а самые низкие – у *Vibrio cholerae* non-O1 p9741 [12]. Поэтому существует необходимость прогнозирования для каждого рода или штамма в отдельности, что может оказаться крайне затратным.

Для определения сроков хранения различных микроорганизмов мы предлагаем использование следующей схемы: 1) провести стресс-тест при одной повышенной температуре 37 °С различных штаммов микроорганизмов; 2) при стресс-тесте проводить отбор проб через 1 и 3 мес.; 3) рассчитать константы дезактивации при данной температуре по трем точкам; 4) распределить все микроорганизмы на группы: устойчивые, умеренно-устойчивые и неустойчивые; 5) для каждой группы прогнозировать сроки хранения методом ускоренного хранения.

Полученные результаты по снижению количества жизнеспособных клеток на 50% могут быть рекомендованы для установления интервала периодичности проверки жизнеспособности тест-штаммов, хранящихся в ампулах в фондах коллекции, примерно через 7–10 лет.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенное исследование подтвердило использование разных типов первичной упаковки (флаконы и ампулы) для лиофильного высушивания и хранения тест-штаммов. Выбор первичной упаковки должен быть обусловлен целями использования тест-штаммов – долгосрочное хранение в фондах Государственной коллекции патогенных микроорганизмов или снабжение конечных потребителей.

Полученные данные могут быть использованы для дальнейших исследований и разработки рекомендаций по хранению лиофилизированных бактериальных штаммов в различных типах упаковки.



## Литература/References

1. Грачева ИВ, Осин АВ, Кутырев ВВ. Принципы формирования коллекционных фондов штаммов микроорганизмов. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2021;(2):16–23. Gracheva IV, Osin AV, Kutuyev VV. Principles of formation of collection funds of microorganism strains. *Problems of Particularly Dangerous Infections*. 2021;(2):16–23 (In Russ.). <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2021-2-16-23>
2. Снатенков ЕА, Агеева НП, Ротов КА, Коваленко АА. Анализ аварийных ситуаций при работе с патогенными биологическими агентами в рамках риск-ориентированного подхода. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2022;(2):145–48. Snatenkov EA, Ageeva NP, Rotov KA, Kovalenko AA. Analysis of emergency situations when working with pathogenic biological agents within the framework of risk-oriented approach. *Problems of Particularly Dangerous Infections*. 2022;(2):145–48 (In Russ.). <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2022-2-145-148>
3. Carraretto AR, Curi EF, Almeida CED, Abatti REM. Glass ampoules: risks and benefits. *Rev Bras Anesthesiol*. 2011;61(4):513–21. [https://doi.org/10.1016/s0034-7094\(11\)70059-9](https://doi.org/10.1016/s0034-7094(11)70059-9)
4. Peiren J, Hellemans A, De Vos P. Impact of the freeze-drying process on product appearance, residual moisture content, viability, and batch uniformity of freeze-dried bacterial cultures safeguarded at culture collections. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2016;100(14):6239–49. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7359-1>
5. Воропаев АА, Фадейкина ОВ, Ермолаева ТН, Давыдов ДС. Лиофилизация бактериальных тест-штаммов в аппарате коллекторного типа: влияние параметров замораживания и высушивания, объема заполнения ампул и плотности ватного фильтра. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2023;23(3):348–60. Voropaev AA, Fadeikina OV, Ermolaeva TN, Davydov DS. Lyophilisation of bacterial test strains in a manifold-type apparatus: effects of freezing and drying parameters, ampoule fill volume, and cotton filter density. *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2023;23(3):348–60 (In Russ.). <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2023-23-3-348-360>
6. Tsen JH, Lin YP, Huang HY, King VAN. Acceleration storage testing of freeze-dried immobilized *Lactobacillus acidophilus*-fermented banana media. *J Food Process Preserv*. 2007;31(6):688–701. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4549.2007.00160.x>
7. Muntu CM, Avanti C, Hayun H, Surini S. Stability study of spray freeze-dried insulin dry powder formulations used for nose-to-brain delivery. *J Appl Pharm Sci*. 2023;13(10):225–37. <https://doi.org/10.7324/JAPS.2023.148983>
8. Zhenhe X, Zihan D, Yuanxing Z, Xiaohong L, Qiyao W, Shuai S, Qin L. Shelf-life prediction and storage stability of *Aeromonas* bacteriophage vB\_Asm\_ZHF. *Virus Research*. 2023;323:198997. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2022.198997>
9. Shalaev E, Ohtake S, Mousa EM, Searles J, Nail S, Roberts CJ. Accelerated storage for shelf-life prediction of lyophiles: temperature dependence of degradation of amorphous small molecular weight drugs and proteins. *J Pharm Sci*. 2023;112(6):1509–22. <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2023.02.008>
10. Ebrahim A, DeVore K, Fischer T. Limitations of accelerated stability model based on the Arrhenius equation for shelf life estimation of *in vitro* diagnostic products. *Clin Chem*. 2021;67(4):684–8. <https://doi.org/10.1093/clinchem/hvaa282>
11. Mitić S, Otenhajmer I, Damjanović V. Predicting the stabilities of freeze-dried suspensions of *Lactobacillus acidophilus* by the accelerated storage test. *Cryobiology*. 1974;11(2):116–20. [https://doi.org/10.1016/0011-2240\(74\)90300-9](https://doi.org/10.1016/0011-2240(74)90300-9)
12. Осин АВ, Червякова НС, Валова ТВ. Лиофилизация штаммов патогенных микроорганизмов на сублимационных установках разного типа и оценка качества полученных препаратов. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2016;(3):66–70. Osin AV, Chervyakova NS, Valova TV. Lyophilization of pathogenic microorganisms strains on freeze-drying modules of different type, and quality assessment of the preparations obtained. *Problems of Particularly Dangerous Infections*. 2016;(3):66–70 (In Russ.). <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2016-3-66-70>

**Вклад авторов.** Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: **А.А. Воропаев** – концепция работы, проведение экспериментальной работы, написание текста рукописи, формулировка выводов; **О.Ц. Цыдыпова** – концепция работы, проведение экспериментальной работы; **О.В. Фадейкина** – формулировка выводов, утверждение окончательной версии статьи для публикации; **Д.С. Давыдов** – концепция работы, утверждение окончательной версии статьи для публикации.

**Authors' contributions.** All the authors confirm that they meet the ICMJE criteria for authorship. The most significant contributions were as follows. **A.A. Voropaev** conceptualised the study, conducted the experimental work, drafted the manuscript, and formulated the conclusions. **O.T. Cidipova** conceptualised the study and conducted the experimental work. **O.V. Fadeikina** formulated the conclusions and approved the final version of the manuscript for publication. **D.S. Davydov** conceptualised the study and approved the final version of the manuscript for publication.

## Об авторах / Authors

**Воропаев Андрей Андреевич / Andrey A. Voropaev**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5786-9159>

**Цыдыпова Ольга Цыренжаповна / Olga T. Cidipova**

ORCID: <https://orcid.org/0009-0000-8893-5932>

**Фадейкина Ольга Васильевна, канд. биол. наук / Olga V. Fadeikina, Cand. Sci. (Biol.)**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8473-7442>

**Давыдов Дмитрий Сергеевич, канд. биол. наук / Dmitry S. Davydov, Cand. Sci. (Biol.)**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1768-1362>

Поступила 19.09.2024

После доработки 28.10.2024

Принята к публикации 06.12.2024

Received 19 September 2024

Revised 28 October 2024

Accepted 6 December 2024