

ТЕХНОЛОГІЯ ОТРИМАННЯ ЕНТЕРОТОКСИНІВ *ESCHERICHIA COLI* У ВИРОБНИЧИХ УМОВАХ

Ю. С. Сухарєв¹, С. О. Гужвинська²

¹ Харківська державна зооветеринарна академія

² ННЦ «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини» НААН, Харків

Розроблена високоефективна технологія отримання ентеротоксинів Escherichia coli у виробничих умовах, придатна для біофабричного виробництва анатоксинів. Підібрано високотоксигенні штами E. coli, встановлено оптимальні параметри їх культивування; визначені умови стимуляції токсиноутворення та детоксикації ентеротоксинів.

Незважаючи на прогрес у лікуванні і профілактиці інфекційних хвороб, шлунково-кишкові захворювання, які викликають ентеротоксигенні *Escherichia coli*, продовжують залишатися досить значущою проблемою у всіх без винятку країнах, оскільки як і раніше стабільно утримують друге місце в структурі захворюваності і смертності у світі [1, 2].

Досвід вакцинації культуральними вакцинами не завжди оберігає від колібактеріозу, що зумовлено рядом причин: бактеріальні вакцини не містять повного набору сероваріантів *E. coli*; найчастіше разом з патогенністю втрачається і імуногенність вакцинуючих препаратів; надлишок антигенів чинить негативний вплив на реакцію імунної відповіді і т. д. [3]. У зв'язку з цим становить інтерес використання для приготування вакцин окремих антигенів — факторів патогенності збудника [4, 5]. Такими факторами патогенності для *E. coli* є ентеротоксини: термостабільний (ST) і термолабільний (LT) [6, 7]. Для промислового виробництва вакцин на їх основі необхідні технології отримання ентеротоксинів у виробничих умовах.

Матеріали і методи. Токсигенні штами O26 (LT) і O9 (ST) з колекції лабораторії хвороб молодняку ННЦ «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини» НААН.

Для отримання материнських расплодок виробничих штамів *E. coli* O26 (LT) і O9 (ST) їх 24 годинні агарові культури висівали роздільно у флакони з 100 мл бульйону Хоттингера. Через 8 годин культивування при 37 °С здійснювали роздільний пересів штамів у бутлі, які містили 10 л цього ж середовища. Після 18 годин культивування в такому ж режимі проводили оцінку чистоти зростання расплодок шляхом мікроскопії мазків, пофарбованих за Граммом, та здійснювали засів промислового ферментера «Elektrolux», наповненого 150–300 л оптимізованого живильного середовища на основі перевару Хоттингера, підігрітого до температури 37 °С.

Виробниче культивування проводили в ферментері при автоматичному регулюванні основних технологічних параметрів: температури, рН, рО₂, обсягу повітря, що подається, обертів мішалки. Кожні дві години культивування брали проби мікробної суспензії і визначали рівень накопичення бактеріальних клітин за оптичним стандартом мутності, і ентеротоксинів — шляхом інтраперитоніального ін'єкціювання білих мишей.

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

Інактивацію ентеротоксинів проводили 0,6 % розчином формаліну при температурі 37 °С протягом 48 годин і перемішуванні через кожні 4 години. Повноту інактивації визначали шляхом інтраперитоніального ін'єкціювання білих безпородних мишей масою 14–16 г за загальноприйнятою методикою.

Результати й 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 виготовлення і контролю вакцини проти колібактеріозу молодняка сільськогосподарських тварин на основі факторів патогенності збудника», ТУУ 46.15.042–94.

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

Були визначені оптимальні параметри культивування: температура — 37 °С; час культивування — 8–10 год. Оберти мішалки — на початку культивування 50–80 об./хв, у кінці культивування — 280–300 об./хв; подача повітря — 50 л/год; рО₂ — 7,9–10,1 па; додавання 10 % розчину NaOH — 0,7–0,8 % від обсягу живильного середовища; 40 % розчину глюкози 1,0–1,5 % від обсягу середовища культивування.

Виробничі штами *E. coli* мали коротку лаг-фазу, яка тривала не більше 1 години. Експоненційна фаза зростання тривала до 10-ої години культивування. Про закінчення експоненційної фази росту свідчило припинення інтенсивного накопичення бактеріальних клітин і підвищення рН середовища до 7,6–7,8, після чого наступала стаціонарна фаза, що закінчувалася через 12–14 годин культивування (рис. 1).

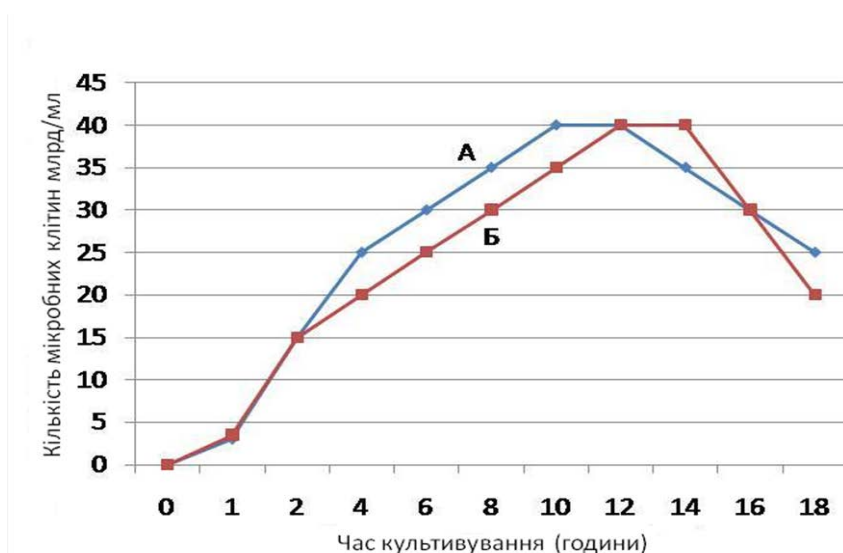


Рис. 1. Динаміка накопичення бактеріальних клітин виробничих штамів *E. coli*, в промисловому ферментері «Elektrolux»: А — штам O26 (LT); Б — штам O9 (ST)

Кількість бактеріальних клітин виробничих штамів *E. coli* продуцентів ST і LT-ентеротоксинів, до 10-ої години культивування було приблизно однаковим і становило $3,5\text{--}4,0 \times 10^9$ КУО/мл. Після 14-ої години культивування відзначали зниження концентрації до $3,0 \times 10^9$ КУО/мл, що пов'язано зі зниженням проліферації клітин внаслідок виснаження живильного середовища і старіння бактеріальних культур.

Концентрація LT- і ST-ентеротоксинів у культуральній рідині на 10-й годині експоненційного зростання *E. coli*, була максимальною і становила 3,0 Dlm/мл (рис. 2).

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

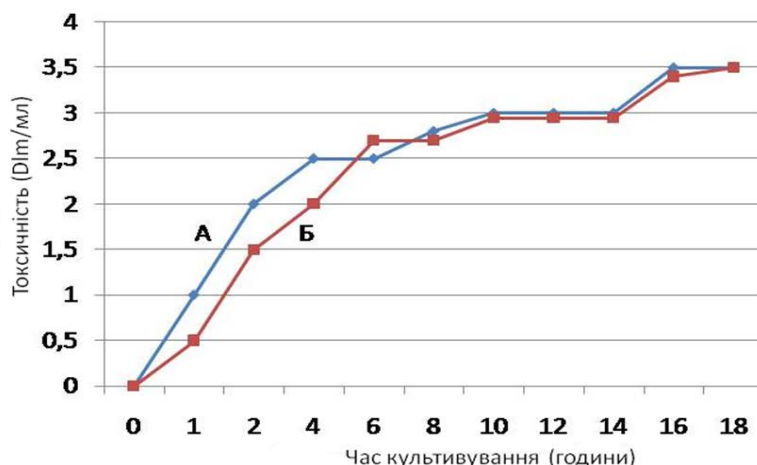


Рис. 2. Динаміка накопичення ентеротоксинів виробничих штамів *E. coli*, в промисловому ферментері «Elektrolux»: А — LT-ентеротоксин; Б— ST-ентеротоксин

Було відмічено, що додавання до культурального середовищі 40 % розчину глюкози (10 % від обсягу) приводило до інгібування синтезу ST-ентеротоксину, тоді як, на продукцію LT-ентеротоксину це не впливало.

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

Чистоту зростання виробничих штамів, продуцентів ентеротоксинів, після закінчення процесу культивування в ферментері визначали шляхом мікроскопії мазків бактерій забарвлених за Грамом. При цьому у всіх випадках були виявлені чисті культури *E. coli*.

Для отримання токсиновмісного матеріалу культуральну суспензію після охолодження ферментера до 18 °С подавали на промислову центрифугу ОТР-101-К-01 під тиском 0,3 атм, центрифугат збирали у 16 л стерильні скляні бутлі і переносили в біореактор об'ємом 1000 л. Максимальний вихід бактеріальної маси *E. coli* з 100 л культури склав 0,7–1,8 кг. Бактеріальна маса, отримана після центрифугування, знешкоджувалася кип'ятінням або автоклавуванням.

Інактивацію ентеротоксинів проводили в реакторі-інактиваторі 0,6 % розчином формаліну при температурі 37 °С протягом 48 годин і перемішуванні через кожні 4 години. Використані режими інактивації забезпечували повну стерильність і нешкідливість для білих мишей одержуваних препаратів ентеротоксинів *E. coli*, тобто перехід їх у анатоксини.

В И С Н О В К И

Розроблена високоефективна технологія отримання ентеротоксинів *Escherichia coli* у виробничих умовах, придатна для біофабричного виробництва анатоксинів. Підібрано високотоксигенні штами *E. coli*, встановлено оптимальні параметри їх культивування; визначені умови стимуляції токсиноутворення та детоксикації ентеротоксинів.

TECHNOLOGY OF PRODUCING *ESCHERICHIA COLI* ENTEROTOXIN IN PRODUCTION

Y. S. Sukharev, S. A. Guzhvinska

¹Kharkiv State Veterinary Academy

²NSC «Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine» NAAS

S U M M A R Y

Developed a highly efficient technology for producing enterotoxin of *Escherichia coli* in a production environment, suitable for the production of biofabrichnogo toxoids. Hightoxigenic selected strains *E. coli*; optimum parameters of their culture; the conditions for stimulation of toxin production and detoxification of enterotoxins were established.

ТЕХНОЛОГИЯ ПОЛУЧЕНИЯ ЭНТЕРОТОКСИНОВ *ESCHERICHIA COLI* В ПРОИЗВОДСТВЕННЫХ УСЛОВИЯХ

Ю. С. Сухарев, С. О. Гужвинская

¹Харковская государственная зооветеринарная академия

²ННЦ «Институт экспериментальной и клинической ветеринарной медицины» НААН

А Н Н О Т А Ц И Я

Разработана высокоэффективная технология получения энтеротоксинов *Escherichia coli* в производственных условиях, пригодная для биофабричного производства анатоксинов. Подобраны высокотоксигенные штаммы *E.coli*; установлены оптимальные параметры их культивирования; определены условия стимуляции токсинообразования и детоксикации энтеротоксинов.

Л І Т Е Р А Т У Р А

1. Малов В. А. Острые инфекционные диарейные заболевания / В. А. Малов, А. Н. Горобченко // Лечащий Врач. — 2005. — № 2. — С. 6–8.
2. Терехов В. И. Эшерихиоз поросят и его профилактика / В. И. Терехов, Н. В. Колесникова, Я. М. Караев // Ветеринария Кубани. — 2006. — № 2. — С. 5.
3. Шахов А. Г. Этиология и пофилактика желудочно-кишечных и респираторных болезней телят и поросят / А. Г. Шахов // Ветеринарный консультант. — 2003. — № 1. — С. 4–5.
4. Олійник Л. В. Розповсюдження ешерихій та оцінка їх патогенного потенціалу : міжвідомчий тематичний науковий збірник «Ветеринарна медицина» / Л. В. Олійник. — Харків, 2004. — № 83. — С. 167–170.
5. Шпонько Ю. Б. Совершенствование методов лечения и профилактики эшерихиоза поросят / Ю. Б. Шпонько // Ветеринарная патология. — 2007. — № 1 (20).
6. Gomi H. In Vitro Antimicrobial Susceptibility Testing of Bacterial Enteropathogens Causing Traveler's Diarrhea in Four Geographic Regions / H. Gomi, Z.-D. Jiang, J. A. Adachi, et al. // Antimicrob. Agents Chemother. — 2001. — 45. — P. 212–216.
7. Thielman N. M. Acute infectious diarrhea / N. M. Thielman, R. L. Guerrant // N. Engl. J. Med. — 2004. — V. 350 (1). — P. 38–47.

Рецензент — кандидат сільськогосподарських наук М. В. Камінська.