

УДК 615.372:576.852.23.014.21..015.2:615.371

БИОТЕХНОЛОГИЯ ПОЛУЧЕНИЯ ДИФТЕРИЙНОЙ ПРЕЦИПИТИРУЮЩЕЙ СЫВОРОТКИ

Калягина С.Ю., Икрамов А.А.

ТашНИИВС АН РУз

Введение

Новые антигенные субстанции являются основой для усовершенствования вакцинных и диагностических препаратов. Исследователями изучены различные антигены, выделенные из *C. diphtheriae* методом солевой экстракции в щелочной среде [1], дезоксихолатом натрия [2], ацетоном и эфиром в сочетании с замораживанием и оттаиванием [3], и др. В нашем эксперименте впервые применен способ экстракции дифтерийных бактерий токсигенного штамма биовара *gravis* гидроксиламином гидроклоридом, который инактивирует бактериальную клетку, не разрушая её [4,5].

Материалы и методы

В эксперименте использовали три штамма *C. diphtheriae*, предоставленных Ташкентской ГорСЭС: №279 tox+ (применяется в Республике в качестве контрольного токсигенного штамма), №1499 tox- и №0801 tox- биовара *gravis*. Штаммы предварительно пассировали на ЭС, изучая морфологические, культуральные и биохимические свойства [6]. Затем проводили глубинное культивирование штаммов *C. diphtheriae* на ЭС. Начальная концентрация микробных клеток для внесения в ферментёр составляла 500 млн. м.к./мл среды. Объем ферментёра был равен 2 л и содержал 1 л питательной среды.

При инокуляции культуры бактерий питательный субстрат в ферментёре имел температуру $36\pm 1^\circ\text{C}$, и величину pH, равную $7,7\pm 0,1$.

Пробу культуры в течение роста брали через каждые 60 мин. культивирования. В пробах определяли густоту микробной массы (количество микробных клеток в 1мл) по ОСО ГИСК им. Л.А. Тарасевича, условно равному 1 млрд. м.к./мл. Значение pH среды определяли с помощью потенциометра, которое корректировали добавлением 20% стерильного раствора мальтозы по 10-15 мл каждый час и прекращали на пике логарифмической фазы роста бактерий для получения биомассы *C. diphtheriae*.

Биомассу инактивировали 20% -м раствором ГГ, добавляя его в реактор из расчета 0,5% концентрации к объему субстрата и продолжали перемешивание ещё 1 час, затем проводили контроль стерильности биомассы.

Для получения растворимых антигенов применяли метод «конвекции» [5,7], заключающийся в следующем: стерильную биомассу центрифугировали при 8000 об/мин в течение 45 минут, супернатант замораживали при $-20\pm 1^\circ\text{C}$, затем собирали жидкость после оттаивания при комнатной температуре (примерно 1/15 часть от объема супернатанта). Полученный концентрат диализовали против дистиллированной воды при температуре $2-4^\circ\text{C}$ в течение 2 суток.

Диализат разливали в инсулиновые флаконы по 1,2 мл и лиофильно высушивали под вакуумом в течение 48 часов. Сухой антигенный препарат хранили в герметично закупоренных флаконах в темном месте при температуре не выше 8°C .

Токсичность РДАtox+ определяли на белых мышах с расчетом величины LD_{50} по формуле Рида и Менча, которая составила 1,775 мкг для белых мышей.

Антигенные свойства РДАtox+ изучали при введении различных доз кроликам весом 2,5-3 кг. Для иммунизации по массе вычисляли среднюю низкотоксичную для кролика дозу антигена. Она составила 250 мкг. РДАtox+ вводили в ушную вену кролика четырехкратно, с интервалом 7 дней.

Иммунизацию проводили на четырех группах животных (по 5 кроликов в каждой). Перед каждой следующей иммунизацией внутривенно брали пробу крови и определяли титр преципитирующих антител в сыворотке. Через 7 дней после последней иммунизации брали пробу для определения титра преципитирующих антител. Для этого ставили реакцию кольцепреципитации (РКП) с РДАtoх+: в микропробирки помещали 0,2-0,3 мл испытуемой сыворотки с титром 1:4, 1:40 и т.д., затем наслаивали 0,1 мл растворенного РДАtoх+ (0,1 мг/мл).

Для определения специфической активности сыворотки РКП проводили методом разведения как опытной сыворотки, так и антигенов (РДА toх+, РДА toх-1,2). В качестве контроля антигена был использован препарат дифтерийного очищенного неадсорбированного анатоксина (50 Lf/мл).

После инкубации пробирок в термостате при $37 \pm 1^\circ\text{C}$ через 20-30 мин. по отчетливому кольцу преципитата на границе сыворотки и антигена учитывали результат: кольцо шириной 1,0-1,5 мм – четыре плюса; 0,5-1,0 мм – три плюса; 0,3-0,5 мм – два плюса; 0,1-0,3 мм – один плюс.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием параметрических методов, традиционных для микробиологических исследований [8].

Результаты и обсуждение

Установлено, что среда культивирования играет важную роль при получении бактериальных антигенов [7,9]. Большое значение имеет ненагруженность среды высокомолекулярными пептидами и белками. В наших экспериментах по получению РДАtoх+ ЭС содержала 100 мг% аминного азота, необходимые микроэлементы и практически не имела белковых компонентов [1]. Для определения оптимальных условий глубинного культивирования дифтерийных бактерий на жидкой ЭС испытаны 5 режимов аэрации и перемешивания (от 0,2 л/мин и 100 об/мин до 2,0 л/мин и 500 об/мин).

В эксперименте наблюдали выраженное влияние режима аэрации на накопление биомассы и времени наступления пика экспоненциальной фазы роста коринебактерий дифтерии (рис. 1-5).

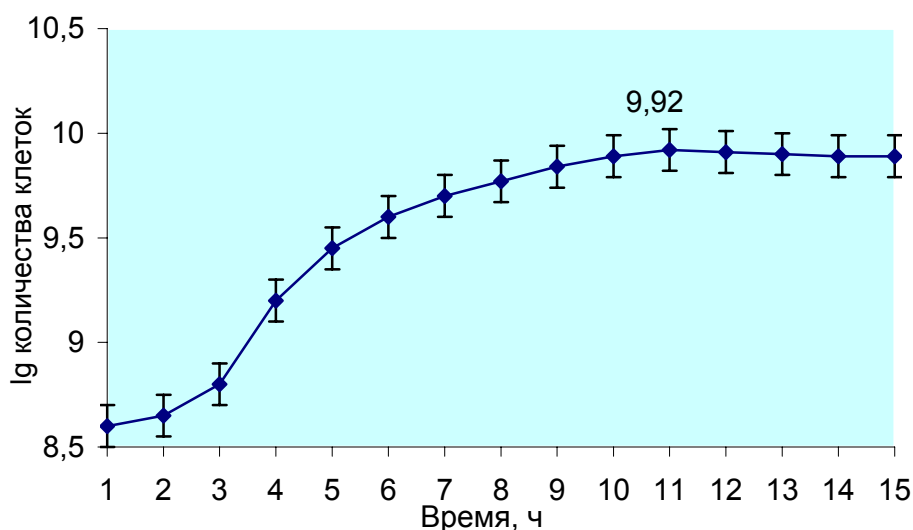


Рис. 1. Реж.№1: скорость перемешивания 100 об/мин, аэрация - 0,2 л/с

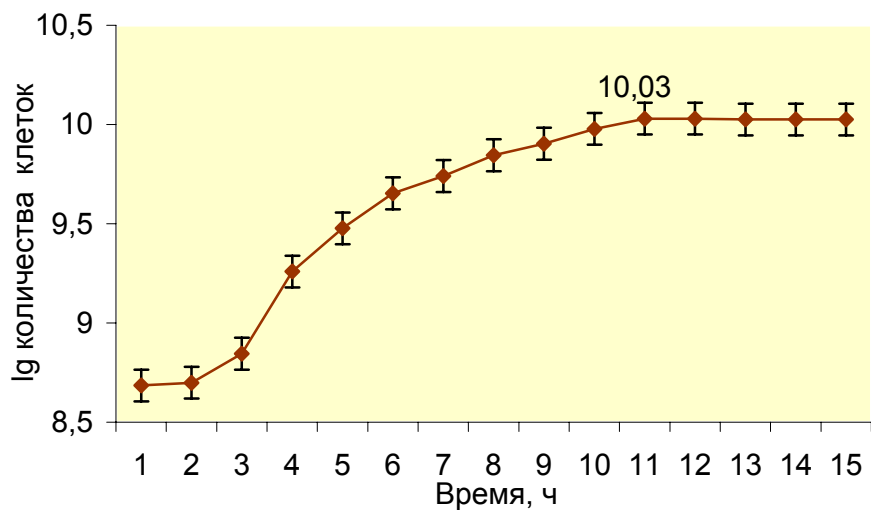


Рис. 2. Реж.№2: скорость перемешивания 200 об/мин, аэрация 0,5 л/с

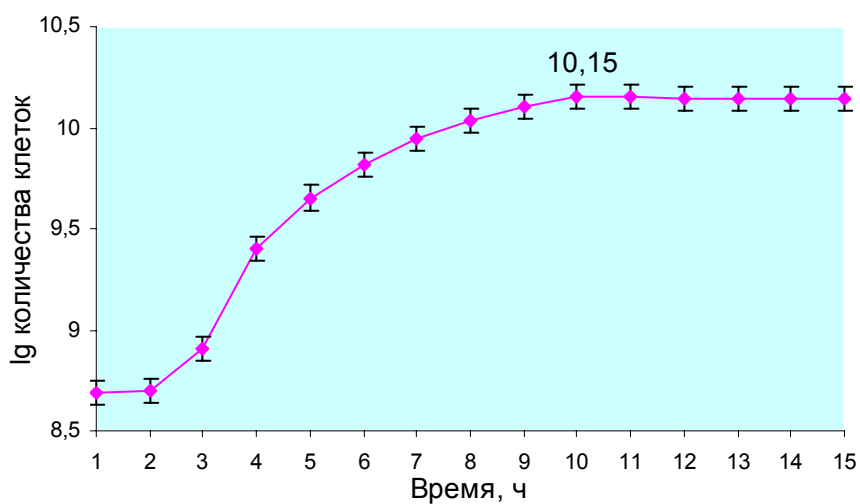


Рис.3. Реж.№3: скорость перемешивания 300 об/мин, аэрация 1л/мин

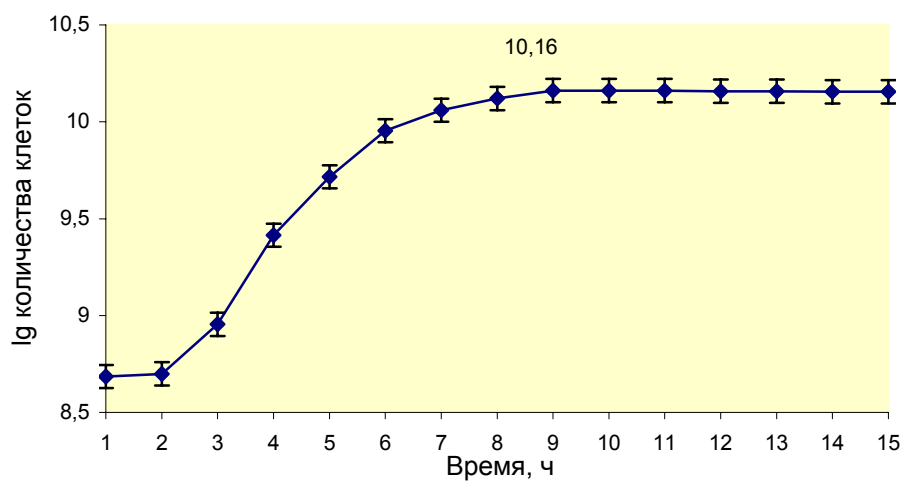


Рис. 4. Реж.№4: скорость перемешивания 400 об/мин, 1,5 л/мин

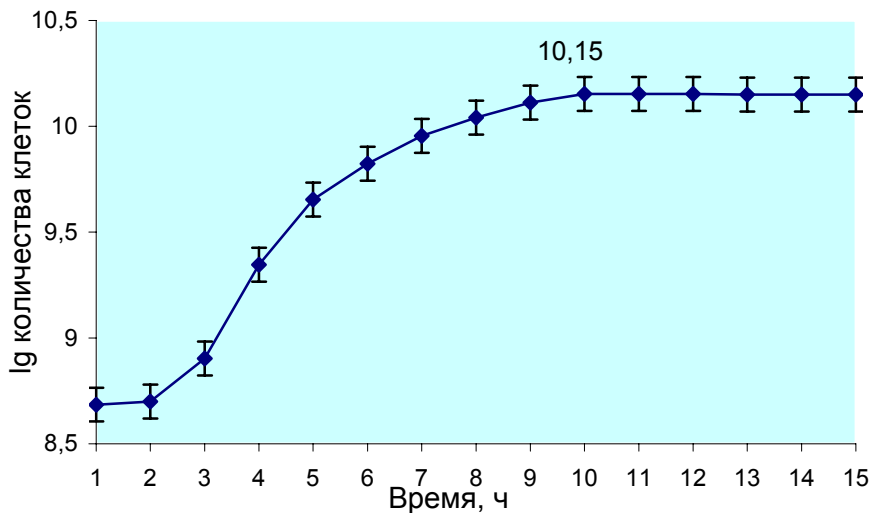


Рис.5. Реж.№5: скорость перемешивания 500 об/мин, аэрация 2 л/мин

Как видно из графиков на рис. 1-5, режим аэрации и перемешивания может влиять на скорость роста и накопление биомассы коринебактерий дифтерии при глубинном культивировании. Так, при скорости перемешивания 100 об/мин и аэрации 0,2 л/мин пик экспоненциальной фазы наступал после 11-и часов культивирования, при этом концентрация бактерий составляло 8,3 млрд.м.к./мл ($\lg=9,96$). При скорости перемешивания 200 об/мин и аэрации 0,5 л/мин (режим №2) пик экспоненциальной фазы наступал после 10-и часов культивирования, при этом число клеток составило 10,5 млрд.м.к./мл ($\lg=10,03$).

Значения пиков экспоненциальной фазы и количества клеток для режимов №3 и №4 соответственно были равны 14 млрд.м.к./мл ($\lg=10,15$) на 10-м часу культивирования и 14,5 млрд.м.к./мл ($\lg=10,16$) на 9-м часу культивирования. Для режима №5 максимальное количество клеток составило 14,3 млрд.м.к./мл ($\lg=10,15$) после 11-и часов культивирования. Лаг-фазы рассмотренных режимов были примерно одинаковыми и в среднем составили $2,5 \pm 0,2$ часа.

Оптимальным для накопления биомассы оказался режим глубинного культивирования при скорости перемешивания 400 об/мин и аэрации 1,5 л/мин. Конечная концентрация биомассы составила 14,5 млрд м.к./мл. Однако при данном режиме отмечали наиболее значительное понижение pH субстрата по сравнению с другими режимами – на $1,2 \pm 0,1$ (рис. 6).

Для получения биомассы *C. diphtheriae* нами применялся этот режим, а для коррекции величины pH и как источник углеводов к культивируемой биомассе прибавляли раствор мальтозы. Прирост биомассы *C. diphtheriae*

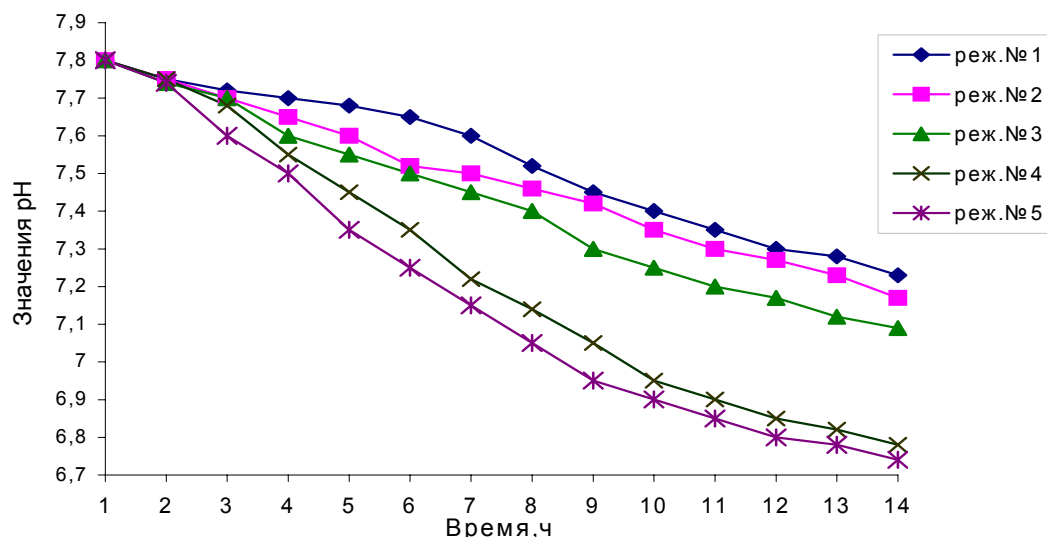


Рис. 6. Изменение значений pH при разных режимах культивирования

при глубинном культивировании на ЭС с добавлением мальтозы до конечной концентрации 0,3% представлен на

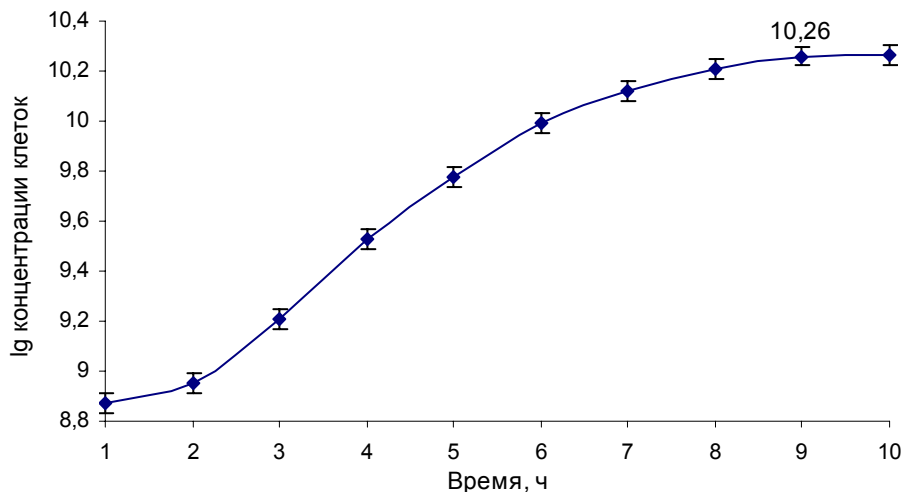


Рис. 7. Кривая роста *C. diphtheriae* в процессе глубинного культивирования с 0,3% мальтозы

Концентрация биомассы дифтерийных бактерий при данном режиме культивирования составила 18,2 млрд м.к./мл.

Из полученной биомассы путем экстракции ГГ выделяли РДАtoх+. Метод экстракции ГГ является щадящим по сравнению с другими методами выделения антигенов, так как не нарушает целостности клеток [4,5,9]. Сухой РДА toх+ представляет собой аморфный порошок бледно-желтого цвета, образующий прозрачный раствор в дистиллированной воде. Выход РДАtoх+ составил в среднем $1,28 \pm 0,1$ г из 1 л культивируемой биомассы.

Экспериментальный антигенный препарат обладал сравнительно низкой токсичностью ($LD_{50} = 1,775$ мкг для белых мышей).

Для изучения антигенной активности РДАtoх+ была проведена иммунизация кроликов (табл.1). Полученные сыворотки затем были изучены на содержание преципитирующих антител.

Таблица 1. Схема иммунизации животных РДАtoх+

Группа	Доза, мкг/мл			
	1-я	2-я	3-я	4-я
I	5	10	15	20
II	20	30	40	50
III	50	75	100	125
IV	80	120	160	200

Как видно из таблицы 1, иммунизацию в каждой группе кроликов проводили путем последовательного введения возрастающих доз экспериментального антигена. Причем дозы возрастали не только во времени, но и от группы к группе. Минимальная первая доза РДАtoх+ равнялась 5 мкг, максимальная – 80 мкг. Минимальная последняя доза РДАtoх+ составила 20 мкг, а максимальная – 200 мкг.

Результаты иммунизации представлены на рис.8.

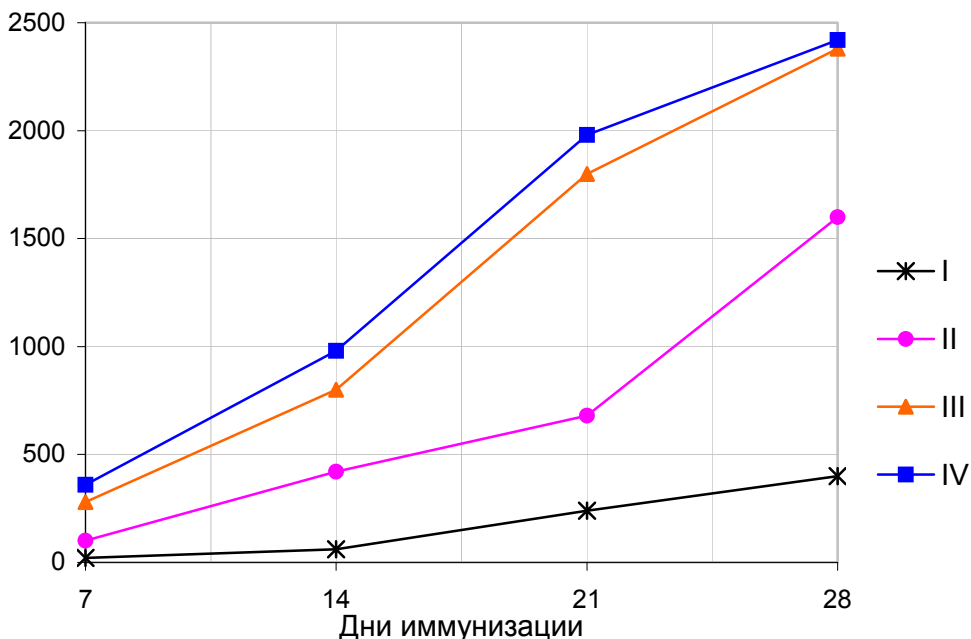
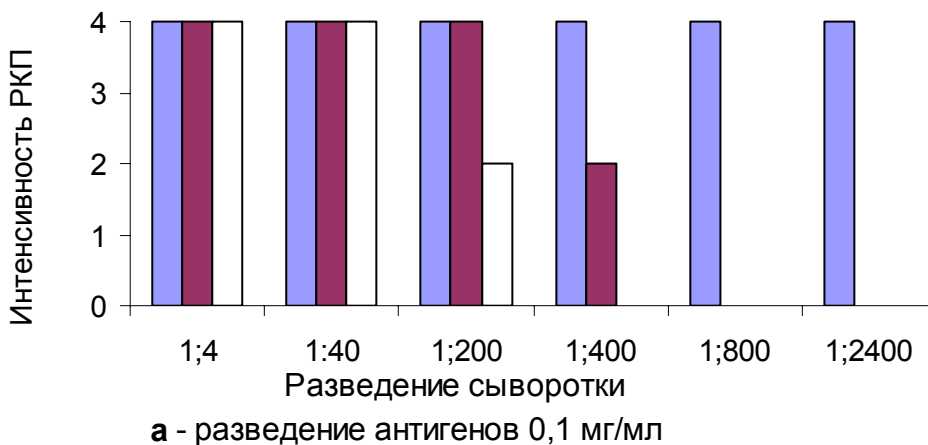


Рис. 8. Динамика накопления преципитирующих антител при иммунизации кроликов RDAtox+

Как видно из данных, титр преципитирующих антител возрастал во всех случаях. Минимальным в эксперименте был конечный титр антител у первой группы, иммунизированной 5-20 мкг RDAtox+. Он составил 1:400±32.

У второй группы, получившей 20-50 мкг RDAtox+ титр антител был выше и составил 1:1600±25. Максимальным был титр антител у животных в четвертой группе, иммунизированных наиболее высокими дозами антигена – от 80 до 200 мкг. Однако средний титр у четвертой группы животных (1:2420±40) незначительно превысил средний титр третьей группы, равный 1:2400±80 (p>0,05). Таким образом, для получения преципитирующей сыворотки целесообразно применять дозы RDAtox+, взятые для третьей и четвертой групп кроликов.

Специфическую активность преципитирующей сыворотки определяли в РКП, при взаимодействии опытных сывороток с комплексными растворимыми антигенами из двух нетоксигенных штаммов (RDAtox-1 и RDAtox-2) в сравнении с RDAtox+ (рис. 9).



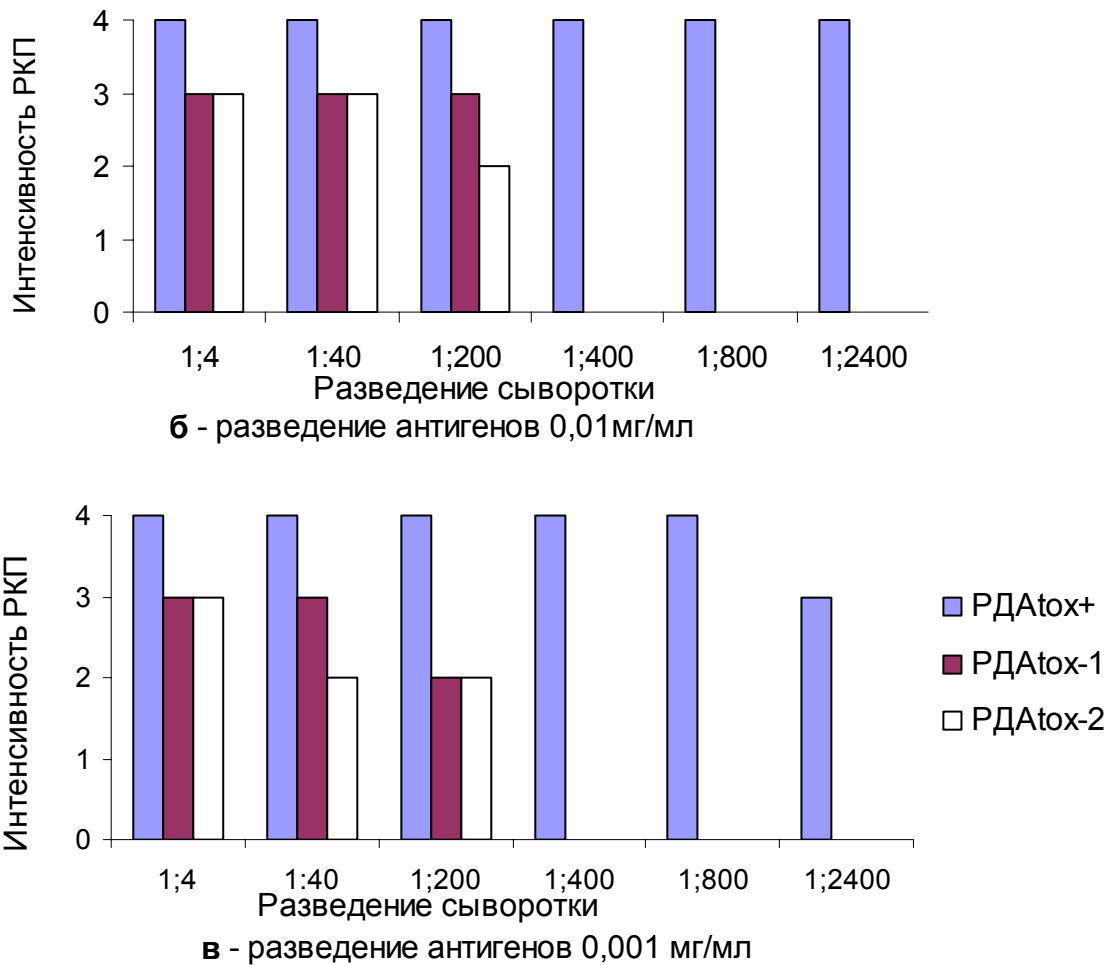


Рис. 9. Специфическая активность экспериментальной сыворотки в реакции кольцепреципитации

Из данных опыта, представленных на рис.9, видно, что при высоких концентрациях сыворотки и антигена наблюдается отчетливая реакция кольцепреципитации для всех вариантов. При разведениях сыворотки 1:40 - 1:200 антигены из нетоксигенных штаммов достаточно слабо реагируют с преципитирующей сывороткой. При дальнейших разведениях сыворотки (1:800, 1:2400) РКП была отрицательной, в то время как РДАtox+ давал во всех случаях отчетливое кольцо преципитации.

На рис. 10 представлены результаты РКП экспериментальной преципитирующей сыворотки с дифтерийным анатоксином (50 Lf/мл).

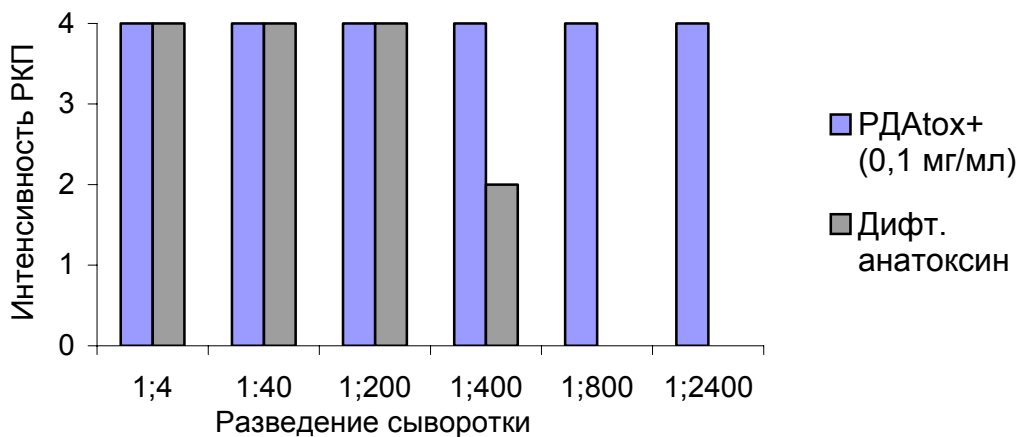


Рис. 10. Активность сыворотки в РКП с дифтерийным анатоксином (50Lf/мл)

Из данных на рис. 10 видно, что с экспериментальной сывороткой в разведении 1:4, 1:40 и 1:200 в реакции возникало отчетливое кольцо преципитации как с опытным антигеном, так и с дифтерийным анатоксином. При разведении сыворотки до 1:400 взаимодействие было слабым, а при титрах сыворотки 1:800 и 1:2400 отчетливая реакция кольцепреципитации наблюдали лишь с РДАtoх+, а с дифтерийным анатоксином реакции не отмечалось.

Судя по результатам, полученным при постановке реакции кольцепреципитации, РДАtoх+ и РДАtoх-1,2 содержали общие антигенные детерминанты, что согласуется с литературными данными по исследованиям антигенных структур токсигенных и нетоксигенных штаммов *S.diphtheriae* [1,3,10,11]. Испытуемая сыворотка проявила активность в РКП при взаимодействии с дифтерийным анатоксином, что свидетельствует о наличии в её составе антитоксических антител. Эти факты подтверждают наше предположение о присутствии дифтерийного токсина в составе РДАtoх+, а также указывают на потенциальную возможность использования противодифтерийной сыворотки, полученной представленным способом, для использования в лабораторной диагностике дифтерийной инфекции.

Таким образом, из биомассы *S.diphtheriae*, полученной в процессе глубинного культивирования на ЭС с оптимальными биотехнологическими параметрами с добавлением мальтозы путем экстракции ГГ выделен РДА toх+, обладающий низкой токсичностью и высокой антигенной активностью. Экспериментальная сыворотка была высокоактивной и обладала выраженной специфичностью в реакции кольцепреципитации с гомологичным антигеном.

Литература

1. Костюкова Н.Н., Кадырова Х.В., Езепчук Ю.В. Серологическое исследование соматического компонента, выделенного из *S. diphtheriae* // Журн. микробиол. – 1970. – №4. – С. 559- 564.
2. Биргер М. О., Гренкова Е. П., Фиш Н. Г., Заводнова Т. И., Кузиков А. Н. Защитный соматический антиген *Corynebacterium diphtheriae* // Журн. микробиол. – 1980. – №1. – С. 46- 48
3. Филиппова Л. М., Холчев Н. В., Мазурова И. К. Фракционный состав экстрактов коринебактерий дифтерии по данным ионообменной хроматографии и гель-фильтрации // Проблемы эпидемиологии и клиники инфекционных болезней. – М., 1979. – Т. XX1. – С. 118- 122.
4. Захарова Н.Е. Определение влияния гидроксиламигидрохлорида на состав и свойства антигенов *Shigella dysenteriae*1. Автореф. канд. дисс., М., 2001
5. Сняшин Н. И., Лобачева Л. А. Щадящий метод выделения защитных антигенов из патогенных бактерий // Использование разных методов в изучении и изготовлении вакцин и анатоксинов: Тр. ТашНИИВС. – Т., 1970. – Т. VII. – С. 7- 8

6. Калягина С.Ю., Икрамов А.А. Свойства *Corynebacterium diphtheriae* при культивировании на среде из пищевого сырья // Журн. микробиол. – 2004. – №4. – С. 76-78
7. Ашмарин И.П., Воробьев А.А. Статистические методы в микробиологических исследованиях. – Л.: Медгиз, 1962 – 267 с.
8. Икрамов А.А. Ускоренный метод диагностики сальмонеллезов групп В и D. Автореф. канд. дисс., М., 1988
9. Сергеев В. В., Цветкова Н. В., Ястребова Н. Е. и др. Характеристика антигенного препарата *Salmonella typhi* ТУ2 4446, выделенного с помощью гидроксилamina солянокислого // Журн. микробиол. – 1993. – №6. – С. 65 - 68
10. Высоцкий В.В. К вопросу о строении поверхностных структур корине- бактерий // Журн. микробиол. – 1976. – №7. – С. 112 – 119
11. Шмелёва Е.А., Кузиков А.Н., Сухорукова Н.Л. Титры антител к антигенам клеточных стенок коринебактерий дифтерии у различных групп детей // Эпидемиология, микробиология и профилактика капельных инфекций: Сб. науч. тр. МНИИЭМ. – М., 1983. – С.50-56

УДК 615.372:576.852.23.014.21..015.2:615.371

БИОТЕХНОЛОГИЯ ПОЛУЧЕНИЯ ДИФТЕРИЙНОЙ ПРЕЦИПИТИРУЮЩЕЙ СЫВОРОТКИ

Калягина С.Ю., Икрамов А.А.

ТашНИИВС АН РУз

Новые антигенные препараты из *C. diphtheriae* представляют большой научно-практический интерес. Биомассу одного токсигенного и двух нетоксигенных штаммов *C. diphtheriae* получали методом глубинного культивирования на экспериментальной питательной среде (ЭС), после подбора оптимального режима аэрации и перемешивания. Инактивацию биомассы дифтерийных бактерий производили гидроксиламином гидрохлоридом (ГГ). Растворимые антигенные препараты выделяли методом «конвекции» и лиофильно высушивали. Для антигенного препарата из токсигенного штамма *C. diphtheriae* (РДА tox+) изучали токсичность на белых мышах и антигенную активность при иммунизации кроликов. Полученную сыворотку испытывали в реакции кольцепреципитации (РКП) с гомологичным антигеном, с антигенами из нетоксигенных штаммов (РДА tox-1,2) и дифтерийным анатоксином.

УДК 615.372:576.852.23.014.21..015.2:615.371

BIOTECHNOLOGY OF THE DIPHTHERIA PRECIPITATE SERUM RECEIPTION

Kaliagina S. Yu., Ikramov A.A.

TaschSRIVS ASRU

New antigenic preparations from *C. diphtheriae* represent the big scientific - practical interest. A biomass of one toxigenic and two nontoxigenic strains *C. diphtheriae* received a method deep cultivation on experimental nutrient medium, after selection of an optimum mode of aeration and hashing. Inactivation of biomass of diphtheritic bacteria made by hydroxylamin hydrochloride. Soluble antigenic preparations allocated with a method of “convection” and liophilic dried up. For an antigenic preparation from toxigenic strain *C. diphtheriae* studied toxicity on white mice and antigenic activity at immunization of rabbits. The received whey tested in reaction precipitation with gomologic antigene, with antigenes from nontoxigenic strains and diphtheritic anatoxin.