

Современные подходы к выделению и очистке холерного тест-токсина

О.С.Дуракова, О.В.Громова, Л.Ф.Ливанова, Н.Г.Авдеева,
Ю.И.Самохвалова, А.В.Гаева, М.Н.Киреев, О.А.Волох

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

В данной статье представлены результаты совершенствования этапов получения холерного тест-токсина. Проведен подбор штамма-продуцента, питательной среды. Определены оптимальные условия для получения максимального выхода антигена.

Ключевые слова: холерная вакцина, штаммы-продуценты, холерный токсин, тест-токсин, питательная среда

Для цитирования: Дуракова О.С., Громова О.В., Ливанова Л.Ф., Авдеева Н.Г., Самохвалова Ю.И., Гаева А.В., Киреев М.Н., Волох О.А. Современные подходы к выделению и очистке холерного тест-токсина. Бактериология. 2018; 3(1): 59–62. DOI: 10.20953/2500-1027-2018-1-59-62

Modern approaches to the selection and purification of cholera test-toxin

O.S.Durakova, O.V.Gromova, L.F.Livanova, N.G.Avdeeva,
Yu.I.Samokhvalova, A.V.Gaeva, M.N.Kireev, O.A.Volokh

Russian Research Anti-Plague Institute «Microbe», Saratov, Russian Federation

This article presents the work on the improvement of the stages of cholera test-toxin production. Selection of a strain-producer, nutrient medium has been carried out. The optimum conditions for maximum antigen yield have been determined.

Keywords: *V. cholerae*, cholera vaccine, cholera toxin, nutrient medium

For citation: Durakova O.S., Gromova O.V., Livanova L.F., Avdeeva N.G., Samokhvalova Yu.I., Gaeva A.V., Kireev M.N., Volokh O.A. Modern approaches to the selection and purification of cholera test-toxin. Bacteriology. 2018; 3(1): 59–62. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2018-1-59-62

В связи с эпидемической ситуацией по холере в России и в мире необходима специфическая профилактика этого заболевания. Холерная химическая вакцина, разработанная в РосНИПЧИ «Микроб» и зарегистрированная на территории России, состоит из холерогена-анатоксина и О-антигенов холерного вибриона сероваров Инаба и Огава. Качество компонента вакцины холерогена-анатоксина определяется специфической активностью холерного токсина (ХТ), которая тестируется в соответствии с промышленным регламентом № ПР 01898109–39–17 на производство [1] методами кожной пробы по *Craig* [2], РПИГ [3] и GM₁-ELISA [4]. Количество холерогена-анатоксина в таблетках вакцины определяется по специфической активности антигена в реакции связывания анатоксина. В данных реакциях, а также для получения антихолерогенной сыворотки используется холерный токсин. В связи с этим оптимизация

условий получения тест-токсина является чрезвычайно актуальной [5].

Материалы и методы

Для получения токсина используют производственный штамм *Vibrio cholerae cholerae* 569В серовара Инаба. Производный от него штамм *V. cholerae cholerae* KM76 серовара Инаба – гиперпродуцент холерного токсина, содержит рекомбинантную плазмиду pC0107-2, несущую гены, ответственные за синтез холерного токсина (*ctxAB*), а также гены резистентности к тетрациклину (Tc^r) и канамицину (Km^r). Данный штамм был изучен ранее и внедрен в производство. Штамм *V. cholerae cholerae* KM68, производный штамма *Дакка* 35 серовара Огава, также содержит рекомбинантную плазмиду pC0107-2 и является гиперпродуцентом холерного

Для корреспонденции:

Дуракова Оксана Сергеевна, младший научный сотрудник лаборатории холерных вакцин ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб»

Адрес: 410005, Саратов, ул. Университетская, 46

Телефон: (8452) 51-5446

E-mail: rusrapi@microbe.ru

Статья поступила 24.01.2018 г., принята к печати 30.03.2018

For correspondence:

Oksana S. Durakova, junior researcher of the laboratory of cholera Vaccines, Russian Research Anti-Plague Institute «Microbe»

Address: 46, Universitetskaya str., Saratov 410005, Russian Federation

Phone: (8452) 51-5446

E-mail: rusrapi@microbe.ru

The article was received 24.01.2018, accepted for publication 30.03.2018

токсина. Штамм *V. cholerae eltor* KM234, производный штамм *V. cholerae eltor* МАК757, продуцирует во внешнюю среду повышенное количество ХТ за счет внедрения в хромосому транспозона Tn 5-Mob (Km^r). Штаммы получены из Государственной коллекции патогенных бактерий РосНИПЧИ «Микроб».

Все изучаемые штаммы являются типичными для S-формы по морфологическим, культуральным, биохимическим и серологическим свойствам и обладают холерогенными, токсигенными и иммуногенными свойствами в опытах на лабораторных животных.

Для культивирования штаммов использовали несколько питательных сред.

1) Бульон казеиновый pH 8,0 следующего состава: аминный азот – 200 мг%; Na₂HPO₄ – 0,06%; NaCl – 0,5%; пептон – 1%. Данная среда используется для глубинного культивирования штаммов *V. cholerae* 569В Инаба и *V. cholerae* M41 Огава при промышленном производстве российской холерной химической вакцины.

2) Бульон АК1 (1,5% бакто-пептона, 0,4% дрожжевого экстракта фирмы «Дифко», 0,5% NaCl, 0,3% NaHCO₂). Специально подобранная среда для получения холерного токсина 2-го типа, продуцируемого природными штаммами *V. cholerae* биовара Эль Тор.

3) Жидкая питательная среда на основе ферментативного гидролизата фибрина (содержание аминного азота 100 мг%). Эту среду готовили согласно патенту RU № 2518282 [6, 7]. В качестве питательной основы она содержит ферментативный гидролизат фибрина – из отхода производства иммуноглобулина антирабического, полученный в результате гидролиза препаратом нативной поджелудочной железы. Содержит следующие компоненты (об.%): ферментативный гидролизат фибрина – 0,2; Na₂HPO₄ × 12H₂O – 0,05; NaCl – 0,5.

Эффективность жидких питательных сред определяли в условиях малообъемного культивирования штаммов в кол-

бах Эрленмейера (250 мл) на термостатируемом шейкер-инкубаторе Infors Multitron.

Глубинное культивирование холерных вибрионов осуществляли в лабораторном биореакторе Biostat A (Sartorius, Германия) с рабочим объемом 1 л. Технические возможности биореактора позволяли регистрировать и регулировать в режиме реального времени значения температуры, pH, растворенного кислорода, скорости вращения мешалки, подачи воздуха в культуральную жидкость и объемов добавляемых корректирующих веществ [8].

Концентрацию биомассы в пробах определяли турбидиметрически на спектрофотометре Biowave. Активность холерного токсина определяли иммунохимическими (РДП, РПИГ, ИФА) и биологическим (Craig) методами.

Результаты и обсуждение

Первым этапом нашей работы был выбор штаммов-продуцентов холерного токсина. Нами было проведено культивирование штаммов *Vibrio cholerae cholerae* 569В, *V. cholerae* KM76, *V. cholerae* KM68, *V. cholerae* KM234 на различных средах для сравнения уровня биосинтеза холерного токсина.

В качестве питательных сред использовали: АК1 (1); бульон казеиновый pH 8,0 – среда сравнения (2); жидкую среду на основе ферментативного гидролизата фибрина (3).

Эффективность жидких питательных сред определяли в условиях малообъемного культивирования в колбах Эрленмейера (250 мл) на термостатируемом шейкер-инкубаторе Infors Multitron в течение 18 ч при температуре 37°C для штамма *V. cholerae* KM234 Km^r, при температуре 30°C для штаммов *V. cholerae* 569В, KM68, KM76. Объем питательной среды при культивировании в колбах составлял 25 мл, скорость вращения платформы – 200 об./мин. Посевной материал (ночная культура) в объеме 1,0 мл. При выращивании штамма *V. cholerae* KM234, содержащего мобильные генетические элементы (МГЭ), для создания селективных условий

Таблица 1. Малообъемное культивирование штаммов *V. cholerae*-продуцентов холерного токсина

Штамм <i>V. cholerae</i>	Среда	Концентрация, млрд/мл	Содержание холерного токсина			
			РДП*	РПИГ*	ИФА*	Крейг*
KM76 Tc ^R Km ^R	1	15,2	4	32	128	8000
	2	20,8	4	32	128	16000
	3	17,8	8	32	128	16000
KM68 Tc ^R Km ^R	1	7,2	4	128	6400	192000
	2	18	2	128	6400	256000
	3	16,4	4	128	6400	256000
569 В	1	16	2	128	800	40000
	2	19,6	2	64	400	32000
	3	19,2	4	128	800	160000
KM234 Km ^R	1	5,8	–	128	800	24000
	2	14,4	–	128	1600	160000
	3	9	2	128	1600	160000

Примечание: *реципрокный титр.

Таблица 2. Контроль содержания холерного токсина на этапах его выделения

Штамм <i>V. cholerae</i>	Стерильный фильтрат			Холерный токсин неочищенный		Холерный токсин после хроматографии		
	ИФА*	РПИГ*	Крейг*	РИД*	ИФА*	ИФА*	Крейг*	Выход (из 1л*)
569В	200	80	10000	16	64	64	40000	500 мкг
KM68 Tc ^R Km ^R	400	160	80000	16	256	254	120000	950 мкг
KM76 Tc ^R Km ^R	400	80	100000	16	64	64	40000	600 мкг
KM234 Km ^R	64	40	10000	8	32	16	0	180 мкг

Примечание: *реципрокный титр.

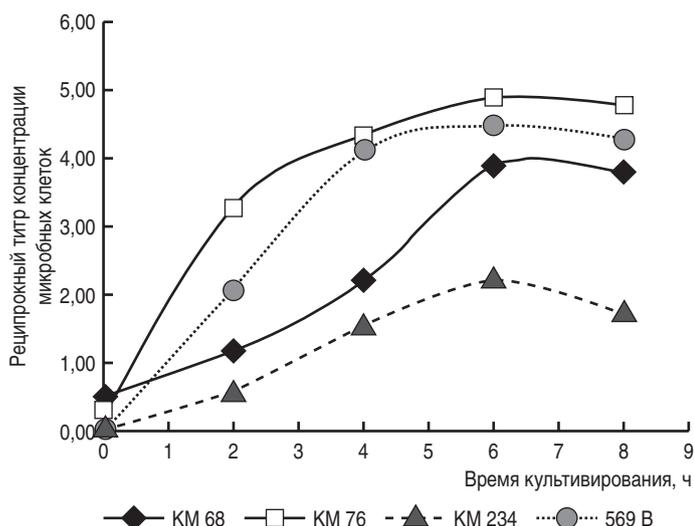


Рис. 1. Кривые роста штаммов-продуцентов холерного токсина.

в бульон добавляли канамицин в концентрации 25 мкг/мл. В присутствии указанного антибиотика в среде происходит размножение лишь клеток, содержащих МГЭ, что способствует повышенной экспрессии антигенов, и подавляется рост клеток, спонтанно утративших их. Результаты представлены в таблице 1.

Как видно из таблицы 1, оптимальной по уровню накопления биомассы и продукции токсина является питательная среда на основе панкреатического гидролизата фибрина.

Следующий этап работы состоял в выявлении оптимальных условий для синтеза холерного токсина при культивировании штаммов-продуцентов на фибриновой среде. Получение антигенов холерных вибрионов осуществляли в экспериментальном биореакторе Biostat A (Sartorius, Германия) с рабочим объемом 1 л, методом периодического культивирования с подпиткой источником углеводного питания и корректировкой pH при закислении культуральной жидкости. В качестве источника углеводного питания использовали глюкозу в виде 40%-ного раствора, а для корректировки

ки уровня pH при закислении культуральной жидкости – раствор аммиака (10%).

Подготовку посевной культуры проводили следующим образом. Агаровую культуру пересевали в пробирку с 5 мл бульона Хоттингера (pH 7,6), подрощивали в течение 6 ч при температуре 37°C в тонком слое, затем вносили в качестве инокулята в колбу со 100 мл питательной среды (фибриновый бульон, pH 8,0) и инкубировали в условиях шейкер-инкубатора в течение (17 ± 1) ч. Для посева в биореактор использовали данную бульонную культуру (100 мл). Выращивание в инкубаторе проводили в течение (8 ± 1) ч. Скорость подачи стерильного раствора глюкозы в процессе культивирования составляла: 2–4-й часы роста культуры – 0,1 мл/мин, далее с 5-го по 6–7-й часы культивирования – 1,0 мл/мин в зависимости от pH культуральной жидкости. При значении pH ≤ 7,6 по каплям добавляли стерильный водный раствор аммиака до восстановления значения pH = 8,0. Культивирование холерных вибрионов в биореакторе прекращали по достижении стационарной фазы роста микробной популяции.

Были проведены три цикла культивирования каждого из штаммов холерного вибриона и проанализированы данные по динамике их роста, представленные на рис. 1.

Оказалось, что при культивировании в биореакторе наибольшая концентрация биомассы и продукция холерного токсина была у штаммов *V. cholerae* KM76 и KM68. Результаты представлены на рис. 2.

Далее мы анализировали выход конечного продукта – холерного токсина у всех используемых штаммов. Для этого были получены стерильные фильтраты культуральной жидкости. Белковую фракцию, содержащую холерный токсин, осаждали в изоточке (pH 4,1). После диализа все осадки подвергали хроматографической очистке.

Полученный после осаждения, диализа и хроматографической очистки препарат тест-токсина из штамма *V. cholerae* KM68 показал высокую активность в пробе Крейга – 120 000 и по своим характеристикам соответствовал ОСО тест-токсина для контроля формализированного центрифугата, фракций и таблеток вакцины в производстве. Этапы получения препарата показаны в таблице 2.

Таким образом, нами проведены работы по испытанию в экспериментальных условиях штаммов-продуцентов холерного токсина, а также получению и сравнительному анализу тест-токсинов из каждого штамма. Показана возможность использования штамма *V. cholerae* KM68 для получения тест-токсина, так как его применение дает максимальный выход антигена.

Благодарность

Выражаем благодарность профессору Смирновой Н.И., заведующей лабораторией патогенных вибрионов, за предоставление высокотоксигенных штаммов холерных вибрионов.

Литература

1. Промышленный регламент №ПР 01898109–39–17 на производство Вакцина холерная бивалентная химическая, таблетки, покрытые кишечнорастворимой оболочкой.
2. Craig SP, Yamamoto K, Takeda, et al. Production of cholera like enterotoxin by vibrio cholera non-O1 strain isolated from the environment. In: Proc. Cholera Res. Symp. Honolulu, Hawaii, 1965 Washington 1965, p. 153.

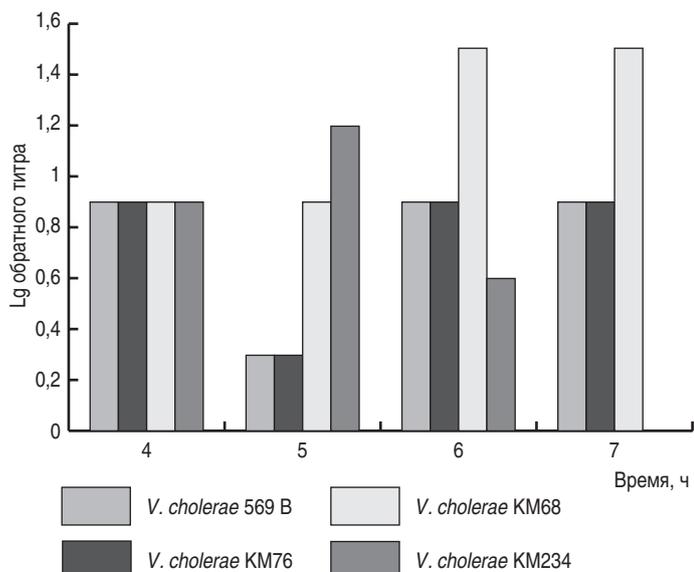


Рис. 2. Динамика содержания холерного токсина при аппаратном культивировании штаммов-продуцентов.

3. Шагинян ИА, Маракуша БМ. Модификация метода пассивного иммунного гемолиза на плотной среде для выявления продукции термолabileных энтеротоксинов штаммами холерных вибрионов и кишечной палочки. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 1983;2:92-6.
4. Маркина ОВ, Алексеева ЛП. Иммуноферментные методы тестирования холерного токсина. Холера и патогенные для человека вибрионы: сб. матер. пробл. Комиссии Науч. Совета по сан.-эпид. Охране территории РФ, 2005, вып. 18, с. 133-135.
5. Москвитина ЭА, Тюленева ЕГ, Самородова АВ, Кругликов ВД, Титова СВ, Иванова СМ, и др. Эпидемиологическая обстановка по холере в мире и России в 2007-2016 гг., прогноз на 2017 г. Проблема особо опасных инфекций. 2017;1:13-20. DOI: 10.21055/0370-1069-2017-1-13-20
6. Волох ОА, Антонычева МВ, Авдеева НГ, Вахрушина НИ, Никифоров АК. Питательная среда для глубинного культивирования туляремийного микроба. Патент РФ №2518282. Оpubl. 10.06.2014.
7. Смирнова НИ, Щелканова ЕЮ, Баранихина ЕЮ, Агафонов ДА, Тучков ИВ, Краснова ЯМ, Кутырев ВВ. Конструирование и изучение свойств авирулентного генетически измененного штамма *Vibrio cholerae* биовара Эль Тор с инактивированными генами термолabileного гемолиза и эффективной экспрессией клонированного гена В-субъединицы холерного токсина. Биотехнология. 2017;33(1):30-41. DOI: 10.21519/0234-2758-2017-33-1-30-41
8. Никифоров АК, Комиссаров АВ, Ульянов АЮ, Еремин СА, Волох ОА, Белякова Н.И., Алешина ЮА, Васин ЮГ. Исследование процессов культивирования штаммов холерного вибриона – продуцентов протективных антигенов вакцины холерной бивалентной химической таблетированной в сконструированном биореакторе. Проблемы особо опасных инфекций. 2012;2(112):85-8.

References

1. Promyshlennym reglamentom №PR 01898109–39–17 na proizvodstvo Vaksina kholernaya bivalentnaya khimicheskaya, tabletki, pokrytye kishechnorastvorimoi obolochkoi. (In Russian).
2. Craig SP, Yamamoto K, Takeda, et al. Production of cholera like enterotoxin by vibrio cholera non-01 strain isolated from the environment. In: Proc. Cholera Res. Symp. Honolulu, Hawaii, 1965 Washington 1965, p. 153.
3. Shaginyan IA, Marakusha BM. Modifikatsiya metoda passivnogo immunogo gemoliza na plotnoi srede dlya vyavleniya produktsii termolabil'nykh enterotoksinov shtammami kholernykh vibriinov i kishечноi palochki. Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology. 1983;2:92-6. (In Russian).
4. Markina OV, Alekseeva LP. Immuofermentnye metody testirovaniya kholernogo toksina. Vol. 18. 2005, pp. 133-135. (In Russian).
5. Moskvitina EA, Tyuleneva EG, Samorodova AV, Kругликов VD, Titova SV, Ivanova SM, et al. Epidemiological situation on cholera across the globe and in the russian federation in 2007–2016. Forecast for 2017. Problems of Particularly Dangerous Infections. 2017;1:13-20. DOI: 10.21055/0370-1069-2017-1-13-20 (In Russian).
6. Volokh OA, Antonycheva MV, Avdeeva NG, Vakhrushina NI, Nikiforov AK. Pitatel'naya sreda dlya glubinnogo kul'tivirovaniya tulyaremiinogo mikroba. Patent RF №2518282. Opubl. 10.06.2014. (In Russian).
7. Smirnova NI, Shchelkanova EYu, Baranikhina EYu, Agafonov DA, Tuchkov IV, Krasnov YaM, Kutuyev VV. Construction and Investigation of Properties of Avirulent Genetically Altered Strain of *Vibrio cholerae* biovar El Tor with Inactivated Genes for Heat-Sensitive Hemolysine and Effective Expression of Cloned Cholera Toxin B-subunit Gene. Applied Biochemistry and Microbiology Biotechnology in Russia. 2017;33(1):30-41. DOI: 10.21519/0234-2758-2017-33-1-30-41 (In Russian).
8. Nikiforov AK, Komissarov AV, Ul'yanov AYU, Eremin SA, Volokh OA, Belyakova NI, et al. Examination of Processes of Cultivation of *V. cholerae* strains - Producers of Protective Antigens of Cholera Bivalent Chemical Vaccine in Tablets - in the Engineered Bioreactor. Problems of Particularly Dangerous Infections. 2012;2(112):85-8. (In Russian).

Информация о соавторах:

Громова Ольга Викторовна, кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник лаборатории холерных вакцин ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора
Адрес: 410005, Саратов, ул. Университетская, 46
Телефон: (8452) 51-5446
E-mail: rusrapi@microbe.ru

Ливанова Людмила Федоровна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории холерных вакцин ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора
Адрес: 410005, Саратов, ул. Университетская, 46
Телефон: (8452) 51-5446
E-mail: rusrapi@microbe.ru

Авдеева Наталья Георгиевна, научный сотрудник лаборатории холерных вакцин ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора
Адрес: 410005, Саратов, ул. Университетская, 46
Телефон: (8452) 51-5446
E-mail: rusrapi@microbe.ru

Самохвалова Юлия Игоревна, научный сотрудник лаборатории холерных вакцин ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора
Адрес: 410005, Саратов, ул. Университетская, 46
Телефон: (8452) 51-5446
E-mail: rusrapi@microbe.ru

Гаева Анна Вячеславовна, кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории холерных вакцин ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора
Адрес: 410005, Саратов, ул. Университетская, 46.
Телефон: (8452) 51-5446
E-mail: rusrapi@microbe.ru

Киреев Михаил Николаевич, кандидат медицинских наук, ведущий научный сотрудник лаборатории холерных вакцин ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора
Адрес: 410005, Саратов, ул. Университетская, 46
Телефон: (8452) 51-5446
E-mail: rusrapi@microbe.ru

Волох Оксана Александровна, кандидат биологических наук, заведующая отделом профилактических препаратов лаборатории холерных вакцин ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора
Адрес: 410005, Саратов, ул. Университетская, 46
Телефон: (8452) 51-5446
E-mail: lhv@microbe.ru

Information about co-authors:

Olga V. Gromova, MD, PhD, senior researcher of the laboratory of cholera vaccines, Russian Research Anti-Plague Institute «Microbe»
Address: 46 Universitetskaya str., Saratov, 410005, Russian Federation
Phone: (8452) 51-5446
E-mail: rusrapi@microbe.ru

Lyudmila F. Livanova, PhD (Biology), senior researcher of the laboratory of cholera vaccines, Russian Research Anti-Plague Institute «Microbe»
Address: 46 Universitetskaya str., Saratov, 410005, Russian Federation
Phone: (8452) 51-5446
E-mail: rusrapi@microbe.ru

Natalia G. Avdeeva, researcher of the laboratory of cholera vaccines, Russian Research Anti-Plague Institute «Microbe»
Address: 46 Universitetskaya str., Saratov, 410005, Russian Federation
Phone: (8452) 51-5446
E-mail: rusrapi@microbe.ru

Julia I. Samokhvalova, researcher of the laboratory of cholera vaccines, Russian Research Anti-Plague Institute «Microbe»
Address: 46 Universitetskaya str., Saratov, 410005, Russian Federation
Phone: (8452) 51-5446
E-mail: rusrapi@microbe.ru

Anna V. Gaeva, PhD (Biology), researcher of the laboratory of cholera vaccines, Russian Research Anti-Plague Institute «Microbe»
Address: 46 Universitetskaya str., Saratov, 410005, Russian Federation
Phone: (8452) 51-5446
E-mail: rusrapi@microbe.ru

Mikhail N. Kireev, MD, PhD, leading researcher of the laboratory of cholera vaccines, Russian Research Anti-Plague Institute «Microbe»
Address: 46 Universitetskaya str., Saratov, 410005, Russian Federation
Phone: (8452) 51-5446
E-mail: rusrapi@microbe.ru

Oksana A. Volokh, PhD (Biology), head of the department of prophylactic preparations of the laboratory of cholera vaccines, Russian Research Anti-Plague Institute «Microbe»
Address: 46 Universitetskaya str., Saratov, 410005, Russian Federation
Phone: (8452) 51-5446
E-mail: lhv@microbe.ru