

А.К.Никифоров, А.В.Комиссаров, А.Ю.Ульянов, С.А.Еремин, О.А.Волох, Н.И.Белякова,
Ю.А.Алешина, Ю.Г.Васин

ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОЦЕССОВ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ШТАММОВ ХОЛЕРНОГО ВИБРИОНА – ПРОДУЦЕНТОВ ПРОТЕКТИВНЫХ АНТИГЕНОВ ВАКЦИНЫ ХОЛЕРНОЙ БИВАЛЕНТНОЙ ХИМИЧЕСКОЙ ТАБЛЕТИРОВАННОЙ В СКОНСТРУИРОВАННОМ БИОРЕАКТОРЕ

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

Изучена кинетика накопления основных антигенов при выращивании штаммов *Vibrio cholerae* М-41 серовара Огава и 569В серовара Инаба в производственных и разработанном реакторах. Установлена возможность получения кондиционных нативных протективных антигенов на разработанном биореакторе. Показана идентичность физиологических и морфологических свойств производственных штаммов холерных вибрионов в ходе их глубинного культивирования на производственных и разработанном биореакторах. Показатели качества вакцины холерной химической бивалентной таблетированной, полученной с использованием разработанного биореактора, соответствуют требованиям нормативной документации и не уступают таковым препарата, производимого традиционным способом.

Ключевые слова: *Vibrio cholerae*, холерная вакцина, холероген-анатоксин, О-антиген, культивирование, свойства.

A.K.Nikiforov, A.V.Komissarov, A.Yu.Ul'yanov, S.A.Eremin, O.A.Volokh, N.I.Belyakova, Yu.A.Aleshina,
Yu.G.Vasin

Examination of Processes of Cultivation of *V. cholerae* strains – Producers of Protective Antigens of Cholera Bivalent Chemical Vaccine in Tablets – in the Engineered Bioreactor

Studied is the kinetics of major antigen accumulation at growing of *Vibrio cholerae* M-41 Ogawa and 569 B Inaba strains in industrial and engineered reactors. Demonstrated is the possibility to obtain conditional native protective antigens in the engineered bioreactor. Shown is the identity of physiological and morphological properties of industrial *Vibrio cholerae* strains during their submerged cultivation in industrial and engineered bioreactors. Cholera bivalent chemical vaccine obtained using engineered bioreactor possesses quality indices meeting the requirements of normative documents and equal to those of preparation received by traditional approach.

Key words: *Vibrio cholerae*, cholera vaccine, cholera toxin, O-antigen, cultivation, properties.

Для создания производственных мощностей приготовления холерной бивалентной химической вакцины, с учетом обеспечения биологической безопасности производства и современных достижений в области разработки оборудования для медицинских иммунобиологических препаратов, коллективом ученых РосНИПЧИ «Микроб» [4] был сконструирован, изготовлен и установлен на аппаратно-технологической линии приготовления вакцины реактор-ферментер.

В предыдущих исследованиях нами была изучена кинетика роста биомассы производственных штаммов *V. cholerae* М-41 серовара Огава и 569В серовара Инаба. Было показано, что она значительно не отличается от аналогичных показателей в существующих производственных реакторах.

Целевыми продуктами при выращивании производственных штаммов являются О-антигены, продуцируемые холерными вибрионами сероваров Огава и Инаба, и холерный токсин, выделяющийся в культуральную среду при культивировании *V. cholerae* 569В серовара Инаба. Поэтому представлялось целесообразным изучить кинетику накопления вышеназванных антигенов в производственных и разработанном реакторах.

Каждый микроорганизм живет со строго определенным значением рН и очень чувствителен к его

изменению. Это приводит либо к замедлению роста, либо к гибели. От рН зависит активность фермента, заряд клеточных оболочек, растворимость катионов и анионов и т.д. Общеизвестно, что при глубинном периодическом культивировании микроорганизмов основную роль в изменение рН культуральной жидкости вносят продукты метаболизма бактерий при потреблении, в основном, углеродных источников их питания [1, 2]. Поэтому несомненный интерес представляло изучение физиологических потребностей в источниках углерода производственных штаммов холерных вибрионов – продуцентов протективных антигенов и их морфологических свойств при культивировании в сконструированном биореакторе. Значимый научно-практический интерес представляло исследование физико-химических и иммунобиологических свойств вакцины холерной химической бивалентной таблетированной, полученной с использованием разработанного биореактора, что и являлось целями данной работы.

Материалы и методы

В работе использованы штаммы *V. cholerae* М-41 серовара Огава и 569В серовара Инаба, являющиеся продуцентами компонентов холерной химической вакцины, и *V. cholerae* 3122-Р серовара Огава

Кинетика накопления антигенов в ходе культивирования

Продолжительность выращивания, ч	Содержание О-антигена <i>V. cholerae</i> 569В Инаба в РИД с О1 сывороткой, обратный титр			Содержание холерного токсина <i>V. cholerae</i> 569В Инаба в РИД с АХС, обратный титр			Содержание О-антигена <i>V. cholerae</i> М-41 Огава в РИД с О1 сывороткой, обратный титр		
	ПР	СР	НЗ	ПР	СР	НЗ	ПР	СР	НЗ
5	1	1	-	1	1	-	0	1	-
6	2	2	-	2	2	-	1	2	-
7	6	6	-	3	3	-	2	4	-
8	10	10	-	4	4	-	6	8	-
9	10	10	Не менее 4	4	4	Не менее 1	10	12	Не менее 8

Примечание. ПР – производственный реактор; СР – сконструированный реактор; НЗ – нормируемое значение; «-» требования отсутствуют.

и *V. cholerae* 879-М серовара Инаба, которые применялись для контроля иммуногенности препаратов (Государственная коллекция патогенных бактерий РосНИПЧИ «Микроб»).

Выращивание штаммов *V. cholerae* М-41 серовара Огава и *V. cholerae* 569В серовара Инаба с целью получения протективных антигенов проводили на разработанном биореакторе и реакторе-ферментере типа РЗРЯ-6/0,63, установленных на аппаратно-технологической линии производства холерной химической вакцины.

Выделение протективных антигенов после этапа осаждения сульфатом аммония осуществляли на сверхцентрифугах СГО-100 и Beckman при 15000 и 10000 g соответственно.

Активность О-антигенов и токсина холерных вибрионов определяли в реакции иммунодиффузии в геле (РИД) по Оухтерлони с сывороткой диагностической холерной О1 адсорбированной и антихолерогенной сывороткой (АХС) соответственно.

Определение ионов аммония и сульфат-ионов, остаточного формальдегида, рН, потери в массе при высушивании проводили в соответствии с методиками, изложенными в методических указаниях (МУК 4.1/4.2.588-96, 1998).

Определение иммуногенности проводили в тесте активной защиты на белых беспородных мышках. Специфическую безвредность (остаточную токсичность) проверяли в полуфабрикате специфической фракции Инаба на кроликах-сосунках. Специфическую безопасность вакцины определяли на кроликах породы шиншилла. Антигенную активность по анатоксинсвязыванию (ЕС) определяли в готовой продукции и полуфабрикате фракции Инаба, на кроликах породы шиншилла.

Результаты и обсуждение

Анализ полученных данных по изучению кинетики накопления антигенов в производственных и разработанном реакторах (табл. 1) показывает, что они значительно не отличаются, при этом полученные полупродукты (О-антигены и холерный токсин) соответствуют нормируемым требованиям.

На следующем этапе исследований изучено изменение уровня рН культуральной среды в ответ на

введение основного энергетического источника питания холерных вибрионов – глюкозы. Временные профили рН среды культивирования и количества глюкозы на производственном и разработанном биореакторах представлены на рисунке.

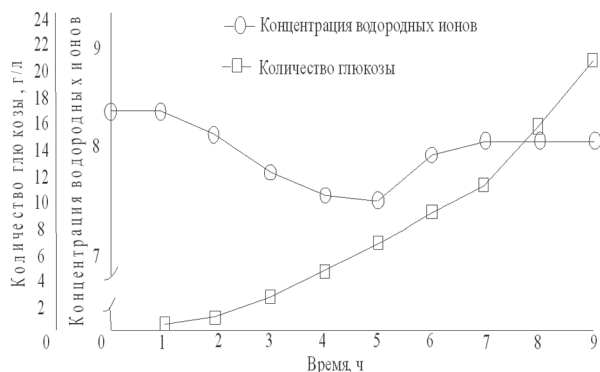
Анализ кривых, представленных на рисунке, показывает практически полное совпадение временных профилей рН среды культивирования и количества глюкозы на производственном и сконструированном биореакторах при выращивании штамма *V. cholerae* 569В Инаба. Максимальное закисление культуральной среды происходит к 5-му часу выращивания, после чего наблюдается возрастание рН, которое достигает своего максимума к 7-му часу и далее не меняется до окончания выращивания.

Временные профили рН среды культивирования и количества глюкозы на производственном и сконструированном биореакторах при выращивании штамма *V. cholerae* М-41 Огава сходны со значениями, полученными при выращивании штамма *V. cholerae* 569В Инаба. Также максимальное закисление культуральной среды происходит к 5-му часу выращивания, после чего наблюдается возрастание рН, которое достигает своего максимума к 7-му часу и далее не меняется до окончания выращивания.

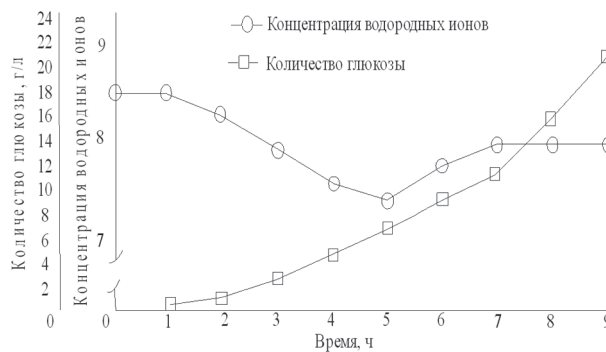
Таким образом, изучение изменения уровня рН культуральной среды в ответ на введение основного энергетического источника питания холерных вибрионов – глюкозы при культивировании производственных штаммов в производственном и сконструированном биореакторах не выявило значимых различий.

Кроме того, на всех этапах культивирования производственных штаммов проверяли их морфологию путем микроскопии мазков, окрашенных по Граму. В мазках, приготовленных из культуральной жидкости производственных и сконструированного биореакторов, вибрионы имели вид слегка изогнутых грамтрицательных палочек длиной 1,5–4,0 мкм, толщиной 0,2–0,4 мкм, обладали полиморфизмом.

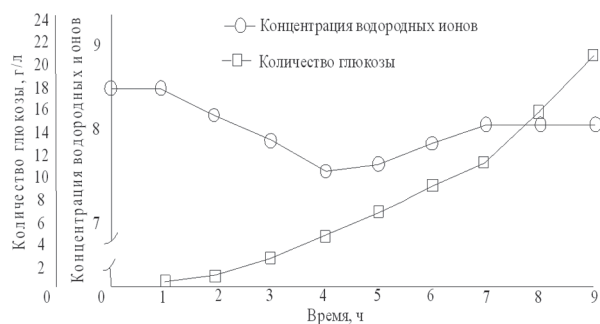
На заключительном этапе работы были определены физико-химические и иммунобиологические свойства вакцины холерной бивалентной химической таблетированной, полученной на сконструированном ферментационном оборудовании и с использованием разработанной экспериментальной технологии концентрирования. Одновременно с эксперименталь-



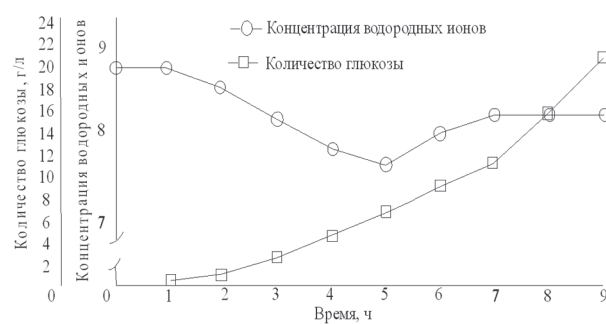
а



б



в



г

Временные профили pH среды культивирования и количества глюкозы:

а – на производственном биореакторе при выращивании штамма *V. cholerae* 569В Инаба; б – на сконструированном биореакторе при выращивании штамма *V. cholerae* 569В Инаба; в – на производственном биореакторе при выращивании штамма *V. cholerae* М-41 Огава; г – на сконструированном биореакторе при выращивании штамма *V. cholerae* М-41 Огава

ными сериями вакцины исследованиям, в качестве контроля, были подвергнута производственная се-

рия № 86, полученная по регламентной технологии. Полученные данные, представленные в табл. 2, по-

Таблица 2

Результаты исследования нормируемых физико-химических и иммунобиологических свойств серий вакцины

Наименование показателя	Требования нормативной документации	Значение показателя по сериям	
		контроль	экспериментальная
Описание	Таблетка – серовато-желтая компактная масса, покрытая светлой блестящей кислотоустойчивой оболочкой	Соответствует	
Ионы аммония и сульфат-ионы	Не допускается наличия ионов аммония и сульфат-ионов	Отсутствуют	
pH растворенного препарата	От 6,7 до 7,4	6,7	6,9
Распадаемость	Оболочка таблетки вакцины должна быть устойчива к действию децимолярного раствора соляной кислоты в течение 3 ч и распадаться в децимолярном растворе натрия гидроксида в течение 1 ч при температуре (37±1) °С	Устойчива – 3 ч 25 мин; распадается в течение 57 мин	Устойчива – 3 ч 35 мин; распадается в течение 55 мин
Средняя масса таблетки	От 0,285 г до 0,315 г	0,3	0,29
Формалин	Не более 0,2 %	0,012	0,014
Потеря в массе при высушивании	Не более 5 %	4,6	4,15
Микробиологическая чистота	Допускается не более 1000 колоний непатогенных микроорганизмов на одну таблетку. Вакцина не должна содержать патогенных и условно патогенных микроорганизмов	Не содержит патогенных и условно патогенных микроорганизмов; непатогенных – 44 колонии	Не содержит патогенных и условно патогенных микроорганизмов; непатогенных – 34 колонии
Токсичность	Вакцина должна быть нетоксичной	Нетоксичны	
Специфическая безопасность	Вакцина должна быть специфически безопасной	Специфически безопасны	
Специфическая активность			
антигенная активность по анатоксиносвязыванию	Должна содержать (100000±20000) единиц связывания анатоксина (ЕС)	100000	120000
содержание О-антигена	Не менее 2000 у.е. штаммов <i>V. cholerae</i>	10240	10480
иммуногенность	ЕД ₅₀ должна быть не более 1/20000 части таблетки	1/125000 (сер. Огава) 1/68000 (сер. Инаба)	1/142000 (сер. Огава) 1/100000 (сер. Инаба)

казали, что экспериментальная серия удовлетворяет требованиям нормативных документов, а ее качество не уступает вакцине, приготовленной по существующей технологии.

Таким образом, в результате проведенных исследований установлено, что культивирование производственных штаммов холерных вибрионов на разработанном биореакторе обеспечивает получение кондиционных нативных протективных антигенов. Изучение физиологических и морфологических свойств производственных штаммов холерных вибрионов в ходе их глубинного культивирования на производственных и разработанном биореакторах показало их идентичность. Исследование физико-химических и иммунобиологических свойств вакцины холерной химической бивалентной таблетированной, полученной с использованием разработанного биореактора, выявило, что она соответствует требованиям нормативной документации и не уступает по качеству препарату, производимому традиционным способом.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бирюков В.В. Основы промышленной биотехнологии. М.: КолосС; 2004. 296 с.
2. Лапшенков Г.И., Носов Г.А., Зиновкина Т.В. и др. Инженерные основы биотехнологии. М.: МГАТХТ им. М.В.Ломоносова; 2005. 380 с.

3. Никифоров А.К., Васин Ю.Г., Щербаков Д.А., Ульянов А.Ю., Стрганов В.В., Еремин С.А. Ферментационная установка для культивирования микроорганизмов. Патент 86184 РФ, опубл. 27.08.09 г. Бюл. № 24.

4. Ульянов А.Ю., Еремин С.А., Васин Ю.Г. и др. Разработка биореактора и оценка возможности его использования в производстве холерной вакцины. Вестник Саратовского государственного университета им. Н.И.Вавилова. 2011; 1:39–44.

References (Presented are the Russian sources in the order of citation in the original article)

1. Biryukov V.V. [Fundamentals of Industrial Biotechnology]. M.; 2004. 296 p.
2. Lapshenkov G.I., Nosov G.A., Zinovkina T.V. et al. [Engineering Fundamentals in Biotechnology]. M.; 2005. 380 p.
3. Nikiforov A.K., Vasin Yu.G., Shcherbakov D.A., Ul'yanov A.Yu., Stroganov V.V., Eremin S.A. [Fermentation unit for cultivation of microorganisms]. RF patent № 86184.
4. Ul'yanov A.Yu., Eremin S.A., Vasin Yu.G. et al. [Engineering of bioreactor and assessment of its possible application in the production of cholera vaccine.]. Vestnik Sar. Gosagr. Universit. 2011; 1:39–44.

Authors:

Nikiforov A.K., Komissarov A.V., Ul'yanov A.Yu., Eremin S.A., Volokh O.A., Belyakova N.I., Aleshina Yu.A., Vasin Yu.G. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russia. E-mail: rusrapi@microbe.ru

Об авторах:

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

Поступила 06.02.12.