

Маматова М.Н.

*и.о.профессора кафедры клинической лабораторной диагностики
с курсом клинической лабораторной диагностики ФПДО*

Шайкулов Х.Ш.

*старший преподаватель
кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии*

Исокулова М.М.

*ассистент кафедры клинической лабораторной диагностики
с курсом клинической лабораторной диагностики ФПДО
Самаркандский государственный медицинский университет*

Узбекистан, Самарканд.

ПРИМЕНЕНИЕ РЕАКЦИИ НЕПРЯМОЙ ГЕМАГГЛЮТИНАЦИИ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИТЕЛ К СТАФИЛОКОККОВОМУ ТОКСИНУ

Резюме. Проведенные испытания показали, что наилучшие условия для сенсibilизации эритроцитов создаются при следующем режиме: равные объемы танизированных эритроцитов и нативного токсина в разведении 1:160 смешивали и выдерживали при 37⁰ С в течение 2-3 часов и затем в рефрижераторе при 4⁰ С в течение 18-20 часов.

Результаты проведенных испытаний показали, что прогревание токсинов практически не влияло на их сенсibilизирующую активность по отношению к эритроцитам: танизированные эритроциты, сенсibilизированные токсинами прогретыми 56, 60 и 100⁰ С, проявляли примерно одинаковую активность и реагировали с противостафилококковой сывороткой почти в таких же разведениях, как и танизированные эритроциты, сенсibilизированные нативным стафилококковым токсином.

Ключевые слова: *сенсibilизации эритроцитов, агглютинин, раствор формалина, антитоксин, иммунитет, анатоксин, стафилококковый токсин.*

UDC 616.48-576.851.49

Mamatova Muborak Nurpulatovna,

Acting Professor of the Department of Clinical Laboratory Diagnostics with the course of clinical laboratory diagnostics of the Faculty of Postgraduate Education of Samarkand State Medical University.

Shaykulov Hamza Shodievich

Senior Lecturer of the Department of Microbiology, Virology and Immunology of Samarkand State Medical University.

Isokulova Mukhabbat Mardanovna

Assistant of the Department of Clinical Laboratory Diagnostics with the course of clinical laboratory diagnostics of the Faculty of Postgraduate Education of Samarkand State Medical University.

Uzbekistan, Samarkand.

THE USE OF INDIRECT HEMAGGLUTINATION REACTION FOR DETERMINATION OF ANTIBODIES TO STAPHYLOCOCCUS TOXIN

Summary. *The authors determined conditions providing sensitization of formalinized sheep erythrocytes with staphylococcus toxin: 2-hour exposure at 37° C and a subsequent 18-hour exposure at 4° C of 2,5% suspension of tannated erythrocytes with a crude toxin in 1:160 dilution (Lh 0,15 ml-an initial characteristics of the toxin). The activity of the preparation was preserved for 3 months with 1% formalin solution. Clumping of sensitized erythrocytes was specifically inhibited by addition of crude or heated toxin to the serum. Toxin samples heated at 56, 60 and 100° C failed to lose their capacity to sensitize erythrocytes under the same conditions.*

Keywords: *sensitized erythrocytes, agglyutinin, formalin solution, antitoxin, immunitetes, anatoxin, staphylococcus toxin.*

Введение. В последние годы в теоретической и прикладной иммунологии все большее применение находит реакция непрямо́й (пассивной) гемагглютинации, которая по чувствительности значительно превосходит другие серологические методы выявления антител и все шире применяется при изучении различных инфекций [1, 3, 5].

Цель исследования. 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 α -токсину [2, 6].

Материалы и методы. 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]. Поэтому для каждого антигена экспериментальным путем приходится устанавливать оптимальные условия для адсорбции. Изложенное и побудило нас более подробно остановиться на методических вопросах применения указанной реакции для определения антител к стафилококковому токсину.

Первоначально мы попытались применить в реакции непрямо́й гемагглютинации нативные эритроциты барана, которые, однако, лизировались при сенсibilизации их различными разведениями нативного стафилококкового токсина. Поэтому нативные бараньи эритроциты оказались непригодными для работы с нативным токсином. Изложенное побудило нас попытаться применить формализированные бараньи эритроциты. Согласно данным литературы,

применение формализированных эритроцитов позволяет избежать лизиса как в процессе танирования, так и при дальнейшем хранении, предотвращает их спонтанную агглютинацию, позволяет получать стойкий препарат сенсibilизированных антигеном эритроцитов [10, 11].

Формализированные бараньи эритроциты хранили в виде 50 % взвеси в физиологическом растворе, а перед постановкой опыта 3-кратно отмывали нейтральным физиологическим раствором и готовили 2,5 % взвесь на буферном солевом растворе рН 7,2. Равные количества полученной взвеси формализированных эритроцитов и таниновой кислоты в разведении 1:20000 смешивали и инкубировали при 37⁰ в течение 20 мин. После 3-кратного отмывания буферным солевым раствором с рН 7,2 эритроциты ресуспендировали до первоначального объема.

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 непрямой гемагглютинации предпочтительно пользоваться наименьшей. Поэтому в основной части работы для сенсibilизации эритроцитов нативный стафилакокковый токсин применяли в разведении 1:160, что соответствовало концентрации 70 мкг на 1 мл белка.

Как показали проведенные испытания, наилучшие условия для сенсibilизации эритроцитов создаются при следующем режиме: равные объемы танированных эритроцитов и нативного токсина в разведении 1:160 (токсин разводили на буферном солевом растворе с рН 6,4) смешивали и выдерживали при 37⁰ в течение 2-3 часов и затем в рефрижераторе при 4⁰ в течение 18-20 часов. За 2-3 часа до окончания сенсibilизации для предотвращения элюции антигена с эритроцитов добавляли формалин из расчета 1-2 % общего объема. После окончания сенсibilизации эритроциты 3-

кратно отмывали буферным солевым раствором с рН 7,2 с 1 % раствором формалина, ресуспендировали в таком же растворе в первоначальном объеме.

Проведенные испытания полученных сенсibilизированных эритроцитов показали, что при хранении в течение 3 месяцев и более в холодильнике при 4° 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 танализированных эритроцитах и оптимальных условий для их сохранения.

Реакцию ставили в полистироловых пластинках. К 0,5 мл соответствовавшего разведения сыворотки (предварительно прогретой при 56° С в течение 30 минут и адсорбированной бараньими эритроцитами) добавляли каплю 2,5 % взвеси сенсibilизированных токсином эритроцитов. Содержимое пластинок тщательно перемешивали и оставляли при комнатной температуре. Реакцию учитывали через 3-4 и окончательно через 18-20 часов по четырехбалльной системе. За титр исследуемой сыворотки принимали наивысшее разведение, обеспечивавшее четкую положительную реакцию (++) при отрицательной реакции в контрольных лунках.

В каждом опыте контролировали испытуемые сыворотки в низшем разведении с контрольными эритроцитами (без антигена) на отсутствие антител к бараньим эритроцитам.

Опытный и контрольный диагностикумы проверяли на отсутствие спонтанной агглютинации в растворителе, применявшемся в данной реакции. Изложенная методика позволила получить стойкий эритроцитарный диагностикум для определения антител к стафилококковому токсину.

Далее мы попытались выяснить ряд методических вопросов, связанных с применением реакции непрямой гемагглютинации при изучении

стафилококковых инфекций, на модели стафилококковый токсин (анатоксин) - антитоксин [7, 8, 9].

Представлялось важным выяснить, насколько пригодны различные серии стафилококкового токсина для сенсibilизации эритроцитов. Проведенные испытания 5 серий, показали, что все препараты обладали хорошей сенсibilизирующей активностью, а полученные диагностикумы - высокой активностью при стандартизации с противостафилококковой сывороткой активностью 80 АЕ (табл. 1).

Полученные материалы свидетельствовали о высокой чувствительности реакции непрямой гемагглютинации для обнаружения антител к компонентам стафилококкового токсина.

Таблица 1

Сравнительное изучение сенсibilизирующей активности различных серий стафилококковых токсинов и анатоксинов

№ серии препарата		Максимальные титры противостафилококковой сыворотки
Токсины	462	1:320 000-1:640 000
	487	1:160 000-1:320 000
	427	1:160 000-1:320 000
	505	1:640 000-1:1 280 000
	507	1:320 000-1:1 280 000
Анатоксины	64-1	1:3 200
	65-2	1:6 400
	61-1	1:800
	62-1	1:200
	63-2	1:100

Далее

мы

попытались применить для сенсibilизации эритроцитов препараты

стафилококкового анатоксина (разные серии) и сравнить сенсibiliзирующую активность токсина. Полученные материалы свидетельствовали, что препараты стафилококкового анатоксина оказывали неодинаковое и значительно более слабое сенсibiliзирующее действие при взаимодействии с танализованными эритроцитами, чем препараты токсина. В то время как одни серии (65-2, 64-1) оказывали определенное сенсibiliзирующее действие на танализованные эритроциты и такие диагностикумы реагировали с противостафилококковой сывороткой в разведениях 1:3200 и 1:6400, другие серии анатоксина (62-1, 63-2) практически вообще были неспособны сенсibiliзировать танализованные эритроциты.

С целью подтверждения высокой специфичности и чувствительности реакции непрямо́й гемагглютинации мы применили реакцию ее торможения. Проведенные исследования показали, что предварительное добавление к разведениям противостафилококковой сыворотки нативного токсина приводило к нейтрализации соответствующих антител и значительному снижению титра антисыворотки в реакции непрямо́й гемагглютинации. Таким образом, результаты реакции торможения непрямо́й гемагглютинации подтвердили специфичность результатов, полученных в реакции непрямо́й гемагглютинации.

Особого внимания, как нам кажется, заслуживал вопрос о том, какими именно антигенными компонентами стафилококкового токсина обусловлена положительная реакция, зависит ли она от термолабильных (являющихся в основном собственно экзотоксинами) компонентов токсина или термостабильных, накопление которых происходит за счет лизиса бактериальных клеток и обусловлено в основном содержащимися в токсине растворимыми антигенами микробной клетки. Для ответа на эти вопросы мы получили препараты стафилококкового токсина, прогретые при 56 и 60⁰ С в течение 30 минут и при 100⁰ С в течение 20 мин. Этими прогретыми токсинами сенсibiliзировали эритроциты и сравнивали активность полученных

диагностикумов с активностью эритроцитов, сенсibilизированных нативным токсином.

Результаты исследования. Результаты проведенных испытаний (табл. 2) показали, что прогревание токсинов практически не влияло на их сенсibilизирующую активность по отношению к эритроцитам: танализированные эритроциты, сенсibilизированные токсинами прогретыми 56, 60 и 100⁰ С, проявляли примерно одинаковую активность и реагировали с противостафилококковой сывороткой почти в таких же разведениях, как и танализированные эритроциты, сенсibilизированные нативным стафилококковым токсином.

Изложенное позволило высказать предположение, что в реакции непрямой гемагглютинации выявляются не токсические (возможно, не столько токсические) компоненты стафилококкового токсина, которые очень чувствительны к нагреванию, а какие-то антигенные компоненты токсина, устойчивые к действию температурного фактора.

Таблица 2.

Реакция непряой гемагглютинации с нативным и гретыми стафилококковыми токсинами

Токсин, использованный для сенсibilизации	Максимальный титр противостафилококковой сыворотки
Нативный.....	1:640 000
Прогретый при 60 ⁰ С 30 мин.....	1:640 000
Прогретый при 60 ⁰ С 30 мин.....	1:320 000
Кипяченый при 100 ⁰ С 20 мин...	1:320 000

По-видимому, в серологических реакциях, в частности в реакции гемагглютинации, выявляются антигенные свойства токсина и микробной клетки, а не токсические компоненты стафилококкового токсина.

С целью подтверждения высказанного предположения и доказательства специфичности полученных данных мы применили реакцию торможения непрямой гемагглютинации. К последовательным разведениям противостафилококковой сыворотки (0,25 мл) добавляли в первом случае равные количества различных разведений нативного токсина, во втором - равные количества токсина, прогретого при 60° С в течение 30 мин. После соответствующей экспозиции (час при 37° и час при комнатной температуре) в качестве тест-системы применяли эритроциты, сенсibilизированные как нативным, так и прогретым при 60° С токсинами. Результаты перекрестных контрольных опытов показали, что добавление для нейтрализации антител противостафилококковой сыворотки токсинов как нативного, так и гретого оказывало вообще одинаковый эффект торможения независимо от того, каким токсином сенсibilизированы эритроциты тест-системы.

Полученные материалы свидетельствовавшие об однозначных результатах реакции с эритроцитами, сенсibilизированными как нативным токсином, так и гретым, подтверждали ранее полученные данные о том, что в реакции непрямой гемагглютинации проявляются в основном термостабильные антигенные компоненты стафилококкового токсина и выявляются соответствующие им антитела в антисыворотках.

В то же время проведенное изучение гемолитических свойств нативного и гретых токсинов (гемолитическим методом) показало, что прогревание токсинов приводило почти к полной потере гемолитических свойств токсинов.

Эти материалы подтверждали данные литературы, согласно которым при нагревании происходит практически почти полное разрушение наиболее устойчивой гемолитической функции стафилококкового токсина и полное разрушение его дермонекротической и летальной функции [12, 13, 14].

Следовательно, прогревание токсинов приводит к потере токсических свойств, но почти не влияет на антигенные компоненты стафилококкового токсина, которые проявляются в реакции непрямой гемагглютинации. Вероятно, при сенсibilизации танализированных эритроцитов как нативным, так и гретыми токсинами эритроцитами сорбируются только эти термостабильные компоненты, держащиеся в токсине, и выявляются в противостафилококковой сыворотке соответствующие антитела. Именно этим, по-видимому, и выясняется примерно одинаковая активность при тестировании с противостафилококковой сывороткой эритроцитов, сенсibilизированных как нативным, так и гретыми токсинами.

Выводы. 1. Определены оптимальные условия сенсibilизации формализированных бараньих эритроцитов нативным стафилококковым токсином и получен стойкий эритроцитарный стафилококковый диагностикум.

2. Различные серии стафилококкового токсина обладали высокой и примерно одинаковой сенсibilизирующей активностью, в то время как различные серии анатоксина обладают неодинаковой и значительно более слабой сенсibilизирующей активностью.

3. Прогревание токсинов не снижало их сенсibilизирующей активности. При помощи реакции торможения установлено, что в реакции непрямой гемагглютинации выявляются в основном антитела к термостабильным антигенным компонентам стафилококкового токсина.

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. Куанова Г.С. Стафилококки и стафилококковые инфекции бактериологические аспекты профилактики стафилококковых заболеваний // Вестник Атырауского университета. 2018;49(2):147-151.
4. Маматова М.Н. Study of the biological properties of rabies by the method of diagnosis of the "Gold standard" // Scientific Journal, Colden Brain. -2024, Volum 2 (4).
5. Негодова Е.В. Распространенность респираторных заболеваний среди детей гарнизона, роль стафилококковой инфекции в этиологии заболеваний органов дыхания // Глав.врач Юга России. 2011. №1 (24).
6. Николаева И. В., Анохин В. А. Стафилококковые инфекции в педиатрии // ПМ. 2010. №4.
7. 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).
8. Шайкулов, Х.Ш., Исокулова М.М. Характеристика энтеропатогенных кишечных палочек, выделенных у детей раннего возраста // Экономика и социум". -2023. №1(104).
9. Шайкулов Х.Ш., Исокулова М.М. Бактериоциногенная активность антибиотикоустойчивых штаммов стафилококков, выделенных в Самарканде // Перспективы развития науки в современном мире. - 2022.
10. Чернова О.Л. Антилизосимная активность стафилококков, выделенных при бактерионосительстве // Автореф. дис. канд. биол. наук. Челябинск, 1989. - С. 22.
11. Чернова О.Л. и др. Роль факторов персистенции Staphylococcus epidermidis в инфекционном процессе // Журн. микробиол. -1997. -№4. - С. 81-83.
12. Baselga R. Staphylococcus aureus capsule and slime as virulence factors in ruminant mastitis // Vet. Microbiol.-1994.-V.39.-N.3-4.-P. 195-204.

13. 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.
14. Welsch M. Le "lysozyme" des Staphylocoques. Compt. Rend // Soc. Biol.-1959. -Vol. 153.-P.2080-2083.