

А.К.Никифоров, О.А.Волох, С.А.Еремин, Т.В.Алёнкина

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА ШТАММОВ *YERSINIA PESTIS* ПО УРОВНЮ ПРОДУКЦИИ КАПСУЛЬНОГО АНТИГЕНА ЧУМНОГО МИКРОБА

Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов

Рекомбинантный штамм *Yersinia pestis* KM277(EV11MpFSK-3) Km^r, является перспективным штаммом-продуцентом капсульного антигена (Ф1) поскольку его продуктивные свойства и иммунохимическая активность синтезируемого им антигена Ф1 была выше, чем у *Y. pestis* EV и его производных. Несомненным преимуществом штамма *Y. pestis* KM277 является его способность к синтезу Ф1 при температуре 28 °С и отсутствие у него собственных плазмид чумного микроба. Разработана схема масштабированного культивирования рекомбинантного штамма и получения препарата капсульного антигена.

Ключевые слова: *Yersinia pestis*, капсульный антиген (Ф1), культивирование.

A.K.Nikiforov, O.A.Volokh, S.A.Eremin, T.V.Alenkina

Comparative Assessment of *Yersinia pestis* Strains on the Level of Plague Microbe Capsular Antigen Production

Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov

Yersinia pestis recombinant strain KM277 (EV11MpFSK-3) Km^r is a potential producer-strain of capsular antigen (F1), since its productive properties and immunochemical activity of F1-antigen, synthesized by it, are higher than in *Y. pestis* EV and its derivatives. The apparent advantage of the *Y. pestis* KM277 strain is the ability to synthesize F1 antigen at 28 °C, and the absence of its own plague-microbe plasmids in cells. Worked out is the scheme of scaled cultivation of the recombinant strain and obtainment of capsular antigen preparation.

Key words: *Yersinia pestis*, capsular antigen (F1), cultivation.

Существование природных очагов чумы, занимающих значительные территории (6–7 % суши), в т.ч. на территории Российской Федерации имеется 11 природных очагов (общей площадью более 250 тыс. км²), обуславливает потенциальную опасность эпидемических вспышек заболевания чумой [7], и в этой связи необходимость усовершенствования диагностических и профилактических препаратов. Одним из практически значимых антигенов чумного микроба является видоспецифический капсульный антиген – фракция 1 (Ф1), на основе которого созданы и длительное время успешно применяются на практике антигенные и иммуноглобулиновые диагностикумы для постановки серологических реакций [6], и интенсивно разрабатываются новые тест-системы [10].

В качестве штаммов продуцентов Ф1 нами были изучены изогенные производные штамма *Y. pestis* EV, утратившие ряд собственных плазмид, но несущих плазмиду pFra: *Y. pestis* KM225 (pFra⁺ pCad⁻ pPst⁻); *Y. pestis* KM226 (pFra⁺ pCad⁺ pPst⁻); *Y. pestis* KM227 (pFra⁺ pCad⁻ pPst⁺), сконструированные О.А.Проценко, и генно-инженерный штамм *Y. pestis* 277 (EV11MpFSK-3) Km^r. Ранее сообщалось о суперпродукции антигена Ф1 генно-инженерными штаммами *Y. pestis* со встроенной плазмидой pFSK3 по результатам серологических реакций и при выращивании на плотных питательных средах [1].

Выращивание на твердых питательных средах штаммов-продуцентов нетехнологично, поэтому сравнительная оценка испытуемых штаммов по способности накапливать биомассу и продукции Ф1 была

проведена в условиях бифазного и глубинного культивирования (малообъемного и масштабированного).

Материалы и методы

Биомассу выращивали в бифазной системе на флаконах, в качестве питательной среды использовали агар и бульон Хоттингера, pH 7,2 (10:1). Культивирование проводили в течение 72 ч при температуре 37 °С для штаммов *Y. pestis* EV и изогенных производных, 28 °С – для *Y. pestis* KM277. Малообъемное культивирование штаммов осуществляли в колбах (250 мл) на бульоне Хоттингера (pH 7,2) с механическим перемешиванием на термостатируемой качалке РС-ТК (США) при температуре 37 и 28 °С для KM277 в течение 24 ч. При культивировании *Y. pestis* KM277 во всех случаях в питательную среду добавляли канамицин. Масштабированное культивирование проводили в производственных условиях на реакторе У-6. Препараты капсульного антигена получали из инактивированной формалином биомассы. Выделение Ф1 из культуральной жидкости проводили методом изоэлектрической преципитации [4, 8] и осаждением сульфатом аммония [2], из клеточной массы – экстракцией и осаждением солевыми растворами [9]. Все полученные препараты Ф1 были лиофилизированы.

Контроль продукции капсульного антигена штаммами-продуцентами, а также активность препаратов на этапах получения осуществляли серологически в реакции непрямой гемагглютинации (РНГА) с

эритроцитарным чумным иммуноглобулиновым диагностикумом (ФГУ ЦНИИ МО РФ, Киров) и реакции диффузионной преципитации (РДП) по Оухтерлони со специфическими чумными сыворотками коммерческих и экспериментальных серий. В качестве контроля использовали препараты Ф1, полученные из клеток агаровой культуры штамма *Y. pestis* EV.

Результаты и обсуждение

При малообъемном культивировании показано (рис. 1), что изогенные производные штамма *Y. pestis* EV превосходят по накоплению биомассы родительский штамм в 2,5–5 раз и по интенсивности выделения Ф1 в среду культивирования в 2–2,3 раза. Преимущество *Y. pestis* KM227 связано, в основном, с высокой скоростью роста и большим накоплением биомассы, хотя по уровню экскреции в среду Ф1 он значительно уступает родительскому штамму, что согласуется с литературными данными [4]. В то же время штамм *Y. pestis* KM277 превосходит все испытываемые штаммы по интенсивности экскреции Ф1 и отличается способностью продуцировать Ф1 при температуре 28 °С. Кроме того, у него отсутствуют все собственные плазмиды чумного микроба. Все эти качества позволяют считать данный штамм наиболее перспективным для использования в производстве чумной химической вакцины в качестве продуцента Ф1.

При анализе полученных данных обращает на себя внимание несовпадение высокого уровня секреции Ф1 в среду штаммом *Y. pestis* KM277 с незначительным выходом биомассы с единицы объема питательной среды. По нашему мнению, подобный феномен можно объяснить, опираясь на следующие данные: сверхсинтез продуктов метаболизма идет только в ограниченных условиях питания и, как правило, во вторую фазу роста периодических культур, когда рост биомассы замедляется или даже останавливается, а скорость синтеза антигенов увеличивается.

Все препараты Ф1, полученные из супернатанта

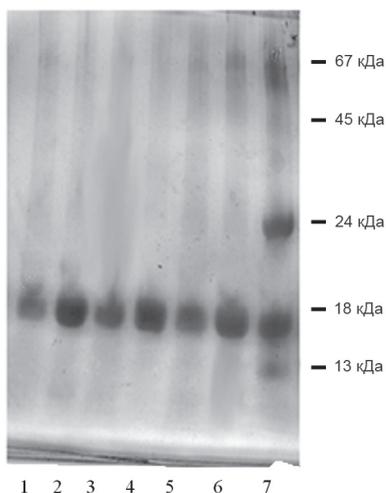


Рис. 1. Накопление биомассы и продукция Ф1 различными штаммами *Y. pestis* в условиях малообъемного культивирования

бульонной культуры различными методами, во всех испытанных концентрациях (0,25–20 мг/мл) давали в РДП одну зону преципитации, идентичную зоне преципитации, образуемой препаратами Ф1, полученными по методу E. Baker [9] из клеток агаровой культуры *Y. pestis* EV, что указывает на иммунохимическую гомогенность изучаемых препаратов Ф1. Для доказательства идентичности препаратов капсульного антигена, выделенных из клеток и супернатанта бульонной культуры штаммов *Y. pestis* EV и *Y. pestis* KM277, провели их сравнительный анализ в SDS-PAG электрофорезе. Полученные данные показали идентичность белкового профиля препаратов Ф1, выделенных из вакцинного и рекомбинантного штаммов осаждением сульфатом аммония и в изоэлектрической точке (рис. 2). Во всех препаратах регистрировался один мажорный белок с молекулярной массой около 17 кДа.

При использовании бифазной системы культивирования для получения биомассы *Y. pestis* KM277 и *Y. pestis* EV с последующим выделением препаратов Ф1 из клеток и культуральной жидкости были получены аналогичные результаты. Серологическая активность капсульного антигена у *Y. pestis* KM277 была выше, чем у *Y. pestis* EV как в самой биомассе, так и в культуральной жидкости и клетках: в РПГА в 100, 10 и 4 раза соответственно. Масса ацетонвысушенных клеток штамма KM277 была на 11,5 % больше, чем EV. Концентрация белка в препарате Ф1 из культуральной жидкости KM277 в 2,2 раза больше, чем из EV, в препаратах из клеток количество белка было одинаково (32±1 мг/мл). Серологическая активность в системе РПГА-РНАт у препаратов Ф1 из штамма KM277 была выше в 4 раза (из ацетонвысушенных клеток) и в 100–200 раз (из культуральной жидкости) по сравнению с препаратами из штамма EV. Показана электрофоретическая (белковый профиль) и иммунохимическая идентичность препаратов Ф1 из штамма KM277 и EV.

На основе полученных из бульонной культуры препаратов Ф1 приготовлены экспериментальные

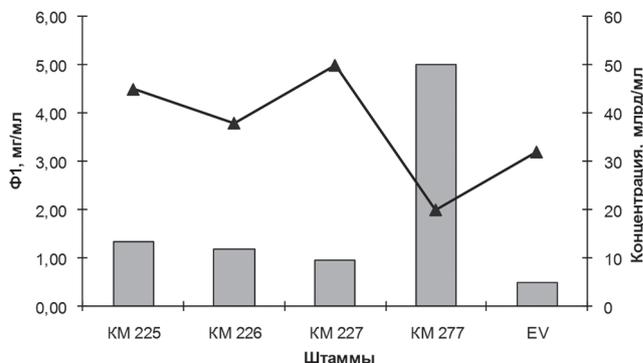


Рис. 2. Электрофореграмма препаратов Ф1, выделенных из штаммов *Y. pestis* KM 277 и *Y. pestis* EV: 1–3 – Ф1 *Y. pestis* KM277; 4–6 – Ф1 *Y. pestis* EV (1, 4 – из клеток; 2, 5 – из культуральной жидкости осаждением сульфатом аммония; 3, 6 – из культуральной жидкости изоэлектрической преципитацией); 7 – маркеры молекулярного веса

серии (по 3 из Ф1 каждого штамма) химической чумной вакцины (ХЧВ), состоящей из Ф1 и ОСА (основного соматического антигена) [3]. В «остром» эксперименте показано, что однократная иммунизация препаратами всех серий ХЧВ обеспечивала выживаемость белых мышей при заражении их вирулентным штаммом *Y. pestis* 231 в дозе 5000 м.к. (1DCl = 25 м.к.). Причем серии вакцины с Ф1, выделенной из штамма *Y. pestis* KM277, обеспечивали защиту от заражения чумой с такой же активностью, как и серии ХЧВ с Ф1 из штамма *Y. pestis* EV (ЕД₅₀ (0,23±0,1) и (0,16±0,1) ч/д соответственно). Отмечалось достоверное увеличение продолжительности жизни иммунизированных животных ((12±0,5) и (16±0,5) сут для серий ХЧВ с препаратами Ф1 из штаммов 277 и EV соответственно) по сравнению с контрольной группой (3,4±0,2) сут.

Следующим этапом было проведение масштабированного культивирования рекомбинантного и вакцинного штаммов с последующим выделением препаратов Ф1. Накопление биомассы *Y. pestis* EV и *Y. pestis* KM277 осуществляли в реакторе У-6 с объемом питательной среды 125 л в бульоне из гидролизатов животного белка (рН 7,4) при температуре 37 и 28 °С соответственно. В результате через 28 ч культивирования штамма *Y. pestis* EV получено 100 л биомассы с концентрацией 10 млрд м.к./мл, активность Ф1 составила 1/4 в РДП с чумной агглютинирующей сывороткой, 1/10⁴ в РНГА, количество бактериальной массы – (610±5) г, после лиофилизации – (97±2) г. Тогда как через 22 ч культивирования рекомбинантного штамма *Y. pestis* KM277 получено 100 л биомассы с концентрацией 35 млрд м.к./мл, активность Ф1 в культуральной жидкости составила 1/128 в РДП, 1/10⁶ в РНГА, количество бактериальной массы (2200±5) г, после лиофилизации – (356±2) г.

Использование этапа концентрирования на ультрафильтрационной колонке F10HPS с полисульфоновыми волокнами для получения препарата Ф1 чумного микроба из культуральной жидкости позволяет без потерь сконцентрировать продукт в 40 раз [5]. Концентрация белка и специфическая активность Ф1 в полученных препаратах капсульного антигена из рекомбинантного штамма значительно выше, чем в препаратах из штамма *Y. pestis* EV (белок (15,2±0,1) мг/мл с >10⁹ АЕ/мг и (2,0±0,1) мг/мл с 1,6·10⁶ АЕ/мг соответственно). Из лиофилизированной клеточной массы также были выделены препараты Ф1. В этом случае содержание белка не зависело от штамма-продуцента – (6,9±0,5) мг на 1 г сухих клеток, но активность была выше в 4–8 раз у препарата из рекомбинантного штамма. Учитывая большой выход клеточной массы в последнем случае, получение антигенного препарата из сухих клеток является целесообразным, т.к. увеличивает общий выход продукта на 30–35 %.

В результате проведенных исследований установлено, что штамм *Y. pestis* KM277 превосходит штамм *Y. pestis* EV и его производные по способно-

сти синтеза в среду капсульного антигена в условиях глубинного культивирования и может быть использован в качестве продуцента Ф1 для оптимизации производства диагностических и профилактических препаратов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Анисимов А.П., Никифоров А.К., Еремин С.А., Дроздов И.Г. Конструирование штамма *Yersinia pestis* с повышенной протективностью. Бюл. эксп. биол. и мед. 1995; 11:27–31.
2. Вейнблат В.И., Дальвадянц С.Н., Веренков М.С. Методы выделения и очистки капсульного антигена и эндотоксина возбудителя чумы. Лаб. дело. 1983; 12:37–9.
3. Дальвадянц С.М., Филиппов А.Ф., Белобородов Р.А., Огарев Н.Н. Эффективность сочетанной иммунизации морских свинок против чумы препаратами фракции I и основного соматического антигена. Пробл. особо опасных инф. 1977; 3(55):105–12.
4. Дятлов И.А., Филиппов А.Ф., Бондаренко Л.Н. и др. Использование изогенной системы штаммов чумного микроба в технологии получения антигенов. В кн.: Генетика, микробиология и совершенствование методов лабораторной диагностики особо опасных инфекций. Саратов; 1991. С. 71–7.
5. Еремин С.А., Волох О.А., Шепелёв И.А. и др. Разработка новых технологических схем и масштабирование процессов получения антигенов чумного и туляреминого микробов. Пробл. особо опасных инф. 2006; 2(92):58–61.
6. Онищенко Г.Г., Кутырев В.В., редакторы. Лабораторная диагностика опасных инфекционных болезней. Практическое руководство. М.: Медицина; 2009. С. 27–61.
7. Попов Н.В., Куклев Е.В., Кутырев В.В. Тенденции эпизоотической активности природных очагов чумы России и стран СНГ в начале XXI столетия. Эпидемиол. и инф. бол. 2006; 2:7–10.
8. Титенко М.М., Вейнблат В.И., Веренков М.С., Васенин А.С. Препаративный метод выделения и очистки капсульного антигена возбудителя чумы при помощи изоэлектрической преципитации. В кн.: Диагностика и профилактика особо опасных инфекций. Саратов; 1983. С. 34–9.
9. Baker E.E., Sommer H., Foster L.E. et al. Studies on immunization against plague. I. The isolation and characterization of the soluble antigen of *Pasteurella pestis*. J. Immunol. 1952; 68(2):131–45.
10. Li B.D., Zhou Z., Wang Z. et al. Antibody profiling in plague patients by protein microarray. Microbes Infect. 2008; 10:45–51.

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

1. Anisimov A.P., Nikiforov A.K., Eremin S.A., Drozdov I.G. [Constructing of the *Yersinia pestis* strain with heightened (enhanced) protective capacity]. Byul. Eksp. Biolog. Med. 1995; 11:27–31.
2. Veynblat V.I., Dal'vadyants S.N., Verenkov M.C. [Methods of isolation and purification of plague-agent capsular antigen and intracellular toxin]. Lab. Delo. 1983; 12:37–9.
3. Dal'vadyants S.N., Filippov A.F., Beloborodov R.A., Ogarev N.N. [Effectiveness of the complex Guinea-pig immunization by anti-plague F1 and basic O-antigen preparations]. Probl. Osobo Opasn. Infek. 1977; 55:105–12.
4. Dyatlov I.A., Filippov A.F., Bondarenko L.N. et al. [Application of the isogenic system of plague-agent strains in the process of antigen obtainment]. In: [Genetics, Microbiology, and Development of Methods of Laboratory Diagnostics of Particularly Dangerous Infections]. Saratov; 1991. P. 71–7.
5. Eremin S.A., Volokh O.A., Shepelev I.A. et al. [Developing of the new technological schemes, and scaling of the processes of plague and tularemia antigens' obtainment]. Probl. Osobo Opasn. Infek. 2006; 92:58–61.
6. Onishchenko G.G., Kutyrev V.V., editors. [Laboratory Diagnostics of Particularly Dangerous Infectious Diseases. Guidelines]. M.: Meditsina; 2009. P. 27–61.
7. Popov N.V., Kuklev E.V., Kutyrev V.V. [Tendencies of epizootic activity of plague natural foci in the Russian Federation and CIS countries in early XXI century]. Epidem. Infek. Bol. 2006; 2:7–10.
8. Titienko M.M., Veynblat V.I., Verenkov M.C., Vasenin A.S. [Preparation method of isolation and purification of plague-agent capsular antigen by means of isoelectric precipitation]. In: [Diagnostics and Prophylaxis of Particularly Dangerous Infections]. Saratov; 1983. P. 34–9.

Authors:

Nikiforov A.K., Volokh O.A., Eremin S.A., Alenkina T.V. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". Universitetskaya St., 46, Saratov, 410005, Russia. E-mail: microbe@san.ru

Об авторах:

Никифоров А.К., Волох О.А., Еремин С.А., Алёнкина Т.В. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: microbe@san.ru

Поступила 13.03.10.