

УДК 616.48-576.851.49

## ЭФФЕКТИВНОСТЬ СТАФИЛОКОККОВОГО АНАТОКСИНА ПРИ ИММУНИЗАЦИИ ЖИВОТНЫХ

**Маматова Муборак Нурпулатовна**

Профессор кафедры клинической лабораторной диагностики Самаркандского  
государственного медицинского университета,

**Халимова Мафтуна Салимовна**

врач лаборант

**Асророва Нафиса Нодировна**

врач лаборант, Узбекистан.

<https://doi.org/10.5281/zenodo.17066864>

**Аннотация:** В настоящее время для профилактики и лечения стафилококковых инфекций успешно применяют стафилококковый анатоксин. В связи с этим мы поставили перед собой задачу изучить возможность использования стафилококкового анатоксина для пероральной иммунизации. В работе представлены результаты экспериментов на животных.

**Ключевые слова:** стафилококковый анатоксин, иммунизация, эксперимент, реактоген.

## EFFECTIVENESS OF STAPHYLOCOCCAL TOXOID IN ANIMAL IMMUNIZATION

**Abstract:** Currently, staphylococcal toxoid is successfully used for the prevention and treatment of staphylococcal infections. In this regard, we set out to investigate the possibility of using staphylococcal toxoid for oral immunization. This paper presents the results of experiments conducted on animals.

**Keywords:** staphylococcus toxoid, immunization, experiments, reactogen.

### ВВЕДЕНИЕ

Экспериментальный материал последних лет свидетельствует о возможности иммунизации перорально живыми вакцинами против различных инфекций - дизентерии, сальмонеллеза [1, 3], чумы, Ку-лихорадки, оспы [2, 4, 5], и др. Эффективной оказалась реиммунизация перорально дифтерийным анатоксином [7, 9, 10]. Однако попытка использовать для пероральной вакцинации гретую стафилококковую вакцину оказалась неудачной.

**Цель исследования.** В настоящее время для профилактики и лечения стафилококковых инфекций успешно применяют стафилококковый анатоксин [11, 12]. В связи с этим мы поставили перед собой задачу изучить возможность использования стафилококкового анатоксина для пероральной иммунизации. В работе представлены результаты экспериментов на животных.

### МЕТОДИКА

В опытах использовали кроликов весом 2,5-3,5 кг. Животные были разделены на 3 группы: кроликов 1-й группы иммунизировали только перорально, 2-й - комбинированным методом (первую иммунизацию проводили подкожно, вторую и третью - перорально), кролики 3-й группы служили контролем, их иммунизировали подкожно. Животным вводили анатоксин троекратно, с 7-дневными интервалами. Иммунизацию перорально

проводили шприцем через тонкий резиновый катетер непосредственно в пищевод или распылением анатоксина во рту также из шприца с обрезанной и затупленной иглой.

Для иммунизации использовали стафилококковый нативный (5 ЕС/мл) или адсорбированный (10 ЕС/мл) анатоксин и стафилококковый очищенный концентрированный анатоксин, содержащий 40-50 ЕС/мл. Эффективность иммунизации изучали по накоплению в крови анти- $\alpha$ -токсина, титр которого определяли до и после иммунизации, а также по развитию внутрикожных очагов инфекции у животных после заражения различными штаммами стафилококка. Внутрикожное заражение кроликов проводили 2, 4 и 10 минимальными некротическими дозами (Dnm). Для этого суточную агаровую культуру стафилококка смывали физиологическим раствором и полученную взвесь доводили до необходимой концентрации по бактериальному стандарту.

Через 2, 4 и 6 месяц животных ревакцинировали перорально или подкожно (контрольная группа) и проводили те же исследования.

В опыт брали животных, у которых до иммунизации в сыворотках не обнаруживали анти- $\alpha$ -токсин, ( $<0,125$  АЕ/мл). При титровании сывороток и определении Dnm руководствовались существующими методическими указаниями [6, 9, 10].

В результате установлено, что стафилококковый анатоксин при введении перорально (в пищевод или орошением полости рта) проникал через слизистые оболочки и вызывал в организме соответствующую иммунологическую перестройку.

Так, при иммунизации перорально 4,5 мл (1+1,5+2) и 13 мл (3+5+5) очищенного концентрированного стафилококкового анатоксина титры после 3-й вакцинации у животных 2-й группы были примерно в 3 раза выше, чем у животных 1-й на протяжении всего срока наблюдения.

При сравнении средних титров анти- $\alpha$ -токсина в крови у животных после введения концентрированного очищенного анатоксина только перорально и комбинированным методом последний не имел преимуществ, так как при иммунизации одними и теми же дозами анатоксина титры у животных были одного порядка. Комбинированная иммунизация кроликов адсорбированным анатоксином оказалась более эффективной, чем иммунизация только перорально: титры анти- $\alpha$ -токсина в сыворотках животных 1-й группы были почти в 2,5 раза выше, чем животных 2-й группы.

При введении концентрированного стафилококкового анатоксина путем орошения полости рта и носоглотки анатоксин также проникал в гемалимфатический ток, в результате чего наступала определенная иммунологическая перестройка.

Ревакцинацию животных проводили через 2, 4 и 6 месяцев после окончания цикла иммунизации. Для ревакцинации брали животных, ранее иммунизированных подкожно и перорально. Так, через 2 недели после ревакцинации 3 мл концентрированного стафилококкового анатоксина перорально титры антител повышались в 7-25 раз, а после подкожного введения - в 16-35. Более высокая концентрация антител в крови наблюдалась после ревакцинации в сентябре - октябре по сравнению с ревакцинацией в мае-июле. После ревакцинации 2 мл коммерческого нативного стафилококкового анатоксина перорально и подкожно титры анти- $\alpha$ -токсина в крови повысились в 1,1 и в 1,9 раза соответственно.

Как уже указывалось, некоторых животных через 2 недели после иммунизации или реиммунизации заражали внутрикожно в заранее выстриженный бок кроликов различными штаммами стафилококка. Для заражения были взяты 3 штамма *Staphylococcus aureus*.

Вид *S. aureus* включает 6 эковаров: А, В, С, D, Е и F. Основными хозяевами этих эковаров являются человек, свинья, домашняя птица, крупный рогатый скот, овцы, зайцы, собаки и голуби [1, 8, 13]. При одинаково широком спектре энзимогенеза и токсиногенеза штамм стафилококка 0-15 был активным продуцентом альфа-токсина, V6 - лейкоцидина и штамм Л-17- бета токсина. Dnm штаммов составляла 200 млн. микробных клеток. Животным вводили внутривенно 2, 4 и 10 Dnm.

### РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Результаты опытов показали (табл. 1), что при заражении стафилококками у неиммунизированного здорового кролика образовывались обширные некрозы кожи, в последующие дни процесс некротизации тканей прогрессировал, и к 4-му дню образовывались глубокие сливные некрозы.

**Таблица 1. Результаты внутривенного заражения штаммами стафилококка иммунных и неиммунных кроликов**

Способ иммунизации	Анти-токсин в крови АЕ/мл	Штаммы	Развитие поражений после введения культуры в разных дозах (в Dnm)					
			2	Число животных	4	Число животных	10	Число животных
Неиммунные (контроль)	<0,125	0-15	прогрессирующий некроз	5	прогрессирующий некроз	5	прогрессирующий некроз	5
		Л-17	прогрессирующий некроз	5	прогрессирующий некроз	5	прогрессирующий некроз	5
		V6	прогрессирующий некроз	5	прогрессирующий некроз	5	прогрессирующий некроз	5
Подкожно + Перорально	2; 4; 2; 2	0-15	краснота	3	краснота	1	инфильтрат	1
					инфильтрат	2	некроз	2
		Л-17	краснота	3	инфильтрат	3	инфильтрат	2
							некроз	1
		V6	инфильтрат	3	инфильтрат	1	некроз	1
					некроз	2	некроз	3
Перорально	1; 1; 1; 6	0-15	краснота	2	краснота	1	инфильтрат	1

в пищевод		Л-17	инфильтрат	2	инфильтрат	3	некроз	3
			краснота	1	инфильтрат	3	инфильтрат	1
			инфильтрат	3	некроз	1	некроз	3
		V6	краснота	1	инфильтрат	2	прогрессирующий некроз	4
			инфильтрат	2	некроз	2		
			некроз	1				
Перорально орошением рта + Носоглотки	0,5; 0,25; 1; 1	О-15	краснота	2	инфильтрат	1	некроз	4
			инфильтрат	1	некроз	3		
			некроз	1				
		Л-17	краснота	3	инфильтрат	2	инфильтрат	1
			некроз	1	некроз	1	некроз	3
		V6	краснота	2	инфильтрат	1	некроз	4
			инфильтрат	1	некроз	3		
			некроз	1				

При внутрикожном введении этих штаммов иммунным кроликам наблюдался определенный защитный эффект у животных всех групп, причем защитная реакция не зависела от высоты титров анти-  $\alpha$  -токсина в крови (табл. 2). У кроликов, иммунизированных перорально и зараженных затем штаммами стафилококка 0-15 и Л-17, на местах введения 2 и 4 Dnm появлялась лишь краснота или инфильтраты, которые к 4-м суткам, как правило, рассасывались. Только у 1 кролика, зараженного штаммом Л-17, наблюдался некроз, также ликвидировавшийся к 4-м суткам. Размеры этого некроза на коже составляли  $\frac{1}{36}$  часть некроза в контроле. При введении 10 Dnm (2 млрд. кокков) некрозы образовывались, но в отличие от контроля поражения подсыхали, рубцевались и переходили в инфильтраты; кроме того, первоначальная величина некрозов, как правило, была значительно меньше, чем, в контроле (см. табл. 1).

Введение животным, иммунизированным а-анатоксином, лейкоцидин активного штамма V6 вызывало образование некрозов в ответ на введение всех доз, хотя некрозы в 175, 112, 58 раз были меньше, чем в контроле (см. табл. 1), и в противоположность последним не увеличивались, рубцевались, хотя осумкованные, флюктуирующие инфильтраты на 10 Dnm обнаруживались еще через 30 дней наблюдения. Таким образом, течение очага инфекции, вызванного у иммунизированных а-анатоксином кроликов, было менее благоприятно при введении лейкоцидин-активного штамма.

Кролики, иммунизированные орошением полости рта и носоглотки, несмотря на очень низкое содержание анти- $\alpha$ -токсина в крови, также проявляли определенную устойчивость к внутрикожному заражению стафилококком. Инфильтраты и небольшие некрозы образовывались в ответ на введение 2, 4 и 10 Dnm всех штаммов, но исход очагов поражения был благоприятным: репаративный процесс на введение 2 Dnm заканчивался к 4-5-му, на 4 Dnm - к 14-му дню. При заражении 10 Dnm через 14 дней оставались инфильтраты у всех животных после введения штаммов 0-15 и V6 и у 1 кролика - после введения штамма Л-17.

После подкожной иммунизации кролики были устойчивы к внутрикожному заражению и особых преимуществ в невосприимчивости к заражению стафилококком в этой группе животных по сравнению с привитыми перорально не наблюдалось.

Мы попытались использовать реакцию непрямо́й гемагглютинации для обнаружения антител к стафилококковому токсину. Применяемый в настоящее время гемолитический метод позволяет выявлять антитела (антитоксины) лишь к токсическому компоненту стафилококкового токсина - в основном к  $\alpha$ -токсину [2, 6].

В основу реакции положен метод непрямо́й гемагглютинации. В то же время разнообразие физико-химических свойств различных антигенов обуславливает значительную сложность сенсibilизации эритроцитов антигенами и это приводит к отсутствию единой стандартной методики [4]. Для выбора оптимальной дозы нативного токсина, которая обеспечивала бы хорошую сенсibilизацию эритроцитов, провели титрование токсина со стандартной противостафилококковой сывороткой. Оптимальными разведениями токсина оказались 1:40-1:160 (активность токсина Lh 0,15 мл). Учитывая возможность групповых реакций, из всех оптимальных концентраций антигена в реакции непрямо́й гемагглютинации предпочтительно пользоваться наименьшей [11, 12]. Поэтому в основной части работы для сенсibilизации эритроцитов нативный стафилококковый токсин применяли в разведении 1:160, что соответствовало концентрации 70 мкг на 1 мл белка.

Проведенные испытания полученных сенсibilизированных эритроцитов показали, что при хранении в течение 3 месяцев и более в рефрижераторе при 4<sup>0</sup> С диагностикумы почти не утрачивали активности. Так, если после приготовления сенсibilизированные токсином эритроциты реагировали с антитоксической сывороткой активностью 80 АЕ до титра 1: 819 200, то через 3 месяца хранения они реагировали с той же сывороткой, разведенной до 1:409 600. Эти материалы свидетельствовали, что нам удалось добиться прочной сорбции компонентов стафилококкового токсина на танизированных эритроцитах и оптимальных условий для их сохранения.

Полученные результаты зависели, по-видимому, от воздействия на стафилококковый антитоксин желудочного сока. Анатоксин вполне удовлетворительно сохранял активность на протяжении 1 ч (срок наблюдения) контакта с соляной кислотой при pH 3,0-4,0 (табл. 4), активность анатоксина сохранялась также при добавлении его к 1-й порции желудочного сока нормальной кислотностью (pH 5,0) и к желудочному соку от больного с ахилией (pH 6,6). При контакте с искусственным желудочным соком (продуктом автолиза слизистой оболочки свиных желудков) и со 2-й порцией нормоцидного желудочного сока человека анатоксин выпадал в осадок и в надосадочной жидкости не определялся. Вероятно, в связи с неустойчивостью сохранения активности анатоксина в желудочном соке у добровольцев не всегда наблюдалось повышение титров антитоксина.

Таким образом, при введении перорально следует предохранять стафилококковый анатоксин от воздействия желудочного сока.

### ВЫВОДЫ

В опытах на кроликах и при исследованиях на добровольцах показана принципиальная возможность иммунизации и реиммунизации стафилококковым анатоксином перорально (при непосредственном введении препарата в желудочно-кишечный тракт и путем орошения полости рта). В результате пероральной иммунизации стафилококковым анатоксином наступала иммунологическая перестройка организма, о которой свидетельствовали появление анти- $\alpha$ -токсина в крови и усиление репаративных процессов при внутрикожном заражении массивными дозами токсигенных штаммов стафилококка. При введении перорально стафилококковый анатоксин необходимо предохранить от воздействия желудочного сока.

### Литература:

1. Акатов А.К., Зуева В.С. Стафилококки // -М.: Медицина.-1983. -С. 256.
2. Кудратова З.Э., Юсупова Н.А., Набиева Ф.С. Нозологическая структура острых кишечных инфекций, вызванных условно-патогенной микрофлорой в Самаркандской области //Medicus. - 2019, № 6.
3. Маматова М.Н., Шайкулов Х.Ш. и др. Применение реакции непрямой гемагглютинации для определения антител к стафилококковому токсину // Журнал «Экономика и социум». 2024, №7 (122).
4. Маматова М.Н. Пейзаж патогенных эшерихий, выделенных от больных в г. Самарканде и его близлежащих территориях // Журнал «Экономика и социум». 2024, №7 (122).
5. Маматова М.Н. Гистологическая диагностика неэффективного эритропоэза // Журнал «Тиббиётда янги кун». 2024, № 7 (69)
6. Негодова Е.В. Распространенность респираторных заболеваний среди детей гарнизона, роль стафилококковой инфекции в этиологии заболеваний органов дыхания // Глав.врач Юга России. 2011. №1 (24).
7. Николаева И. В., Анохин В. А. Стафилококковые инфекции в педиатрии // ПМ. 2010. №4.
8. Осипов Ю.С. Анатоксины // Большая российская энциклопедия. - М.: 2005. Т. №1., - С. 674.
9. Шайкулов Х.Ш., Исокулова М.М., Маматова М.Н. Степень бактериоциногенности антибиотикорезистентных штаммов стафилококков, выделенных в Самарканде // Eurasian journal of medical and natural sciences. -2023, № 3(1).
10. Чернова О.Л. Антилизозимная активность стафилококков, выделенных при бактерионосительстве // Автореф. дис. канд. биол. наук. Челябинск, 1989. - С. 22.
11. Baselga R. Staphylococcus aureus capsule and slime as virulence factors in ruminant mastitis // Vet. Microbiol. -1994.-V.39.-N.3-4.-P. 195-204.
12. Corbella X. Staphylococcus aureus nasal carriage as marker for subsequent staphylococcal infections in intensive care unit patients // Eur. J. Clin. Microbiol. Infekt. Dis.-1997. -Vol.16, №5.-P.351-357.
13. Welsch M. Le "lysozyme" des Staphylocoques. Compt. Rend // Soc. Biol.-1959. -Vol. 153.-P.2080-2083.