



Списание за наука

„Ново знание“

ISSN 2367-4598 (Online)

Академично издателство „Талант“

*Висше училище по агробизнес и развитие на
регионите - Пловдив*

New Knowledge

Journal of Science

ISSN 2367-4598 (Online)

Academic Publishing House „Talent“

*University of Agribusiness and Rural Development -
Bulgaria*

<http://science.uard.bg>

A NEW APPROACH TO PROPHYLAXIS AND THERAPY OF ENTEROHEMORRHAGIC *E. COLI* AND VIRAL INTESTINAL INFECTIONS

**Wolfgang Luepcke¹, Dimitar Yakimov¹, Julia Ferencz², Iliyana Nacheva³,
Axel Wehrend⁴, Plamen Georgiev⁵, Teodora Sarakostova⁶, Eva Krieps⁷**

¹*University of agribusiness and rural development – Plovdiv, Bulgaria*

²*ONKOZERT - Bundesrepublik Deutschland*

³*The Institute of Cryobiology and Food Technology of BAS – Sofia*

⁴*Veterinaerfakultaet der Universitaet Giessen*

⁵*Trakia university – Stara Zagora*

⁶*Risk assessment center on food chain – Sofia*

⁷*Landaerztin – Grossherzogtum Luxemburg*

Abstract: Enterohemorrhagic *Escherichia coli* bacteria (EHEC) as well as Rota and Coronaviruses are very dangerous pathogens of severe intestinal infections in humans and animals, which require a very special approach. EHEC contraindicates the use of antibiotics, as they destroy the bacteria and release their endotoxins as a result which can lead to permanent kidney damage and even death in patients. Antibiotics are ineffective with viral pathogens, possibly only preventing secondary bacterial infections.

Based on Luepcke's many years of laboratory and practical tests, we therefore recommend the targeted use of specific colostral antibodies for the above-mentioned intestinal infections. These are obtained by means of combined intramammary and intracisternal application of attenuated pathogen isolates or vaccine strains in dry cows and goats. In this way, the first colostrum with high antibody titres is obtained, which also contains large amounts of trypsin inhibitor and thus protects the antibodies against proteolytic splitting. The first colostrum is therefore particularly valuable, because it ensures the integrity and functionality of the antibodies. This is both a basic prerequisite for their passage from the intestinal lumen into the blood (passive humoral immunity) and also ensures the effectiveness of the non-

absorbed antibodies in the intestinal lumen and on the intestinal mucosa (passive local immunity). In order to accelerate the elimination of the antigen-antibody complexes that arise in the intestine in this approach, Yakimov recommends the use of a sorbent that cannot be absorbed via the intestine. Cryopreservation enables simple storage and, if necessary, easy shipping of the first colostrum produced targeted against the respective infectious agents which is to be regarded as a food supplement with simultaneous effect as an immunopreparation.

Keywords: colostrum, trypsininhibitor, maternal antibodies, immunity, *Escherichia coli*, *Rotavirus*, *Coronavirus*.

НОВ ПОДХОД ЗА ПРОФИЛАКТИКА И ТЕРАПИЯ НА ЕНТЕРОХЕМОРАГИЧНИТЕ *E. COLI* И ЧРЕВНИ ВИРУСНИ ИНФЕКЦИИ

Волфганг Люпке¹, Димитър Якимов¹, Julia Ferencz², Илияна Начева³, Axel Wehrend⁴, Пламен Георгиев⁵, Теодора Саракостова⁶, Eva Krieps⁷

¹ВУАРР – Пловдив, филиал В. Търново

²ONKOZERT - Bundesrepublik Deutschland

³Институт по криобиология и хранителни технологии към БАН – София

⁴Veterinaerfakultaet der Universitaet Giessen

⁵Тракийски университет – Стара Загора

⁶Център за определяне на риска по хранителната верига – София

⁷Landaerztin – Grossherzogtum Luxemburg

Резюме: Ентерохеморагичните *Escherichia coli* бактерии /ЕНЕС/ и Рота- и Коронавирусите (*Rota- and Coronaviruses*) са много опасни възбудители на тежки чревни инфекции при хора и животни и изискват специален подход. При ЕНЕС прилагането на антибиотици е противопоказано, защото те разрушават бактериите и с това се стига до освобождаването на бактериалните ендотоксини, които при болните водят до трайни увреждания на бъбреците и понякога дори до смъртен изход. Срещу вируси антибиотици не действат, но могат да потискат вторични бактериални инфекции.

На база на дългогодишни лабораторни и практически опити, проведени от В. Люпке, препоръчваме при посочените чревни инфекции целенасочено третиране със специфични колострални антители. Тези антители се получават чрез комбинирано интрамамарно и интрацистернално аплициране на атенуирани възбудители или ваксинални щамове на сухостойни крави и кози. По този начин се получава първична коластра с високи титри на антителя и с големи количества на трипсин инхибитор, който предпазва тези антители от протеолитично разграждане. Това означава, че първичната коластра е много ценна, защото гарантира пълноценното действие на антителата, което е предпоставка за тяхното преминаване от чревния лумен в кръвта (с оглед създаване на пасивния хуморален имунитет) и гарантира пълноценното действие на антителата, които не се резорбират и осигуряват по този начин важния пасивен локален имунитет в червата. За ускореното елиминиране на антиген-антитяло комплексите, които се образуват в червата при това третиране на чревните инфекции, Д. Якимов препоръчва сорбент, който не преминава в кръвта. Целенасочено произведената първична коластра с антителя срещу съответните инфекциозни агенти представлява хранителна добавка и

действа едновременно и като имунен препарат, който за безпроблемно съхранение и транспортиране се предлага в криоконсервирана прахообразна форма.

Ключови думи: коластра, трипсининхибитор, матернални антитела, имунитет, *Escherichia coli*, Ротавирус, Коронавирус.

ВЪВЕДЕНИЕ

Ентерохеморагичните *Escherichia coli* бактерии /ЕНЕС/ са били регистрирани като възбудители на опасни зооантропонози още през 1982 година и до ден днешен причиняват мащабни епидемии и нередко се стига до смъртни случаи след консумация на контаминирани храни. Смята се, че опасните *E. coli* бактерии са произлезли от апатогенни шамове на *E. coli* чрез трансфер на гени с патогенна насоченост (Baljer and Wieler, 1998). Общото за всички патогенни ЕНЕС-изолати е, че те произвеждат опасния Shigatoxin (Verotoxin), а някои от тях имат способност и за образуване на хемолизин, служещ за прилепване към чревната лигавица и за разрушаването на ентероцитите.

Като резервоар на ЕНЕС се посочват най-вече домашни и диви преживни животни, при които тези бактерии съжителстват без клинична изява с микрофлората на храносмилателния тракт и се отделят с фекалиите. Но ЕНЕС се изолират и от изпражненията на други животни - като свине, коне, кучета, котки, зайци, птици и човека (Wieler, Bauerfeind and Baljer, 1992).

Заразяването на хората става орално при пренебрегване на елементарна хигиена /мръсни ръце/ или след консумация на контаминирани хранителни продукти /непреварено мляко, салатата и други зеленчуци, кълнове, вода за пиене и др. (Bockemuehl and Karch, 1996; Baljer and Bauerfeind, 1997). По същия начин в повечето от случаите става заразяване и с гастроентерични вируси, напр. норовирус /*Norovirus*/, като проучванията показват, че заразяването на хора с норовируси все повече се увеличава (Korsun, 2007). Същевременно специфични антивирусни средства срещу норовирусите все още не са разработени (Tumbariski, 2013).

Клиничната картина при болелите от ЕНЕС се характеризира с болки в корема и водниста до кървава диария. Като усложнения могат да се появят увреждания на бъбреците, хемолитична анемия, а понякога и неврологични симптоми.

Най-важно е, че не могат и не бива да се използват антибиотици, тъй като тяхното прилагане води до разрушаването на колибактериите и с това до освобождаването на изключително опасните шигатоксини, които при болните често причиняват трайно увреждане на бъбреците, а реконвалесцентните след това стават зависими от хемодиализа и трансплантация на този жизненоважен орган и нередко се стига дори до смъртни случаи.

При една мащабна ЕНЕС-епидемия през 2011 година в Германия, причинена от контаминирани кълнове, са заразени над 3000 души и над 800 от тях са получили тежки увреждания на бъбреците, а 50 са починали.

Целият проблем с ЕНЕС-инфекциите до момента не е решен и е много резонно това да стане. Поради тези обстоятелства се сформира у нас колектив от ветеринарни и хуманни лекари, микробиолози, имунолози, биохимици и други специалисти, които се координират от доц. д-р В. Люпке и доц. д-р Д. Якимов от ВУАРР. Екипът разработва нов подход и цялостна стратегия за ефикасна профилактика, метафилактика и терапия на ЕНЕС-инфекциите посредством целенасочено използване на специфични антитела, защитени от протеолитично разграждане под действието на трипсининхибитора в стомах и черва. С оглед доставянето на трипсининхибитор ние прилагаме перорално приемане на първична коластра, получена от крави и кози.

Предпоставка за този нов подход са дългогодишните изследвания на доц. д-р В. Люпке, проведени през деветдесетте години на миналия век в Районната

ветеринарна станция - град Варна и през първите години на сегашния век в ръководения от него Научноизследователски и диагностичен районен ветеринарномедицински институт - град Велико Търново.

На база на комплексните експерименти чрез комбинирано интрамамарно и успоредно и интрацестернално аплициране на отслабени Рота- и Коронавирусни щамове във вимето на сухостойни крави и кози е получена хиперимунна коластра и т. нар. „имунно мляко” (Люпке и Йонкова, 1987). Такова мляко съдържа най-вече димерни IgA-антитела, които са по-устойчиви срещу протеолитичното разграждане от трипсина – ензим, който се образува и съхранява в панкреаса под форма на неактивния трипсиноген и се отделя като проензим. Под тази форма попада в дванадесетопръстника, където се активира, за да участва в разграждането на белтъчините. На такова разграждане биха били подложени естествено и антителата, поети с коластрата и млякото или жълтъка, ако нямаше присъствието на важния трипсининхибитор, който ги опазва от това.

Целта на настоящата статия е да се представи цялостната рамка за въведени от нас методи и стратегия за ефикасна профилактика, метафилактика и терапия на ЕНЕС-инфекции посредством целенасочено използване на специфични антитела, защитени чрез трипсининхибитор от протеолитичното разграждане в стомах и черва.

НОВИТЕ АСПЕКТИ

Една от основните предпоставки на препоръчания от нас комплексен метод за борба с ЕНЕС-инфекции е подходящото прилагане на трипсининхибитора, който се отделя най-вече с първичната коластра и по този начин предпазва от разграждане на матерналните антитела, съдържащи се в нея след натрупването им по време на сухостойния период. Така се осигурява тяхното пълноценно функциониране и с това и постигането на хуморален и локален пасивен имунитет. Въз основа на това стигнахме до новата стратегия за борба с особено опасните ЕНЕС-инфекции, а също така и до ефикасно противодействие срещу чревни вирусни инфекции, причинени от рота- и коронавируси (Люпке, 1991; Lürske and Mitarb, 2017). Най-важно за ефикасното противодействие срещу бактериални и вирусни чревни инфекции е наличието на пълноценно функциониращи антитела в лумена на червата и върху чревната лигавица. Там тези антитела могат да се свързват със съответните вируси или бактерии, и дори с техните токсини, и по този начин да ги неутрализират под форма на антиген-антитяло комплекси и да се блокира тяхното размножаване и патогенно действие. При някои чревни вируси, като коронавирусите, патогенното действие се състои в увреждането на власинките на чревната лигавица, които в последствие изглеждат като обръснати и така те вече не могат да осъществяват резорбирането на течности, и респективно и на разтворените в тях хранителни вещества. А поради масивна водниста и сравнително често кървава диария се стига до дехидратация на организма на болните.

Във връзка с това изпъква ключовата роля на трипсининхибитора, който се съдържа в големи количества в първичната коластра на бозайниците, но с всяка нова порция коластра намалява и вече не може да предотвратява или поне да редуцира протеолитичното разграждане на матерналните антитела в червата. Това от своя страна означава, че перорално поетата комбинация от високотитърни хиперимунни серуми /млечни или кръвни/ и трипсининхибитор от първична коластра ще осигурява наличието на пълноценно действащи антитела в чревния лумен и върху чревната лигавица. Само с въвеждането на тази комбинация би могло ефективно да се противодейства на съответните чревни вируси и респективно и на ЕНЕС-бактериите и да се попречва на тяхното размножаване (Люпке и кол., 2017).

Това е от изключително значение при ЕНЕС-инфекциите и е най-ефикасният начин за лечение, тъй като по този начин ЕНЕС-бактериите остават цели и токсините им се отделят заедно с бактериите, а вирусите биват също така неутрализирани от съответните антитела под форма на антиген-антитяло комплекси.

Новата стратегия на нашия подход включва освен това и ускореното извеждане на тези антиген-антитяло комплекси от организма, което може да бъде осъществено посредством включването на подходящ носител-сорбент, който поема антиген-антитяло комплексите.

За тази цел ние включваме перорално прилагане на сорбент, който се поема 30 до 60 минути след приема на комбинацията от имунния препарат и първична коластра. Този сорбент абсорбира антиген-антитяло комплексите и по този начин извежда от храносмилателния тракт бактериите и част от отделените от тях опасни токсини.

От съществено значение е да се подбере подходящ сорбент, който абсорбира голямо количество течност от лумена на червата, но да не преминава през чревната бариера (Olano-Martin Estibaliz и кол., 2003). В тази връзка предлагаме пероралното прилагане на алгинова киселина, която трябва да се приема в сух вид в капсули от микроцелулоза или под форма на таблетки, а не под форма на прах, суспендиран в течност, тъй като смесването с течност многократно ще редуцира абсорбционния капацитет на сорбента. Удачен вариант е приемането на микронизиран зеолит до размери, чийто диаметър след набъбване във вода да надвишава 20 μm .

Както бе посочено по-горе, нашият подход представлява въвеждането в заразните на комбинация на трипсининхибитор и хиперимунни серуми. Тези серуми предварително получаваме в коластрата при целенасочени ваксинации на бременни бозайници /крави, кози, овце, свине и др./. Получават се чрез подкожно и интрамускулно инжектиране на атенуирани *E. coli* щамове по време на сухостойния период. По този начин в първичната коластра освен трипсининхибитор също се натрупват във високи титри матернални антитела, които предпазват телетата от клиничното манифестиране на *E. coli* инфекции (*E-coli-Vaccine für Rinder* “DESSAU“ 1965). А чрез интрамамарно аплициране на ваксината „РОКО -86“ върху бременни крави и в резултат получените матерналните антитела в коластрата се защитават техните телета на базата на пасивен чревен имунитет срещу Рота- и Коронавирусни инфекции в периода от раждането им до собствено образуване на съответните чревни лигавични антитела (Георгиев и Хараламбиев, 1988; Филипов, Люпке, Йонкова и Хараламбиев, 2013).

В. Люпке препоръчва използването на имунно мляко, получено посредством атенуирани Рота- и Коронавирусни щамове, изолирани от деца и интрамамарно и интрацистернално аплицирани на сухостойни крави или кози (Lüpcke and Yonkova, 1991). Тогава още не е било обърнато специално внимание на изключително важната роля на трипсининхибитора за опазването на коластралните и млечни антитела от протеолитичното разграждане. Това става при по-късни негови комплексни проучвания върху матерналните антитела при бозайници и птици, най-вече когато установява, че тяхното преминаване от червата в кръвта зависи от тяхната цялостност, която се дължи на ролята на трипсининхибитора (Люпке, 1999).

В рамките на тези изследвания Люпке установява също, че тези матернални хуморални антитела персистират много по-дълго отколкото се посочва в литературата и че при тях не отговаря принципът за т.нар. “време на полуразпадане“, а всъщност се касае за време на полуразреждане, което се дължи на удвояването на количеството на кръвта, което от своя страна е свързано с растежа.

При птиците матерналните антитела се съдържат в жълтъка и започват да преминават от там в кръвта на пилешките ембриони през последните дни преди излюпването, и най-вече през първите 8-10 дена след излюпването на пилетата, докато

се стига до пълното резорбиране на жълтъка. По този начин създава пасивният хуморален имунитет (Iburg, 1997). При бозайниците има два начина на предаването на матерналните антитела - вътреутробно /диаплацентарно/ при примати и в минимални количества при месоядни, но най-вече след раждането посредством поемането на коластрата. Диаплацентарно предадените матернални антитела водят само до пасивен хуморален имунитет, докато колостралните матернални антитела, които преминават от чревния лумен в кръвта, осигуряват пасивния хуморален имунитет, а нерезорбираните колострални антитела остават в лумена на червата и върху чревната лигавица и по този начин осигуряват пасивния локален имунитет, което е от голямо значение при чревни инфекции, причинени от ЕНЕС-бактериите или Рота- и Корона-вируси.

Във връзка с това от решаващо значение е ролята на трипсининхибитора, който се съдържа в големи количества в първичната коластра и неутрализира трипсина като по този начин допринася за предпазването на матерналните антитела от протеолитичното им разграждане.

С други думи, трипсининхибиторът е важен както за резорбцията на неразградени и така пълноценно функциониращи колострални антитела, с което се постига пасивният хуморален имунитет, и също така и за опазването на нерезорбираните колострални антитела, които, оставащи в червата, могат там да осигуряват по този начин пасивния локален имунитет.

Това обстоятелство е решаваща предпоставка за предложението от нас подход срещу *E.coli* инфекции и срещу чревни вирусни инфекции посредством използването на комбинация от трипсининхибитор и високотитърна специфична първична хиперимунна коластра, получена чрез двукратно комбинирано интрамамарно и интрацистернално инжектиране на съответни атенуирани теренни или ваксинални *E. coli* щамове, или респективно такива щамове на чревни вируси на сухостойни крави, кози и др. Получена по този начин, тази специфична първична хиперимунна коластра прилагаме за перорално третиране на болни или застрашени пациенти /хора или животни/. Получава се първична коластра с високи титри на специфични матернални антитела както срещу ЕНЕС-бактерии, така и срещу техните токсини. От антителата получаваме най-вече димерни матернални IgА-антитела, които са особено ценни, защото при тях протеолитичното разграждане е забавено и така те могат да присъстват по-дълго време в червата.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

От казаното дотук става ясно, че най-важното в случая е наличието на значителни количества в първичната коластра на трипсининхибитора и на целенасочено получени високи титри на функционални матернални антитела в кръвта и в червата. Трипсининхибиторът запазва перорално поетите матернални антитела от протеолитичното разграждане и осигурява по този начин тяхното пълноценно функциониране – решаваща предпоставка за преминаването им в кръвта и също така важно за локалното им действие в чревния лумен и върху чревната лигавица. Така след изтичането на колостралния период още подължително време може да се получава имунно мляко, което по-оптимално може да се използва, ако се смесва с криоконсервирана първична коластра непосредствено преди оралния прием.

С оглед получаването на оптимално действащи компоненти в първичната коластра, която съдържа големи количества трипсининхибитор, необходими за опазването на антителата, имунното мляко или хиперимунните серуми и жълтък с високи титри на антитела срещу ЕНЕС, или съответно срещу чревни вируси, се подлагат на криоконсервиране и се смесват преди целенасочената употребата. Съществено е да се отбележи, че жълтъчните антитела срещу *E. coli* се резорбират по-бавно и удълженото

им наличие в червата подсилва ефекта от прилагането на криоконсервиран жълтък (Iburg, 1997).

Повечето от опасните ЕНЕС щамове, като О 157, О 111, О 103, О 26, О 145 и др. (Baljer and Wieler, 1989), които причиняват изключително тежки чревни инфекции с опасни усложнения при човека, се срещат в над 50% от говедата. Други патогенни щамове се изолират от фекалии на кози, овце, диви преживни, свине, коне, котки, кучета и дори от птици без те да боледуват. Поради нарастващия брой на случаите на ЕНЕС при хората, завършвайки с тежки увреждания на бъбреците и нерядко дори със смъртен изход, се стигна до международното сътрудничество между Висше училище по агробизнес и развитие на регионите, Българска академия на науките – Институт по криобиология, Факултет по ветеринарна медицина при Тракийски университет – Стара Загора, Факултет по ветеринарна медицина на Университета GIESSEN (Германия). И така на база на досегашните ни изследвания предлагаме в рамките на стартирания съвместен международен проект детайлизираното разработване на комплексни мерки и мероприятия срещу ЕНЕС, които се състоят в следното:

1. Производство на криоконсервирани препарати /хранителни добавки/ като: хиперимунна коластра, млечни и кръвни серуми с антители срещу опасните ЕНЕС-бактерии и техните токсини .

2. Производство на препарати от криоконсервирана първична коластра с високо съдържание на трипсининхибитор.

3. Производство на криоконсервирани жълтъчни антители срещу опасните ЕНЕС-щамове.

4. Производство на препарати-сорбенти за ускореното извеждане на антиген-антитяло комплексите от храносмилателния тракт.

5. Създаване на центрове за разработване, съхранение и доставка на горепосочените препарати.

6. Създаване на референтен център за диагностика и борба с опасните ЕНЕС-инфекции.

ЛИТЕРАТУРА

1. Георгиев, Г. и Х. Хараламбиев, 1988. Вет. сбирка, бр. 7, стр. 11.
2. Люпке, В. и В. Йонкова, 1991. Сборник - Харков „5 години след Чернобил“ стр. 32.
3. Люпке, В., Сб. „Дни на науката - 1999“, Велико Търново, стр. 194.
4. Филипов, Ч., В. Люпке, В. Йонкова и Х. Хараламбиев, 2013. Сборник - Ст. Загора.
5. Anonym, 1966. Taschenbuch fuer Tieraerzte “DESSAU” – VEB GUSTAV - FISCHER-VERLAG Jena, pp. 68.
6. Baljer, G. und L. H. Wieler, 1998. Lohmann Information 4, pp. 19.
7. Baljer, G. and R. Bauerfeind, 1977. Material Kongress der beamteten Tieraerzte Dresden.
8. Bockemuehl, J. und H. Karch, 1999. Bundesgesundheitsblatt, 39 (8), pp. 290-296.
9. Iburg, M, 1997. Lohmann Information, 20, pp. 37-43.
10. Karch, H. und J. Bockemuehl, 1989. Infekt.Immun.17, pp. 206-211.
11. Korsun, N., 2017. Caliciviruses. In: Korsun N. (Edts.). Viral intestinal infections, pp. 99–115.
12. Lüpcke und Mitarb, 2017. Materialien 15. Büffelkongress Penig/Deutschland – 20.
13. Olano-Martin Estibaliz, Marte R. Williams, Glenn R. Gibson and Robert R. Rasfall, 2003. FEMS, Microbiology Letters 218, pp. 101-105.

14. Pirro, F., L.H. Wieler, K. Failing, R. Bauerfeind and G. Baljer, 1995. *Vet. Mikrobiol.*, 43, pp. 131-14.

15. Yulian, T., Z. Denkova, V. Yanakieva, Il. Dobrev, R. Denkova, 2013. Role of the noroviruses as substantial foodborne pathogens: A review, Сб. „Научни трудове на Русенски университет, том 52, серия 10.2, стр. 70-74.

16. Wieler, L.H., R. Bauerfeind und G. Baljer, 1992. *Tieraerztl. Umschau* 47, pp. 524-533.

Адрес за контакт:

Assoc. Prof. Dr. Dr. med. vet. Wolfgang Lüpcke

BG 9000 Varna, 14 A, Bdin Str.

E-mail: luepcke@abv.bg

Tel. 00 359 52 62 64 11

GSM 00 359 (0) 888 20 88 98