



НАТИВНЫЙ СТАФИЛОКОККОВЫЙ АНАТОКСИН

Маматова Муборак Нурпулатовна,

д.в.н., профессор СамГМУ,

Абдурашидов Уразали Уралович,

Нарзикулов Сухроб Келдиярович

врач лаборант, Самарканд, Узбекистан

Аннотация. Целью настоящей работы было изучение образования стафилококкового антилейкоцидина у лошадей и кроликов в условиях иммунизации и ревакцинации нативным и очищенным сорбированным стафилококковыми анатоксинами. При изучении биологических свойств различных стафилококков обнаружены штаммы с высоким титром лейкоцидина и низким содержанием α -гемолизина и штаммы, содержащие мало лейкоцидина и являющиеся стойкими продуцентами α -гемолизина. Нативный стафилококковый анатоксин, полученный из штамма белого стафилококка O-15, содержащего лейкоцидин, в отличие от очищенного сорбированного стафилококкового анатоксина сохранял способность вызывать образование антилейкоцидина у иммунизированных животных.

Ключевые слова: антилейкоцидин, стафилококк, ревакцинация, revaccinated, антистафилококк, интрадермал.

NATIVE STAPHYLOCOCCAL TOXOID

Mamatova Muborak Nurpulatovna,

Doctor of Medical Sciences, Professor, Samarkand State Medical University

Abdurashidov Urazali Uralovich

Narziculov Sukhrob Keldiyarovich,

Laboratory Physician, Samarkand, Uzbekistan

Abstract. A study was made of the staphylococcus antileukocidin production in the sera of horses after hyperimmunization with crude staphylococcus toxoid prepared from the industrial staphylococcus strain O-15. A study was also made of the conditions of staphylococcus antileukocidin formation in the rabbit sera following immunization with the crude and purified sorbed staphylococcus toxoid. A mixture prepared from 5 crude leukocidins (4 strains of plasmocoagulating phylococcus aureus and 1 strain of Staphylococcus albus O-15) was used for antileukocidin titration. All the antisptaphylococcus horse sera (crude fluid and lyuophilized, as well as purified concentrated with the aid of Diapherm-3 method) contained antileukocidin; it was absent in control sera. In rabbits antileukocidin appeared in the blood sera only after revaccination with crude staphylococcus toxoid. In the same conditions no antileukocidin was revealed in rabbits immunized and revaccinated with purified sorbed staphylococcus toxoid, although rabbits did acquire immunity to intradermal administration of staphylococcus culture and toxin.

Keywords: antileukocidin, staphylococcus, revaccinated, antisptaphylococcus, intradermal.

NATIV STAFILOKOKK ANATOKSINI

Mamatova Muborak Nurpulatovna,
tibbiyot fanlari doktori, professor, Samarqand davlat tibbiyot universiteti
Abdurashidov Urazali Uralovich
Narziculov Suxrob Keldiyarovich,
shifokor-laborant, Samarqand, O'zbekiston

Annotatsiya. Ushbu ishning maqsadi otlar va quyonlarda nativ hamda tozalangan sorbsiyalangan stafilocokk anatoksinlari bilan immunizatsiya va revaksinatsiya sharoitida stafilocokk antileukoçidinining hosil bo'lishini o'rganishdan iborat bo'ldi. Turli xil stafilocokklarning biologik xususiyatlarini o'rganish jarayonida leykoçidin titri yuqori, ammo α -gemolizin miqdori past bo'lgan shtammlar, shuningdek, leykoçidin miqdori kam, biroq α -gemolizinning barqaror produsenti hisoblangan shtammlar aniqlangan. Leykoçidin saqlovchi oq stafilocokkning O-15 shtammidan olingan nativ stafilocokk anatoksini tozalangan sorbsiyalangan stafilocokk anatoksinidan farqli ravishda immunizatsiya qilingan hayvonlarda antileukoçidin hosil bo'lishini chaqirish xususiyatini saqlab qolgan.

Kalit so'zlar: antileukoçidin, stafilocokk, revaksinatsiya, revaksinatsiyalangan, antistafilocokk, intradermal.

Актуальность темы. В последние годы появились работы, указывающие на значение стафилококкового лейкоцидина в патогенезе и антилейкоцидина в иммунитете при стафилококковой инфекции. Было показано совпадение резистентности к стафилококковым заболеваниям с высокими титрами антилейкоцидина в крови и несовпадение с титрами а-антитоксина [4, 8, 9, 12].

При изучении биологических свойств различных стафилококков обнаружены штаммы с высоким титром лейкоцидина и низким содержанием а-гемолизина и штаммы, содержащие мало лейкоцидина и являющиеся стойкими продуцентами а-гемолизина [2, 3, 7].

Цель научного исследования. Целью настоящей работы было изучение образования стафилококкового антилейкоцидина у лошадей и кроликов в условиях иммунизации и ревакцинации нативным и очищенным сорбированным стафилококковыми анатоксинами.

Материалы и методы. Анатоксин был приготовлен на казеиново-растительной среде, согласно требованию действующей инструкции, из производственного штамма стафилококка O-15. В 1 мл анатоксина содержалось 5 ЕС. В сыворотках животных определяли параллельно антилейкоцидин и а-антитоксин.

Для титрования а-антитоксина применяли общепринятый метод нейтрализации испытуемой сывороткой гемолитических свойств а-токсина, Lh которого предварительно определяли со стандартной противостафилококковой сывороткой.

Для титрования антилейкоцидина применяли смесь из 5 лейкоцидинов и из 4 штаммов плазмокоагулирующих золотистых стафилококков, (№ Л-17, Б-42, Т-89, Л-23, Б-28, V8) выделенных со слизистой оболочки носа новорожденных детей, и производственного штамма патогенного белого стафилококка O-15. Штаммы золотистых стафилококков с достаточным постоянством образовывали лейкоцидин в титре 80-160 минимальных лейкоцидиновых доз (МЛД), из штамма стафилококка O-15 получали лейкоцидин с титром 40 МЛД.

Минимальной лейкоцидиновой дозой считали наибольшее разведение лейкоцидина, которое вызывало гибель более 50 % нейтрофилов человеческой донорской крови по сравнению с контрольным препаратом из той же крови без добавления лейкоцидина.

Испытуемые сыворотки разводили нейтральным раствором Хэнкса с 1:4 до 1:256-1:512 [5, 6, 11]. В каждое разведение сыворотки, взятое в объеме 0,2 мл добавляли по 0,1 мл лейкоцидина, изготовленного в день постановки опыта из смесей лейкоцидинов 5 указанных выше штаммов. Затем добавляли по 0,1 мл человеческой гепаринизированной или консервированной крови, взятой от донора в день постановки опыта. Обработка крови подробно приведена в ранее опубликованной работе.

Некоторые лошадиных противостафилококковых сывороток мы титровали с двумя лейкоцидинами: одним, представлявшим собой смесь лейкоцидинов 5 штаммов стафилококков, и со вторым лейкоцидином из штамма стафилококка V8.

При титровании обязательно ставили 2 контроля: контроль крови без лейкоцидина и сыворотки и контроль лейкоцидина в разведении от 1:5 до 1:160-1:320 без сыворотки. После выдерживания в течение $1\frac{1}{2}$ часов при 37° из каждого разведения приготавливали мазки на обезжиренных предметных стеклах, которые высушивали на воздухе, фиксировали 10 минут этиловым спиртом и окрашивали по Романовскому - Гимзе. В каждой мазке, соответствовавшем определенному разведению сыворотки, подсчитывали 50-100 лейкоцитов. Число лимфоцитов, нейтрофилов и эозинофилов обозначали в процентах. Полученный результат сравнивали с контролем. Титром антилейкоцидина считали то наибольшее разведение сыворотки, которое нейтрализовало рабочую дозу лейкоцидина; за единицу антилейкоцидина принимали количество сыворотки, нейтрализовавшее 100 минимальных лейкоцидиновых доз. При этом разведении насчитывалось более 50 % нейтрофилов по сравнению с контролем. Если взятая в опыт рабочая доза лейкоцидина содержала 100 минимальных единиц, то считалось, что в данном разведении сыворотки содержится 1 ед. антилейкоцидина. Затем высчитывали, сколько антилейкоцидиновых единиц содержится в 1 мл неразведенной сыворотки. Если рабочая доза лейкоцидина содержала менее 100 ед., производили соответствующий перерасчет. Например, титр антилейкоцидина равнялся 1:40, а титр лейкоцидина - 1:80, следовательно, испытуемая сыворотка содержала $0,8 \times 40 = 32$ ед. в 1 мл.

Из 5 образцов противостафилококковых антитоксических лошадиных сывороток 4 были нативными с титрами а-антитоксина, равными 200, 150, 90 и 200, и одна очищенной и концентрированной методом Диаферм-3 с титром 1200 АЕ. Все они были получены путем гипериммунизации лошадей нативным стафилококковым анатоксином с 1 % квасцов, приготовленным из штамма стафилококка О-15. Лошадей иммунизировали подкожно с 5-дневными интервалами анатоксином в возрастающих дозах (максимальная составила 200 мл). При последующих прививках к анатоксину добавляли $\frac{1}{20}$ объема стафилококкового токсина. Цикл иммунизации продолжался примерно 50 дней. Кровопускание производили на высоте содержания максимальных титров а-антитоксина в крови. Одновременно в качестве контрольных были испытаны смесь 10 нормальных кроличьих сывороток, содержащая менее 0,25 АЕ, одна нормальная лошадиная сыворотка; содержащая 0,5 АЕ, и 6 противостолбнячных сывороток. Диаферм-3 с титрами стафилококкового а-антитоксина от 2 до 6 АЕ, содержащими в 1 мл 1500-1800 АЕ.

Все противостафилококковые сыворотки содержали антилейкоцидин. В контрольных сыворотках антилейкоцидина не было. При этом оказалось, что в процессе

лиофильной сушки нативной сыворотки, а также обработки сыворотки методом Диаферм-3 антилейкоцидин сохранился.

В дальнейшем мы попытались в опытах на кроликах выяснить, образуется ли антилейкоцидин в условиях первичной троекратной иммунизации, а также последующей ревакцинации их нативным стафилококковым анатоксином. Параллельно проведены опыты с очищенным сорбированным стафилококковым анатоксином.

Кроликов иммунизировали подкожно 5 сериями соответствующего анатоксина. Кролики, которым вводили одни и те же нативные стафилококковые анатоксины, были разделены на 4 подгруппы по 3 кролика в каждой: 3 кролика получили по 0,5-1-1 мл нативного стафилококкового анатоксина с 5-дневным интервалом по схеме официальной инструкции по контролю иммуногенных свойств препарата; 3 кролика были иммунизированы повышенными дозами - 1, 2 и 2 мл с теми же интервалами; 3 кролика получили повышенные дозы с добавлением убитых 0,3% формалина микробных клеток (590 млн. на 1 мл анатоксина) из штаммов стафилококков, содержавших лейкоцидин, а 3 последние кролика получили эти дозы анатоксина с добавлением 1 % квасцов. На 6, 10, 20 и 55-й день после троекратной прививки в сыворотках кроликов определяли параллельно антилейкоцидин и а-антитоксин. Ни в одной из сывороток антилейкоцидина не оказалось. Таким образом, ни двукратное увеличение иммунизационной дозы, ни добавление микробных клеток, вырабатывающих лейкоцидин, ни добавление квасцов не способствовали накоплению антилейкоцидина в сыворотках кроликов в условиях первичной иммунизации.

Существенной разницы в титрах а-антитоксина у отдельных кроликов в зависимости от способа иммунизации также не было отмечено. Максимальные титры а-антитоксина сохранялись до 10-го дня после иммунизации.

Через 4 месяца 8 кроликов ревакцинировали нативным стафилококковым анатоксином, который вводили двукратно с 8-дневным интервалом в количестве 1 мл квасцов. Титры а-антитоксина и антилейкоцидина определяли на 6, 14, 30 и 60-й день после ревакцинации. Во всех сыворотках, кроме одной был обнаружен антилейкоцидин, его титры держались на уровне 11-16 ед. с 6-го по 30-й день после ревакцинации, а к 60-му дню антилейкоцидин сохранился только у 2 кроликов (8 и 16 ед. из 6). Титры а-антитоксина до 30-го дня после ревакцинации были достаточно высокими: 16,6 и 4 АЕ на 6-й и 14-й день соответственно и 4,4 АЕ на 30-й день; к 60-му дню титры снизились до 1,5 АЕ.

После первичной иммунизации, как и после ревакцинации очищенным сорбированным стафилококковым анатоксином, в сыворотках кроликов антилейкоцидин обнаружить не удалось, хотя титры, а-антитоксина были высокими.

Представляло интерес сопоставить дермонекротическую реакцию у кроликов, привитых нативным и очищенным сорбированным стафилококковым анатоксином, на стафилококковый токсин (2 Dhм) и стафилококковую культуру (2 Dhм). Испытание проводили через 55 дней после первичной иммунизации, через 2 месяца после ревакцинации нативным очищенным стафилококковым анатоксином и через месяц после ревакцинации очищенным сорбированным стафилококковым анатоксином.

Внутрикожная реакция кроликов, иммунизированных и ревакцинированных как нативным, так и очищенным сорбированным стафилококковым анатоксином, по сравнению контрольными была значительно менее выраженной, кратковременной и ограниченной.

Некрозы при введении стафилококкового токсина кроликам, ревакцинированным нативным стафилококковым анатоксином, наблюдались, только у 3 из 6 и не превышали 0,4-0,5 см, в то время как в контроле некроз достигал 3 см; к 12-му дню кожа становилась чистой,

а в контроле размеры некроза продолжали увеличиваться, достигая 9,2 см. У кроликов, привитых и ревакцинированных очищенным сорбированным стафилококковым анатоксином, также наблюдался ясно выраженный антибактериальный и достаточно выраженный антитоксический иммунитет к внутрикожному введению стафилококковой культуры и стафилококкового токсина.

По-видимому, а-антитоксин для кроликов имеет ведущее значение и, возможно, тождествен антилейкоцидину.

Результаты. В заключение следует отметить, что титрование антилейкоцидина представляет значительные трудности, которые, помимо всего с прочего, связаны с тем, что приходится пользоваться кровью различных доноров с неодинаковой резистентностью лейкоцитов к действию лейкоцидина, что может обусловить расхождение результатов при повторении опытов.

Приходится титрование повторять многократно. Тем не менее метод титрования антилейкоцидина следует рекомендовать для изучения иммунологических процессов в организме при стафилококковой инфекции.

Выводы: Нативный стафилококковый анатоксин, полученный из штамма белого стафилококка О-15, содержащего лейкоцидин, в отличие от очищенного сорбированного стафилококкового анатоксина сохранял способность вызывать образование антилейкоцидина у иммунизированных животных. У кроликов, иммунизированных очищенным сорбированным стафилококковым анатоксином, при отсутствии антилейкоцидина в крови наблюдался ясно выраженный антибактериальный и антитоксический иммунитет к внутрикожному введению стафилококкового токсина и культуры. Требуется дальнейшее изучение факторов, обуславливающих иммунитет при стафилококковой инфекции.

Использованные литературы:

1. Акатов А.К., Стафилококки //-М.: Медицина.-1983.-С. 256.
2. Воронковская Г.Н. Сопоставление патоморфологических изменений при затяжном септическом эндокардите и ревматизме // Казанский медицинский журнал. 2021, Т. 42, (5) 71-72.
3. Кадыров Ж.Ф., Маматова М.Н. Защитное действие стафилококкового анатоксина при заражении животных разными штаммами стафилококка // Инфекция, иммунитет и фармакология. Научно-практический журнал. -2025. № 4. -С. 129-137. <https://infection-immunity.uz>.
4. Даминов Ф.А., Маматова М.Н. Биологические свойства стрептококков в условиях экспериментальной стрептококковой инфекции // Research Focus International Scientific Journal, 2024, V. 3(10), 33-39.
5. Маматова М.Н. Экспериментальное изучение зависимости «доза - эффект» при иммунизации стафилококковым анатоксином // Research Focus International Scientific Journal, 2024, V. 3(9), 221-229.
6. Маматова М.Н. Гистологическая диагностика неэффективного эритропоэза // «Тиббиётда янги кун» Илмий журнал. 2024, 7 (69), 77-85.
7. Сойбназаров, О. Э., Маматова, М. Н., & Аламов, Т.С. Новые лабораторные показатели стресс-синдрома // Research and education, 2024. 3(10), 110-117.

8. Шайкулов Х.Ш., Маматова М.Н., Исокулова М.М. Применение реакции непрямой гемагглютинации для определения антител к стафилококковому токсину // Ж. Экономика и социум. 26.07.2024.

9. Шайкулов Х.Ш., Исокулова М.М., Маматова М.Н. Diareya bo'lgan bolalardan ajratib olingan enteropatogen esherixiyalarning seroguruhlari // International journal of recently scientific researcher's theory, ISSN: 2992-8885. 2(7), 2024. -P. 106-111.

10. Deviri E., Glenville B.E. Inflammatory response in infective endocarditis // Eur. J. Inflamm. 2007; 5(2): 57-63.

11. Kadirov J.F., Mamatova M.N. The use of infect немagglutination reaction for determination of antibodies to staphylococcus toxin // Infeksiya, immunitet end farmakologiy. 2024, 5 (2) 66-75.

12. McKenzie P.E., Hawke D., Woodroffe A.J. et al. Serum and tissue immune complexes in infective endocarditis. J. Clin Lab Immunol 1980; 4(3): 125.