

ANNALES  
UNIVERSITATIS MARIAE CURIE-SKŁODOWSKA  
LUBLIN — POLONIA

VOL. XIV, 22

SECTIO D

1961

Z Katedry i Zakładu Chemii Ogólnej Wydziału Lekarskiego Akademii Medycznej w Lublinie  
Kierownik: doc. dr Irena Krzeczowska

Irena KRZECZKOWSKA i Halina KRÓL

**Wolne aminokwasy szczepionki przeciwkrztuścowej**

**Свободные аминокислоты противокклюшной вакцины**

**Free Amino Acids in Pertussis Vaccine**

Szczepionka przeciwkrztuścowa jest zawiesiną zabitych fenolem pałeczek *Haemophilus pertussis* w płynie fizjologicznym. 1 ml szczepionki zawiera około 10 miliardów bakterii. Gęstość zawiesiny bakteryjnej oznaczana jest metodą nefelometryczną wg wzorca pyrexowego. Do konserwowania szczepionki stosuje się fenol o stężeniu 2,4% lub mertiolat 0,01%. Szczepionka podawana jest podskórnie.

W celu otrzymania wyjściowej zawiesiny do produkcji szczepionki bakterie krztuśca hoduje się na podłożu płynnym Hornibrooka, zmodyfikowanym przez Cohena i Wheelera. Podsiawowym składnikiem tego podłoża jest kwaśny hydrolizat kazeiny wzbogacony dodatkiem cysteiny, aminokwasu wpływającego korzystnie na wzrost pałeczek krztuśca. Poza tym w skład podłoża wchodzi różne sole mineralne jak np. NaCl, KCl, CaCl<sub>2</sub>, MgCl<sub>2</sub>, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> oraz skrobia i dializat drożdży jako czynniki wzrostowe.

Iskierko J., Sabbo M. i Franaszczyk R. jako źródło aminokwasów zastosowali do podłoża zamiast kwaśnego hydrolizatu kazeiny, kwaśny hydrolizat fasoli (1). Inne modyfikacje podłoża Hornibrooka dokonane przez Wilsona Verwey (4) i innych różnią się w zasadzie tylko ilościową zawartością różnych składników mineralnych i hydrolizatu kazeiny.

W przedstawionej pracy zajęto się przebadaniem wolnych aminokwasów zawartych w szczepionce przeciwkrztuścowej, które wraz z zabitym zawiesiną dostają się do organizmu szczepionego dziecka. Przebadano też skład wolnych aminokwasów kwaśnego hydrolizatu kazeiny celem stwierdzenia czy wolne aminokwasy szczepionki są wyłącznie pochodzenia podłożowego, czy też niektóre z nich powstają w procesach metabolizmu bakterii *Haemophilus pertussis*.

**METODY I MATERIAŁY**

Do badań użyto 9 ampulek à 1 ml z 9 różnych serii szczepionki produkcji Warszawskiej Wytwórni Surowic i Szczepionek. Kwaśny hydrolizat kazeiny sporządzano z kazeiny firmy Merck.

Przygotowanie materiału do badań. Szczepionkę zawartą w 2 ampulkach á 1 ml wylewano do parowniczk i odparowywano promiennikami podczerwonymi do suchości. Lampa promienników umieszczona była nad parowniczką w odległości 5—6 cm, aby temperatura odparowywanego roztworu nie przekraczała 60°C. Suchą pozostałość zalewano 5 ml 96% etanolu i po dokładnym przemyciu pozostawiano na 15 minut. Następnie etanol z rozpuszczonymi w nim aminokwasami oddzielano przez dekantację od chlorku sodu i komórek bakteryjnych i odparowywano promiennikami do suchości; kryształki aminokwasów rozpuszczano w 0,5—1,0 ml wody redestylowanej i наносono na bibułę w ilości 0,05 ml — 0,1 ml. Nakraplań dokonywano mikropipetką lub melanżerem. Hydrclizat kazeiny przygotowuywano hydrolizując kazeinę 6 n HCl w ciągu 48 godzin. Kwaśny hydrolizat do nakropleń na bibułę przygotowuywano metodą promiennikową wg J. I sk i e r k o.

#### BADANIA WŁASNE

Aminokwasy rozdzielano metodą chromatografii bibułowej krążkowej oraz jedno- i dwuwymiarowej wstępującej. Używano bibuły Whatman Nr 3 i 1. Rozdział chromatograficzny przeprowadzono przy użyciu układu rozpuszczalników: 1) n-bunatol-kw. octowy-woda, 4:1:1, 2) propanol — woda 7:3, 3) fenol — woda, 7:3. Chromatogramy wywoływano acetonowym roztworem ninhydryny o stężeniu 0,15% i izatyny o stężeniu 0,25%. Do identyfikacji stosowano wzorcowe roztwory aminokwasów o stężeniu 0,1%. Chromatogramy z rozdzielonymi aminokwasami utrwalano metodą termiczną wg I. Krzeczowskiej (2), (3). Skład wolnych aminokwasów *Vaccinum pertussis* oraz kwaśnego hydrolizatu kazeiny zestawiono w tabeli 1.

#### OMÓWIENIE WYNIKÓW I WNIOSKI

W szczepionce przeciwkrztuścowej wykryto 13 wolnych aminokwasów, które wraz z zabitym zawiesiną bakterii *Haemophilus pertussis* dostają się drogą podskórną do organizmu szczepionego dziecka. Wymienione aminokwasy są pochodzenia podłożowego i zawarte są w hydrolizacie kwaśnym kazeiny — głównego składnika podłoża Hornibrooka wg modyfikacji Cohena i Wheelera. Szczepionka zawiera o 3 aminokwasy mniej niż hydrolizat kwaśny kazeiny.

Treonina i kwas asparaginowy nie zostały wykryte w szczepionce przeciwkrztuścowej, w hydrolizacie kazeiny występowały w śladowych stężeniach i nie we wszystkich seriach.

Na niektórych chromatogramach szczepionki przeciwkrztuścowej nie wykryto argininy.

W przedstawionej pracy określono również w jakim środowisku aminokwasowym są hodowane bakterie krztuśca do celów produkcji szczepionki przeciwkrztuścowej.

Tab. 1. Zestawienie składu wolnych aminokwasów szczepionki przeciwkrztuścowej oraz hydrolizatu kazeiny

Free amino acid composition of pertussis vaccine and casein hydrolysate

Lp.	aminokwas	kwaśny hydrolizat kazeiny	szczepionka <i>Vaccinum pertussis</i>
1	Lizyna	+	+
2	Arginina	+	+—
3	Histydyna	+	+
4	Kw. asparaginowy	+—	—
5	Glicyna	+	+
6	Seryna	+	+
7	Kw. glutaminowy	+	+
8	Treonina	+—	—
9	Alanina	+	+
10	Prolina	+	+
11	Tyrozyna	+	+
12	Tryptofan	+	+
13	Metionina	+	+
14	Walina	+	+
15	Fenylalanina	+	+
16	Leucyna	+	+

Legenda: + oznacza obecność aminokwasu, +— obecność małych stężeń i nie na wszystkich chromatogramach, — nieobecność aminokwasów.

## PIŚMIENNICTWO

1. Iskierko J., Sabbo M., Franaszczyk R.: Podłoże z hydrolizatem fasoli dla wzrostu *Haemophilus pertussis*. Acta Microbiol. Pol., 4, 61—66, 1956.
2. Krzeczowska I.: Sposób termiczny wywoływania aminokwasów. Ann. Univ. Mariae Curie-Skłodowska, sec. D, 12, 255—257, 1957.
3. Krzeczowska I.: Termiczny sposób wywoływania aminokwasów (II). Ann. Univ. Mariae Curie-Skłodowska, sec. D, 14, 99—107, 1959.
4. Verwey W. E.: A Simplified Liquid Maltose Medium for the Growth of *Haemophilus pertussis*. J. Bact., 58, 76—78, 1949.

## РЕЗЮМЕ

Обследовано 9 различных серий противокклюшной вакцины на содержание свободных аминокислот. Кроме того определен также аминокислотный состав гидролизата кислого казеина, главного сос-

тавного элемента субстрата Горнибрука в модификации Коена и Вилера — применяемого в производстве *Vaccinum pertussis*. Установлено, что свободные аминокислоты, попадающие в организм ребенка вместе с вакциной, субстратного происхождения.

В вакцине не обнаружен треонин и аспарагиновая кислота, а в некоторых сериях и аргинин; эти аминокислоты автором обнаружены в кислом гидролизате казеина.

---

## SUMMARY

9 different series of pertussis vaccine were investigated for the presence of free amino acids. The authors also determined the amino acid composition of the acid hydrolysate of casein, main component of Hornibrook's base modified by Cohen and Wheeler, which is used for the production of *Vaccinum pertussis*. It was found that the free amino acids which enter the child's organism derive from the base.

Threonine and aspartic acid were not found in the vaccine; arginine was also absent from some series. These amino acids were found in the acid hydrolysate of casein.