



УКРАЇНА

(19) UA (11) 60110 (13) A

(51) 7 G09B23/28

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІОПИС
ДО ДЕКЛАРАЦІЙНОГО ПАТЕНТУ
НА ВИНАХІДВидається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ МОДЕЛЮВАННЯ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ ДИФТЕРІЙНОЇ ІНТОКСИКАЦІЇ

1

2

(21) 2003010803

(22) 30 01 2003

(24) 15 09 2003

(46) 15 09 2003, Бюл. № 9, 2003 р.

(72) Колесников Михайло Михайлович, Петруше-
вич Тетяна Володимирівна(73) НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМ. О.О. БОГОМОЛЬЦЯ

(57) Спосіб моделювання експериментальної дифтерійної інтоксикації, що передбачає щоденне підшкірне введення морським свинкам дробних доз дифтерійного токсину до розвитку дифтерійної інтоксикації, який відрізняється тим, що за місяць до введення дифтерійного токсину морських свинок імунізують анатоксином дифтерійно-правцевим очищеним адсорбованим із зменшенням вмістом антигенів в дозі, яка містить 2 флокулюючі одиниці (0,2 мл), а далі на основі встановленого поствакцинального рівня протидифтерійних антитіл морських свинок поділяють на три групи - з

низьким, середнім та високим рівнем антитіл, після чого тваринам дрібно вводять дифтерійні антигени в такій послідовності: першу ін'єкцію дифтерійного анатоксину, через 2 години другу ін'єкцію дифтерійного анатоксину та першу ін'єкцію дифтерійного токсину, через 24 години третю останню ін'єкцію дифтерійного анатоксину та другу ін'єкцію дифтерійного токсину, через 24 години після першої ін'єкції дифтерійного анатоксину фіксують рівень падіння протидифтерійних антитіл, в разі падіння поствакцинального рівня більш ніж в 4 рази, або до повної відсутності протидифтерійних антитіл тваринам з низьким, середнім та високим рівнем антитіл щоденно підшкірно вводять дрібні дози дифтерійного токсину з антигенним навантаженням по 4, 15, 20 мінімальних смертельних доз, відповідно, до розвитку загальної картини дифтерійної інтоксикації і далі до загибелі тварин.

Винахід, який заявляється, стосується галузі експериментальної медицини, епідеміології та імунології і призначений для відтворення патогенетичного механізму виникнення дифтерійної інтоксикації на тваринах.

Сучасна епідемія дифтерії, яка проходить на тлі охоплення 98,7% населення України профілактичними протиепідемічними щепленнями [1], призвела до необхідності визначення причин та механізмів виникнення тимчасової сприйнятливості до дифтерійного токсину у щеплених. При дифтерії головним фактором патогенності є токсин, який патогенетично обумовлює токсико-інфекційний характер захворювання, а імунорезистентність, яка забезпечується природною та штучною імунізацією, має антитоксичну направленість. При відсутності резистентності у інфікованого збудником дифтерії організму, як правило, розвиваються клінічні форми прояву інфекції. Значна частка захворюваності щеплених дозволяє припустити, що хворіють не лише так звані "рефракторні" щеплені та особи з титрами нижче захисних, а можливі і ті, кого вважають імунними на момент

інфікування збудником дифтерії. Щоб проявилася дія токсину в такому організмі необхідно виникнення стану сприйнятливості. Патогенетичним механізмом виникнення сприйнятливості може бути гіпо- і, навіть, десенсибілізація (деімунізація) організму факторами патогенності збудників (феномен Безредка), які паразитують, активно розмножуються та продукують токсини в місці специфічної локалізації. Для токсину в період розвитку гіпосенсибілізації та досягнення десенсибілізації відбувається за законом розвитку парадоксальної чутливості до токсинів (феномен Беринга) [2] і триває до початку імунної активності, в тому числі вторинної відповіді організму на дифтерійний антиген, що надійшов природним шляхом під час інкубаційного періоду хвороби. Такий процес більш активно відбувається в осіб, які часто хворіють на системну патологію, патогенетичне пов'язану з клінікою інфекційної хвороби.

Питання про причини захворюваності і, навіть, загибелі від дифтерії осіб, щеплених проти цієї інфекції, до теперішнього часу залишається невирішеним і зберігає актуальність.

(13) A

(11) 60110

(19) UA

Існуючі способи моделювання дифтерійної інтоксикації базуються на феномені парадоксальної чутливості до токсинів, який полягає в тому, що при щоденному підшкірному введенні 1/10 мінімальної смертельної дози дифтерійного токсину свинка гине від дифтерійної інтоксикації раніш, аніж отримає половину дози отрути [2]. Проте вони не дозволяють вирішити питання про механізм виникнення захворювання на дифтерію щеплених, оскільки вони відтворюють інфекцію на неімунних організмах і не враховують можливості виникнення стану тимчасової сприйнятливості до дифтерійного токсину у випадку наявності в крові циркулюючих протидифтерійних анитоксичних антитіл, захисної дії яких можливо позбутися шляхом десенсибілізації організму факторами патогенності збудника, які він продукує в місці специфічної локалізації.

Так, відомий спосіб моделювання експериментальної дифтерійної інтоксикації (прототип) передбачає щоденне підшкірне дробне введення морським свинкам 1/10, 1/20, 1/100 та 1/1000 Dlm (мінімальна смертельна доза) дифтерійного токсину. На 3-7 добу після введення 4/20 та 7/100 Dlm у них утворюються інфільтрати в місці ін'єкції, а при дозі 3/10 Dlm розвивається місцевий некроз. При подальшому щоденному введенні дробних доз токсину у свинки розвивається загальна картина дифтерійної інтоксикації (млявість, задуха, втрата ваги), після сумарних доз 5/10, 6/10, 5/20 та 9/100 Dlm тварини гинуть від дифтерійної інтоксикації. При одноразовому введенні сумарних доз 5/20 та 9/10 Dlm спостерігається лише місцева реакція (розвиток інфільтрату та некрозу), тварини залишаються живими [2]. Вказаний спосіб моделювання експериментальної дифтерійної інтоксикації доводить ефект потенціювання токсичних подразнень, але він відтворюється на неімунних організмах, що не дозволяє вивчати механізм виникнення захворювання у щеплених.

Завдання, яке вирішується у даному винаході, полягає у відтворенні дифтерійної інтоксикації на морських свинках, щеплених за місяць до експерименту адсорбованим дифтерійно-правцевим анатоксином очищеним із зменшеним вмістом антигенів (АДП-м-анатоксин), тобто на імунних морських свинках з встановленим рівнем протидифтерійних антитіл, що цілком є адекватною моделлю відтворення механізму виникнення захворювання на дифтерію щеплених.

Технічний ефект буде полягати у можливості відтворення механізму виникнення тимчасової сприйнятливості імунних організмів до дифтерійного токсину, що пояснює реальну можливість виникнення захворювання та летальних випадків від дифтерійної інтоксикації в умовах масової імунізації населення, на цій основі з'ясовується необхідність проведення комплексу профілактичних заходів серед осіб, які часто хворіють на системну патологію, патогенетично пов'язану з клінікою інфекційної хвороби, з обов'язковим визначенням рівня імунності у вищезначених осіб.

Поставлена задача вирішується тим, що у відомому способі моделювання експериментальної дифтерійної інтоксикації, що передбачає щоденне підшкірне введення морським свинкам дробних

доз дифтерійного токсину до розвитку дифтерійної інтоксикації, згідно винаходу за місяць до введення дифтерійного токсину морських свинки імунізують анатоксином дифтерійно-правцевим очищеним, адсорбованим із зменшеним вмістом антигенів (АДП-м-анатоксином) в об'ємі 0,2 мл (2 флокулюючі одиниці ДА), на основі встановленого поствакцинального рівня протидифтерійних антитіл морських свинки поділяють на три групи - з низьким, середнім та високим рівнем антитіл, після чого тваринам вводять дробні дози дифтерійних антигенів в такий послідовності: першу ін'єкцію дифтерійного анатоксину, через 2 години другу ін'єкцію дифтерійного анатоксину та першу ін'єкцію дифтерійного токсину, через 24 години третю останню ін'єкцію дифтерійного анатоксину та другу ін'єкцію дифтерійного токсину, через 24 години після першої ін'єкції дифтерійного анатоксину фіксують рівень падіння протидифтерійних антитіл, в разі падіння поствакцинального рівня більш ніж в 4 рази, або до повної відсутності протидифтерійних антитіл тваринам з низьким, середнім та високим рівнями антитіл щоденно підшкірно вводять дробні дози дифтерійного токсину в дозі 1 мл з антигенним навантаженням по 4, 15, 20 мінімальних смертельних доз, відповідно, до розвитку загальної картини дифтерійної інтоксикації і далі до загибелі тварин.

Відмінною особливістю способу, що заявляється, є попереднє щеплення морських свинки АДП-м-анатоксином в дозі, яка містить 2 флокулюючі одиниці ДА (0,2 мл), тобто проведення експерименту на імунних тваринах, далі шляхом дробного введення ім дифтерійних антигенів за такою схемою: перша ін'єкція дифтерійного анатоксину, через 2 години друга ін'єкція дифтерійного анатоксину та перша ін'єкція дифтерійного токсину, через 24 години третя остання ін'єкція дифтерійного анатоксину та друга ін'єкція дифтерійного токсину, досягають стану тимчасової сприйнятливості до дифтерійного токсину, який тестують в реакції пасивної гемаглютинації через 24 години після першої ін'єкції дифтерійного анатоксину по падінню титрів протидифтерійних антитіл більш ніж в 4 рази, або до повної відсутності протидифтерійних антитіл, і тільки на цьому тлі щоденне підшкірне введення дробних доз дифтерійного токсину призводить до розвитку загальної картини дифтерійної інтоксикації (млявість, задуха), при подальшому введенні дробних доз дифтерійного токсину спостерігається загибель тварин від дифтерійної інтоксикації.

За доступними літературними даними такий спосіб моделювання експериментальної дифтерійної інтоксикації не відомий.

Запропонований спосіб моделювання експериментальної дифтерійної інтоксикації здійснюється наступним чином.

Згідно з заявленим способом моделювання експериментальної дифтерійної інтоксикації в якості біологічного об'єкту обрані морські свинки птадокошерстої породи, які відповідають вимогам відтворення дифтерійної інтоксикації. Для імунізації тварин був використаний АДП-м-анатоксин. Протидифтерійні антитіла визначали в реакції пасивної гемаглютинації (РИГА) за загальноприйнятою

методикою на 5, 7, 14, 30 добу після вакцинації з визначенням кількісних параметрів. Активність дифтерійного анатоксину 320Lf (Limes flocculation - флокулююча одиниця) та активність дифтерійного токсину 60 Dlm (мінімальна смертельна доза) підтверджені в реакції нейтралізації антитіл (РНАт), дифтерійного токсину - додатково за допомогою біологічної проби на тваринах.

Морських свинок з середньою вагою 600 г за місяць до експерименту щеплюють АДП-анатоксином в дозі, яка містить 2Lf ДА (0,2 мл), через місяць після вакцинації визначають рівень протидифтерійних антитіл 0,06-4МО/мл. При моделюванні дифтерійного імунітету під впливом АДП-анатоксину в дозі, яка містить 2Lf ДА (0,2 мл) встановлюють розвиток імунної відповіді у всіх тварин, при меншій дозі реєструють утворення протидифтерійних антитіл лише у частини тварин. На основі поствакцинального рівня протидифтерійних антитіл морських свинок поділяють на три групи з низьким (0,06 МО/мл), середнім (0,125-0,25 МО/мл) та високим (0,5-4МО/мл) рівнями антитіл.

Подібно до зараження живих організмів коринобактеріями дифтерії, розмноження збудника, продукування токсину та здійснення при цьому гіпо- та специфічної десенсибілізації (деімунізації) експериментальним тваринам вводять індивідуальні, відповідні імунності, дробні дози антигену - дифтерійного анатоксину (ДА). Індивідуальну дозу ДА розраховують за наступною схемою:

середня кількість циркулюючої крові морської свинки складає 7,14мл на 100 г ваги тварини [3], при відомій вазі тварини (m) в г об'єм циркулюючої крові (V) в мл визначається за такою формулою

$$V = \frac{7,14 \times m}{100},$$

2V - об'єм циркулюючої крові з урахуванням депо крові,

кількість антитіл МО у морської свинки складає

кількість антитіл МО/мл \times об'єм циркулюючої крові (з урахуванням або без урахування депо крові тварини)

$$1 \text{ МО/мл} = 1 \text{ Лf/мл}$$

Одноразове введення розрахованої дози ДА тваринам з встановленими рівнями протидифтерійних антитіл призводить до падіння поствакцинальних рівнів більш ніж в 4 рази, або до повної відсутності протидифтерійних антитіл в крові - стан тимчасової сприйнятливості до дифтерійного токсину, який триває 24-48 годин. Після цього титри протидифтерійних антитіл починають зростати. Падіння поствакцинальних титрів антитіл в 2 рази недостатнє для відтворення експериментальної дифтерійної інтоксикації, введення на цьому тлі ДТ не призводить до виникнення захворювання. Згідно з запропонованою методикою, стан тимчасової сприйнятливості до дифтерійного токсину досягають кількаразовим введенням дифтерійних антигенів (анатоксину та токсину). Розраховану індивідуальну дозу ДА поділяють на три ін'єкції, що є достатнім для досягнення стану тимчасової сприйнятливості до дифтерійного токсину і вводять за наступною схемою: перша ін'єкція, через 2 години друга, через 24 години третя, одночасно з другою ін'єкцією ДА вводиться перша доза диф-

терійного токсину. Через 24 години після першої ін'єкції ДА фіксують рівень падіння протидифтерійних антитіл, в разі падіння поствакцинального титру більш ніж в 4 рази, або до повної відсутності протидифтерійних антитіл тваринам з низьким, середнім та високим рівнем антитіл щоденно підшкірно вводять дробні дози ДТ з антигенним навантаженням по 4, 15, 20 мінімальних смертельних доз, відповідно, до розвитку загальної картини дифтерійної інтоксикації і далі до загибелі тварин. Встановлено, що для тварин з низьким, середнім та високим рівнями імунності обране щоденне антигенне навантаження ДТ 4, 15, 20 Dlm, відповідно, що в середньому складає 1/100 від одноразової дози ДТ, яка призводить до нейтралізації протидифтерійних антитіл та виникнення дифтерійної інтоксикації в групі тварин де не проводилась десенсибілізація, є ефективним, а щоденне введення доз із меншим антигенним навантаженням призводить до виникнення дифтерійної інтоксикації у незначній кількості тварин. Методом внутрішньосерцевої пункції кількаразово на протязі експерименту проводять забор крові для контролю коливань рівня протидифтерійних антитіл в РПГА.

Приклад 1. Морських свинок імунізують АКДП-анатоксином в дозі, яка містить 2Lf ДА (0,2 мл), через місяць після імунізації відбирають 7 тварин з рівнем протидифтерійних антитіл 0,06МО/мл (низький рівень - титр антитіл 1:20). Піддослідним тваринам підшкірно вводять 1мл ДА з антигенним навантаженням, яке складає 1/3 від розрахованої та зменшеної в два рази дози ДА (без урахування депо крові), через 2 години вводять ще 1мл ДА з таким же антигенним навантаженням, одночасно з другою ін'єкцією ДА вводиться ДТ в дозі 1 мл з антигенним навантаженням 4 Dlm, через 24 години після першої ін'єкції ДА вводять останню дозу ДА разом з 1мл (4 Dlm) ДТ, далі щоденно вводять тільки ДТ у вищенаведений дозі до розвитку загальної картини дифтерійної інтоксикації, подальше введення ДТ призводить до загибелі тварин від дифтерійної інтоксикації. Через 24 години після першого введення ДА (вже зроблені 2 ін'єкції ДА та 1 ін'єкція ДТ) в реакції пасивної гематїїнації реєструють відсутність протидифтерійних антитіл в крові. На цьому тлі при кількаразовому введенні дробних доз ДТ спостерігають розвиток у морських свинок млявості, задухи, загибель тварин відбувається після 3-4 ін'єкцій (12 -16 Dlm), що складає в середньому 1/27, а 4 Dlm складає 1/96 від розрахованої одноразової дози ДТ, яка призводить до нейтралізації циркулюючих протидифтерійних антитіл та виникнення дифтерійної інтоксикації в групі тварин, де не проводилась десенсибілізація (деімунізація). Серед контрольних імунних тварин з низьким рівнем протидифтерійних антитіл щоденне підшкірне введення дробних доз ДТ з одноразовим антигенним навантаженням 4 Dlm (без попередньої десенсибілізації) не призводить до виникнення захворювання.

Приклад 2. Морських свинок імунізують АКДП-анатоксином в дозі, яка містить 2Lf ДА (0,2 мл), через місяць після імунізації відбирають 9 морських свинок з рівнем протидифтерійних антитіл 0,125 - 0,25 МО/мл (середній рівень - титр антитіл

1 40 - 1 80) Піддослідним тваринам підшкірно вводять 1 мл ДА з антигенним навантаженням, яке складає $\frac{1}{3}$ від розрахованої дози ДА (без урахування депо крові), через 2 години вводять ще 1 мл ДА з таким же антигенним навантаженням, одночасно з другою ін'єкцією ДА вводиться ДТ в дозі 1 мл з антигенним навантаженням 15 DIm, через 24 години після першої ін'єкції ДА вводять останню дозу ДА разом з 1 мл (15 DIm) ДТ, далі щоденно вводять тільки ДТ у вищенаведеній дозі до розвитку загальної картини дифтерійної інтоксикації, подальше введення ДТ призводить до загибелі тварин від дифтерійної інтоксикації. Падіння рівня протидифтерійних антитіл відмічено через 24 години після першого введення ДА (вже зроблені 2 ін'єкції ДА та 1 ін'єкція ДТ) до 0,03-0,06 МО/мл (в середньому в 6 разів). На цьому тлі при кількарázовому введенні дробних доз ДТ розвиток у тварин задухи та млявості відбувається після трьох ін'єкцій ДТ, загибель тварин відбувається після 4-5 ін'єкцій (60-75 DIm), що складає в середньому $\frac{1}{24}$, а 15 DIm складає $\frac{1}{107}$ від розрахованої одноразової дози ДТ, яка призводить до нейтралізації циркулюючих протидифтерійних антитіл та виникнення дифтерійної інтоксикації в групі тварин, де не проводилась десенсибілізація (деімунізація). Серед контрольних імунних тварин з середнім рівнем протидифтерійних антитіл щоденне підшкірне введення дробних доз ДТ (без попередньої десенсибілізації), з одноразовим антигенним навантаженням 15 DIm не призводить до виникнення захворювання.

Приклад 3. Морських свинок імунізують АКДП-м-анатоксином в дозі яка містить 2 Lf ДА (0,2 мл), через місяць після імунізації відбирають 8 тварин з рівнем протидифтерійних антитіл 0,5-4 МО/мл (високий рівень - титр антитіл 1 160 - 1 1280). Піддослідним тваринам підшкірно вводять 1 мл ДА з антигенним навантаженням, яке складає $\frac{1}{3}$ від розрахованої дози ДА (з урахуванням депо крові тварин) через 2 години вводять ще 1 мл ДА з таким же антигенним навантаженням, одночасно з другою ін'єкцією ДА вводиться ДТ в дозі 1 мл з антигенним навантаженням 20 DIm, через 24 години після першої ін'єкції ДА вводять останню дозу ДА разом з 1 мл (20 DIm) ДТ, далі щоденно вводять тільки ДТ у вищенаведеній дозі до розвитку загальної картини дифтерійної інтоксикації, подальше введення призводить до загибелі тварин від дифтерійної інтоксикації. Падіння рівня протидифте-

рійних антитіл відмічено через 24 години після першого введення ДА (вже зроблені 2 ін'єкції ДА та 1 ін'єкція ДТ) до 0,06-0,25 МО/мл (в середньому в 12 разів), на цьому тлі при кількарázовому введенні дробних доз ДТ спостерігають розвиток задухи, млявості у морських свинок після трьох ін'єкцій ДТ, загибель тварин відбувається після 4-5 ін'єкцій (80-100 DIm), що складає в середньому $\frac{1}{21}$, а 20 DIm складає $\frac{1}{96}$ від розрахованої одноразової дози ДТ, яка призводить до нейтралізації циркулюючих протидифтерійних антитіл та виникнення дифтерійної інтоксикації в групі тварин, де не проводилась десенсибілізація (деімунізація). Серед контрольних імунних тварин з середнім рівнем протидифтерійних антитіл щоденне підшкірне введення дробних доз ДТ (без попередньої десенсибілізації) з одноразовим антигенним навантаженням 20 DIm не призводить до виникнення захворювання.

Таким чином, запропонований спосіб не тільки підтверджує ефект потенціювання токсичного подразнення (феномен Беринга), а й дозволяє відтворити механізм виникнення тимчасової (на протязі 24-48 год) сприйнятливості організму до дифтерійного токсину в залежності від рівня імунності. На тлі тимчасової сприйнятливості надходження незначних дробних доз дифтерійного токсину може призвести до розвитку інфекційного процесу, що пояснює реальну можливість виникнення захворювання та петальних випадків від дифтерії в умовах масової імунізації населення. На цій основі з'ясовується необхідність проведення комплексу профілактичних заходів серед осіб, які часто хворіють на системну патологію патогенетичне пов'язану з клінікою інфекційної хвороби.

Література

- 1 Бобильова О О, Бережнов В П, Мухарська Л М та інш. Досягнення та перспективи охорони здоров'я в галузі імунопрофілактики населення України // "Сучасні інфекції" - 2001 - №2 - С 4-9
- 2 Здродовский П Ф. Проблемы инфекции, иммунитета и аллергии - 1969 - С 104-105
- 3 Западнюк И В, Западнюк В И и др. Лабораторные животные. Разведение, содержание, использование в эксперименте - 1983 - с 226
- 4 Здродовский П Ф. Явления суммации специфических раздражений в инфекционно-токсических и иммунологических процессах и их значение // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии - 1952 - №7 - С 3-12