

гребінчатих м'язів у вушках є особливим пристосуванням, яке при систолі призводить до утворення вихреподібних потоків крові, які накладаються на основний потік крові з передсердь в шлуночок, надаючи йому деяку турбулентність. Крім цього із-за наявності в лівому вушці багато численних тупикових порожнинних випинів умови для застійних явищ крові і тромбоутворення повинно бути більш виражено, чим в правому вушці.

Ключові слова: серце, передсердя, вушко, гемодинаміка, тромб, кров, гребінчасті перекардіни.

Стаття надійшла 22.02.2011 р.

device which in systole leads to the formation of vortex blood flow, superimposed on the basic flow of blood from the atria to the ventricles, giving him some turbulence. In addition, because of the presence in the left auricle of multiple dead-end cavities diverticulum's conditions for stagnation of blood and blood clots should be more pronounced than in the right auricle of.

Key words: heart, atria, auricular, hemodynamics, thrombus, blood, pectinate muscles.

УДК 619;616.98:579.842.11:631.147

Ю.С. Сухарев, С.А. Гужвицькая
Харьковская государственная зооветеринарная академия, ИИИ «Институт экспериментальной и клинической ветеринарной медицины» НААНУ, Харьков

МЕТОДЫ ДЕТОКСИКАЦИИ ЭНТЕРОТОКСИНОВ ESCHERICHIA COLI

Показано, что эффективность детоксикации термолабильного и термостабильного энтеротоксинов Escherichia coli, зависит от индивидуальных особенностей их молекул, которые следует учитывать при разработке оптимальных условий анатоксिनобразования.

Ключевые слова: Escherichia coli, желудочно-кишечные заболевания, энтеротоксины, детоксикация, анатоксины.

Работа выполнена в рамках научно-исследовательской темы №76 задание 04.02.01.М, утвержденной Национальной академией аграрных наук Украины.

Желудочно-кишечные заболевания, которые вызывают энтеротоксигенные Escherichia coli, продолжают оставаться значимой проблемой во всех без исключения странах [1, 4, 5]. Вакцинация культуральными вакцинами не всегда предохраняет от болезни, что обусловлено рядом причин: бактериальные вакцины не содержат полного набора серовариантов E.coli; зачастую вместе с патогенностью теряется и иммуногенность вакцинирующих препаратов; избыток антигенов оказывает отрицательное влияние на реакцию иммунного ответа и т.д. [2]. В связи с этим представляет интерес использование для приготовления вакцин отдельных антигенов - факторов патогенности возбудителя. Такими факторами патогенности для E.coli являются энтеротоксины: термостабильный (ST) и термолабильный (LT) [6, 7, 8]. Одним из наиболее важных, для экспериментальных целей, биохимических свойств токсинов, является их способность при определенных условиях трансформироваться в анатоксин [3]. В связи с тем, что обезвреживание токсинов – неперемное условием приготовления из них иммунизирующих препаратов, до недавнего времени внимание исследователей было обращено преимущественно на эту сторону анатоксिनобразования. Между тем качественная характеристика препаратов целиком связана со степенью сохранения ими антигенной информации, и объяснение этого феномена имеет принципиальное значение.

Целью работы была разработка методов детоксикации энтеротоксинов E.coli и сравнении их эффективности.

Материал и методы исследования. Нативные термолабильный и термостабильный энтеротоксины Escherichia coli; 0,6 % раствор формальдегида; 0,0125 % раствор глутарового альдегида; рН-метр; термометр; термостат; белые беспородные мыши массой 14-16 г. Формольно-тепловая детоксикация: к раствору энтеротоксинов (рН 7,0-7,2) дробно добавляли 0,3-0,2-0,1 % 0,6 % раствора формальдегида с интервалом в пять дней, температуре 37°C, рН 5,5-5,8 и экспозиции 10-17 суток. Глутаральдегидная детоксикация: к раствору энтеротоксинов (рН 7,0-7,2) добавляли 0,0125% раствор глутарового альдегида при температуре: 18-20 °C и 37 °C. Для контроля полноты детоксикации энтеротоксинов и их переход в анатоксины, белым беспородным мышам интраперитонеально вводили 0,5 мл отдельно LT- и ST-анатоксины в количестве: 0,25, 0,50, 1,00, 2,00 мкг/мл. Дозу анатоксина считали безвредной при полном отсутствии летального эффекта у зараженных животных, в течение 7 дней наблюдения. Контрольным мышам инъекцировали нативные энтеротоксины E.coli в таких же дозах. Иммунизирующие дозы (ИМД₅₀) анатоксинов E.coli вычисляли по формуле:

$$\lg \text{ИМД}_{50} = \lg \text{DN} - \sigma (\sum \text{Li} - 0,5),$$

где DN - наибольшая из испытанных доз; σ - логарифм отношения каждой последующей дозы к предыдущей (при двукратном интервале эта величина равна 0,3); Li - отношение числа выживших от данной дозы животных к общему количеству животных, которым была введена эта доза; $\sum \text{Li}$ - сумма всех значений Li для всех испытанных доз. Антигенные свойства анатоксинов определяли в реакции термофлокуляции. Для этого в

отдельные пробирки разливали возрастающие количества антитоксической сыворотки к ST- и LT-анатоксинам: 0,1-0,5 мл и добавляли, раздельно по 2 мл ST- и LT- анатоксинов гомологичных штаммов E.coli. Содержимое пробирок встряхивали и нагревали до 40-45 °С на водяной бане. Учет вели в течение суток. Положительной считали реакцию в случае выпадения мелких хлопьев (+, ++) и осаждение их на дне пробирки (+++), а также в случае полного просветления жидкости (++++). Иммуногенную активность LT- и ST- анатоксинов определяли в опыте на белых беспородных мышах, методом подкожной (в область спины) инокуляции различных доз препаратов: 0,05, 0,1, 0,2, 0,4, 0,8 мл, с последующим заражением их летальными дозами культур токсигенных штаммов E.coli. В контроле использовали не иммунизированных анатоксинами животных.

Результаты исследования и их обсуждение. Установили, что подобранные режимы детоксикации LT- и ST-энтеротоксинов E.coli с помощью формольно-теплого метода приводили к их полному обезвреживанию (отсутствию летального эффекта у зараженных мышей), при 100% гибели животных в контроле, (табл.1).

Таблица 1

Количество мышей выживших после иммунизации анатоксинами E.coli, полученными методом формольно-тепловой детоксикации

Исследуемый антиген	Количество мышей в опыте	Доза антигена (мкг/мл)	Учет падежа по дням							Выжило мышей (%)
			1	2	3	4	5	6	7	
LT-анатоксин	3	0,25	-	-	-	-	-	-	-	100
	3	0,50	-	-	-	-	-	-	-	100
	3	1,00	-	-	-	-	-	-	-	100
	3	2,00	-	-	-	-	-	-	-	100
Контроль: LT-энтеротоксин	3	0,25	2	-	-	-	-	-	-	33,3
	3	0,50	2	1	-	-	-	-	-	0
	3	1,00	3	-	-	-	-	-	-	0
	3	2,00	3	-	-	-	-	-	-	0
ST-анатоксин	3	0,25	-	-	-	-	-	-	-	100
	3	0,50	-	-	-	-	-	-	-	100
	3	1,00	-	-	-	-	-	-	-	100
	3	2,00	-	-	-	-	-	-	-	100
Контроль: ST-энтеротоксин	3	0,25	2	1	-	-	-	-	-	0
	3	0,50	3	-	-	-	-	-	-	0
	3	1,00	3	-	-	-	-	-	-	0
	3	2,00	3	-	-	-	-	-	-	0

Сравнение длительности детоксикации энтеротоксинов E.coli, при использовании различных методов обезвреживания показало, что наиболее быстрой была детоксикация с помощью 0,0125% раствора глутаральдегида при 18-20 °С, которая позволила сократить время на анатоксинообразование до 2 дней в сравнении с обработкой глутаральдегидом при 37 °С (7 дней) и формольно-тепловым методом (17 дней). В процессе обезвреживания LT-энтеротоксина практически все его количество модифицировалось в анатоксин. При обезвреживании ST - большая часть его антигенной активности утрачивалась (табл.2).

Таблица 2

Степень флокуляции анатоксинов E.coli, полученных формольно-тепловым методом, в реакции с гомологичными антисыворотками.

Исследуемый антиген	Доза антигена (мл)	Количество сыворотки (мл)	Степень флокуляции (в баллах)
ST-анатоксин	2	0,1	-
	2	0,2	-
	2	0,3	-
	2	0,4	-
	2	0,5	+
LT-анатоксин	2	0,1	++
	2	0,2	++++
	2	0,3	++++
	2	0,4	++++
	2	0,5	++++

Установили, что LT-анатоксин E.coli обладал иммуногенными свойствами (табл.3). Тогда как ST-анатоксин проявил низкую иммуногенную активность (табл.4).

Таблица 3

Количество иммунизированных LT- анатоксином мышей, выживших после заражения культурой гомологичного токсигенного штамма E.coli

Иммунизирующая доза (мл)	Заражено мышей после иммунизации	Доза заражения КУЕ/мл	Выжило мышей (%)
0,05	10	1×10^9	10
0,1	10	1×10^9	20
0,2	10	1×10^9	40
0,4	10	1×10^9	50
0,8	10	1×10^9	80
Контроль	10	1×10^9	0

Таблиця 4

Количество иммунизированных ST- анатоксином мышей, выживших после заражения культурой гомологичного токсигенного штамма E.coli

Иммунизирующая Доза (мл)	Заражено мышей после иммунизации	Доза заражения КУЕ/мл	Выжило мышей (%)
0,05	10	1×10^9	0
0,1	10	1×10^9	0
0,2	10	1×10^9	0
0,4	10	1×10^9	0
0,8	10	1×10^9	10
Контроль	10	1×10^9	0

Выводы

1. На основании полученных результатов энтеротоксина E.coli по чувствительности к действию формалина и тепла были разделены на две группы - формалинстабильную и формалинлабильную. В процессе обезвреживания формалинстабильного токсина практически все его количество модифицировалось в анатоксин. При обезвреживании формалинлабильного - модифицировалось лишь незначительное количество токсина. К первой группе отнесли LT-энтеротоксин, характеризовавшийся высокочувствительностью к действию формалина и тепла. Ко второй группе - ST-энтеротоксин, с высокой неустойчивостью к действию этих агентов, в связи с чем детоксикация его сопровождалась большой потерей антигенной активности. 2. Наиболее быстрым был метод детоксикации с помощью 0,0125% раствора глутаральдегида при 18-20 °С, который позволил сократить время на анатоксинообразование до 2 дней в сравнении с обработкой глутаральдегидом при 37 °С (7 дней) и формольно-тепловым методом (17 дней). Исследования показали бесперспективность получения иммунизирующего препарата на основе ST-анатоксина E.coli.

Перспектива исследований в данном направлении направлены на конструирование препаратов на его основе, которые обладали бы антигенными и иммуногенными свойствами. Полученные результаты будут использованы при разработке технологии получения анатоксинов E.coli в условиях биофабричного производства.

Література

1. Малов В. А. Острые инфекционные диарейные заболевания /В. А. Малов, А. Н. Горобченко // Лечащий Врач.- 2005.- № 2.- С. 6–8.
2. Олійник Л.В. Розповсюдження ешерихій та оцінка їх патогенного потенціалу / Л.В. Олійник // Ветеринарна медицина: Міжвідомчий тематичний науковий збірник. – Харків, 2004. –№83. –С.167-170.
3. Караев Я.М. Протективные и иммуногенные свойства эшерихиозного анатоксина / Я.М. Караев // Автореферат диссер.на соиск. уч ст. к. вет н.-16.00.03.-Краснодар.-2008.-25 с.
4. Терехов В.И. Эшерихиоз поросят и его профилактика / В.И. Терехов, Н.В.Колесникова, Я.М. Караев // Ветеринария Кубани.-2006.-№2.-С.5.
5. Шахов А.Г. Этиология и профилактика желудочно-кишечных и респираторных болезней телят и поросят /А. Г. Шахов //Ветеринарный консультант.- 2003.- №1.- С.4-5.-Библиогр.: с. 19.
6. Шпонько Ю.Б. Совершенствование методов лечения и профилактики эшерихиоза поросят / Ю.Б. Шпонько // Ветеринарная патология, 2007. - №1. – С. 20-23.
7. In Vitro Antimicrobial Susceptibility Testing of Bacterial Enteropathogens Causing Traveler's Diarrhea in Four Geographic Regions / H.Gomi, Z.-D.Jiang [et all.] //Antimicrob. Agents Chemother.- 2001.- 45.-P. 212-216.
8. Thielman N. M., Acute infectious diarrhea / N. M.Thielman, R. L.Guerrant // N. Engl. J. Med.-2004.-V.350 (1).- P.38-47.

Удєрґаґи

МЕТОДИ ДЕТОКСИКАЦІЇ ЕНТЕРОТОКСИНІВ ESCHERICHIA COLI

Сухарєв Ю.С., Гужвинська С.О.

Показано, що ефективність детоксикації термолабільного і термостабільного ентеротоксинів Escherichia coli, залежить від індивідуальних особливостей їх молекул, які слід враховувати при розробці оптимальних умов анатоксиноутворення.

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

Стаття надійшла 10.02 2011 р.

METHODS OF DETOXIFICATION ENTEROTOXIN ESCHERICHIA COLI

Sukharev Y.S., Guzhvinskaya S.A.

It is shown that the efficiency of detoxification of heat-lability and thermo stability enterotoxins Escherichia coli, depends on the individual characteristics of their molecules, which should be considered in the development of optimal conditions creation of toxoids.

Key words: Escherichia coli, enterotoxins, detoxification, toxoids.