

М.Н.Киреев, Т.М.Тараненко, Т.А.Храмченкова, Н.П.Гусева, Т.А.Полунина, В.И.Павлова,
Н.А.Подборонова, З.Л.Девдариани, А.Б.Голова, С.М.Дальвадянц

ИЗУЧЕНИЕ СТАБИЛЬНОСТИ АНТИГЕННЫХ КОМПОНЕНТОВ ЧУМНОЙ ХИМИЧЕСКОЙ ВАКЦИНЫ (Ф1+ОСА) В ТЕСТАХ НА «УСКОРЕННОЕ СТАРЕНИЕ» И СТРЕСС-УСЛОВИЯ

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

При комплексном иммунохимическом и иммунобиологическом анализе видоспецифического капсульного белка Ф1 чумного микроба и гликопротеидного по химической природе основного соматического антигена (ОСА), общего по специфичности у близкородственных бактерий чумы и псевдотуберкулеза, было установлено, что оба препарата, выделенные из клеток *Yersinia pestis* по стандартным методикам, в тестах на «ускоренное старение» при 37 °С в течение 4 недель и на стресс-условия при 60 °С в течение 24 ч, подобно препаратам, находившимся в условиях холодильника при 4–8 °С, стабильно сохраняли свои основные параметры, характеризующие их полноту и специфическую активность: внешний вид, растворимость, химический состав, иммунохимическую гомогенность и иммунобиологическую активность.

Ключевые слова: *Yersinia pestis*, антигены Ф1 и ОСА, иммунохимические и иммунобиологические характеристики, ускоренный тест термостабильности.

Выделение в очищенном виде и сохранение биологически активных веществ микробного происхождения представляет несомненный научный и практический интерес как для выяснения их роли в патологии инфекционного процесса, так и для целей диагностики и профилактики соответствующих заболеваний. На сегодняшний день лиофилизация бактериальных антигенов, используемых как компоненты диагностических тест-систем или бесклеточных вакцин, считается пока лучшим способом достижения стабильности всех качественных показателей таких препаратов, обеспечивающим их безопасность и эффективность. Как известно, для лиофилизированного препарата отсутствуют такие поверхности как воздух-жидкость или стекло-жидкость. Кроме того, высокий негативный заряд поверхности стекла и гидрофобные силы пластикового контейнера могут вызывать усиленную агрегацию белка в растворе [7], которую можно предупредить путем лиофилизации препарата.

Очень часто для сохранения специфических антигенных свойств бактериальных препаратов в качестве стабилизаторов используют различные вещества. Так, например, добавление комплексона пентацина в концентрации 0,5 % в 2 раза увеличивало продолжительность срока хранения при 4 °С энтеротоксина *E. coli* [7], а одновременное внесение сахарозы (3 %) и тиосульфата натрия (1 %) заметно повышало стабильность холерных агглютинирующих сывороток [15]. Согласно международной практике в качестве стабилизаторов для внутривенных иммуноглобулинов используют в специально подобранной комбинации и оптимальной концентрации мальтозу, глюкозу, глицин, а также сахарозу и полиэтиленгликоль [7].

В то же время в медицинской практике широко используются бесклеточные вакцины против гриппа,

брюшного тифа, пневмококковых и стафилококковых инфекций, содержащие только растворимые антигены без добавления стабилизаторов [12, 14]. В отечественной практике также разрабатываются экспериментальные химические чумные вакцины (ХЧВ), представленные бикомпонентным препаратом, состоящим из смеси капсульного белка Ф1 и основного соматического антигена (ОСА) гликопротеиновой природы или одним антигеном Ф1, депонированным на геле гидроокиси алюминия [5]. К тому же Ф1, будучи основным иммуногеном и видоспецифическим антигеном чумного микроба, является важнейшим компонентом современных диагностических тест-систем [11].

Учитывая практическое использование Ф1 и ОСА чумного микроба как компонентов профилактических и диагностических препаратов, несомненную важность приобретают вопросы стабильности их основных специфических свойств при хранении антигенов в нестандартных экстремальных условиях.

В настоящей работе приведены результаты изучения стабильности сухих лиофилизированных антигенных препаратов Ф1 и ОСА чумного микроба в тестах на «ускоренное старение» и стресс-условия.

Материалы и методы

Для экспериментов были взяты антигенные препараты чумного микроба Ф1 и ОСА (по 3 серии каждого), изолированные из вакцинного штамма *Yersinia pestis* EV НИИЭГ.

Препараты извлекали по стандартным методикам: Ф1 – из центрифугата бульонной культуры путем одноэтапной колоночной гель-хроматографии [13] и ОСА – из агаровой культуры экстракцией трихлоруксусной кислотой по Буавену [1].

Все исследованные образцы антигенов были лио-

фильно высушены в течение 18–24 ч на коллекторном аппарате в камере ЛЗ-9 (фирма «Фригера», ЧССР) при экспериментально отработанном оптимально эффективном режиме: медленное (4–10 ч) предварительное замораживание до -40°C для обоих препаратов и досушивание при температуре не выше 16°C для Ф1 и более высокой ($20\text{--}22^{\circ}\text{C}$) – для ОСА [2].

Показатели стабильности получены при испытании антигенов Ф1 и ОСА в тестах на «ускоренное старение» (выдерживание антигенов при 37°C в течение четырех недель) и на стресс-условия (при 60°C 24 ч). Выбор таких достаточно жестких температурных режимов был сделан на основе рекомендаций международной практики для контроля стабильности вводимых внутривенно иммуноглобулинов [7] и определения сроков годности лекарственных средств [10] и холерных агглютинирующих сывороток [15]. Контрольные образцы сохранялись в холодильнике при $4\text{--}8^{\circ}\text{C}$.

Для оценки качественных показателей антигенных препаратов определяли основные параметры, характеризующие их подлинность и специфическую активность: внешний вид, растворимость, физико-химические, серологические и биологические свойства. Содержание белка в препаратах определяли по Лоури, полисахарида – с тимоловым реактивом, О-ацетильных групп – по Алицыно [8]. Серологическую активность исследовали в реакции иммунодиффузии (РИД), иммуноферментном анализе (ИФА), в реакции непрямой гемагглютинации (РНГА), которую ставили с диагностикумом эритроцитарным чумным иммуноглобулиновым (сер. № 4, Киров), любезно предоставленным канд. мед. наук Е.П.Савостиной, а также в ракетном иммуноэлектрофорезе [3]. Антигенные свойства Ф1 изучали на беспородных белых мышах, определяя титр специфических антител в сыворотке животных через 14 дней после однократной внутрибрюшинной иммунизации в дозе 100 мкг с ПАФ. Статистическую обработку ряда показателей проводили традиционными методами с расчетом средних величин, их ошибок и достоверности различий по таблице Стьюдента.

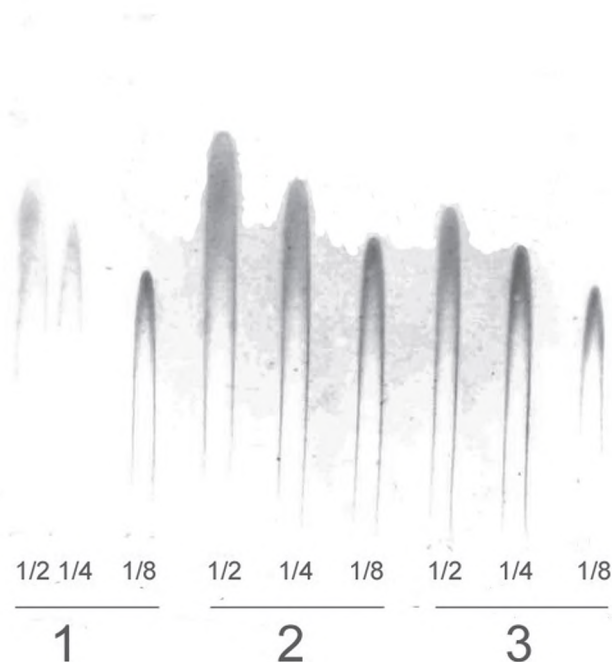
Результаты и обсуждение

Результаты воздействия указанных условий на сухие препараты капсульного антигена Ф1 представлены в табл. 1. Как оказалось, капсульный антиген в тестах на «ускоренное старение» и стресс-условия проявил достаточную стабильность своих основных параметров. По сравнению с контролем ($4\text{--}8^{\circ}\text{C}$) при выбранных двух экспериментальных режимах хранения (37 и 60°C) капсульный антиген полностью сохранял внешний вид, характеристики растворимости по времени, прозрачности и цветности растворов, а также гомогенность, давая единственную линию преципитации в РИД с чумной лошадиной поливалентной агглютинирующей сывороткой. При этом очень важно, что капсульный антиген практи-

чески полностью сохранил и первоначальную серологическую активность, выявляемую в РИД, РНГА и ИФА. Такое сохранение высокой серологической активности у Ф1 в условиях высоких температур при наблюдаемом статистически недостоверном снижении ($P > 0,05$) содержания белка в опытных препаратах Ф1 по сравнению с контролем (средние величины белка: контроль $4\text{--}8^{\circ}\text{C}$ – $(85,5 \pm 9,37)\%$, опыт 37°C – $(78,5 \pm 7,1)\%$; опыт 60°C – $(70,0 \pm 5,0)\%$ может свидетельствовать о заметной термостабильности специфических белковых эпитопов, ответственных за иммунохимическую активность [9]. При этом опытные образцы Ф1 после воздействия высоких температур наравне с контрольными проявляли также выраженную дозозависимую активность в ракетном иммуноэлектрофорезе с кроличьей антисывороткой (рисунок).

При сравнительном изучении иммунореактивности на беспородных мышах контрольного препарата Ф1 ($4\text{--}8^{\circ}\text{C}$) и его подвергшихся температурному воздействию образцов Ф1 (60°C 24 ч) и Ф1 (37°C 4 нед.) уровень антительного ответа ($M \log_{10} \pm m$) в ИФА был соответственно $14,2 \pm 0,4$; $13,7 \pm 0,3$; $13,6 \pm 0,3$ и колебался в пределах недостоверной статистической разницы ($P > 0,05$).

Представленные в табл. 2 результаты иммунохимического анализа препаратов ОСА также в основном подтвердили их стабильность в тестах на «ускоренное старение» и стресс-условия. Прежде всего было установлено, что все экспериментальные образцы ОСА после воздействия высоких (37 и 60°C) температур как и контрольные ($4\text{--}8^{\circ}\text{C}$) сохраняли свою подлинность и в тесте иммунодиффузии



Ракетный иммуноэлектрофорез Ф1 (сер. 44) с кроличьей антисывороткой:

1/2, 1/4, 1/8 – концентрация белка 0,5; 0,25 и 0,125 мг в 1 мл соответственно (в лунку вносили по 10 мкл образца);
1 – 4 недели при 37°C ; 2 – 24 часа при 60°C ; 3 – контроль

Показатели стабильности лиофилизированных препаратов капсульного антигена Ф1 чумного микроба в процессе хранения при разных условиях

Параметры	Препараты Ф1, серия	Условия хранения*		
		Контроль (4–8 °С)	Ускоренное старение (37 °С, 4 нед.)	Стресс-условия (60 °С, 24 ч)
Внешний вид	40	Белая масса	Белая масса	Белая масса
	42	Слабо-желтая порошкообразная масса	Слабо-желтая порошкообразная масса	Слабо-желтая масса
	44	Белая сыпучая масса	Белая сыпучая масса	Белая сыпучая масса
Растворимость** (1 мг/мл)	40	В течение 1 ч при 20–25 °С	В течение 1 ч при 20–25 °С	В течение 1 ч при 20–25 °С
	42	В течение 30 мин	В течение 30 мин	В течение 30 мин
	44	«	«	«
Прозрачность раствора (1 мг/мл)	40	Слабоопалесцирующий	Слабоопалесцирующий	Слабоопалесцирующий
	42	Прозрачный	Прозрачный	Прозрачный
	44	Слабоопалесцирующий	Слабоопалесцирующий	Слабоопалесцирующий
Цветность раствора (1 мг/мл)	40	Бесцветный	Бесцветный	Бесцветный
	42	«	«	«
	44	«	«	«
Подлинность*** (идентификация)	40	Содержит только Ф1 в тесте РИД	Содержит только Ф1 в тесте РИД	Содержит только Ф1 в тесте РИД
	42	«	«	«
	44	«	«	«
Общий белок, %	40	81,0	79,0	65,0
	42	72,0	68,6	65,0
	44	103,5	88,0	80,0
(M ± m)		85,5±9,4	78,5±7,1	70,0±5,0
Серологическая активность (титры)****	РИД	40	64000	16000
		42	32000	16000
		44	32000	16000
	РНГА	40	256·10 ⁶	128·10 ⁶
		42	128·10 ⁶	256·10 ⁶
		44	512·10 ⁶	512·10 ⁶
	ИФА	40	8·10 ⁶	8·10 ⁶
		42	16·10 ⁶	16·10 ⁶
		44	16·10 ⁶	16·10 ⁶

*Все препараты хранились в лиофилизированном состоянии в стеклянных плотно закрытых флаконах без вакуума, защищенных от света.

**В воде и в 0,85 % растворе натрия хлорида (рН 7,2).

***Препараты специфически стерильны, не содержат антимикробных консервантов; иммунохимически гомогенны, образуя одну четкую характерную зону преципитации в РИД с чумными агглютинирующими лошадиными сыворотками.

****Указаны обратные значения титров.

в агаре давали одну четкую линию преципитации с чумной лошадиной агглютинирующей поливалентной сывороткой. Однако под воздействием высоких температур у двух из трех исследованных образцов наблюдалось некоторое изменение в окраске биомассы, которая из желтой стала коричневатой, очевидно за счет процессов карамелизации полисахаридной части ОСА. Это изменение внешнего вида совершенно не влияло на свойства растворимости препарата и содержание в нем белка. Наблюдавшиеся некоторые изменения углеводного компонента ОСА как средние показатели трех серий в виде увеличения процента

полисахарида [контроль 4–8 °С – (23±1,53) %; опыт 37 °С – (28,93±5,73) %; опыт 60 °С – (34,73±7,38) %] и О-ацетильных групп [контроль 4–8 °С – (4,73±0,43) %; опыт 37 °С – (7,91±1,03) %] были статистически недостоверны при P > 0,05.

Учитывая это, а также тот факт, что серологическая активность в РИД наиболее заметно (в 4 раза) снизилась при 60 °С только у одного (сер. 32) из трех препаратов ОСА, можно заключить, что подобно Ф1, ОСА в тестах на «ускоренное старение» и стресс-условия проявил достаточно высокую стабильность.

Поскольку ранее была выявлена иммунохими-

Таблица 2

Показатели стабильности лиофилизированных препаратов ОСА чумного микроба в процессе хранения при разных условиях

Параметры	Препараты, серия	Условия хранения *		
		Контроль (4–8 °С)	Ускоренное старение	Стресс-условия (60 °С, 24 ч)
Внешний вид	27	Слабо-желтая масса	Слабо-желтая масса	Слабо-желтая масса
	31	Желтая масса	Коричневая масса	Коричневая масса
	32	Слабо-желтая масса	Слабо-желтая масса	Коричневая спекшаяся масса
Растворимость**	27	Мгновенно при 20–25 °С	Мгновенно при 20–25 °С	Мгновенно при 20–25 °С
	31	«	«	«
	32	«	«	«
Прозрачность раствора	27	Прозрачный	Прозрачный	Прозрачный
	31	«	«	«
	32	«	«	«
Цветность раствора	27	Бесцветный	Бесцветный	Бесцветный
	31	Желтый	Желтый	Желтый
	32	Слабо-желтый	Слабо-желтый	Слабо-желтый
Подлинность*** (идентификация)	27	Содержит только ОСА в тесте РИД	Содержит только ОСА в тесте РИД	Содержит только ОСА в тесте РИД
	31	«	«	«
	32	«	«	«
Белок, %	27	6,2	5,8	5,0
	31	10,0	12,8	15,0
	32	12,5	10,8	12,0
Полисахарид, %	27	21,0	31,4	35,7
	31	26,0	37,4	47,0
	32	22,0	18,0	21,5
(M ± m)		23,0±1,5	28,93±5,73	34,73±7,38
Ацетильные группы, %	27	4,3	8,60	4,30
	31	5,6	7,74	5,16
	32	4,3	5,16	2,58
(M ± m)		4,73±0,43	7,91±1,03	4,1±0,96
Серологическая активность в РИД****	27	128000	128000	64000
	31	128000	128000	64000
	32	64000	128000	16000

*Все препараты хранились в лиофилизированном состоянии в стеклянных плотно закрытых флаконах без вакуума, защищенных от света.

**В воде и в 0,85 % растворе натрия хлорида (рН 7,2).

***Препараты специфически стерильны, не содержат антимикробных консервантов; иммунохимически гомогенны, образуя одну четкую характерную зону преципитации в РИД с чумными агглютинирующими лошадиными сыворотками.

****Указаны обратные значения титров.

ческая общность выделенного по Буавену R-соматического антигена у возбудителей чумы и псевдотуберкулеза и показана возможность использования последнего для иммунизации против чумы [4, 6], нами также изучена в экстремальных температурных условиях стабильность препаратов ОСА, выделенных из штамма *Y. pseudotuberculosis* 53, находящегося в R-форме диссоциации.

Иммунохимический анализ двух серий ОСА псевдотуберкулезных иерсиний, полученных в виде

сухого ацетонвысушенного порошка [1], в целом также свидетельствовал о достаточной стабильности этих антигенных компонентов в тестах на «ускоренное старение» и стресс-условия. Препараты ОСА псевдотуберкулезного микроба, подобно ОСА чумного микроба, при воздействии высоких температур (37 °С 4 нед. и 60 °С 24 ч), по сравнению с контролем (4–8 °С), сохраняли свои основные параметры (см. табл. 2): внешний вид (кремовый порошок), растворимость (в течение 1 ч при встряхивании),

прозрачность и цветность (слабо-желтый) раствора, подлинность (в РИД давали одну зону преципитации, идентичную с ОСА чумного микроба с чумной агглютинирующей лошадиной сывороткой), с этой сывороткой серологическую активность (в титре 1:4000), количество белка (9,5–11,5 %) и полисахарида (60,0–77,2 %). В то же время у ОСА псевдотуберкулезных иерсиний в жестких температурных условиях наблюдалось заметное снижение процента ацетильных групп (4–8 °С – 5,5 %, 37 °С – 2,76 %, 60 °С – 2,15 %).

Следует отметить, что при температуре 60 °С (30 мин) препарат ХЧВ (Ф1+ОСА) также не изменяет своей иммунологической активности (ИД₅₀ для белых мышей при подкожном инфицировании 5·10³ к.о.е. *Y. pestis* 231 = 5,744 мкг). Его активность заметно (ИД₅₀ > 20 мкг) снижается после прогрева при 80 °С (30 мин), а последующее повышение до 100 °С полностью инактивирует антигенную активность. Представление о влиянии стресс-условий на ХЧВ (Ф1+ОСА) расширились после получения результатов исследований, проведенных с целью обработки оптимальных условий ее стерилизации, в которых были применены радиационный и комбинированные (термо- и магнито-радиационный) методы обработки [5]. Стерилизующий эффект достигался при всех испытанных способах воздействия, но препарат ХЧВ не изменил своей специфической активности и, как показали последующие исследования, сохранил ее до 20 лет.

Таким образом, проведенный комплексный иммунохимический и иммунобиологический анализ видоспецифического капсульного белка Ф1 чумного микроба и гликопротеидного по химической природе основного соматического антигена (ОСА), общего по специфичности у близкородственных возбудителей чумы и псевдотуберкулеза показал, что оба препарата в тестах на «ускоренное старение» при 37 °С (4 нед.) и стресс-условия при 60 °С (24 ч), подобно препаратам, находившимся при 4–8 °С, стабильно сохраняли основные качественные показатели: внешний вид, растворимость, химический состав, иммунохимическую гомогенность и иммунобиологическую активность. Полученные результаты свидетельствуют об определенной термостабильности специфических биополимерных структур, ответственных за иммунобиологическую активность антигенов Ф1 и ОСА, используемых на практике в качестве компонентов экспериментальной ХЧВ (Ф1+ОСА).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бахрах Е.Э., Вейнблат В.И., Тараненко Т.М., Дальвадяню С.М., Гольдфарб Л.М. Методы выделения и очистки соматических антигенов чумных бактерий. Профилактика особо опасных инф. 1976; 1(47):131–9.
2. Буренин В.Г., Брандзишевский Ю.В., Пономарев И.Г., Филиппов А.Ф. Серологическая активность антигенов чумного микроба, лиофилизированных в различных режимах. В кн.: Диагн. и профилактика особо опасных инф. Саратов; 1983. С. 44–8.
3. Гааль Э., Медьешин Г., Верекеи Л. Электрофорез в разделении биологических макромолекул. М.: Мир; 1982. 448 с.
4. Дальвадяню С.М., Филиппов А.Ф., Михайлова Р.С. Напряженность противочумного иммунитета, вызываемого у

морских свинок бактериями псевдотуберкулеза. Пробл. особо опасных инф. 1977; 4(56):40–3.

5. Дальвадяню С.М., Сероглазов В.В., Шарова И.Н., Сергеева Г.М., Дробышева Т.М., Миронова Н.П., Клайков С.А. Иммунологическая активность химической чумной вакцины, стерилизованной различными способами. Пробл. особо опасных инф. 1998; 1:69–73.

6. Домарадский И.В. Проблемы перекрестного иммунитета. М.: Медицина; 1976. 136 с.

7. Исрафилов А.Г., Кудашева Г.Б., Корнилова И.А., Алсынбаев М.М., Лютов А.Г., Кудашева Э.Ю. Иммунонин – первая отечественная стабильная лиофилизированная форма внутривенного иммуноглобулина в Российской Федерации. В кн.: Медицинские иммунобиол. препараты в XXI веке: разработка, производство и примен. Матер. Всерос. конф. Уфа; 2005. Ч. II. С. 5–12.

8. Кэбот Е., Мейер М. Экспериментальная иммунология. М.: Медицина; 1968. С. 657–8.

9. Коссе Л.В. Характеристика препаратов капсульного антигена чумного микроба, выделенных из генетически различающихся штаммов продуцентов [автореф. дис. ... канд. биол. наук]. Саратов; 1992. 18 с.

10. Кузнецов В.Д., Филиппов С.Н., Муравьева С.А., Фишман В.М. Прогнозирование выживаемости лиофилизированных спор *Actinomyces parvullus*, основанное на методе ускоренного хранения. Микробиология. 1977; 46(2):318–23.

11. Наумов А.В., Ледванов М.Ю., Дроздов И.Г. Иммунология чумы. Саратов; 1992. 172 с.

12. Осипова Г.Л. Поликомпонентная вакцина ВП-4 в терапии аллергических заболеваний. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 2003; 1:36–42.

13. Сердобинцев Л.Н., Тараненко Т.М., Веренков М.С., Наумов А.В. Получение капсульного антигена методом одноэтапной гелевой фильтрации. В кн.: Вопр. профилактик. природноочагов. инф. Саратов; 1983. С. 37–41.

14. Степанова Л.К., Белая Ю.А., Сергеева Н.С., Агеева В.А., Петрухин В.Г. Химическая бромнотифозная вакцина, содержащая комплекс поверхностных антигенов, включающий К-антиген. Журн. микробиол. 1993; 1:51–6.

15. Тюменцев С.Н., Каретникова Э.С., Андреевская Н.М., Журавлева Н.П., Завезенов Н.П. Повышение стабильности холерных О, Инаба, Огава агглютинирующих сывороток. В кн.: Информация проблемно-тематич. комиссии по проблеме «Холера». Ростов н/Д; 1993. С. 31–2.

Об авторах:

Киреев М.Н., Тараненко Т.М., Храмченкова Т.А., Гусева Н.П., Полунина Т.А., Павлова В.И., Подборонова Н.А., Девдариани З.Л., Голова А.Б., Дальвадяню С.М. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». 410005, Саратов, ул. Университетская, д. 46. Тел. (845-2) 26-21-31. E-mail: microbe@san.ru

M.N.Kireev, T.M.Taranenko, T.A.Khramchenkova, N.P.Gooseva, T.A.Polunina, V.I.Pavlova, N.A.Podboronova, Z.L.Devdariani, A.B.Golova, S.M.Dalvadyants

Analysis of Stability of Plague Chemical Vaccine (F1+MSA) Antigenic Components in the Tests of "Accelerated Ageing" and Stress Conditions

Russian Anti-Plague Research Institute "Microbe", Saratov

Carried out was comprehensive immunochemical and immunobiological analysis of plague microbe species-specific capsule F1 protein, and glycoprotein main somatic antigen (MSA) the latter being common in specificity in closely related plague and pseudotuberculosis agents. Both preparations isolated from *Yersinia pestis* cells using standard techniques were examined in the test of "accelerated ageing" (exposure at 37 °C for 4 weeks) and in stress conditions (exposure at 60 °C for 24 hours). They were shown to preserve their main features that characterized their authenticity and specific activity (visual appearance, solubility, chemical content, immunochemical homogeneity and immunobiological activity) as compared with preparations stored in refrigerator at 4–8 °C.

Key words: *Yersinia pestis*, F1 antigen, MSA, immunochemical and immunobiological properties, accelerated test of thermostability.

Authors:

Kireev M.N., Taranenko T.M., Khramchenkova T.A., Gooseva N.P., Polunina T.A., Pavlova V.I., Podboronova N.A., Devdariani Z.L., Golova A.B., Dalvadyants S.M. Russian Anti-Plague Research Institute "Microbe". 410005, Saratov, Universitetskaya St., 46. E-mail: microbe@san.ru

Поступила 27.10.08.