

## ВИЗНАЧЕННЯ СТАБІЛЬНОСТІ БАКТЕРІЙНИХ ЕНДОТОКСИНІВ

I. М. Кушнір

Державний науково-дослідний контрольний інститут ветеринарних препаратів та кормових добавок

У результаті проведених досліджень встановлено, що бактерійні ендотоксини мікроорганізмів *Enterobacter cloacae*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella oxytoca*, *Escherichia coli*, *Yersinia enterocolica* є надзвичайно стійкими. Концентрація бактерійних ендотоксинів, залежно від виду мікроорганізмів, у стерильному 40 % розчині глюкози упродовж двох років зберігання за температури 6 °С зменшувалась від 1,6 до 3,3 %, а за кімнатної температури — від 2,1 до 4,3 %. Контроль ветеринарних лікарських засобів за вмістом бактерійних ендотоксинів є запорукою забезпечення їх біологічної безпеки.

Одним із факторів патогенності грамнегативних бактерій є ліпополісахариди (ЛПС), які представляють собою складний глікокон'югат, розташований на зовнішній мембрані стінки клітини. Ліпополісахариди характеризуються широким спектром біологічної активності (ендотоксичної, пірогенної), вектор якої визначається концентрацією ЛПС [1, 2]. Ліпополісахариди, завдяки подібності свого фрагменту (ліпиду А) до біологічних мембран клітин, може зв'язуватися з різними клітинами та безпосередньо взаємодіяти з ліпідними компонентами мембран, вбудовуючись у них, і таким чином порушувати їх функції [3].

Залежно від концентрації, ЛПС може викликати активацію лейкоцитів і макрофагів, стимулювання та продукування ендогенного пірогену, інтерферону, інтерлейкінів тощо [4, 5]. Молекула ЛПС складається з трьох частин: О-специфічного полісахариду, який зумовлює антигенну активність; олігосахариду, який відіграє суттєву роль у підтриманні цілісності зовнішньої мембрани та ліпиду А, який складається із 200 епітопів та трьох молекул кетодезоксиоктанату. Ліпід А, який є ендотоксиновим центром, відповідає за всі види токсичної активності ЛПС [6, 7]. Джерелом бактерійних ендотоксинів (БЕ) у макроорганізмі можуть бути сапрофітні та патогенні аеробні й анаеробні грамнегативні мікроорганізми травного тракту та вогнищ запалення [8].

При проведенні аналізу даних літератури було встановлено, що БЕ несуть загрозу здоров'ю та життю тварин, проте, даних щодо вивчення їх впливу на безпеку ветеринарних препаратів не достатньо. Власне тому наша робота була спрямована на дослідження питання безпеки ветеринарних лікарських засобів, пов'язаної із забрудненням їх БЕ. З огляду на це, метою роботи було встановити стабільність БЕ у стерильних ветеринарних препаратах.

**Матеріали і методи.** З метою визначення стабільності БЕ, 100 мг відцентрифгованих культур *Enterobacter cloacae*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella oxytoca*, *Escherichia coli*, *Yersinia enterocolica* вносили у пробірки та додавали по 2,2 см<sup>3</sup> дистильованої води, потім 0,4 см<sup>3</sup> 100 мМ трис-НСІ-буферу (рН 8,0), 0,4 см<sup>3</sup> 0,5 М MgCl<sub>2</sub> та 1,0 см<sup>3</sup> 8 % розчину тритон Х-100. Пробірки щільно закривали та нагрівали у водяній бані за температури 100 °С упродовж 10 хв. Після вистигання суміш центрифугували при 15 000 об./хв. упродовж 15 хв., осад промивали розчином такого складу: 10 мМ трис-НСІ-буферу (рН 8,0) та 10 мМ MgCl<sub>2</sub>. Після цього до осаду додавали по 1 см<sup>3</sup> дистильованої води, 0,2 М ЕДТА, 2М NaCl і 8 % розчин тритон Х-100. Суміш добре перемішували та інкубували за температури 36±1 °С упродовж 60 хв., потім центрифугували при 15000 об./хв. упродовж 15 хв. Верхню фазу супернатанту переносили у нову центрифужну пробірку. До супернатанту (3,6-4 см<sup>3</sup>) додавали 0,4 см<sup>3</sup> 1 М MgCl<sub>2</sub>, суміш інкубували за температури 36±1 °С упродовж 60 хв. Розчин, що утворився, негайно центрифугували при 100 000 об./хв. упродовж 90 хв., прозорий осад промивали один раз 4 см<sup>3</sup>

буферу такого складу: 10 мМ трис-НСІ-буферу (рН 8,0) та 10 мМ MgCl<sub>2</sub>. Перед остаточним промиванням осад інкубували з протеїназою К (20 мкг/ см<sup>3</sup>) за температури 36±1 °С упродовж 2 год. [9]. Отримані БЕ вносили у стерильні флакони із 40 % розчином глюкози, одну частину яких зберігали за кімнатної температури, а іншу — за температури 6 °С. Через відповідні проміжки часу відбирали зразки та визначали концентрацію БЕ. Визначення БЕ проводили методом А, згідно з відповідними фармакопейними статтями [10-12]. Для постановки ЛАЛ-тесту використовували набори реактивів «Associates of Cape Cod Inc.»(США): ЛАЛ-реактив Pyrotell (заявлена чутливість — 0,03 МО/мл), ЛАЛ-вода Pyroclear, контрольний стандарт ендотоксину (*Escherichia coli* 0113:H10) і буферний розчин Pygosol (0.2М трис-НСІ буфер, рН =7,4). Для розведення використовували апірогенні наконечники та пробірки 13x75 мм. Інкубацію реакційної суміші проводили за температури 37±1 °С упродовж 60±2 хв. у сухоповітряному термоблоці «PYROTHERM».

**Результати й обговорення.** При визначенні стабільності БЕ мікроорганізмів: *E. cloacae*, *P. mirabilis*, *K. oxytoca*, *E. coli*, *Y. enterocolica*, які були внесені у 40 % розчин глюкози і зберігалися за кімнатної температури, встановили, що упродовж двох років вони зберігали свою стабільність. До того ж їх концентрація суттєво не знижувалась (табл. 1).

Зокрема, концентрація ендотоксину *E. coli* упродовж першого місяця знизилась лише на 0,4 %, упродовж наступних трьох, шести місяців, одного та двох років, відповідно, на — 1,7, 2,6, 3,5 та 4,3 %. При визначенні стабільності ендотоксину *Y. enterocolica* упродовж першого, третього, шостого місяця, одного та двох років встановили незначне його зниження, відповідно, на — 0,2, 0,6, 1,0, 1,8 та 2,3 %, а при визначенні стабільності ендотоксину *K. oxytoca*, відповідно, на — 0,3, 0,6, 0,8, 1,5 та 2,1 %.

Таблиця 1

**Стабільність БЕ за кімнатної температури (M±m, n=5)**

Терміни випробувань	БЕ, ЕО/см <sup>3</sup>				
	<i>E. cloacae</i>	<i>P. mirabilis</i>	<i>K. oxytoca</i>	<i>E. coli</i>	<i>Y. enterocolica</i>
При внесенні	312 ± 2,11	279 ± 2,98	578 ± 4,08	231 ± 6,02	478 ± 6,73
1 місяць	311 ± 3,05	277 ± 2,79	576 ± 4,33	230 ± 7,21	477 ± 4,72
3 місяці	308 ± 4,01	274 ± 3,16	574 ± 3,68	227 ± 5,84	475 ± 3,05
6 місяців	309 ± 5,24	270 ± 2,75	573 ± 5,86	225 ± 5,95	473 ± 3,91
1 рік	305 ± 5,50	267 ± 5,80	569 ± 4,89	223 ± 8,61	469 ± 2,82
2 роки	301 ± 7,26	264 ± 3,16	566 ± 5,19	221 ± 7,16	467 ± 1,70

Отже, при внесенні ендотоксинів *Y. enterocolica*, *K. oxytoca*, *E. coli* у 40 % розчин глюкози та зберіганні їх за кімнатної температури суттєвого зменшення їх кількості упродовж двох років зберігання не встановлено.

При визначенні стабільності ендотоксинів мікроорганізмів *E. cloacae*, *P. mirabilis*, *K. oxytoca*, *E. coli*, *Y. enterocolica*, які були внесені у 40 % розчин глюкози і зберігалися за температури 6 °С, встановили, що ендотоксини всіх досліджуваних мікроорганізмів упродовж двох років були досить стабільними і їх концентрація знижувалась незначно (табл. 2).

Таблиця 2

**Стабільність БЕ за температури 6 °С (M±m, n=5)**

Терміни випробувань	БЕ, ЕО/см <sup>3</sup>				
	<i>E. cloacae</i>	<i>P. mirabilis</i>	<i>K. oxytoca</i>	<i>E. coli</i>	<i>Y. enterocolica</i>
При внесенні	611±4,77	777 ±11,24	451 ± 3,16	622 ± 5,22	179±4,04
1 місяць	611 ± 6,61	776±3,16	450 ± 3,11	621 ±4,09	178±2,93
3 місяці	608 ± 3,89	775±3,0	449 ± 1,92	620 ± 3,42	177±3,42
6 місяців	605 ± 3,80	774±4,54	447 ± 2,70	618 ± 4,72	175±4,13
1 рік	604 ± 7,87	770±6,73	443 ± 3,15	615 ± 3,86	173±3,63
2 роки	602±4,47	768±7,63	442 ± 4,92	612 ± 5,13	170±4,86

Зокрема, кількість ендотоксину *E. coli* після першого, третього, шостого місяця та одного і двох років знижувались, відповідно, на — 0,2, 0,3, 0,6, 1,1 та 1,6 %.

При визначенні стабільності ендотоксину *Y. enterocolica* упродовж згаданих вище термінів зберігання спостерігали незначне його зниження, відповідно, на — 0,5, 1,1, 2,2, 3,3 та 5,0 %, а при визначенні стабільності ендотоксину *K. oxytoca* зниження його концентрації було, відповідно, на — 0,2, 0,4, 0,8, 1,8 та 2,1 %. Подібні дані отримали і при визначенні БЕ *E. cloacae* та *P. mirabilis*.

## В И С Н О В К И

Концентрація БЕ *E. cloacae*, *P. mirabilis*, *K. oxytoca*, *E. coli*, *Y. enterocolica* при зберіганні за кімнатної температури та за температури 6 °С упродовж двох років суттєво не зменшувалася.

Одержані результати досліджень вказують на необхідність проведення контролю ветеринарних лікарських засобів за показником “бактерійні ендотоксини”.

**Перспективи подальших досліджень.** Вивчити кумулятивні властивості бактерійних ендотоксинів.

## DETERMINATION OF STABILITY OF BACTERIAL ENDOTOXINS

*I. M. Kushnir*

State Scientific Research Control Institute of Veterinary Medicinal Products and Feed Additive

## S U M M A R Y

As a result of undertaken studies it was set that bacterial endotoxins of microorganisms of *Enterobacter cloacae*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella oxytoca*, *Escherichia coli*, *Yersinia enterocolica* is were extraordinarily proof. Concentration of bacterial endotoxins, depending on the type of microorganisms, in a sterile 40 % solution of glucose during two years of storage for temperatures 6 °C diminished from 1,6 to 3,3 %, and at a room temperature — from 2,1 to 4,3 %. Control of veterinary medicinal facilities on maintenance of bacterial endotoxins is the mortgage of providing their biological safety.

## ОПРЕДЕЛЕНИЕ СТАБИЛЬНОСТИ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ЭНДОТОКСИНОВ

*И. М. Кушнир*

Государственный научно-исследовательский контрольный институт ветеринарных препаратов и кормовых добавок

## А Н Н О Т А Ц И Я

В результате проведенных исследований установлено, что бактериальные эндотоксини *Enterobacter cloacae*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella oxytoca*, *Escherichia coli*, *Yersinia enterocolica* чрезвычайно стойкие. Концентрация бактериальных эндотоксинов, в зависимости от вида микроорганизмов, в стерильном 40 % растворе глюкозы в течении двух лет хранения при температуре 6 °С уменьшалась от 1,6 до 3,3 %, а при комнатной температуре — от 2,1 до 4,3 %. Контроль ветеринарных лекарственных средств на бактериальные эндотоксини является залогом обеспечения их биологической безопасности.

## ЛІТЕРАТУРА

1. Яковлев М. Ю. "Эндотоксиновая агрессия" как предболезнь или универсальный фактор патогенеза заболеваний человека и животных / М. Ю. Яковлев // Успехи современной биологии. — 2003. — Т. 123, № 1. — С. 31–40.
2. Яковлев М. Ю. Элементы эндотоксиновой теории физиологии и патологии человека / М. Ю. Яковлев // Физиология человека. — 2003. — Т. 29, № 4. — С. 98–109.
3. Иммуноморфологическая оценка резервов связывания эндотоксина полиморфноядерными лейкоцитами / Н. К. Пермяков, И. А. Аниховская, Н. В. Лиходед [и др.] // Архив патологии. — 1995. — № 2. — С. 47.
4. Повышенные титры антител к бифидумбактериям как маркер дисбактериоза кишечника / И. А. Аниховская, Я. Х. Вышегуров, В. Г. Лиходед [и др.] // Физиология человека. — 2005. — № 2. — С. 132–134.
5. Лиходед В. Г. Роль эндотоксина грамотрицательных бактерий в инфекционной и неинфекционной патологии / В. Г. Лиходед, Н. Д. Ющук, М. Ю. Яковлев // Архив патологии. — 1996. — № 2. — С. 813.
6. Яковлев М. Ю. Кишечный липополисахарид: системная эндотоксинемия, эндотоксиновая агрессия, SIR-синдром и полиорганная недостаточность, как звенья одной цепи / М. Ю. Яковлев // Бюлл. ВНИЦ РАМН. — 2005. — № 1. — С. 15–18.
7. Шубчинський В. В. Ендотоксична активність ліпополісахаридів *Pragia Fontium* / В. В. Шубчинський, Л. Д. Варбанець, О. С. Броварська // Современные проблемы токсикологии. — 2007. — № 4. — С. 35–38.
8. Современные аспекты патогенеза эндотоксинового шока / И. М. Салахов, А. И. Ипатов, Ю. В. Конев [и др.] // Успехи современной биологии. — 1998. — № 1. — С. 33–49.
9. Варбанець Л. Д. Методи дослідження ендотоксинів / Л. Д. Варбанець, Г. М. Здоровенко, Ю. А. Книрель. — К.: Наукова Думка, 2006. — 236 с.
10. Державна фармакопея України / Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр». 1-е вид. — Харків: РІРЕГ, 2001. — 556 с.
11. Державна фармакопея України / Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр». 1-е вид., Доповнення 1. — Харків: Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр», 2004. — 520 с.
12. Державна фармакопея України / Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр». 1-е вид., Доповнення 2. — Харків: Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр», 2008. — 620 с.