



УДК 579.842.14.083.3:616.927-097

## КАПСУЛЬНЫЙ ПОЛИСАХАРИД *Salmonella enterica* СЕРОВАРА Typhi (*Salmonella typhi*) – Vi-АНТИГЕН ВЫСОКОЙ СТЕПЕНИ ОЧИСТКИ ДЛЯ СЕРОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ БРЮШНОГО ТИФА

© 2002 г. А. М. Тешева, П. Г. Апарин, В. Л. Львов<sup>#</sup>

ГНЦ Институт иммунологии МЗ РФ, 115478, Москва, Каширское шоссе, д. 24, к. 2

Поступила в редакцию 05.02.2001 г. Принята к печати 26.04.2001 г.

Для использования в целях дифференциальной диагностики брюшного тифа выделены образцы капсульного полисахарида *Salmonella enterica* серовара Typhi (далее – *S. typhi*), который обычно называют Vi-антигеном, и исследованы их физико-химические и серологические свойства. Показано, что образец Vi-антигена с минимальным уровнем примеси соответствующего липополисахарида (ЛПС) *S. typhi* (0.57%) сохранял высокую серологическую активность в тестах с монорецепторными анти-Vi-сыворотками, но существенно слабее реагировал с сыворотками нормальных доноров и больных острыми нетифоидными сальмонеллезами, чем препараты Vi-антигена, с большим содержанием примеси ЛПС (0.8–1.2%). Очистка проведена трехкратным переосаждением хроматографически чистого Vi-антигена в виде соли с бромистым цетилтриметиламмонием. Для количественной оценки примеси ЛПС в выделенных образцах Vi-антигена использовали ГЖХ. Достигнутый высокий уровень очистки Vi-антигена от примеси ЛПС позволяет рассматривать препарат в качестве потенциального компонента тест-системы для диагностики брюшного тифа.

*Ключевые слова:* Vi-антиген; *Salmonella typhi*; брюшной тиф; липополисахарид (ЛПС).

### ВВЕДЕНИЕ

Углеводсодержащие антигены, расположенные вблизи и на поверхности внешней мембраны клеточной стенки грамотрицательных бактерий, играют важнейшую роль в патогенезе инфекционных заболеваний. Главные углеводсодержащие антигены *Salmonella enterica* серовара Typhi (далее – *S. typhi*) – возбудителя брюшного тифа – капсульный полисахарид (Vi-антиген) и липополисахарид (ЛПС, O-антиген) также непосредственно вовлечены во все этапы взаимодействия микроорганизма с организмом хозяина (инвазия, локальное воспаление, внедрение в фагоцитирующие клетки, фебрильный синдром, индукция адаптивного иммунного ответа).

Хорошо известно, что продукция специфических антител против детерминант O- и Vi-антигенов является важнейшим и эффективным механизмом защиты макроорганизма и основой стратегии для разработки брюшнотифозных вакцин [1]. Хотя многие параметры гуморального иммунного ответа к Vi- и O-антигенам при брюшном тифе изучены достаточно подробно, отмечаются существенные сложности в интерпретации клинико-иммунологических данных [2, 3]. В частности, отсутствуют современные системы для дифференциальной серологической диагно-

стики брюшного тифа, нетифоидных сальмонеллез и других кишечных инфекций. Эти проблемы в той или иной степени обусловлены использованием в тест-системах углеводных антигенов недостаточной степени чистоты, что, по-видимому, может приводить к ложноположительным результатам.

Настоящее исследование посвящено получению препарата Vi-антигена *S. typhi* высокой степени чистоты с поэтапным контролем содержания посторонних антигенов, влияющих на его серологическую чистоту, с помощью физико-химических методов.

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В течение нескольких последних лет мы изучали главные полисахаридные антигены *S. typhi* – капсульный полисахарид и ЛПС – с целью создания на их основе вакцинного препарата для профилактики брюшного тифа. Мы показали, что Vi-антиген из *S. typhi* может быть получен с достаточно высокой степенью чистоты при использовании ферментативных подходов (для удаления примесей белков и нуклеиновых кислот) с последующей препаративной гель-хроматографией [1]. Выделенный таким образом хроматографически чистый Vi-антиген (ХЧ-Vi) содержит в качестве примеси не более 1% белков и 2% нуклеиновых кислот и успешно используется в настоящее время как основной компонент

<sup>#</sup> Автор для переписки (тел.: (095) 111-82-49; эл. почта: teshu@mail.ru).

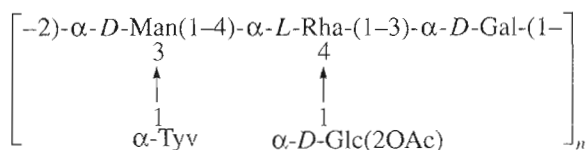
брюшнотифозной вакцины “Вианвак” (“Гритвак”, Москва) [1, 4].

Аналогичный по содержанию примесей препарат Vi-антигена получен нами по методу Годшлиха [5], основанному на осаждении Vi-антигена в виде соли с цетавлоном (Цт-Vi) из надклеточной жидкости культивирования *S. typhi*.

Предварительный анализ препаратов ХЧ-Vi и Цт-Vi показал, что, с одной стороны, они проявляют высокую серологическую активность в тестах с монорецепторными анти-Vi-сыворотками, но с другой – обладают ярко выраженной склонностью к реакции с сыворотками нормальных доноров и больных острыми нетифоидными сальмонеллезами (сыворотки отбирались у больных с диагнозами, подтвержденными выделением бактериальной культуры *S. enteritidis*, *S. muenchen*, *S. virchow*). Данное явление, очевидно, может быть обусловлено наличием в образцах Vi-антигена примеси соответствующего ЛПС *S. typhi*, а в сыворотках нормальных доноров и больных нетифоидными сальмонеллезами – антител к ЛПС рода *Salmonella* серогрупп А, В и D, которые имеют общие структурные элементы (и, следовательно, общие O-антигенные детерминанты) с ЛПС *S. typhi* [6].

Чтобы доказать наличие примеси ЛПС в образцах ХЧ-Vi и Цт-Vi, мы предприняли сравнительный анализ их спектров <sup>13</sup>C-ЯМР. Оказалось, что спектры обоих препаратов (не представлены) практически совпадают и не отличаются от спектра Vi-антигена, опубликованного ранее [7]. Полученные результаты подтвердили строение выделенных образцов Vi-антигена как линейного гомополисахарида, построенного из (1 → 4)-связанных остатков N-ацетил-α-D-галактозаминуриновой кислоты [8]. В то же время отсутствие характерных сигналов атомов C6 остатков тивелозы и рамнозы (в области 16–18 м.д., см. [6]) – компонентов повторяющегося звена O-специфической полисахаридной цепи ЛПС *S. typhi*, доказывало, что если ЛПС и присутствовал в образцах Vi-антигена, то его содержание не превышало 3–5%. Таким образом, с помощью метода ЯМР не удалось доказать наличие примеси ЛПС в образцах Vi-антигена.

Использование метода SDS-гель-электрофореза в полиакриламидном геле позволило показать, что ХЧ-Vi и Цт-Vi действительно содержат незначительные примеси ЛПС. Электрофореграмма представляла собой группу систематически расположенных полос (не приведена), расстояние между которыми определяется молекулярной массой повторяющегося звена O-специфического полисахарида ЛПС (в данном случае пентасахаридного повторяющегося звена, см. структуру, [6]). Однако даже с использованием стандарта ЛПС *S. typhi* достоверно определить количественное содержание примеси ЛПС в образцах Vi-антигена не представлялось возможным.



Структура повторяющегося звена O-специфической полисахаридной цепи ЛПС *S. typhi* (серогруппа D1) [6]. Tuv – тивелоза.

Более успешной оказалась попытка оценки примеси ЛПС в Vi-антигене с помощью ГЖХ. Предварительное исследование показало, что метод ГЖХ позволяет достоверно обнаруживать не менее 5–10 мкг каждого из моносахаридов, входящих в состав ЛПС *S. typhi*. Анализ гидролизатов образцов Vi-антигена был проведен в виде ацетатов полиолов\* при использовании внутреннего стандарта – инозита (всегда – 0.5% от веса Vi-антигена). Оптимальным для интегрирования и сопоставления с пиком ацетата инозита оказался пик ацетата рамнита, так как тивелоза частично разрушалась в процессе гидролиза ЛПС, а пики, соответствующие ацетатам маннита, дульцита и сорбита располагались довольно близко друг к другу, что могло искажать результаты интегрирования.

Несложный расчет показывает, что содержание рамнозы в ЛПС *S. typhi* составляет 18% (из данных гель-электрофореза следовало, что полисахаридная цепь достаточно длинна, чтобы можно было не учитывать вклад “кора” и липида А). Тогда содержание ЛПС в Vi-антигене (C<sub>ЛПС</sub> в процентах) можно рассчитать по формуле:

$$C_{\text{ЛПС}} = \frac{m_{\text{ЛПС}}}{m_{\text{Vi}}} \times 100.$$

Заменяя в этом соотношении массу ЛПС на массу Rha, содержание которой в ЛПС – 18%, получаем:

$$C_{\text{ЛПС}} = 5.5 \times \frac{m_{\text{Rha}}}{m_{\text{Vi}}} \times 100.$$

Учитывая, что

$$\frac{m_{\text{Rha}}}{m_{\text{Ino}}} = \frac{S_{\text{Rha}}}{S_{\text{Ino}}},$$

где S<sub>Rha</sub> и S<sub>Ino</sub> – площади пиков при ГЖХ, соответствующие ацетату рамнитола и ацетату инозита\*\*, получаем:

$$C_{\text{ЛПС}} = 5.5 \times \frac{m_{\text{Ino}} S_{\text{Rha}}}{m_{\text{Vi}} S_{\text{Ino}}} \times 100.$$

\* Частично образующаяся при гидролизе Vi-антигена галактозаминуриновая кислота не мешает анализу моносахаридного состава ЛПС, так как не дает летучих ацетатов.

\*\* Анализ методом ГЖХ смесей заведомых образцов инозита и рамнитола в виде ацетатов полиолов показал, что калибровочный коэффициент для этих соединений очень близок к единице.

**Таблица 1.** Результаты РТГА Vi-антигенов с монорецепторной анти-Vi-сывороткой

Антигены	Конечная концентрация торможения (мкг/мл) РТГА с моно-анти-Vi-сывороткой
Цт-Vi	0.185
ХЧ-Vi	0.097
3-Цт-Vi	0.048

**Таблица 2.** Взаимодействие Vi-антигенов с сыворотками нормальных доноров и больных нетифоидными сальмонеллезами

Антигены	Количество ложноположительных ( $A_{492} > 1.0$ ) результатов в ИФА с сыворотками (в процентах)	
	нормальных доноров	больных нетифоидными сальмонеллезами
ХЧ-Vi	5.5	28.5
3-Цт-Vi	3.1	9.5

Но, как указывалось выше, соотношение количества внутреннего стандарта – инозита и препарата Vi-антигена всегда соответствовало 1 : 200 (или 0.5%, см. выше), следовательно, формула для расчета содержания ЛПС в Vi-антигене может быть представлена следующим образом:

$$C_{\text{ЛПС}}, \% = 5.5 \times \frac{S_{\text{Rha}}}{200 \times S_{\text{Ino}}} \times 100 = 2.75 \times \frac{S_{\text{Rha}}}{S_{\text{Ino}}}$$

Анализ хроматограмм, полученных при ГЖХ гидролизатов образцов Vi-антигенов, с использованием приведенной выше формулы показал, что содержание ЛПС в Цт-Vi – 1.18, а в ХЧ-Vi – 0.82%.

Таким образом, наличие даже незначительной примеси ЛПС *S. typhi* (серогруппа D1) в Vi-антигене могло приводить к резкому снижению специфичности его взаимодействия с сыворотками нормальных доноров и больных нетифоидными сальмонеллезами.

В этой связи были предприняты попытки более тщательной очистки Vi-антигенов от ЛПС.

Очистка с помощью гель-хроматографии на колонках с сефарозой 2В-CL и сефарозой 6В-CL в различных буферах (0.05 М пиридин-уксусная кислота, 0.1 Трис-HCl, PBS) не привели к желаемому результату: интенсивность взаимодействия полученных таким образом антигенов с сыворотками нормальных доноров и больных нетифоидными сальмонеллезами не уменьшилась.

Более успешным оказалось удаление примеси ЛПС из образца ХЧ-Vi с использованием цетавлонового метода. При трехкратном переосаждении ХЧ-Vi в виде соли с цетавлоном (см. “Эксперимент. часть”) был получен (с выходом 30%)

препарат Vi-антигена (3-Цт-Vi), содержание ЛПС в котором, определенное при помощи ГЖХ и рассчитанное в соответствии с формулой, приведенной выше, составило 0.57%.

Препарат 3-Цт-Vi не уступал исходному ХЧ-Vi-антигену в способности реагировать с монорецепторной анти-Vi-сывороткой, но существенно слабее, чем исходный ХЧ-Vi, реагировал с фоновыми антителами из сывороток нормальных доноров и сыворотками больных нетифоидными сальмонеллезами\* (табл. 1, 2). Таким образом, выделение, даже с небольшим выходом, препарата 3-Цт-Vi, обладающего наиболее выраженной Vi-антигенной иммуноспецифичностью, позволяет надеяться создать на его основе тест-систему для дифференциальной диагностики брюшного тифа и других кишечных инфекций\*\*.

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Гель-фильтрацию проводили на колонках (2.5 × 90 см) с сефарозой 4В-CL (Pharmacia, Швеция) в 0.05 М Трис-HCl-буфере, pH 7.4. Объединенные фракции подвергали диализу и далее лиофилизовали.

Детектирование осуществляли с помощью УФ-детектора Uvicord S (206 нм) и проточного рефрактометра Gilson (модель 131).

Растворы упаривали в вакууме при 40°C или лиофилизовали.

ГЖХ проводили с использованием хроматографа Hewlett-Packard 5890 на капиллярной колонке (25 м) Ultra 1. Моносахариды анализировали в виде ацетатов полиолов в интервале 150–290°C (10°/мин). Соотношения площадей пиков получали с помощью интегратора Hewlett-Packard 3393 А.

<sup>13</sup>C-ЯМР-спектры снимали на приборе Bruker WM при 80°C в присутствии триэтиламина.

**Препарат Vi-антигена ХЧ-Vi** был выделен из надклеточной жидкости, полученной в результате культивирования *S. typhi*, штамм 4446.

Культуру выращивали при 37°C в течение 8 ч в 10л-ферментере (“Анкум”). К клеточной суспензии (~7 л), полученной в результате культивирования, прибавляли формалин до 0.1% концентрации, через 4 ч клетки отделяли центрифугированием при 8000 об/мин в течение 40 мин, надклеточную жидкость упаривали до объема 300 мл и остаток подвергали диализу против дистиллированной воды. После лиофилизации получили 155 мг Vi-антигена, содержащего ЛПС, нуклеиновые кислоты и

\* Не исключено, что в процессе трехкратной обработки цетавлоном, Vi-антиген освобождался также и от следовых примесей белков, наличие которых могло приводить к снижению специфичности его взаимодействия с сыворотками нормальных доноров и больных с нетифоидными сальмонеллезами.

\*\* Для создания даже коммерческих образцов тест-системы необходимо очень небольшое количество антигена – несколько десятков миллиграммов.

белки. ЛПС удаляли в виде осадка в результате ультрацентрифугирования ~1% водного раствора полисахарида при 105 000 *g* в течение 18 ч. Супернатант лиофилизировали и остаток (120 мг) подвергали повторному ультрацентрифугированию в тех же условиях при концентрации Vi-антигена 3%.

Для очистки от примеси белков и нуклеиновых кислот 100 мг полученного таким образом Vi-антигена растворяли в 10 мл буфера, содержащего 0.05 М Трис-HCl, 0.05 М NaCl, 0.01 М MgCl<sub>2</sub> (рН 7.8) и инкубировали 16 ч при 37°C с рибонуклеазой А и дезоксирибонуклеазой I (Serva, Германия) в концентрациях 1 мкг/мл, а затем 3 ч – с 0.5 мг протеиназы К (Serva, Германия). Препарат ХЧ-Vi выделяли гель-хроматографией на колонке с сепарозой 4В-CL, выход ~75 мг.

**Препарат Цт-Vi получали по методу Годшлиха [5].**

**Препарат 3-Цт-Vi.** К раствору 60 мг ХЧ-Vi в 5 мл 0.5 М NaCl прибавляли 3 мл 2% раствора цетавлона в 0.5 М NaCl, смесь центрифугировали 15 мин при 8000 об/мин, супернатант разбавляли водой до прекращения выпадения осадка. Осадок (комплекс цетавлона с Vi-антигеном) растворяли в 3–5 мл 1 М NaCl, раствор выливали при перемешивании в 10-кратный объем спирта, осадок диализовали против деионизованной воды и лиофилизировали. Подобным образом Vi-антиген пересаждали еще два раза. Выход ~20 мг (~30%).

**Анализ на содержание белка** в препаратах Vi-антигена проводили по методу Лоури [9].

**Содержание нуклеиновых кислот** определяли с помощью УФ-спектрометрии водных растворов антигенов на спектрофотометре Beckman DU 520 в области длин волн от 200 до 300 нм по методу Спирина [10].

**Иммунохимические методы.** Тестирование выделенных антигенов в реакции торможения геммагглютинации (РТГА) проводили по общепринятой методике [11].

Взаимодействие Vi-антигенов с сыворотками нормальных доноров и больных нетифоидными сальмонеллезами анализировали методом ИФА. На микротитровочных планшетах (Greiner, Германия) сорбировали антигены из 0.1 мл раствора в 0.05 М карбонатном буфере (ЛПС – 10 мкг/мл, Vi-антигены – 25 мкг/мл). Сенсibilизированные планшеты блокировали 1% казеином (Sigma, США) в 10 мМ фосфатном буфере (PBS) в течение 1 ч при 37°C и трехкратно промывали 0.05% Твин-20 в 10 мМ PBS. Исследуемые и стандартные сыворотки

разводили в 10 мМ PBS, содержащем 0.05% Твин-20 и 0.5% казеина, и титровали двукратным шагом. Для выявления специфических IgG-антител использовали меченный пероксидазой мышьяный конъюгат против IgG человека (Amerscard, Москва, Россия). Сыворотки и конъюгаты IgG человека инкубировали по 1.5 ч при 37°C. После инкубации промывали как описано выше. Далее в лунки вносили цитратно-фосфатный буфер с 0.04% орто-фенилендиамина (Sigma, США) и 0.1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Реакцию останавливали 5 н. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, оптическое поглощение измеряли на ИФА-ридере (Dynatech, Англия) при длине волны 492 нм (A<sub>492</sub>). За положительный результат принимали значения A<sub>492</sub> > 1.0.

**Сыворотки.** Для тестирования антигенов в РТГА использовали монорецепторную кроличью анти-Vi-сыворотку, произведенную ЛенНИИ вакцин и сывороток (Санкт-Петербург).

При проведении иммунохимического анализа была использована панель из 24 сывороток, полученных от больных с острыми нетифоидными сальмонеллезами из инфекционных клиник Москвы и Душанбе (сыворотки отбирались у больных с диагнозами, подтвержденными выделением бактериальной культуры *S. enteritidis*, *S. muenchen*, *S. virchow*), и панель из 122 сывороток от нормальных доноров из Москвы и Душанбе.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ancudinov I.V., Golovina M.E., L'vov V.L., Vaneeva N.P., Verner I.C., Yolкина S.I., Aparin P.G. // Med. J. Indonesia. 1998. V. 7. P. 240–246.
2. Kang G., Sridharan G., Jesudason M.V., John T.J. // J. Clin. Pathol. 1991. V. 45. P. 740–741.
3. Mekara Y., Manecaarn N., Vithayasai V., Makonwekeyoon S. // Asian Pacific J. Allergy Immunol. 1990. V. 8. P. 95–101.
4. Апарин П.Г., Львов В.Л., Савинова И.В., Медведев С.А., Некрасов А.В. // Аллергия, астма и клин. иммунол. 1999. № 9. С. 81–84.
5. Godshlich E.C., Lin D.Y., Arenstein M.S. // J. Exp. Med. 1969. V. 29. P. 1349–1365.
6. Книрель Ю.А. // Прогресс химии углеводов / Ред. И.В. Торгов. М.: Наука, 1985. С. 41–56.
7. Szu S.C., Stone A.L., Robbins J.D., Schneerson R., Robbins J.B. // J. Exp. Med. 1987. V. 166. P. 1510–1524.
8. Heyns K., Keissling G. // Carbohydr. Res. 1967. V. 3. P. 340–353.
9. Lowry O.H., Rosenbrough H.J., Farr A.L., Randall R.J. // J. Biol. Chem. 1961. V. 193. P. 265–275.
10. Спирин А.С. // Биохимия. 1958. Т. 23. С. 656–662.
11. Антитела. Методы: Т. 1 / Ред. О.В. Рохлин. М.: Мир, 1991. С. 264–266.

## Isolation of a Highly Purified Capsular Polysaccharide from *Salmonella enterica* Serovar Typhi (*Salmonella typhi*) and Its Use in Serological Diagnostics of Typhoid Fever

A. M. Tesheva, P. G. Aparin, and V. L. L'vov<sup>#</sup>

<sup>#</sup>Phone: +7 (095) 111-8249; e-mail: teshu@mail.ru

State Research Center Institute of Immunology, Ministry of Public Health of the Russian Federation, Kashirskoe sh. 24-2, Moscow, 115478 Russia

For use in differential diagnostics of typhoid fever, samples of the capsular polysaccharide from *Salmonella enterica* serovar Typhi (usually named Vi-antigen) were isolated and characterized by physicochemical and serological methods. It was shown that only the sample of Vi-antigen with the minimal (0.57%) admixture of the corresponding lipopolysaccharide (LPS) from *S. typhi* retained a high serological activity in the tests with monoreceptor anti-Vi sera. However, it exhibited a substantially weaker reaction with sera from normal donors and patients with acute nontyphoid salmonellosis, than Vi-antigen preparations with a higher (0.8–1.2%) LPS content. The chromatographically pure Vi-antigen was purified by triple reprecipitation with hexadecyltrimethylammonium bromide. The content of the LPS admixture in the resulting Vi-antigen samples was quantitatively determined by GC. A high purification level of the Vi-antigen from the LPS admixture allows us to hope that this preparation could serve as a basic component of the test system for the diagnostics of typhoid fever. The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2002, vol. 28, no. 1; see also <http://www.maik.ru>.

*Key words:* lipopolysaccharide, LPS, *Salmonella typhi*, typhoid fever, Vi-antigen