

С.А.Еремин, А.В.Комиссаров, О.А.Волох, И.А.Шепелев, О.В.Громова, А.К.Никифоров,
Ю.А.Алешина, Н.Г.Авдеева, Н.И.Белякова

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ТЕХНОЛОГИЯ ПОЛУЧЕНИЯ О-АНТИГЕНОВ АТОКСИГЕННЫХ ШТАММОВ ХОЛЕРНОГО ВИБРИОНА

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

Определены основные биокинетические показатели глубинного культивирования атоксигенных штаммов-продуцентов О-антигенов холерного вибриона. Апробирована технология концентрирования О-антигенов методом тангенциальной ультрафильтрации. Установлена принципиальная возможность использования этих штаммов для создания биологически безопасного производства химических холерных вакцин.

Ключевые слова: холерная вакцина, О-антиген, культивирование, концентрирование, тангенциальная ультрафильтрация.

S.A.Eremin, A.V.Komissarov, O.A.Volokh, I.A.Shepelev, O.V.Gromova, A.K.Nikiforov, Yu.A.Aleshina,
N.G.Avdeeva, N.I.Belyakova

Experimental Technology for O-Antigens Production of Non-Toxicogenic Strains of *Vibrio cholerae*

Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov

Determined are the key bio-kinetic indexes of submerged cultivation of *Vibrio cholerae* non-toxicogenic strains, producers of O-antigens. Evaluated is the technology of O-antigen concentration using tangential ultrafiltration technique. The results suggest the principal possibility of using these strains for biologically safe production of chemical cholera vaccines.

Key words: cholera vaccine, O-antigen, cultivation, concentration, tangential ultrafiltration.

Лицензированная на территории России холерная химическая вакцина, разработанная в РосНИПЧИ «Микроб» и состоящая из холерогена-анатоксина и О-антигенов холерного вибриона сероваров Инаба и Огава, не уступает по эффективности рекомендованной ВОЗ [9] оральной холерной вакцине WC-rBS [5, 7]. Недостатком российской химической холерной вакцины является отсутствие в ее составе компонентов О-антигенов, способных создавать иммунитет против возбудителей холеры O139 серогруппы, хотя еще в 2001 г. ВОЗ заявила, что «существует острая необходимость в вакцинах против холеры, которые эффективны против различных эпидемических штаммов *Vibrio cholerae*, включая штамм O139» [8]. Российскими исследователями разработана оральная химическая вакцина для специфической профилактики холеры, вызванной эпидемически значимыми штаммами НАГ вибрионов O139 серовара [3]. В технологии производства вышеназванных отечественных холерных вакцин используются вирулентные штаммы холерного вибриона. Работа с вирулентными штаммами в условиях производства требует больших материальных затрат для обеспечения биологической безопасности.

В РосНИПЧИ «Микроб» сконструированы атоксигенные штаммы холерного вибриона *V. cholerae eltor* Инаба М 569 (ПВ) и *V. cholerae eltor* Огава 5/65 (ПВ) [6], являющиеся продуцентами O1-антигенов.

Для продукции O139 антигена возможно использование нетоксигенного штамма *V. cholerae* O139 М 377. Эти штаммы холерного вибриона перспективны для создания отечественной современной химической вакцины против холеры.

Однако отсутствие, на данный момент, технологии получения О-антигенов из атоксигенных штаммов холерных вибрионов определяет важность и перспективность научных исследований по ее разработке.

Целями данной работы являлись определение условий глубинного культивирования штаммов-продуцентов протективных антигенов (соматического О-антигена Инаба и Огава, O139 антигена) и разработка экспериментальной технологии их концентрирования.

Материалы и методы

Источником протективных антигенов служили рекомбинантные атоксигенные штаммы, полученные из Государственной коллекции патогенных бактерий РосНИПЧИ «Микроб»: *V. cholerae eltor* Инаба М 569 (ПВ) – продуцент О-антигена Инаба; *V. cholerae eltor* Огава 5/65 (ПВ) – продуцент О-антигена Огава и авирулентный штамм *V. cholerae* O139 М 377 – продуцент O139-антигена.

Глубинное культивирование штаммов-продуцентов проводили на ферментере с рабочим объемом

20 дм³ с автоматическими системами поддержания параметров культивирования в течение 7–10 ч с подкормкой (глюкоза 40 %) и коррекцией рН (аммиак). Объем питательной среды составлял 14 дм³, температура культивирования 37 °С. Исследуемые штаммы выращивали на питательных средах, используемых при культивировании штаммов-продуцентов при производстве химической холерной вакцины (казеиновый бульон, рН 7,6–8,0, с 1 % (2 %) пептоном). В ходе выращивания контролировали такие параметры, как рН среды, концентрация биомассы (м.к./мл), жизнеспособность (КОЕ/мл), продукция антигена. В зависимости от этих показателей изменяли уровень подаваемого кислорода, скорость перемешивания питательной среды и подачу дополнительного источника питания – глюкозы. Содержание О1 и О139 антигенов определяли в реакции диффузионной преципитации в агаровом геле по Оухтерлони (РДП) со специфическими агглютинирующими сыворотками (О1, Инаба и Огава, О139), производства РосНИПЧИ «Микроб». Продукцию О-антигенов в почасовых пробах оценивали в реакции дот-иммуноанализа (ДИА) со специфическими сыворотками (О1, Инаба и Огава, О139).

Оценку биокинетических показателей роста проводили с использованием морфометрических и биокинетических методов анализа. Состояние популяции оценивали по следующим показателям [2]: удельная скорость роста клеток, удельная скорость образования антигена.

Исходным материалом для концентрирования холерных антигенов являлись обработанные формалином центрифугаты бульонной культуры указанных штаммов холерного вибриона, полученных при глубинном культивировании. Для концентрирования протективных антигенов холерного вибриона применяли установки для микро- и ультрафильтрации на базе фильтродержателя АСФ-009 (производства СП «Владисарт», Владимир), оснащенной мембранными модулями с номинальной отсечкой по молекулярной массе (НОММ) 20 и 300 кДа, с площадью фильтрации 0,1 м² и Vivaflow-200 (производства фирмы Sartorius, Германия) с мембранными модулями 100 кДа, с площадью фильтрации 0,02 м². Критерием окончания процесса выбрано уменьшение объема безмикробного центрифугата в 10 раз.

Результаты и обсуждение

Для всех штаммов присуще отсутствие фазы приспособления (лаг-фазы) и практически полное отсутствие стационарной фазы и быстрый лизис бактериальных клеток, особенно при достижении концентраций более 140 млрд м.к./мл. По нашим наблюдениям, такая кривая роста – сокращенные лаг-фаза и стационарная фаза – характерны для штаммов биоэпидемиологического эльтор. Все это способствует сокращению времени культивирования до 8–8,5 ч (в сравнении – 9–11 ч при производстве вакцины бивалентной химической таблетированной), что делает процесс более технологичным и менее затратным по времени.

При культивировании всех штаммов-продуцентов отмечено усиленное пенообразование на самых ранних стадиях (после 1–2 ч от начала выращивания). Применение пеногасителей как органической (для штамма 5/65 (ПВ), так и минеральной природы (для штаммов 5/65 (ПВ), М 569 (ПВ), М 377) позволило использовать более высокую скорость мешалки (до 800 об/мин) для улучшения массо- и газообменных характеристик процесса в ходе всего периода культивирования. Максимальная удельная скорость накопления и выход О-антигенов наблюдались при переходе в стационарную фазу, при этом из поддукция в 4–8 раз превышала нормируемые значения при выращивании производственных вирулентных штаммов.

На следующем этапе работы оценивали возможность концентрирования О-антигенов атоксигенных штаммов холерных вибрионов методом тангенциальной ультрафильтрации. Основываясь на данных литературы [1] и результатах собственных исследований [4], концентрирование О-антигенов проводили на мембранах с НОММ – 20, 100 и 300 кДа при давлении на входе в фильтрационную установку 1,5 кгс/см². Результаты данного этапа исследований представлены в таблице.

В результате сравнительного анализа показателей исходных центрифугатов, концентратов и фильтратов, представленных в таблице, установлено, что во всех циклах концентрирования О-антигены, растворенные в культуральной жидкости, в процессе ультрафильтрации сохранялись в концентрате, при этом их содержание увеличивалось в 8 раз. Наибольшая средняя удельная скорость фильтрации

Характеристики О-антигенов

Показатель	О139-антиген штамма М 377						О-антиген Инаба штамма М 569 (ПВ)						О-антиген Огава штамма 5/65 (ПВ)								
	БМЦ	20 кДа		100 кДа		300 кДа		БМЦ	20 кДа		100 кДа		300 кДа		БМЦ	20 кДа		100 кДа		300 кДа	
		К	Ф	К	Ф	К	Ф		К	Ф	К	Ф	К	Ф		К	Ф	К	Ф	К	Ф
Содержание О-антигена в РДП, обратный титр	8	64	н/о	64	н/о	64	н/о	8	64	н/о	64	н/о	64	н/о	16	128	н/о	128	н/о	128	н/о
Мутность (ОД)	0,14	1,4	0,07	1,4	0,07	1,4	0,07	0,14	1,4	0,07	1,4	0,07	1,4	0,07	0,8	1,8	0,07	1,8	0,07	1,8	0,07
рН	7,6	7,6	7,6	7,6	7,6	7,6	7,6	7,6	7,6	7,6	7,6	7,6	7,6	7,6	6,8	6,8	6,8	6,8	6,8	6,8	6,8
Средняя удельная скорость фильтрации, дм ³ /м ² /ч	-	9,5		15,6		18,7		-	11,0		17,2		22,6		-	13,9		20,2		28,2	

Примечание. БМЦ – безмикробный центрифугат; К – концентрат; Ф – фильтрат; н/о – не обнаружено.

наблюдалась при использовании ультрафильтрационной мембраны с НОММ 300 кДа.

Далее провели исследования по обоснованию оптимальных параметров давления при проведении процесса концентрирования О-антигенов штаммов М 377, М 569 (ПВ) и 5/65 (ПВ). Было показано, что оптимальными параметрами давления при проведении процесса концентрирования всех трех О-антигенов является давление на входе и выходе фильтрационной установки – $(2,5 \pm 0,1)$ и $(0,5 \pm 0,1)$ кгс/см². При этом средняя удельная скорость фильтрации составила для О139-антигена штамма М 377 – 36,0, О-антигена Инаба штамма М 569 (ПВ) – 43,2 и О-антигена Огава штамма 5/65 (ПВ) – 54,0 дм³/м²/ч.

На заключительном этапе исследований получали готовый полуфабрикат вакцины. Концентраты О-антигена центрифугировали для осаждения нерастворимых компонентов на центрифуге Beckman при 15000 g. Из надосадочной жидкости О-антиген осаждали сульфатом аммония и снова центрифугировали, как описано выше, диализовали и стерилизовали. После лиофильной сушки О-антигенсодержащие фракции показали специфическую активность с коммерческими гомологичными сыворотками (титры в РДП 1:8, 1:16, 1:4 у антигенов Инаба, Огава и О139 соответственно). Серологическая активность О-антигенов Инаба и Огава в реакции непрямой геммагглютинации с холерной О-сывороткой составляла 1:228, что соответствует требованиям регламента производства вакцины холерной бивалентной химической таблетированной.

Таким образом, в результате проведенных исследований определены основные биокинетические показатели глубинного культивирования атоксигенных штаммов-продуцентов О-антигенов холерного вибриона, позволяющие осуществить масштабный переход от лабораторных к промышленным ферментерам.

Апробирована экспериментальная технология концентрирования О-антигенов атоксигенных штаммов холерного вибриона. Показано, что для их концентрирования целесообразно использование мембран с НОММ 300 кДа. Доказано, что большая скорость фильтрации наблюдается при давлении на входе и выходе фильтрационной установки равными $(2,5 \pm 0,1)$ и $(0,5 \pm 0,1)$ кгс/см² соответственно.

Установлена принципиальная возможность использования этих штаммов для создания биологически безопасного производства химических холерных вакцин.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Адамов А.К., Наумшина М.С.* Холерные вибрионы. Саратов: Изд-во Саратов. ун-та; 1984. 328 с.
2. *Бирюков В.В.* Основы промышленной биотехнологии. М.: КолосС; 2004. 296 с.
3. *Громова О.В., Джанпаридзе М.Н., Дятлов И.А., Елисеев Ю.Ю., Киреев М.Н., Наумов А.В.* Оральная химическая вакцина против холеры. Патент РФ 2159128, опублик. 20.11.2000.
4. *Комиссаров А.В., Еремин С.А., Алешина 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):83–5.
5. *Кутырев В.В., Девдариани З.Л., Саяпина Л.В.* Современное состояние научных исследований в области профилактики особо опасных инфекционных бактериальных инфекций. Пробл. особо опасных инф. 2006; 2(92):18–24.
6. *Стрельникова-Ааб Е.Н., Ливанова Л.Ф., Горяев А.А., Челдышова Н.Б., Смирнова Н.И.* Авирулентные штаммы *Vibrio cholerae* O1 – продуценты протективного O1-антигена: получение и свойства. Пробл. особо опасных инф. 2010; 4(106):39–42.
7. *Шуковская Т.Н., Саяпина Л.В., Кутырев В.В.* Вакцинопрофилактика холеры: современное состояние вопроса. Эпидемиол. и вакцинопрофилактик. 2009; 2(45):62–7.
8. Cholera, 2000. Weekly Epidemiological Record (WER). 2001; 76(31):233–40.
9. Cholera vaccines: WHO position paper. Weekly Epidemiological Record (WER). 2010; 85(13):117–28.

References

1. *Adamov A.K., Naumshina M.S.* [Cholera Vibrios] Saratov; 1984. 328 p.
2. *Biryukov V.V.* [Basic Principles of Industrial Biotechnology]. M.; 2004. 296 p.
3. *Gromova O.V., Dzhaparidze M.N., Dyatlov I.A., Eliseev Yu.Yu., Kireev M.N., Naumov A.V.* [Oral chemical vaccine against cholera]. Patent RF 2159128.
4. *Komissarov A.V., Eremin S.A., Aleshina Yu.A., Vasin Yu.G., Klokova 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. 2006; (108):83–5.
5. *Kutyrev V.V., Devdariani Z.L., Sayapina L.V.* [Present status of the researches in the sphere of vaccine prophylaxis of particularly dangerous bacterial infections]. Probl. Osobo Opasn. Infek. 2006; (92):18–24.
6. *Strelnikova-Aab E.N., Livanova L.F., Goryaev A.A., Cheldyshova N.B., Smirnova N.I.* [*Vibrio cholerae* O1 avirulent strains-producers of protective O1 antigen: obtaining and peculiarities]. Probl. Osobo Opasn. Infek. 2010; (106):39–42.
7. *Shchukovskaya T.N., Sayapina L.V., Kutyrev V.V.* [Vaccine prophylaxis of cholera: present status]. Epidemiol. Vaktinoprof. 2009; 2(45):62–7.
8. Cholera, 2000. Weekly Epidemiological Record (WER). 2001; 76(31):233–40.
9. Cholera vaccines: WHO position paper. Weekly Epidemiological Record (WER). 2010; 85(13):117–28.

Authors:

Eremin S.A., Komissarov A.V., Volokh O.A., Shepelev I.A., Gromova O.V., Nikiforov A.K., Aleshina Yu.A., Avdeeva N.G., Belyakova N.I. Russian Research Anti-Plague Institute “Microbe”. 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russia. E-mail: rusrap@microbe.ru

Об авторах:

Еремин С.А., Комиссаров А.В., Волох О.А., Шепелев И.А., Громова О.В., Никифоров А.К., Алешина Ю.А., Авдеева Н.Г., Белякова Н.И. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrap@microbe.ru

Поступила 09.02.12.