Ann. Ist. Super. Sanità
Vol. 25, N. 2 (1989), pp. 333-336

CONTROLLO DEI VACCINI ANTINFLUENZALI A SUBUNITA'

I. DONATELLI e G. MANCINI

Laboratorio di Virologia, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Riassunto. - *Il Controllo di Stato del vaccino antinfluenzale a "subunità" necessita, rispetto a quello del vaccino a virus intero, di una ulteriore analisi che accerti l'eliminazione delle proteine interne. A tale scopo gli autori hanno messo a punto e standardizzato una metodica di controllo che impiega la tecnica di elettroforesi in gel di poliacrilamide-SDS per l'evidenziazione, nel prodotto in questione, della presenza delle sole subunità proteiche di superficie.*

Summary (Control of subunit influenza vaccine). - *Influenza subunit vaccines contain essentially only the envelope spike proteins, haemagglutinin (HA) and neuraminidase (NA). It is important to check the purity of each monovalent batch of these vaccines, in comparison with whole virus preparation. The authors have standardized a biochemical analysis for the laboratory control of this kind of vaccines, using PAGE test. All the vaccine manifactures are required to demonstrate, by this method, that the subunit vaccine contains HA and NA, with no more than trace amounts of internal proteins.*

Introduzione

Nella profilassi della malattia influenzale i vaccini a virus intero, inattivato, sono oggi i più utilizzati. Essi sono costituiti da sospensioni acquose di virus influenzali di tipo A e B, coltivati nella cavità allantoidea di uova embrionate di pollo. I liquidi allontoidei, raccolti dopo un appropriato periodo di incubazione, vengono concentrati, purificati e inattivati. I progressi tecnici raggiunti nei metodi di produzione di tali vaccini (filtrazione, ultracentrifugazione zonale in gradiente di saccarosio) permettono oggi di ottenere sospensioni virali altamente purificate, contenenti virioni influenzali, che secondo il tipo di preparazione vaccinale potranno essere: interi (vaccino a virus intero inattivato) o frazionati (vaccini split e vaccini a subunità). Tra i vaccini frazionati, quelli a subunità richiedono, nella fase di produzione, una ulteriore purificazione per rimuovere tutti i componenti virali al di fuori delle proteine di superficie: l'emagglutinina (HA) e la neuraminidasi (NA).

Il loro alto grado di purezza, in termini di esclusione delle proteine interne, ha conseguentemente ridotto sensibilmente le reazioni collaterali (febbre, sintomalogia dolorosa nel punto di inoculazione), a volte associate alla somministrazione del vaccino antinfluenzale a virus intero.

I vaccini influenzali a subunità risultano quindi ben tollerati e per questo trovano una particolare indicazione nella profilassi infantile. La loro recente introduzione sul mercato nazionale e il loro arrivo al Controllo di Stato ha determinato la necessità di standardizzare un metodo qualitativo per accertare che queste preparazioni contengano solo gli antigeni di superficie del virus influenzale. Questa analisi ovviamente si aggiunge alle usuali prove di controllo dei requisiti di qualità del prodotto (identità, sterilità, tossicità, contenuto antigenico, inattivazione virale, contenuto in ovoalbumina) che vengono effettuate su tutti i vaccini influenzali sia a virus intero che frazionato.

Il metodo qui appresso descritto fa uso della tecnica dell'elettroforesi in gel di poliacrilamide-SDS [1-3].

Materiali

Reagenti impiegati e loro preparazione

1. PAGE tampone A (1,5 M tris/HCl, pH 8,7). - Sciogliere 37 g di tris(idrossimetil)-metilamina in 150 ml di acqua distillata. Portare la soluzione a pH 8,7, aggiungendo circa 6 ml di HCl concentrato. Portare al volume finale di 200 ml con acqua distillata. Conservare a + 4 °C per un periodo massimo di due mesi.

2. PAGE tampone B (1 M tris/HCl, pH 6,8). - Sciogliere 24,2 g di tris(idrossimetil)-metilamina in 150 ml di acqua distillata. Portare la soluzione a pH

6,8 con l'aggiunta di circa 10 ml di HCl concentrato. Portare al volume finale di 200 ml con acqua distillata. Conservare a + 4 °C per un periodo massimo di due mesi.

3. PAGE tampone C (1,5 M tris/HCl, pH 6,8). - Sciogliere 19 g di tris(idrossimetil)-metilamina in 70 ml di acqua distillata. Portare la soluzione a pH 6,8 con l'aggiunta di circa 4 ml di HCl concentrato. Portare al volume finale di 100 ml con acqua distillata. Stabile a + 4 °C per un periodo massimo di due mesi.

4. SDS al 10% (peso/volume, p/v). - Sciogliere 10 g di SDS (sodiododecil-solfato) in 100 ml (volume finale) di acqua distillata. Conservare a temperatura ambiente per sei mesi.

5. Tampone di corsa, pH 8,3. - Sciogliere 144 g di glicina e 30 g di tris(idrossimetil)-metilamina in 700 ml di acqua distillata. Aggiungere 50 ml di SDS al 10% (vedi punto 4) e portare ad 1 litro (volume finale) con acqua distillata. Conservare a temperatura ambiente fino a sei mesi. Diluire cinque volte prima dell'uso.

6. Tampone di caricamento. - Sciogliere 10 g di saccarosio in circa 30 ml di acqua distillata, aggiungere 0,83 ml di 1,5 M tris-HCl pH 6,8 (vedi punto 3), 1 g di SDS, 0,3 ml di blu di bromofenolo (BPB) allo 0,2% (vedi punto 10) e 0,3 ml di β-mercaptoetanolo. Portare la soluzione al volume finale di 50 ml con acqua distillata, distribuire in aliquote di circa 2 ml e conservare a - 20 °C per circa un anno. Il β-mercaptoetanolo può anche essere omesso dalla soluzione. La presenza o meno di questo reagente nel tampone di caricamento darà origine a profili elettroforetici diversi, che saranno discussi nel capitolo "Risultati e discussione".

7. Acrilamide al 30% (p/v). - Sciogliere 150 g di acrilamide in 500 ml (volume finale) di acqua distillata. Conservare a + 4 °C per sei mesi.

8. Bisacrilamide all'1% (p/v). - Sciogliere 1 g di bisacrilamide in 100 ml (volume finale) di acqua distillata. Conservare a + 4 °C per sei mesi.

9. Ammonio persolfato al 10% (p/v). - Sciogliere 1 g di ammonio persolfato in 10 ml (volume finale) di acqua distillata. Conservare a + 4 °C per un periodo massimo di una settimana.

10. Soluzione di BPB allo 0,2% (p/v). - Sciogliere 20 mg di BPB in 10 ml di acqua distillata. Conservare a + 4 °C, al riparo dalla luce, per un anno.

11. Soluzione decolorante. - Unire 5 parti di metanolo, 5 parti di acqua distillata ed 1 parte di acido acetico glaciale. Conservare a temperatura ambiente per tre mesi.

12. Soluzione decolorante di coomassie blue allo 0,3% (p/v). - Sciogliere 3 g di colorante in 1 litro di soluzione decolorante (punto 11), con l'aiuto di un agitatore magnetico. Filtrare su carta e conservare a temperatura ambiente, al riparo dalla luce, per tre mesi.

Metodi

Preparazione dei campioni

Prima della corsa elettroforetica, i campioni vengono concentrati tramite precipitazione alcolica con metanolo freddo. A questo scopo 750 µl di sospensione virale vengono uniti a 750 µl di metanolo e concentrati a 10.000 g per 15 minuti. I "pellets" vengono risospesi in 60 µl di tampone di caricamento e lasciati tutta la notte a temperatura ambiente. Prima della corsa elettroforetica, i campioni vengono bolliti e lasciati raffreddare in ghiaccio.

Preparazione dei gel di corsa

A) Gel di separazione al 12,5% di acrilamide; quantità per 30 ml di soluzione:

acrilamide al 30%	12,5	ml
bisacrilamide all'1%	1,25	ml
1,5 M tris/HCl pH 8,7	7,5	ml
acqua distillata	8,3	ml
SDS al 10%	0,3	ml
Aggiungere al momento dell'uso:		
ammonio persolfato all'1%	165	µl
temed (tetrametiletilendiamina)	10	µl

B) "Stacking" gel al 5% di acrilamide; quantità per 15 ml di soluzione:

acrilamide al 30%	3,2	ml
bisacrilamide all'1%	2,6	ml
1 M tris/HCl pH 6,8	2,5	ml
SDS al 10%	100	µl
acqua distillata	6,8	ml
Aggiungere al momento dell'uso:		
ammonio persolfato all'1%	100	µl
temed	5	µl

Usando un gel di 1,5 mm di spessore e di 20 cm x 20 cm di dimensioni, vengono utilizzati 25 ml di gel di separazione e 5 ml di "stacking" gel.

Dopo aver lavato, sgrassato con etanolo e assemblato le due lastre di vetro, si versa la soluzione A fino ad un'altezza di circa 16 cm. Si versa lentamente una piccola quantità di acqua distillata sulla soluzione di gel, ancora non polimerizzato, al fine di livellarne la superficie. Si lascia polimerizzare per circa un'ora. Eliminata l'acqua in superficie, si procede a versare la soluzione B e ad inserirvi, immediatamente dopo, il "pettine". Si lascia polimerizzare per circa un'ora, si rimuove il pettine e si procede al caricamento dei campioni e alla corsa elettroforetica. L'acrilamide in polvere ed in soluzione è

altamente neurotossica, per cui si consiglia l'uso di guanti di plastica e di pipettatrici automatiche. Si raccomanda inoltre che la preparazione delle soluzioni di acrilamide avvenga esclusivamente sotto una cappa chimica di aspirazione.

Elettroforesi

I campioni in esame vengono introdotti nei rispettivi pozzetti (approssimativamente, 30/40 µl per campione) dopo aver montato l'apparato elettroforetico e averlo riempito con tampone di corsa. Il volume di semina varia notevolmente da partita a partita, secondo il contenuto proteico totale della sospensione virale: le quantità sopra riportate sono quindi solo indicative. La separazione elettroforetica delle proteine virali viene eseguita a corrente costante di 30 mA durante il passaggio delle proteine nel primo gel; la corrente viene quindi aumentata a 40 mA finché il marker di corsa (BPB) non abbia raggiunto la fine del gel.

Colorazione e decolorazione

Le bande proteiche vengono evidenziate immergendo il gel nella soluzione colorante di coomassie blue e successivamente in quella decolorante di metanolo/acido acetico. Per una migliore visualizzazione delle bande polipeptidiche, la matrice di fondo del gel deve risultare perfettamente decolorata. Per una opportuna conservazione, il gel può essere fotografato o alternativamente essiccato su carta Whatman 3M, servendosi degli appositi essiccatori di gel disponibili in commercio.

Risultati e discussione

Lo schema di separazione elettroforetica delle proteine strutturali di un vaccino antinfluenzale a virus intero è mostrato nella Fig. 1, dove vengono riportate anche le bande di migrazione di opportuni marcatori di pesi molecolari che eventualmente, possono essere inseriti nell'analisi elettroforetica, parallelamente ai campioni in esame.

La Fig. 2 mostra i profili elettroforetici di alcuni vaccini influenzali a virus intero (colonne A-C-E) e a subunità (colonne B-D-F).

Un vaccino a subunità non deve contenere, se non in piccole tracce, le due principali proteine strutturali interne del virus influenzale e cioè la nucleoproteina (NP) e la proteina della matrice (M). Queste proteine (di peso molecolare di circa 65 e 25 kDa rispettivamente) sono facilmente individuabili sul gel, in quanto danno origine a bande nette e intensamente colorate. La banda corrispondente all'emagglutinina, al contrario, risulta più diffusa e debolmente colorata.

Come indicato nella Fig. 1, l'impiego del β-mercaptoetanolo quale riducente nel tampone di corsa, si traduce nell'evidenziazione delle due frazioni HA1 (frazione pesante) e HA2 (frazione leggera), prodotte dal clivaggio dall'HA e tenute insieme da ponti disolfuro.

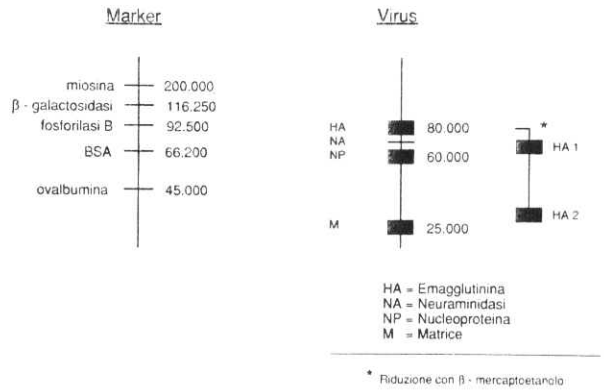

Fig. 1. - Schema della separazione elettroforetica dei polipeptidi strutturali di un vaccino influenzale a virus intero.

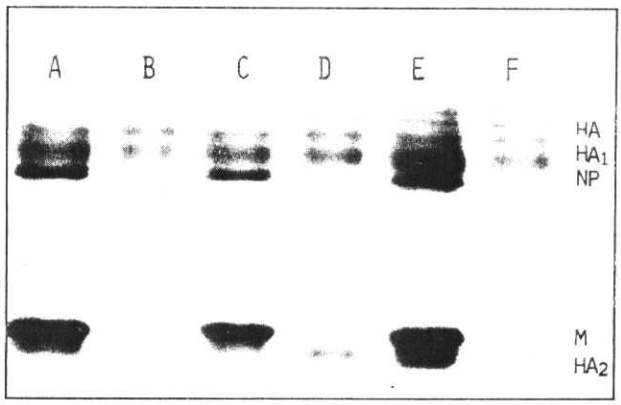

Fig. 2. - Profili elettroforetici di 3 vaccini influenzali di tipo A. Colonne A, C, E: virus interi; colonne B, D, F: corrispondenti subunità virali. La presenza delle due bande delle HA1 e HA2 è dovuta all'impiego del β-mercaptoetanolo nel tampone di caricamento.

La migrazione elettroforetica dell'HA1 e dell'HA2 varia marcatamente da ceppo a ceppo: l'HA1 di alcuni stipiti influenzali migra più o meno rapidamente della NP, mentre l'HA2 può risultare più o meno veloce rispetto alla proteina M [4].

Bande deboli e diffuse risultano anche quelle corrispondenti alla NA che usualmente comigra o migra strettamente associata alla NP.

Va inoltre notato che le tre proteine strutturali con attività polimerasica (P1, P2 e P3), presenti nel virione in piccola quantità, non sono chiaramente risolte in questo sistema elettroforetico (a concentrazione relativamente alta di acrilamide), a causa del loro alto peso molecolare.

Lavoro eseguito nell'ambito del Progetto Finalizzato: "Controllo della Malattie da Infezione" del CNR, Contratto N. 87.00659.52.

Ricevuto l'1 agosto 1988.
Accettato il 7 ottobre 1988.

BIBLIOGRAFIA

1. LAEMMLI, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assemby of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.

2. OXFORD, J.S., CORCORAN, T. & SCHILD, G.C. 1981. Intratypic eletrophoretic variation of structural polypeptides of human influenza A viruses. *J. Gen. Virol.* **56**: 431-436.

3. INGLIS, S.C., CARROL, A.R., LAMV, R.A. & MAHY, B.W.J. 1976. Polypeptides specified by the influenza virus genome. Evidence for eight distinct gene products specified by fowl plague virus. *Virology* **74**: 489-503.

4. DONATELLI, I., ROZERA, C., BUTTO', S., ARANGIO-RUIZ, G. & MANCINI, G. 1985. Comparative electrophoretic study of polypeptides of influenza A/H3N2 viruses isolated in circumscribed geographical areas. *J. Gen. Virol.* **66**: 637-641.