

А. М. ДИЛАНЯН

О ТОКСИНООБРАЗОВАТЕЛЬНОЙ ФУНКЦИИ ЭНТЕРОПАТО- ГЕННЫХ И НЕКОТОРЫХ БАНАЛЬНЫХ ШТАММОВ ESCHERICHIA COLI

Изучались бульонные фильтраты эталонных культур *E. coli*, полученные при аэробном и анаэробном росте культур.

Показано, что фильтраты *E. coli* обладают более сильно выраженной биологической активностью при анаэробном росте, чем при аэробнозе. Термолabile и термостабильные компоненты фильтратов *E. coli* являются аллергенами, внутрикожными тестами выявлена аутоенсиблизация у экспериментальных животных (у кроликов) к фильтратам *E. coli*.

Вопрос о токсинообразовании *E. coli* представляет как теоретический, так и практический интерес в аспекте аутоинфекционной патологии и аллергии.

За последние десятилетия большое внимание уделяется энтеропатогенным эшерихиям, которые вызывают острозаразные заболевания у человека, особенно у детей раннего возраста.

Патогенное действие энтеропатогенных кишечных палочек связано с их способностью размножаться в тонком кишечнике [1], что, по-видимому, происходит благодаря повышенной кислотообразующей функции их, следовательно, повышенная кислотообразующая способность *E. coli* может быть одним из факторов патогенности этого вида [2].

Еще в 1924 году П. Ф. Здродовский и Е. Н. Бренн наблюдали резкую геморрагическую имбибицию пейеровых бляшек у кроликов, зараженных внутривенно кишечной палочкой, после дополнительного внутривенного введения им небольшой дозы фильтрата кишечной палочки [3].

По литературным данным, гемолизины, обнаруживаемые в жидких кровяных средах, являются экзотоксинами кишечной палочки [4], они имеют белковую природу, легко разрушаются при доступе воздуха и нагревании, их можно обнаружить в суточных бульонных культурах и смывах агаровых культур у свежeweделенных штаммов. Этот токсин имеет нейротропное действие и обладает некротическим свойством. Эндотоксин кишечной палочки стабилен, термоустойчив, является энтеротропным ядом [5]. В Калькутте были выделены культуры кишечной палочки серотипов 078,06 и 015 от больных острой диареей. Фильтраты бульонных культур вызывали накопление жидкости и расширение изолированной кишечной петли кролика. Этот энтеротоксин был термоустойчив, а лиофилизированный лизат агаровой культуры—термолabile. По эффекту «изолированной кишечной петли» он не уступает холерному энтеротоксину, даже превосходит его [6].

Материал и методика. Жизнедеятельность *E. coli* протекает в толстых кишках в отсутствие свободного кислорода воздуха, поэтому нам казалось небезынтересным проверить некоторые биологические свойства их в аэробных и анаэробных условиях роста. В подобном аспекте этот вопрос в доступной нам литературе не освещен.

Из Государственного контрольного института (Москва) были получены морфологически и биохимически типичные энтеропатогенные и апатогенные штаммы: *E. coli* Голубевой за № 145 (ИЭМ, Москва, 1958 г.); *E. coli* Новгородской № 408 (из Ин-та им. Пастера, Ленинград, 1956 г.); *E. coli* 055:В5 за № 155 (из Швеции, 1955 г.); *E. coli* ОШ:В4 за № 24 (из Венгрии, 1955 г.); *E. coli* 086:В7 за № Е-990 (от Кауфмана, 1958 г.); *E. coli* 026:В6 за № 157 (из Швеции, 1956 г.); *E. coli* за № 86 (из Ин-та им. Листера, Лондон, 1944 г.); *E. coli* за № 846 (из Ин-та им. Листера, Лондон, 1944 г.); *E. coli* за № 675 (из Ин-та эксп. вет., Москва, 1944 г.); *E. coli* communiog за № 815 (из Ин-та эксп. вет., Москва, 1944 г.); *E. coli* communiog за № 7—8/9 (из Мед. ин-та, Пермь, 1942 г.); *E. coli* communiog за № 1715 (из Ин-та им. Листера, Лондон, 1946 г.).

Последние три культуры—*E. coli* communiog—отличались от *E. coli* сахарозоферментирующим свойством, поэтому, согласно новой номенклатуре [7], они будут названы *E. coli* сахарозорасщепляющим биоваром по терминологии инфраподвидовых названий.

В 1959 году были изучены биохимические свойства патогенных и апатогенных штаммов *E. coli* в аэробных (обычных) и анаэробных условиях роста. Оказалось, что ферментативная активность культур более интенсивно выражена в анаэробных условиях культивирования, чем при обычных условиях роста. В последующем была проверена и токсинообразовательная функция *E. coli*.

Опыты по токсинообразованию были поставлены с шестью энтеропатогенными штаммами *E. coli* на мартеновском бульоне при pH 7,3 и 7,6. Культуры инкубировались в термостате при 37° в течение суток, девяти и шестнадцати дней в условиях аэробного роста и одного, четырех, девяти и шестнадцати дней при анаэробном культивировании в микроанэростате при 37° термостата. Бульонные культуры фильтровались через фильтр Зейтца на льду. Фальтраты культур проверялись на стерильность. Биологическая активность этих фильтратов была проверена внутрикожными пробами на 26 кроликах. Были использованы нативные—негретые и гретые фильтраты. Нагревание фильтратов проводилось в кипящей воде в течение одного часа. На каждом кролике ставилось по 12 проб: с левой стороны спины кролика внутрикожно вводилось шесть негретых фильтратов, а с правой стороны того же кролика—гретые фильтраты по 0,2 мл. Фильтраты хранились в запаянных ампулах при 4—6°.

Результаты и обсуждение. Полученные экспериментальные данные представлены в табл. 1, 2 и на рис. 1, 2, 3.

Как видно из табл. 1, в суточных фильтратах энтеропатогенных штаммов *E. coli* внутрикожными тестами термолабильные вещества не были обнаружены, а термостабильные вещества дали резко выраженную гиперемию. Но эти токсические компоненты находились в фильтратах культур при культивировании в течение девяти и шестнадцати дней. В фильтратах банальной *E. coli* термолабильные вещества обнаруживались кожными пробами в четырех случаях из шести при 16-дневном росте, а термостабильные вещества отсутствовали. Негретые девятидневные фильтраты дали более четкие результаты, чем гретые.

В табл. 2 представлены данные о биологической активности бульонных фильтратов энтеропатогенных и апатогенных штаммов *E. coli* при анаэробнозе.

Однодневные негретые и гретые фильтраты энтеропатогенных шести штаммов *E. coli* были введены внутрикожно кролику на другой день

после фильтрации. Спустя 30 мин кролик стал облизываться, чесаться, затем наблюдались судороги передних конечностей. Спустя шесть часов наступил паралич—животное лежало на левом боку, дыхание стало замедленным, оно погибло через семь час. после введения фильтратов. При вскрытии были отмечены застойные явления в сердце и легких. Желудочно-кишечный тракт, селезенка и почки оказались в норме. Печень была наполнена кровью. При вскрытии черепа обнаружено большое кровоизлияние в области четверохолмия. Гибель животного, вероятно, наступила от острой интоксикации при всасывании биологически активных веществ однодневных фильтратов, полученных при анаэробно-энтеропатогенных *E. coli*. Эти вещества, по-видимому, действуя на нервную систему, вызвали сильное расширение сосудов с нарушением кровяного давления и последующим кровоизлиянием и параличом жизненно важных центров мозга. Можно предполагать, что кролик был аутоенсибилизирован продуктами жизнедеятельности *E. coli*, а однодневные фильтраты возбудителей колиэнтеритов оказались аллергенами, вызвавшими анафилактический шок, так как после внутрикожного введения фильтратов отмечались симптомы анафилаксии. Результаты вскрытия погибшего кролика также подсказывают мысль об аллергической реактивности на антигенный раздражитель.

Патогенез аллергических и анафилактических феноменов объясняют воздействием на организм антигена-аллергена; последний соединяется с сенсибилизированными тканями, что ведет к нарушению функции органов с выделением различных медиаторов (М-вещества)—гистамина, ацетилхолина, серотонина-5-НТ (5-гидрокситриптамин) и других. Ацетилхолин оказывает преимущественно местное воздействие, а для гистамина, наоборот, характерно общее действие. Гистамин вызывает распространенное расширение капилляров с повышением их проницаемости [3].

Весьма возможно, что при внутрикожном введении аутоенсибилизированному кролику однодневных фильтратов возбудителей колиэнтеритов, последние, как аллергены, соединяясь с сенсибилизированными поврежденными клетками, нарушая их функции, вызывают выделение гистамина, а это ведет к расширению капилляров и сосудов с повышением их проницаемости, падению кровяного давления, последующему кровоизлиянию, приводящему к летальному исходу.

Из табл. 2 видно, что четырехдневные негретые и гретые фильтраты энтеропатогенных шести штаммов *E. coli* вызывали довольно выраженную гиперемию. Негретье фильтраты банальных штаммов *E. coli* дали отрицательные кожные реакции, а от гретых фильтратов были получены положительные реакции в первые 24 часа инкубации, выражающиеся в расширении капилляров, что оказалось обратимым в двух случаях из шести (через 48 час.).

В анаэробных условиях роста культур интенсивное образование токсических веществ в бульоне Мартена при рН 7,3 наблюдалось в течение девяти дней. От внутрикожного введения негретых фильтратов

Таблица 1

Внутрикожные реакции после введения фильтратов энтеропатогенных и апатогенных E. coli (при аэробном росте на бульоне Мартена при pH 7,3)

Фильтраты культур	Гиперемия после введения негретых фильтратов						Гиперемия после введения гретых фильтратов						
	суточный филь- трат		9-дневный фильтрат		16-дневный фильтрат		суточный филь- трат		9-дневный фильтрат		16-дневный фильтрат		
	через 24 час.	через 48 час.	через 24 час.	через 48 час.	через 24 час.	через 48 час.	через 24 час.	через 48 час.	через 24 час.	через 48 час.	через 24 час.	через 48 час.	
E. coli 0111:B4	-/+	+++	---	+++	+++	++	++	++++	++++	расширение капилляров	расширение капилляров	++	---
E. coli 026:B6	-/+	+++	---	+++	+++	++	++	++++	++++	+++	+++	++	+
E. coli 055:B5	-/-	---	---	+++	+++	++	++	++++	++++	+++	+++	++	+
E. coli 086:B7	-/-	---	---	+++	+++	++	++	++++	++++	+++	+++	++	+
E. coli 145	+/-	+	---	+++	+++	++	++	++++	++++	+++	+++	++	+++
E. coli 408	-/-	---	---	+++	+++	++	++	++++	++++	+++	+++	++	+++
E. coli 86	-/-	---	---	+++	+++	++	++	++++	++++	+++	+++	++	+++
E. coli 675			---	+++	++	+	---			+++	расширение капилляров	---	---
E. coli 846			+++	+++	++	+	+++инф филь- трат			+++	гиперемия	---	---
E. coli сахарозорасщепляющий биовар			+++	+++	++	++	+++			+++	+	---	---
E. coli сахарозорасщепляющий биовар 815			+++	+++	++	++	+++инф филь- трат			+++	---	---	---
E. coli сахарозорасщепляющий биовар 1715			---	+++	+++	++	+++			+++	гиперемия	---	---
Контроль (б. Мартена)	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

Обозначения:

Гиперемия диаметром до 1 см обозначена +
 Гиперемия диаметром до 2 см обозначена ++
 Гиперемия диаметром до 3 см обозначена +++
 Гиперемия диаметром больше 3 см обозначена ++++
 Отсутствие реакции -

Дробью отмечены кожные реакции после введения кроликам
 суточного фильтрата после фильтрации через 20 дней (в числи-
 теле) и после фильтрации через 36 дней (в знаменателе).

возбудителей колиэнтеритов были получены резко выраженные положительные кожные реакции в виде геморрагии, которые на следующий день были некротизированы с резко выраженным покраснением и инфильтратом вокруг них. Через восемь дней в некротических очагах, на месте введения фильтратов, образовались темные сухие струпья (рис. 1). Внутрικοжное введение тех же, но гретых фильтратов патогенных



Рис. 1. Внутрικοжные реакции от введения негретых 9-дневных фильтратов возбудителей колиэнтеритов при анаэробном росте культур.

шести штаммов *E. coli* вызвало спустя 24 часа распространенную гиперемию, которая проходила бесследно через двое суток (рис. 2). Все гретые фильтраты банальной *E. coli*, за исключением одного, дали так-



Рис. 2. Внутрικοжные реакции от введения гретых 9-дневных фильтратов возбудителей колиэнтеритов при анаэробном росте культур.

же сильно выраженные положительные кожные реакции в виде геморрагии с инфильтратом в течение суток и последующей некротизацией

ткани (рис. 3). В ряде случаев некротические очаги флюктуировали спустя десять дней после введения фильтратов. При микроскопическом исследовании мазков, приготовленных из гноя некротических очагов ткани, микрофлора не обнаружена. Гретье фильтраты сапрофитной кишечной палочки дали отрицательные кожные реакции.



Рис. 3. Внутрикожные реакции после введения негретых 9-дневных фильтратов апатогенных штаммов *E. coli* при анаэробном культивировании.

Таким образом, фильтраты энтеропатогенных штаммов *E. coli* качественно отличаются от фильтратов апатогенных штаммов. В 9-дневных фильтратах возбудителей колиэнтеритов имеются как термолабильные, так и термостабильные токсические вещества, которые являются аллергенами; соединяясь с аутоенсибилизованными тканями, они нарушают их функции, пораженными клетками выделяется, по-видимому, ацетилхолин. У банальных *E. coli* положительные кожные реакции вызывают нативные фильтраты. Некротические изменения кожи у кроликов вызываются термолабильными веществами как энтеропатогенных, так и апатогенных *E. coli*.

При введении 16-дневных фильтратов возбудителей колиэнтеритов и сапрофитной *E. coli* оказалось, что негретые три фильтра *E. coli* (ОШ:В4, 026:В6 и 055:В5) дали отрицательные кожные реакции в течение 24 час., а спустя 48 час. была отмечена гиперемия диаметром 2—3 см, остальные три фильтра дали положительные реакции, которые были более выражены также через 48 час. после введения (табл. 2). Гретье фильтраты дали положительные кожные реакции в четырех случаях из шести только в первые 24 часа. При введении шести негретых и гретых фильтратов банальной *E. coli* в пяти случаях были получены положительные результаты.

Итак, при 16-дневном культивировании *E. coli* при аэробных и анаэробных условиях образование токсических веществ сравнительно меньше, чем при 9-дневном росте.

При культивировании *E. coli* на мартеновском бульоне при рН 7,6 в анаэробных условиях были получены фильтраты, содержащие как термолабильные, так и термостабильные вещества, которые вызывали положительные кожные реакции в виде гиперемии.

Указанные выше однодневные фильтраты шести возбудителей колиэнтеритов и двух штаммов банальной *E. coli* при аэробнозе и анаэробнозе, гидролизата суточной агаровой культуры и 9-дневный фильтраты *E. coli* ОШ:В4 были подвергнуты хроматографическому анализу. Аминокислотный состав фильтратов и гидролизата бактериальных клеток определялся одномерной восходящей бумажной распределительной хроматографией.

Полученные данные выявили в однодневных фильтратах *E. coli* при аэробнозе и анаэробнозе наличие лейцина, фенилаланина, метионина, тирозина, аланина, глутаминовой кислоты, аспарагиновой кислоты+глицина, серина и лизина; не были обнаружены валин, треонин и цистин. В фильтратах ОШ:В4 при аэробнозе и анаэробнозе обнаружен изолейцин, и при анаэробнозе—аспарагиновая кислота+глицин. Выявлены аргинин+гистидин в фильтратах 055:В5 и 086:В7 при аэробнозе, а при анаэробнозе—ОШ:В4, 026:86, 055:В5, 020:К84 (145), 408 и банальной *E. coli*. Альфа-аминомасляная кислота обнаружена при анаэробнозе в фильтратах 055:В5, 086:В7 и в одном фильтрате сапрофита, в остальных фильтратах эта аминокислота не обнаружена.

Аминокислотный состав гидролизата суточной агаровой культуры ОШ:В4, ее однодневный и 9-дневный фильтраты, полученные при аэробнозе и анаэробнозе, имеют как сходство, так и различие. На хроматограммах гидролизата ОШ:В4 из 17 аминокислот не выявлены лейцин, изолейцин, в однодневном фильтрате не обнаружены альфа-аминомасляная кислота, треонин, цистин, а в 9-дневном фильтрате—изолейцин. Наблюдалось различие в аминокислотном составе фильтратов при аэробном и анаэробном росте культуры в течение суток и девяти дней. В однодневном фильтрате не выявлены валин, но, кроме других аминокислот, были обнаружены при анаэробнозе аспарагиновая кислота+глицин, аргинин+гистидин и лизин, которые не оказались при аэробнозе. В 9-дневном фильтрате при аэробнозе не обнаружен изолейцин, остальные аминокислоты выявлены; при анаэробнозе были обнаружены фенилаланин, метионин, альфа-аминомасляная кислота, аспарагиновая кислота+глицин, аргинин+гистидин в меньшем количестве, чем другие аминокислоты, кроме изолейцина, не были обнаружены также лизин и цистин.

По-видимому, определенное сочетание аминокислот дает определенный биологический эффект общего или местного характера. Необходимо провести более углубленное изучение фильтратов и гидролизатов культур для выяснения природы их аллергена.

Уместно также отметить, что рефрактометрией фильтратов—коликтоксинов, полученных при аэробном и анаэробном условиях культивирования энтеропатогенных и апатогенных *E. coli* на мартеновском

бульоне при рН 7,3, выявлены различия в показателях преломления, следовательно, имеется количественная разница в сухих веществах.

Институт экспериментальной биологии АН АрмССР

Поступило 13.II 1976 г.

Ա. Մ. ԴԻԼԱՆՅԱՆ

ԷՆՏԵՐՈՊԱԹՈԳԻՆ ԵՎ ՈՉ ՊԱԹՈԳԻՆ *E. COLI* ՄԻ ՔԱՆԻ
ՇՏԱՄԵՆՆՐԻ ՏՈՔՍԻՆԱԳՈՅԱՑՄԱՆ ՄԱՍԻՆ

Ա մ փ ո փ ո լ մ

E. coli տոքսինագոյացման հարցի ուսումնասիրությունն ունի թե՛ տեսական և թե՛ գործնական նշանակություն ախտաբանական ինքնավորակման և ալերգիայի տեսակետից:

Տվյալ աշխատանքում շարադրվում է աերոբ և անաերոբ պայմաններում *E. coli* տոքսինագոյացման հարցին նվիրված հետազոտության արդյունքները: *E. coli* բուլյոնային ֆիլտրատներն, որոնք ստացվել են կուլտուրաների անաերոբ աճեցվածքում, ունեն բավականին ուժեղ արտահայտված կենսաբանական ակտիվություն, քան աերոբիոզի ժամանակ: Ֆիլտրատների ջերմանակյուն և ջերմակյուն բաղադրամասերը հանդիսանում են ալերգեններ: Էքսպերիմենտալ կենդանիների ներմաշկային տիտերով ի հայտ է բերվել աուտոսենսիբիլիզացիայի երևույթ՝ ճագարների մոտ *E. coli* ֆիլտրատների նկատմամբ: Ախտածին *E. coli* միորյա անաերոբ աճեցված կուլտուրաների ֆիլտրատների ներմաշկային ներարկումը ճագարի մոտ առաջացրեց մահացու անաֆիլակտիկ շոկ, իսկ իննօրյա ֆիլտրատները—ջերմամշակման շենթարկված՝ ջերմանակյուն ֆիլտրատները ախտածին և ոչ ախտածին *E. coli* առաջացրին համոռագիա դերմանեկրոզով:

Աերոբիոզի և անաերոբիոզի պայմաններում ստացված ֆիլտրատներում սահմանվել է ռեֆրակցիայի ցուցանիշների տարբերություն, հետևապես և շոր նյութերի քանակական տարբերություն:

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Новгородская Э. М., Анцилес И. М. и Лосева А. Г. Колиэнтериты детей раннего возраста. (Методич. мат-лы), Л., 1958.
2. Диланян А. М. ДАН АрмССР, 63, 2, 1976.
3. Здродовский П. Ф. Кн.: Проблемы инфекции иммунитета и аллергии. 91—92, 99, 104, 108, 130, М., 1963.
4. Зацепин Н. И. Колиэнтериты. 122—135, М., 1962.
5. Голубева И. В. Кишечная коли-инфекция. Этиология. Руковод. по микробиол. клинике и эпид. инфекц. болезней. М., VI, 126—130, 1964.
6. Etkin S., Gorbach. J. Labor. and Clin. Med., 78, 1, 81—87, 1971.
7. Проект Международного кодекса номенклатуры бактерий, Ереван, 1974.