

Ю.А.Алешина, В.И.Павлова, А.В.Комиссаров, О.В.Громова, А.К.Никифоров, М.Н.Киреев,
С.А.Еремин, О.А.Волох, А.В.Гаева, Л.Ф.Ливанова

СВОЙСТВА ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ И ПРОИЗВОДСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ ПРОТЕКТИВНОГО О-АНТИГЕНА *VIBRIO CHOLERAЕ* М41 ОГАВА

ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов,
Российская Федерация

Изучены иммунохимические, химические и биохимические свойства препаратов О-антигена, полученных из штамма *Vibrio cholerae* М41 классического биовара серовара Огава с применением производственной и усовершенствованной технологий их концентрирования ультрафильтрацией в режиме тангенциального потока жидкости на мембранах с различными номинальными отсечками по молекулярной массе. Анализ исследуемых образцов иммуноферментным методом ИФА ELISA показал одинаковое содержание в них О-антигена. Изучение специфических фракций с помощью хроматографических и электрофоретических методов продемонстрировало подобие их свойств. Исследование химического состава выявило совпадение концентраций определяемых компонентов. Таким образом, доказана возможность использования усовершенствованной технологии концентрирования протективных антигенов *V. cholerae* М41 серовара Огава в производственном процессе получения вакцины холерной химической бивалентной таблетированной.

Ключевые слова: *Vibrio cholerae*, О-антиген, концентрирование, ультрафильтрация, тангенциальный режим, иммунохимические, химические и биохимические свойства.

Yu.A.Aleshina, V.I.Pavlova, A.V.Komissarov, O.V.Gromova, A.K.Nikiforov, M.N.Kireev, S.A.Eremin,
O.A.Volokh, A.V.Gaeva, L.F.Livanova

Properties of Experimental and Standard Preparations of the Protective O Antigen of *Vibrio cholerae* M41 Ogawa

Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov, Russian Federation

Investigated are immunochemical, chemical and biochemical properties of the O-antigen preparations obtained from *Vibrio cholerae* M41 classical biovar, serotype Ogawa strain using standard manufacturing and improved technologies of their concentrating. The preparations have been concentrated by ultrafiltration in the mode of tangential liquid flow with membranes of various cut-off levels for a particular molar weight. ELISA has revealed equal O-antigen load in all of these preparations. Studies of specific fractures by means of chromatographic and electrophoretic methods have demonstrated their properties to be alike. Chemical composition analysis has also identified coincidence in the load of components under specification. Thus, it has been proved that application of the improved *V. cholerae* protective antigen concentrating technology for manufacturing cholera chemical bivalent palletized vaccine is justified.

Key words: *Vibrio cholerae*, O-antigen, immuno- and biochemical properties, concentrating, ultrafiltration, tangential mode.

В Российском научно-исследовательском противочумном институте «Микроб» разработана и внедрена в практику вакцинопрофилактики против холеры на территории России бивалентная химическая таблетированная холерная вакцина, содержащая основные протективные антигены холерного вибриона: холероген-анатоксин, соматические О-антигены Огава и Инаба. Указанные компоненты вакцины получают из детоксицированной формалином культуральной жидкости штаммов-продуцентов путем осаждения сульфатом аммония. Для повышения эффективности процессов выделения О-антигена из детоксицированного безмикробного центрифугата штамма холерного вибриона М41 серовара Огава был разработан способ предварительного концентрирования культуральной жидкости на установке из шести ультрафильтрационных модулей на полых волокнах марки УВА-ПС-20-1040. При этом была достигнута большая экономия (в 10–12 раз) сульфата аммония и рабочего времени [1]. Данная технология

была внедрена в производственный процесс. Однако отсутствие таких модулей на биотехнологическом рынке и некоторые недостатки данной технологии, к которым можно отнести низкую удельную скорость фильтрации и потери препарата, побудили нас исследовать возможность использования процесса концентрирования протективных антигенов штамма *V. cholerae* М41 серовара Огава методом тангенциальной ультрафильтрации.

Нами был разработан способ концентрирования нативного О-антигена холерных вибрионов с применением мембран с номинальной отсечкой по молекулярной массе (НОММ) 20, 50, 100, 300 и 500 кДа в режиме тангенциальной фильтрации. Преимущество этого способа заключается в увеличении производительности процесса и снижении потерь О-антигена, с сохранением показателей качества препарата [2, 3].

При этом свойства полученных компонентов вакцины изучались только в соответствии с показателями, установленными в нормативных докумен-

Сравнительная характеристика препаратов, полученных по производственной и усовершенствованной технологии

Наименование характеристики	Значение характеристики препарата О-антигена, полученного					
	по регламентному способу	по экспериментальной технологии при использовании мембран с НОММ, кДа				
		20	50	100	300	500
Белок, %	62,0	48,5	45,3	39,0	53,5	45,0
Углеводы, %	20,0	14,0	22,0	15,0	18,0	14,0
Липиды, %	14,0	10,0	15,0	10,5	13,0	13,5
Нуклеиновые кислоты, %	5,1	3,9	4,9	5,0	4,9	4,8
Альдогептоза, %	1,3	1,5	1,85	2,0	2,3	2,3
Содержание О-АГ, мг/мл	0,18	0,22	0,24	0,2	0,19	0,19

тах на производство холерной вакцины (активность О-антигена в реакции иммунной диффузии и его содержание в реакции непрямой агглютинации). Поэтому значимый научно-практический интерес представляло более детальное исследование иммунохимических, химических и биохимических свойств протективных антигенов штамма *V. cholerae* М41 серовара Огава, полученных по усовершенствованной технологии их концентрирования, что и являлось целью данной работы.

Материалы и методы

В качестве препарата сравнения использовали О-антигенную фракцию производственной (№ 240) серии вакцины, полученную в соответствии с производственным регламентом. Исследованиям подвергались пять сухих специфических фракций, содержащих О-антиген холерного вибриона штамма М41 серовара Огава, полученных с использованием усовершенствованной технологии их концентрирования на мембранах с различными НОММ: 20, 50, 100, 300, 500 кДа.

В исследовании использовали коммерческую сыворотку диагностическую холерную О1 адсорбированную сухую для реакции агглютинации производства РосНИПЧИ «Микроб» (серия 78).

Хроматографическое фракционирование осуществляли в системе для хроматографии Biologic LP (Bio-Rad, США) с использованием колонки длиной 16 см с диаметром 2,0 см с TSK-гелем HW-65. Электрофоретический контроль выделенных фракций осуществляли по методу U.K.Laemmli [5] в системе для электрофореза «Mini protean II» фирмы

«Bio-Rad» (США).

Определение концентрации белка проводили в соответствии с методиками, изложенными в методических указаниях (МУК 4.1/4.2.588-96). Изучение химического состава препаратов осуществляли общепринятыми методами: суммарных углеводов – по Дюбуа, альдогептозы – по Osborn. Количество нуклеиновых кислот измеряли по методу, описанному А.С.Спириным [4]. Для определения общих липидов использовали биотест «Lachema».

Количество О-антигена во фракциях измеряли иммуноферментным методом ИФА ELISA [6], при постановке которого в качестве положительного контроля и для определения чувствительности метода использовали хроматографически очищенный препарат О-антигена, полученный из эталонного штамма *V. cholerae* М41 классического биовара серовара Огава.

Результаты и обсуждение

Изучение химического состава фракций, полученных двумя различными способами, результаты которых представлены в таблице, показало, что общее количество основных химических компонентов в препаратах было сходным и составляло: углеводов – 15–20 %, липидов – 12–15 %, нуклеиновых кислот – 3–5 %. Некоторые отличия были обнаружены в количестве белка: у экспериментальных О-антигенов оно составляло 40–50 %, у полученного по регламентной технологии – 62 %. Данное обстоятельство можно объяснить удалением неспецифических белковых компонентов в процессе ультрафильтрации. Содержание альдогептозы во всех

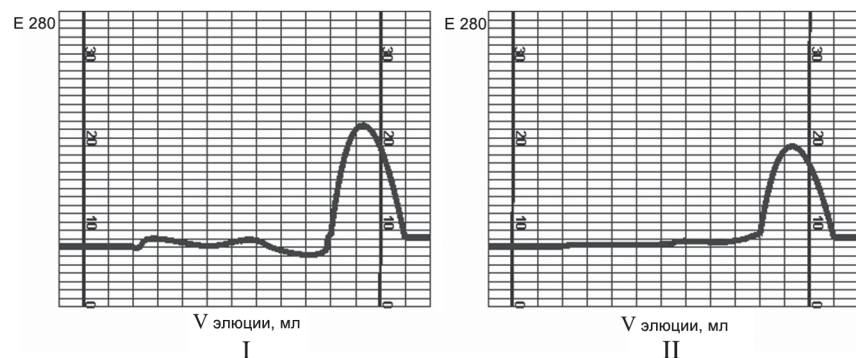


Рис. 1. Результаты хроматографического анализа препаратов, полученных различными способами:

I – препарат, полученный традиционным способом (серия № 240); II – препарат, полученный разработанным способом (с использованием мембран с НОММ 500 кДа)

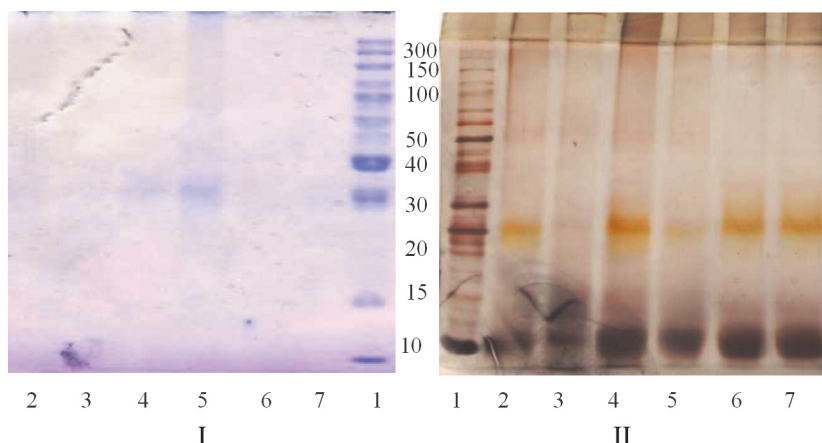


Рис. 2. Результаты анализа электрофоретической подвижности препаратов, проведенного с использованием диск-электрофореза с окраской Кумасси R250 (I) и серебром (II):

I – маркеры молекулярной массы от 10 до 300 кДа, II – серия № 240; 3–7 – препарат, полученный разработанным способом (с использованием мембран с НОММ 20, 50, 100, 300 и 500 кДа соответственно)

препаратах О-антигена было сходным и составляло 1,3 % для серии № 240 и 1,5–2,3 % для экспериментальных серий.

Содержание О-антигена, измеренное иммуноферментным методом ИФА ELISA, было близким и составляло 0,18 мг/мл для серии № 240 и 0,19–0,22 мг/мл для экспериментальных образцов.

Изучение препаратов методом гель-хроматографии, результаты которого представлены на рис. 1, показало, что профили элюции представляли собой подобные пики, оба препарата выходили с колонки практически с одинаковой задержкой во времени, что также характеризует стандартность серий О-антигена. Необходимо отметить, что профили элюции для препаратов О-антигена, полученных при использовании мембран с НОММ 20, 50, 100 и 300 кДа, были одинаковы и не различались от таковых для О-антигена, полученного при использовании мембран с НОММ 500 кДа, поэтому на рис. 1 они не приведены.

Проведенный анализ электрофоретической подвижности экспериментальных препаратов, данные которого представлены на рис. 2, свидетельствует о том, что их белково-углеводные комплексы практически идентичны.

Таким образом, проведенный сравнительный анализ иммунохимических, химических и биохимических свойств препаратов О-антигена *V. cholerae* М41 классического биовара серовара Огава, полученных по традиционной и экспериментальной технологиям их концентрирования показал, в основном, на совпадение их характеристик, что дает основания для возможного внедрения разработанных приемов в технологический процесс производства бивалентной химической таблетированной холерной вакцины.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Дятлов И.А., Нижегородцев С.А., Громова О.В., Васин Ю.Г., Бутов А.С., Клокова О.Д., Белякова Н.И. Разработка ультрафильтрационной технологии получения О-антигена холер-

ного вибриона для производства вакцин. Пробл. особо опасных инф. 2001; 2(82):133–9.

2. Комиссаров А.В., Еремин С.А., Аleshina Ю.А., Васин Ю.Г., Клокова О.Д., Белякова Н.И. Экспериментальная оценка использования метода ультрафильтрации по принципу «кросс-флоу» для концентрирования О-антигена в производстве холерной бивалентной химической вакцины. Пробл. особо опасных инф. 2011; 2(108):83–6.

3. Комиссаров А.В., Никифоров А.К., Еремин С.А., Аleshina Ю.А., Громова О.В., Крайнова А.Г., Клокова О.Д., Белякова Н.И., Васин Ю.Г. Способ концентрирования нативного холерного О-антигена *Vibrio cholerae*. Патент 2445116 РФ, опубл. 20.03.2012 г. Бюл. № 8.

4. Спиринов А.С. Спектрофотометрическое определение суммарного количества нуклеиновых кислот. Биохимия. 1958; 23(5):656–62.

5. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 1970; 227:680–5.

6. Svennerholm A.M., Holmgren J. Identification of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin by means of a ganglioside immunosorbent assay (GM₁-ELISA) procedure. Curr. Microbiol. 1978; 1:19–23.

References

1. Dyatlov I.A., Nizhegorodtsev S.A., Gromova O.V., Vasin Yu.G., Butov A.S., Klokov O.D., Belyakova N.I. [Development of ultrafiltration technology for cholera vibrio O-antigen preparation for further vaccine production]. Probl. Osobo Opasn. Infek. 2001; 2(82): 133–9.

2. Komissarov A.V., Eremin S.A., Aleshina Yu.A., Vasin Yu.G., Klokov O.D., Belyakova N.I. [Experimental evaluation of application of “cross-flow” ultrafiltration method for O-Antigen concentrating in cholera chemical bivalent vaccine production]. Probl. Osobo Opasn. Infek. 2011; 2(108): 83–6.

3. Komissarov A.V., Nikiforov A.K., Eremin S.A., Aleshina Yu.A., Gromova O.V., Kraynova A.G., Klokov O.D., Belyakova N.I., Vasin Yu.G. [Method of concentrating of *Vibrio cholerae* native cholera O-antigen]. RF Patent 2445116.

4. Spirin A.S. [Spectrophotometric identification of the nucleic acids cumulative amount]. Biokhimiya. 1958; 23(5):656–62.

5. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 1970; 227:680–5.

6. Svennerholm A.M., Holmgren J. Identification of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin by means of a ganglioside immunosorbent assay (GM₁-ELISA) procedure. Curr. Microbiol. 1978; 1:19–23.

Authors:

Aleshina Yu.A., Pavlova V.I., Komissarov A.V., Gromova O.V., Nikiforov A.K., Kireev M.N., Eremin S.A., Volokh O.A., Gaeva A.V., Livanova L.F. Russian Research Anti-Plague Institute “Microbe”. 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russian Federation. E-mail: rusrap@microbe.ru

Об авторах:

Аleshina Ю.А., Павлова В.И., Комиссаров А.В., Громова О.В., Никифоров А.К., Киреев М.Н., Еремин С.А., Волох О.А., Гаева А.В., Ливанова Л.Ф. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». Российская Федерация, 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrap@microbe.ru

Поступила 23.11.12.