

## **Разработка математических моделей синтеза O-антигенов холерными вибрионами атоксигенных штаммов на основе модели синтеза O-антигена, секретируемого в процессе культивирования *Vibrio cholerae* M-41 Огава вирулентного штамма при производстве холерной вакцины**

*А.В. Комиссаров, О.А. Волох, Ю.А. Алешина, А.К. Никифоров*

*ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора, Саратов, Россия*

## **Development of mathematical models of synthesis of the O-antigens atoxigenic strains of *Vibrio cholerae* based on the model of the synthesis of O-antigen secreted in the process of culturing the virulent strain of *Vibrio cholerae* M-41 Ogawa in the production of cholera vaccine**

*A.V. Komissarov, O.A. Volokh, Yu.A. Aleshina, A.K. Nikiforov*

*Federal State Healthcare Institution Russian Scientific Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov, Russia*

**В статье представлены результаты разработки математических моделей синтеза O-антигенов холерными вибрионами атоксигенных штаммов KM 262 биовара Эль Тор серовара Огава, KM 263 биовара Эль Тор серовара Инаба и M 377 O139 серогруппы на основе модели синтеза O-антигена, секретируемого при культивировании вибрионов *Vibrio cholerae* вирулентного штамма M-41 классического биовара серовара Огава. Полученные данные дают возможность успешно осуществить задачу масштабирования разработанной пилотной технологии культивирования холерного вибриона атоксигенных штаммов на промышленные культиваторы.**

**Ключевые слова:** математическая модель; O-антиген; атоксигенный штамм; холерный вибрион.

**Библиографическое описание:** Комиссаров АВ, Волох ОА, Алешина ЮА, Никифоров АК. Разработка математических моделей синтеза O-антигенов холерными вибрионами атоксигенных штаммов на основе модели синтеза O-антигена, секретируемого в процессе культивирования *Vibrio cholerae* M-41 Огава вирулентного штамма при производстве холерной вакцины. Биопрепараты 2015; (3): 54–57.

**The paper contains the results of the development of mathematical models for O-antigen synthesis by atoxigenic cholera vibrio strains KM 262 biovar El Tor serovar Ogawa, KM 263 biovar El Tor serovar Inaba, and M 377 O139 serogroup based on the modeling of the synthesis of O-antigen, produced in the course of cultivation of the virulent *Vibrio cholerae* M 41 strain belonging to classical biovar, serovar Ogawa. The data obtained provide the possibility to successfully perform the task of up-scaling the designed pilot technology for cultivation of atoxigenic cholera vibrio strains to be utilized on commercial-scale bioreactors.**

**Key words:** mathematical model; O-antigen; atoxigenic strains; *Vibrio cholerae*.

**Bibliographical description:** Komissarov AV, Volokh OA, Aleshina YuA, Nikiforov AK. Development of mathematical models of synthesis of the O-antigens atoxigenic strains of *Vibrio cholerae* based on the model of the synthesis of O-antigen secreted in the process of culturing the virulent strain of *Vibrio cholerae* M-41 Ogawa in the production of cholera vaccine. Biopreparation (Biopharmaceuticals) 2015; (3): 54–57.

В технологии приготовления российской коммерческой холерной вакцины используются токсигенные штаммы *Vibrio cholerae* 569В Инаба и M-41 Огава. Использование вирулентных штаммов холеры при промышленном производстве вакцины увеличивает вероятность инфицирования персонала в случае возникновения аварийных ситуаций. Учеными института «Микроб» созданы штаммы-продуценты O1 антигенов *V. cholerae* KM 262

биовара Эль Тор серовара Огава [1] и *V. cholerae* KM 263 биовара Эль Тор серовара Инаба [2], в которых отсутствует *ctxA* ген, кодирующий А-субъединицу холерного токсина. Получить O139 антиген представляется возможным при применении вибрионов штамма *V. cholerae* M 377 O139 серогруппы, у которых также отсутствует *ctxA* ген. Данные штаммы *V. cholerae* целесообразно использовать для создания новой холерной химической вакцины.

Нами была разработана пилотная технология культивирования *V. cholerae* авирулентных штаммов, секретирующих О-антигена [3]. Создание промышленной технологии выращивания холерных вибрионов этих штаммов служит одним из шагов к построению производства для получения новой вакцины против холеры. Масштабирование экспериментальных технологий представляется возможным проводить при наличии уже отработанных технологических процессов. Разработка математического описания процедуры выращивания бактерий требует анализа биокинетических характеристик этого процесса, которые служат базой для создания адекватной модели. В связи с изложенным актуальность приобретало установление таких характеристик периодического процесса выращивания в биореакторах *V. cholerae* авирулентных штаммов КМ 263, КМ 262 и М377 и составление математической модели этих процессов.

Цель работы – разработка математических моделей синтеза О-антигена холерными вибрионами атоксигенных штаммов на основе модели синтеза О-антигена, секретируемого в процессе культивирования *Vibrio cholerae* вирулентного штамма М-41 Огава при производстве холерной вакцины.

## Материалы и методы

В работе использовали авирулентные штаммы *Vibrio cholerae* КМ 262 биовара эльтор серовара Огава, *V. cholerae*

КМ 263 биовара Эль Тор серовара Инаба и *V. cholerae* М 377 О139 серогруппы, полученные из Государственной коллекции патогенных микроорганизмов института «Микроб».

Выращивание клеток *V. cholerae* штаммов КМ 263 и КМ 262, а также *V. cholerae* М 377 О139 осуществляли на пилотном ферментере вместимостью 20 дм<sup>3</sup> согласно изложенному ранее [3].

## Результаты и обсуждение

Нами, на основе имеющихся данных, проанализированы полученные сведения по культивированию холерного вибриона, выделению О-антигенов и потреблению глюкозы, а также определены удельные скорости размножения вибрионов атоксигенных штаммов *V. cholerae* и секреции ими О-антигенов (табл. 1–3).

Полученные результаты дают основание говорить о том, что рост холерных вибрионов и продуцирование О-антигенов происходит пропорционально израсходованной глюкозе. Скорости размножения холерных вибрионов и секреции О-антигенов принимают наибольшие значения к шестому и восьмому часам от начала процесса соответственно. В последующем наблюдается их снижение. Из сказанного логично заключить, что рост вибрионов *V. cholerae* определяется не только содержанием в культуральной среде глюкозы,

Таблица 1. Сведения по процессу синтеза О-антигена при культивировании штамма холерного вибриона КМ 263

Содержание в культуральной жидкости, г/дм <sup>3</sup>	Время культивирования, ч										
	$t_1=0$	$t_2=1$	$t_3=2$	$t_4=3$	$t_5=4$	$t_6=5$	$t_7=6$	$t_8=7$	$t_9=8$	$t_{10}=8,5$	$t_{11}=9$
Холерные вибрионы (X)	0,036	0,036	1,107	2,221	4,443	13,329	19,993	26,657	33,329	35,55	33,329
О-антиген (P)	нет данных	нет данных	нет данных	нет данных	0,1	0,4	0,6	0,6	0,8	1,6	1,6
Количество израсходованной глюкозы (S), г	0	25	40	50	55	60	70	80	90	95	100
Удельные скорости, ч <sup>-1</sup>	Промежутки времени, ч										
	$t_2-t_1$	$t_3-t_2$	$t_4-t_3$	$t_5-t_4$	$t_6-t_5$	$t_7-t_6$	$t_8-t_7$	$t_9-t_8$	$t_{10}-t_9$	$t_{11}-t_{10}$	
размножения холерных вибрионов	0	0,96	0,50	0,50	0,67	0,33	0,25	0,2	0,06	-0,07	
синтеза О-антигена	нет данных	нет данных	нет данных	нет данных	0,0375	0,025	0,0375	0,003	0,056	0	

Таблица 2. Сведения по процессу синтеза О-антигена при культивировании штамма холерного вибриона КМ 262

Содержание в культуральной жидкости, г/дм <sup>3</sup>	Время культивирования, ч									
	$t_1=0$	$t_2=1$	$t_3=2$	$t_4=3$	$t_5=4$	$t_6=5$	$t_7=6$	$t_8=7$	$t_9=8$	$t_{10}=8,5$
Холерные вибрионы (X)	0,036	0,036	1,107	3,33	8,89	13,33	19,99	26,657	31,09	28,89
О-антиген (P)	нет данных	нет данных	нет данных	нет данных	0,1	0,4	1,0	1,6	3,2	3,2
Количество израсходованной глюкозы (S), г	0	25	40	50	55	60	70	80	90	95
Удельные скорости, ч <sup>-1</sup>	Промежутки времени, ч									
	$t_2-t_1$	$t_3-t_2$	$t_4-t_3$	$t_5-t_4$	$t_6-t_5$	$t_7-t_6$	$t_8-t_7$	$t_9-t_8$	$t_{10}-t_9$	
размножения холерных вибрионов	0	0,96	0,67	0,63	0,33	0,33	0,25	0,14	-0,03	
синтеза О-антигена	нет данных	нет данных	нет данных	нет данных	0,017	0,015	0,007	0,026	0	

Таблица 3. Сведения по процессу синтеза О-антигена при культивировании штамма холерного вибриона М377

Содержание в культуральной жидкости, г/дм <sup>3</sup>	Время культивирования, ч										
	$t_1=0$	$t_2=1$	$t_3=2$	$t_4=3$	$t_5=4$	$t_6=5$	$t_7=6$	$t_8=7$	$t_9=8$	$t_{10}=8,5$	$t_{11}=9$
Холерные вибрионы (X)	0,036	0,036	1,10	2,22	6,67	13,33	17,72	24,43	28,89	31,09	24,43
О-антиген (P)	нет данных	нет данных	нет данных	нет данных	0,075	0,15	0,3	0,4	0,45	0,8	0,8
Количество израсходованной глюкозы (S), г	0	20	35	40	45	50	55	65	70	75	80
Удельные скорости, ч <sup>-1</sup>	Промежутки времени, ч										
	$t_2-t_1$	$t_3-t_2$	$t_4-t_3$	$t_5-t_4$	$t_6-t_5$	$t_7-t_6$	$t_8-t_7$	$t_9-t_8$	$t_{10}-t_9$	$t_{11}-t_{10}$	
размножения холерных вибрионов	0	0,98	0,50	0,66	0,50	0,25	0,28	0,15	0,035	-0,14	
синтеза О-антигена	нет данных	нет данных	нет данных	нет данных	0,006	0,008	0,005	0,017	0,009	0	

Таблица 4. Значения кинетических коэффициентов

Коэффициент	Значение коэффициента		
	KM263	KM262	M377
$\mu_{max}$	0,97	0,99	0,95
$qP_{max}$	0,02	0,035	0,01
$K_S$	0,5	0,5	0,5
$K_{iS}$	0,332	0,451	0,148
$K_p$	2,5	4	2,3
$K_{ip}$	0,001	0,001	0,001
$Y_{XS}$	0,95	0,99	0,96

но также зависит от содержания продуктов жизнедеятельности бактерий. Также представляется возможным утверждать, что увеличение количества последних уменьшает скорость размножения холерных вирионов. Эти сведения коррелируют с результатами опытов, представленных в нашей статье [4]. Основываясь на этом, было решено использовать разработанные нами методические подходы к моделированию процесса синтеза О-антигена, секретируемого при культивировании *V. cholerae* вирулентного штамма М-41 Огава, для построения моделей синтеза О-антигенов атоксигенными штаммами холерных вибрионов. Кинетика синтеза О-антигена М-41 Огава была нами описана с помощью системы дифференциальных уравнений (1).

$$\left\{ \begin{array}{l} \frac{dX}{dt} = \begin{cases} \mu_{max} \frac{S_L}{K_S + S_L} \times X, & \text{если } 0 \leq t \leq 3 \\ \mu_{max} \frac{S_L}{K_S + S_L} \times \frac{1}{(1 + P/K_{iS})} \times X, & \text{если } t \geq 3 \end{cases} \\ \frac{dS}{dt} = \begin{cases} -\mu_{max} \frac{S_L}{K_S + S_L} \times \frac{X}{Y_{XS}}, & \text{если } 0 \leq t \leq 3 \\ -\mu_{max} \frac{S_L}{K_S + S_L} \times \frac{1}{(1 + P/K_{iS})} \times \frac{X}{Y_{XS}}, & \text{если } t \geq 3 \end{cases} \\ \frac{dP}{dt} = \begin{cases} 0, & \text{если } 0 \leq t \leq 3 \\ q_{Pmax} \frac{X^2}{(K_p S + X)} - K_{ip} \cdot X^2, & \text{если } t \geq 3 \end{cases} \end{array} \right. \quad (1)$$

где  $X$  – концентрация вирионов *V. cholerae*, г/л;  
 $P$  – концентрация О-антигена, г/л;  
 $\mu_{max}$  – удельная максимальная скорость роста микроорганизмов, ч<sup>-1</sup>;  
 $q_{Pmax}$  – удельная максимальная скорость образования О-антигена, ч<sup>-1</sup>;  
 $S_L$  – текущая концентрация растворенной глюкозы, г/л;  
 $K_S, K_{iS}, K_p, K_{ip}$  – кинетические константы, г/л;  
 $Y_{XS}$  – расходный коэффициент, г/г.

Эта модель была также предложена для математического описания кинетики синтеза О-антигенов, секретируемых *V. cholerae* авирулентных штаммов KM 263, KM 262 и M377 в ходе их культивирования.

С использованием разработанной программы для ЭВМ в среде Mathcad [4] при решении систем дифференциальных уравнений были определены значения кинетических коэффициентов (табл. 4) и получены зависимости, характеризующие рост холерного вибриона, накопление антигенов и потребление глюкозы (рис. 1).

Анализ данных рисунка позволяет говорить о несущественных расхождениях данных реального культивирования холерных вибрионов и результатов, полученных при решении системы дифференциальных уравнений.

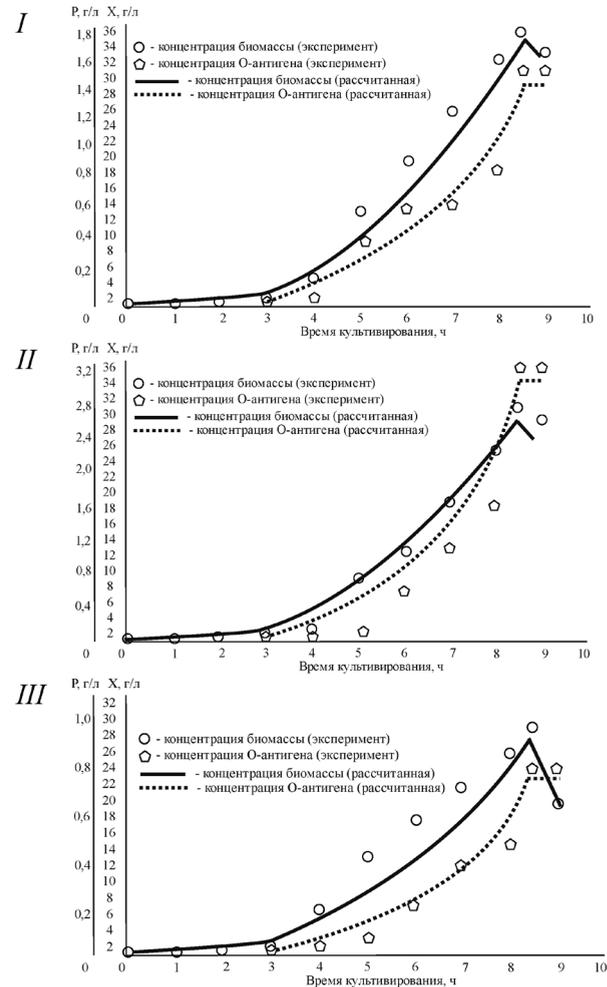


Рис. 1. Результаты моделирования процесса культивирования атоксигенных штаммов KM 263 (I), KM 262 (II), M377 (III).

### Вывод

Таким образом, созданные в ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора математические модели синтеза О-антигенов холерными вибрионами атоксигенных штаммов достаточно хорошо (средняя ошибка не более 15%) описывают этот процесс. Это дает возможность успешно осуществить задачу масштабирования разработанной пилотной технологии культивирования холерных вибрионов атоксигенных штаммов на промышленные культиваторы.

### Литература:

1. Стрельникова ЕН, Ливанова ЛФ, Горяев АА. Авирулентный штамм бактерий *Vibrio cholerae* KM 262 биовара эльтор серовара Огава – продуцент протективного О1 антигена. Патент Российской Федерации, № 2425868; 2010.
2. Ливанова ЛФ, Стрельникова-Ааб ЕН, Заднова СП, Смирнова НИ. Авирулентный штамм бактерий *Vibrio cholerae* KM 263 биовара Эльтор серовара Инаба – продуцент протективного О1 антигена. Патент Российской Федерации, № 2425867; 2010.
3. Еремин СА, Комиссаров АВ, Волох ОА, Шепелев ИА, Громова ОВ, Никифоров АК и др. Разработка экспериментальной технологии получения О-антигенов атоксигенных штаммов холерного вибриона. Пробл особо опасных инфекций 2013; (1): 85–7.
4. Комиссаров АВ, Никифоров АК, Задохин СН, Еремин СА, Волох ОА, Алешина ЮА. Математическая модель кинетики накопления

*O*-антигена в ходе периодического глубинного культивирования *Vibrio cholerae* M-41 Огава с лимитацией по углеродному субстрату. Пробл особо опасных инфекций 2013; (1): 91–3.

## References

1. Strel'nikova EN, Livanova LF, Goryaev AA et al. Avirulent strain of *Vibrio cholerae*, KM 262 biovar El Tor serovar Ogawa – producer of protective O1-antigen. RF Patent No 2425868; 2010.
2. Livanova LF, Strel'nikova EN, Zadnova SP, Smirnova NI. Avirulent strain of *Vibrio cholerae*, KM 263 biovar El Tor serovar Inaba – producer of protective O1-antigen. RF Patent No 2425867; 2010.
3. Eremin SA, Komissarov AV, Volokh OA, Shepelev IA, Gromova OV, Nikiforov AK, Aleshina YuA, Avdeeva NG, Belyakova NI. [Experimental Technology for O-Antigens Production of Non-Toxigenic Strains of *Vibrio cholerae*]. *Probl osobo opasnykh infek. (Problems of Particularly Dangerous Infections)*. 2013; (1): 85–7.
4. Komissarov AV, Nikiforov AK, Zadokhin SN, Eremin SA, Volokh OA, Aleshina YuA. *Mathematical Model of Kinetics of O-Antigen Accumulation in the Process of Periodic Submerged Cultivation of Vibrio cholerae M-41 Ogava with Limitation on Carbon Substrate. Probl. osobo opasnykh infek. (Problems of Particularly Dangerous Infections)*. 2013; (1): 91–3.

## Authors:

Federal Government Health Institution «Russian Research Anti-Plague Institute “Microbe”» of the Federal Service for Surveillance in the Sphere of Consumers Rights Protection and Human Welfare. 46 Universitetskaya St., 410005, Saratov, Russian Federation.

Komissarov AV. Head of the Department at the FGHI RusRAPI “Microbe”. PhD in Technical Sciences, Associate Professor.

Volokh OA. Head of the Department at the FGHI RusRAPI “Microbe”. PhD in Biological Sciences.

Aleshina YuA. Junior Research Officer at the FGHI RusRAPI “Microbe”. PhD in Biological Sciences.

Nikiforov AK. Deputy Directr at the FGHI RusRAPI “Microbe”. Doctor of Biological Sciences, Associate Professor.

## Об авторах

Федеральное казенное учреждение здравоохранения Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека. Российская Федерация, 410005, Саратов, ул. Университетская, 46.

Комиссаров Александр Владимирович. Заведующий отделом ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора. Канд. техн. наук, доцент.

Волох Оксана Александровна. Заведующая отделом ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора. Канд. биол. наук.

Алешина Юлия Александровна. Младший научный сотрудник ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора. Канд. биол. наук.

Никифоров Алексей Константинович. Заместитель директора ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора. Докт. биол. наук, доцент.

**Адрес для переписки:** Комиссаров Александр Владимирович; komissarov-9@yandex.ru

Поступила 30.07.2015 г.  
Принята 18.08.2015 г.