

Технологія отримання ентеротоксинів *Escherichia coli* у виробничих умовах

Ю.С. Сухарєв

Харківська державна зооветеринарна академія
Мала Данилівка, Дергачівський р-н, Харківська обл., 62341, Україна

Резюме. Уперше розроблено технологію отримання ентеротоксинів *Escherichia coli* у виробничих умовах, придатну для масового біофабричного виробництва анатоксинів. Використано високотоксигенні штами — продуценти термостабільного і термолабільного ентеротоксинів, визначено оптимальні параметри їх культивування, стимуляції токсиноутворення та детоксикації ентеротоксинів. Перевагами технології є мінімізація числа операцій та їх тривалості, автоматизація культивування, контроль і корекція його окремих стадій. Отримані анатоксини пропонуються для використання як імунізуючі препарати для створення антитоксичного імунітету при профілактиці та лікуванні колібактеріозу сільськогосподарських тварин.

Ключові слова: *Escherichia coli*, ентеротоксини, детоксикація, анатоксини.

Вступ. Колібактеріоз до цього дня є актуальною проблемою для тваринництва у світі [1, 2]. Недаремно в багатьох розвинених країнах (США, Канада, Великобританія та ін.) колібактеріоз тварин знаходиться під пильною увагою ветеринарних і медичних лікарів, а також Всесвітньої організації охорони здоров'я [3], оскільки важливу роль в інфекційній патології людини стали грати *Escherichia coli*, що виробляють ентеротоксини [4], резервуаром яких є сільськогосподарські тварини [5].

У багатьох країнах Європи й Америки збитки від коліінфекції становлять майже 56 % втрат від усіх інфекційних та неінфекційних хвороб новонароджених сільськогосподарських тварин [6–8]. В Україні захворюваність новонароджених телят на колібактеріоз коливається від 36,4 до 93,9 %, а летальність від цього захворювання — від 9,3 до 24 % [9].

Колібактеріоз зустрічається всюди й обумовлює величезні втрати поросят-смоктунів і свиней на початковій стадії відгодівлі. У неблагополучних по колібактеріозу господарст-

вах Росії хворіє до 80 % молодняку свиней, відхід тварин коливається в межах від 28 до 65 %, а прирости тих, що перехворіли, знижується до 30 % [10].

На фермах Кубані летальність при колібактеріозі складає у телят 23,8 %, у поросят — 29,0 %. Це означає, що з числа хворих на колібактеріоз гине кожне четверте теля і кожне третє порося [11].

Як показує досвід, вакцинація не завжди оберігає від колібактеріозу, що зумовлено рядом причин: бактерійні вакцини не містять повного набору сероваріантів *E.coli*, найчастіше разом із патогенністю втрачається й імуногенність вакцинних препаратів; надлишок антигенів чинить негативний вплив на імунну відповідь і т.д. [12]. У зв'язку з цим становить інтерес використання для приготування вакцин окремих бактерійних антигенів-факторів патогенності збудника [13]. Такими факторами для *E.coli* є ентеротоксини: термостабільний (ST) і термолабільний (LT), які детермінуються трансмісивними *Ent*⁺ плазмідами [14]. Для промислового виробництва вакцин на їхній основі необхідні технології отримання ентеротоксинів у виробничих умовах.

Мета дослідження полягала в розробці тех-

* Corresponding author.

Tel.: +066-4984811

E-mail address: Yuriy_sukharev@mail.ru

© Ю.С. Сухарєв, 2011

нології отримання ентеротоксинів *E.coli* у виробничих умовах, придатної для біофабричного виробництва анатоксинів.

Матеріали і методи досліджень. У роботі використано токсигенні штами O26LT⁺ і O9ST⁺ з колекції лабораторії хвороб молодняка ННЦ «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини» НААНУ.

Для отримання нагромаджувальної культури виробничих штамів *E.coli* їх 24-годинні агарові культури ($0,2 \times 10^9$ КУО/мл або 0,625 г/л) висівали у флакони з 100 мл бульйону Хоттингера. Через 8 год культивування при 37 °С здійснювали пересів штамів у бутлі, які містили 10 л цього ж середовища. Після 18 год культивування в такому ж режимі проводили оцінку чистоти культури шляхом мікроскопування мазків, пофарбованих за Грамом, і здійснювали засів промислового ферментера «Elektrolux», наповненого 150-300 л оптимізованого живильного середовища на основі бульйону Хоттингера, підігрітого до температури 37 °С.

Виробниче культивування проводили в ферментері при автоматичному регулюванні основних технологічних параметрів: температури, рН, рO₂, об'єму повітря, що подається, обертів мішалки. Кожні дві години культивування відбирали проби мікробної суспензії і визначали щільність бактерійних клітин за оптичним стандартом мутності й ентеротоксини шляхом інтраперитоніальних ін'єкцій білим мишам [15].

Рівень рН культуральної рідини підтримували на рівні 7,0-7,5 за допомогою 10% розчину NaOH, а вуглеводне харчування бактерій — додаванням 40% розчину глюкози.

Інактивацію ентеротоксинів проводили 0,6% розчином формаліну за температури 37 °С протягом 48 год, перемішуючи культуральну рідину кожні 4 год. Повноту інактивації визначали шляхом інтраперитоніальних ін'єкцій білим мишам масою 14-16 г за загальноприйнятою методикою [16].

Результати та їхнє обговорення. Технологія отримання ентеротоксинів *E.coli* у виробничих умовах була розроблена й випробувана на Сумській біофабриці, згідно з дозволом Головного управління ветеринарної медицини України, відповідно до «Інструкції з виготов-

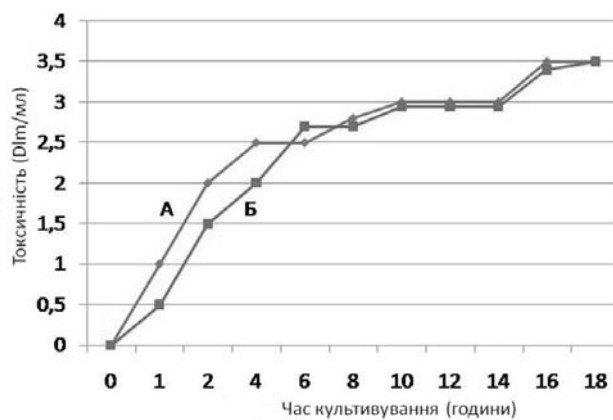


Рис. 1. Динаміка накопичення ентеротоксинів виробничими штамми *E.coli* O26 LT⁺ і O9 ST⁺ у промисловому ферментері «Elektrolux»: А — LT-ентеротоксин; Б — ST-ентеротоксин.

лення і контролю вакцини проти колібактеріозу молодняка сільськогосподарських тварин на основі факторів патогенності збудника», ТУУ 46.15.042-94.

Технологічний процес складався з таких етапів: приготування оптимізованого середовища культивування, підбір і культивування токсигенних штамів *E.coli*, отримання токсиновмісного матеріалу, інактивація ентеротоксинів; контроль стерильності і токсичності анатоксинів.

Були визначені оптимальні параметри культивування: температура — 37 °С; час культивування — 8-10 год. Оберти мішалки — на початку культивування 50-80 об./хв, наприкінці культивування — 280-300 об./хв; подача повітря — 50 л/год; рO₂ — 7,9-10,1 Па; додавання 10% розчину NaOH 0,7-0,8% відповідно до об'єму живильного середовища; 40% розчину глюкози у кількості 1,0-1,5 % від об'єму середовища культивування.

Бактерійна популяція визначалася двома параметрами: мікробною щільністю, тобто масою клітин на одиницю об'єму (біомаса), і клітинною концентрацією, тобто числом клітин на одиницю об'єму. Зростання цих двох параметрів відображає ріст бактерій. Біомаса виражає сукупну масу як живих, так і мертвих клітин, концентрація — число клітинних поділів. Для одержання ентеротоксинів останнє відіграє вирішальну роль, оскільки продукція цих речовин зумовлена синтетичною активністю тільки живих проліферуючих клітин.

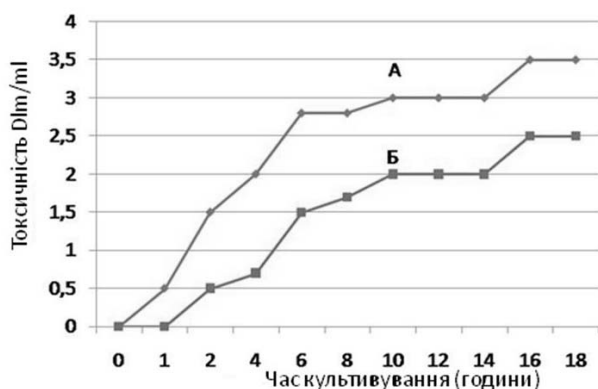


Рис. 2. Динаміка накопичення ST-ентеротоксину виробничим штамом *E.coli* O9 ST⁺ у промисловому ферментері «Elektrolux»: А — за додавання 1,0-1,5% глюкози; Б — за додавання 10% глюкози.

Виробничі штами *E.coli* мали невелику лаг-фазу, яка тривала ~1 год. Експоненційна фаза росту тривала до 10-тої години культивування. Концентрація клітин виробничих штамів *E.coli* — продуцентів ST- і LT-ентеротоксинів на 10-й годині культивування була приблизно однаковою і становила $3,5-4,0 \times 10^9$ КУО/мл. Про закінчення експоненційної фази росту свідчило припинення інтенсивного накопичення бактерій, що пов'язано зі зниженням проліферації клітин унаслідок виснаження живильного середовища і старіння бактерійних культур, а також підвищення рН середовища до 7,6-7,8, після чого наставала стаціонарна фаза.

Концентрація LT- і ST-ентеротоксинів у культуральній рідині на 10-й годині експоненційного росту *E.coli* була максимальною і становила 3,0 Dlm/мл (рис. 1).

Зростання токсичності до 3,5 Dlm/мл на 16-й год культивування пов'язане з аутолізом старіючих бактерійних клітин і вивільненням ендотоксинів у культуральне середовище.

Було відмічено, що додавання до культурального середовища 40% розчину глюкози у кількості 10 % від об'єму призводило до інгібування синтезу ST-ентеротоксину, тоді як на продукцію LT-ентеротоксину це не впливало (рис. 2).

Збільшення продукції LT-ентеротоксину досягали підлужнюванням середовища культивування (рН 7,8-8,0) і додаванням лінкоміцину (50-100 мкг/мл) (рис. 3).

Чистоту виробничих штамів-продуцентів ентеротоксинів після закінчення процесу

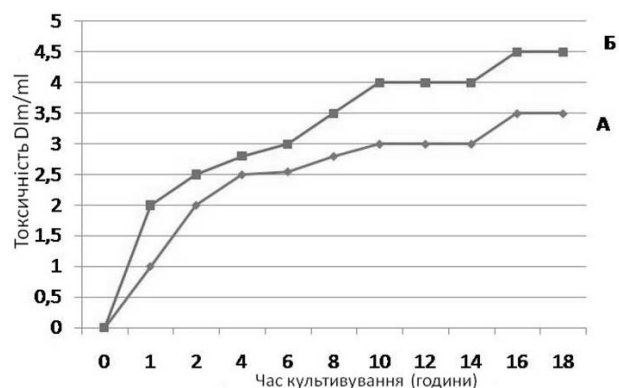


Рис. 3. Динаміка накопичення LT-ентеротоксину виробничим штамом *E.coli* O26 LT⁺ у промисловому ферментері «Elektrolux»: А — без додавання лінкоміцину; Б — з додаванням (50-100 мкг/мл) лінкоміцину.

культивування у ферментері визначали шляхом мікроскопування мазків бактерій, забарвлених за Грамом. При цьому в усіх випадках були виявлені чисті культури *E.coli*.

Для отримання токсиновмісного матеріалу культуральну суспензію після охолодження ферментера до 18 °С подавали на промислову центрифугу ОР-101-К-01 під тиском 0,3 атм. Центрифугат збирали в шістнадцятилітрові стерильні скляні бутлі і переносили в біореактор об'ємом 1000 л. Максимальний вихід бактерійної маси з 100 л культури *E.coli* становив 0,7-1,8 кг. Бактерійні клітини, отримані після центрифугування, знешкоджували кип'ятінням або автоклавуванням.

Інактивацію ентеротоксинів проводили в реакторі-інактиваторі 0,6% розчином формаліну за температури 37 °С протягом 48 год і переміщування через кожні 4 год. Використовувані режими інактивації забезпечували повну стерильність і нешкідливість для білих мишей одержуваних препаратів ентеротоксинів *E.coli*, тобто перехід їх в анатоксини.

Висновки. Таким чином, уперше розроблено технологію отримання ентеротоксинів *E.coli* у виробничих умовах, придатну для масового біофабричного виробництва анатоксинів.

Ефективність технології досягалася використанням високотоксигенних штамів *E.coli* O9 ST⁺ і O26 LT⁺, що дало змогу отримувати значні концентрації біологічно активних ентеротоксинів; зниженням трудомісткості в результаті мінімізації числа операцій та їх тривалості (~64 год); автоматизацією процесу культивування у

промислового реакторі, контролю і корекції його окремих стадій, а також визначенням оптимальних умов стимуляції токсинування (додавання 40% розчину глюкози у кількості 10% від об'єму середовища) та детоксикації ентеротоксинів (0,6% розчином формаліну за температури 37 °С протягом 48 год).

Одержані анатоксини можуть використовуватися як імунізуючі препарати для створення антитоксичного імунітету під час профілактики й лікування колібактеріозу сільськогосподарських тварин.

Надійшла в редакцію 05.05.2011 р.

Technology for producing *Escherichia coli* enterotoxin in a production environment

Yu.S. Sukharev

Kharkov State Zooveterinary Academy
Malaya Danylivka, Dergachevsky district, Kharkov region, 62341, Ukraine

Summary. First worked out technology of receipt of enterotoxins of *Escherichia coli* in productive terms, suitable for the mass biofactory production of anatoxins. Hightoxigenic stamms — producers of heat-stability and heat-lability enterotoxins are used, the optimal parameters of their cultivation, stimulation of synthesis of toxins and detoxications of enterotoxins are certain. Advantages of technology is minimization of number of operations and their duration; automation of cultivation, control and correction of him the separate stages. Receipt anatoxins are offered for using as immunizing preparations for creation of antitoxic immunity at a prophylaxis and treatment of colibacterios of agricultural animals.

Keywords: *Escherichia coli*, enterotoxins, detoxification, toxoids.

Перелік літератури

1. Малов В.А., Горобченко А.Н. Острые инфекционные диарейные заболевания // Лечащий врач. — 2005. — 2. — С. 6-8.
2. Олійник Л.В. Розповсюдження ешерихій та оцінка їх патогенного потенціалу // Ветеринарна медицина: Міжвідомчий тематичний науковий збірник. — Харків, 2004. — 83. — С. 167-170.
3. Kosek M., Bern C., Guerrant R. The global burden of diarrhoeal disease, as estimated from studies published between 1992 and 2000 // Bull. World Health Organ. — 2003. — Vol. 81, No. 3. — P. 197-204.
4. Gomi H., Jiang Z.-D., Adachi J.A., Ashley D., Lowe B., Verenkar M.P., Steffen R., DuPont H.L. In vitro antimicrobial susceptibility testing of bacterial enteropathogens causing traveler's diarrhea in four geographic regions // Antimicrob. Agents Chemother. — 2001. — 45. — P. 212-216.
5. Thielman N.M., Guerrant R.L. Acute infectious diarrhea // N. Engl. J. Med. — 2004. — 350(1). — P. 38-47.
6. Кашин А.С., Заздравных М.И., Шкиль Н.А. Колібактеріоз телят в современных экологических условиях Сибири. — Барнаул: Азбука, 2003. — 79 с.
7. Липин А.В. Диспепсия телят // Ветеринарный консультант. — 2002. — 15. — С. 6-7.
8. Ломако Ю.В., Андросик Н.Н. Эпизоотический мониторинг колібактеріоза новорожденных телят в Республике Беларусь // Ветеринарная медицина Беларуси. — 2002. — 2. — С. 15-17.
9. Малахов Ю.Г., Душук Р.В. Специфическая профилактика и диагностика бактериальных болезней молодняка // Ветеринария. — 2001. — 1. — С. 35-38.
10. Карева Э.П., Ирский А.Г., Солдатенко Н.А., Зимилина В.Н. Этиологическая структура желудочно-кишечных болезней у поросят // Ветеринарный консультант. — 2003. — 1. — С. 6.
11. Терехов В.И., Колесникова Н.В., Караев Я.М. Эшерихиоз поросят и его профилактика // Ветеринария Кубани. — 2006. — 2. — С. 5-10.
12. Шахов А.Г. Этиология и пофилактика желудочно-кишечных и респираторных болезней телят и поросят // Ветеринарный консультант. — 2003. — 1. — С. 4-5.
13. Короваєва І.В. Специфічна профілактика колібактеріозу та рота-, коронавірусних інфекцій новонароджених телят: автореф. дис. ... канд. вет. наук. — Харків, 2002. — 20 с.
14. Osek J. Detection of the enteroaggregative *Escherichia coli* heatstable enterotoxin 1 (EAST1) gene and its relationship with fimbrial and enterotoxin markers in *E.coli* isolates from pigs with diarrhea // Vet. Microbiol. — 2003. — 91(1). — P. 65-72.
15. Лабинская А.С. Микробиология с техникой микробиологических исследований. — Москва: Медицина, 1978. — С. 392.
16. Шпонько Ю.Б. Совершенствование методов лечения и профилактики эшерихиоза поросят // Ветеринарная патология. — 2007. — 1 (20). — С. 255-257.