АКАДЕМИЯ НАУК РЕСПУБЛИКИ БАШКОРТОСТАН
ОТДЕЛЕНИЕ МЕДИЦИНСКИХ НАУК
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИСПЫТАТЕЛЬНЫЙ
ИНСТИТУТ ВОЕННОЙ МЕДИЦИНЫ МИНИСТЕРСТВА ОБОРОНЫ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

**Р.Ш. Магазов, А.П. Савельев, О.П. Мисников,
С.В. Чепур, В.Н. Быков, А.В. Степанов**

ВАКЦИНОПРОФИЛАКТИКА КЛОСТРИДИАЛЬНЫХ ИНФЕКЦИЙ

Под редакцией Р.Ш. Магазова

Гилем

Уфа-2016

БАШКОРТ
ЭНЦИКЛОПЕДИЯҺЫ
БАШКИРСКАЯ
ЭНЦИКЛОПЕДИЯ

Светлой памяти нашего дорогого Учителя
заслуженного деятеля науки Российской Федерации,
лауреата Государственной премии СССР и премии
Правительства Российской Федерации,
доктора медицинских наук, профессора, генерала
ГАПОЧКО Константина Георгиевича

и нашего друга, соратника
заслуженного врача Российской Федерации,
заслуженного деятеля науки Республики Башкортостан,
лауреата премии Совета Министров СССР,
доктора медицинских наук, профессора
МЕЛЬНИКОВА Владимира Николаевича
посвящается

УДК 615.1
ББК 52.6
В 14

Издание осуществлено при содействии
Фонда поддержки научных исследований АН РБ

Рецензенты:
Ю.В. Лобзин, академик РАН, директор НИИ детских инфекций ФМБА РФ
А.Р. Мавзютов, доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой фундаментальной и прикладной микробиологии БГМУ МЗ РФ

В 14 **Магазов Р.Ш., Савельев А.П., Мисников О.П., Чепур С.В., Быков В.Н., Степанов А.В.** Вакцинопрофилактика клостридиальных инфекций / под ред. Р.Ш. Магазова. – Уфа: Гилем, Башк. энцикл., 2016. – 288 с.

ISBN 978-5-88185-293-1

В монографии обобщен многолетний опыт ведущих научных учреждений страны (Научно-производственного объединения «Иммунопрепарат» Минздрава РФ и Научно-исследовательского испытательного института военной медицины Минобороны России) в области разработки средств вакцинопрофилактики клостридиальных инфекций и внедрения их в противоэпидемическую практику.

Предназначена для эпидемиологов, микробиологов, инфекционистов и научных сотрудников, занимающихся вопросами вакцинологии.

УДК 615.1
ББК 52.6

© Магазов Р.Ш., Савельев А.П., Мисников О.П., Чепур С.В., Быков В.Н., Степанов А.В., 2016
© Издательство «Гилем» НИК «Башкирская энциклопедия», 2016

ISBN 978-5-88185-293-1

Перечень сокращений, условных обозначений, символов, единиц и терминов

АМЧ – абсолютное количество макрофагов
АТ – антитела
БТВ – вакцина брюшнотифозная
ВВ – вирус вакцины
ВЖЛ – вакцина желтой лихорадки
ВОЖС – вакцина оспенная живая сухая
ВКЭ – вакцина клещевого энцефалита
ВЧЖС – вакцина чумная живая сухая
ГЗТ – гиперчувствительность замедленного типа
ГНТ – гиперчувствительность немедленного типа
ДМВ – двухэтапный метод вакцинации
ИБ – инфекционные болезни
Иг – иммуноглобулин
ИРЛ – интерфероновая реакция лейкоцитов
Кон-А – конканавалин А
КПЭ – клетки перитонеального экссудата
КИЛП – комплекс иммунобиологических лекарственных препаратов
$ЛД_{50}$ – 50% летальная доза
ИЛП – иммунобиологический лекарственный препарат
МПО – миелопероксидаза
Мф – макрофаг
МГР – медико-географический регион
ОК – оспа кроликов
ПБЗ – противобактериологическая защита
ПДК – предельно допустимая концентрация
РАИ – раневая анаэробная инфекция
РСК – реакция связывания комплемента

Башкирская энциклопедия

С – секстаанатоксин
СГТА – средний геометрический титр антител
СИП – средство иммунопрофилактики
СТВ – вакцина сыпнотифозная
ТА – тетраанатоксин адсорбированный очищенный жидкий
$ТКИД_{50}$ – 50% тканевая инфекционная доза
ТЭОВак – вакцина оспенная эмбриональная живая (таблетки)
ФИ – фагоцитарный индекс
ФЧ – фагоцитарное число
ХВ – вакцина холерная
ЦИК – циркулирующий иммунный комплекс
EMC – вирус энцефаломиокардита мышей
GRA – гранулоциты
GRA% – количество гранулоцитов, %
HASA – нафтол-AS-ацетатэстераза
HGB – гемоглобин
HCT – гематокрит
LYM – лимфоциты
LYM% – лимфоцитов, %
MCH – среднее содержание гемоглобина в эритроцитах
MCHC – средняя концентрация гемоглобина в эритроцитах
MCV – средний объем эритроцитов
MON – моноциты
MON% – моноцитов, %
MPV – средний объем тромбоцитов
PCT – тромбокрит
PDWc – широта распределения популяции тромбоцитов по объему
PLT – тромбоциты
RBC – эритроциты
VVS – вирус везикулярного стоматита
WBC – лейкоциты

БАШКИРСКАЯ ЭНЦИКЛОПЕДИЯ

ВВЕДЕНИЕ

Клостридиальные инфекции – ботулизм, газовая гангрена, столбняк и другие непатогенные и патогенные клостридиозы, представляют распространенные болезни людей и животных, вызываемые бактериями рода клостридий. Они наносят ощутимый ущерб здоровью населения. Смертность и инвалидизация от ботулизма, столбняка, газовой гангрены и клостридиальных энтероколитов весьма значительна.

Разработка и осуществление мероприятий по борьбе с клостридиозами во второй половине XIX в., в течение всего XX в. являлись и остаются предметом серьезного внимания ученых и практических врачей.

Интенсивные научные исследования, особенно в XX в., направленные на раннюю диагностику, лечение и профилактику анаэробных клостридиальных инфекций, позволили достичь определенных успехов в борьбе с этим грозным соперником.

Серьезные результаты были получены в изучении природы патогенных клостридий, отдельных звеньев патогенеза, клиники и эпидемиологии клостридиозов.

Существенный вклад отечественных и зарубежных ученых был сделан в познание природы специфических токсинов клостридий, а также в исследования иммуногенности нативных и очищенных сорбированных анатоксинов, что послужило основой для создания и внедрения в противоэпидемическую практику высокоэффективных ассоциированных вакцинных препаратов.

Научные коллективы под руководством Т.И. Булатовой, П.Н. Бургасова, А.А. Воробьева, Г.В. Выгодчикова, К.Г. Гапочко, К.И. Матвеева, В.Н. Мельникова, Р.Ш. Магазова и др. внесли неоценимый вклад в учение о патогенных анаэробных клостридиальных инфекциях, в разработку и внедрение в противоэпидемическую практику полианатоксинсодержащих препаратов.

В результате многочисленных экспериментальных исследований на животных и в клинико-иммунологических испытаниях на людях были обоснованы высокоэффективные анатоксинсодержащие ассоциированные иммунобиологические лекарственные препараты – брюшнотифозная вакцина с секстаанатоксином, секста-анатоксин, тетра-(три)анатоксин и др.

Именно при конструировании многокомпонентных анатоксинсодержащих препаратов достигнуты наибольшие успехи в создании

методов изготовления, очистки, концентрации, сорбции и обезвреживании токсинов патогенных клостридий, о чем свидетельствует перечень внедренных в практику ассоциированных препаратов.

В предлагаемой работе авторы обобщили опыт многочисленных разработчиков полианатоксинов и результаты собственных исследований, представили анализ литературных данных и историческую справку о развитии анатоксинсодержащих ассоциированных вакцинных препаратов.

Важно подчеркнуть, что наряду с разработкой полианатоксинов против актуальных клостридиозов были разработаны методы изготовления анатоксинов для комбинированных вакцин, включающих в свой состав препараты против клостридий и других инфекций (кишечных, детских – ТАВТе, АКДС, АДС, БУБО-м и др.).

К сожалению, необходимо констатировать, что в настоящее время в стране кардинально снизилась настороженность в отношении профилактики клостридиальных анаэробных инфекций. В 1995 г. «по экономическим» соображениям было прекращено производство сухого сорбированного секстаанатоксина, практически заморожен выпуск тетра (три)анатоксина против ботулизма и раневых инфекций. Этот закономерный опасно отрицательный результат – детище близорукой политики, разрушившей национальную систему управления экономикой, ликвидировавшей надежно испытанного противоэпидемического и санитарного щита государства – санэпидемстанций, десяти институтов вакцин и сывороток и девяти промпредприятий, успешно производящих жизненно важные медицинские иммунобиологические, в том числе вакцинные, препараты. Авторы надеются и уверены, что конструктивно мыслящие государственные умы Российской Федерации, по-настоящему заботящиеся о стране, жизни, здоровье и материальном благополучии населения, и далее будут обеспечивать их безопасность, защиту от эпидемий и биотерроризма, а значит, будут прилагать усилия для сохранения государственных комплексов научных институтов вакцин и сывороток с производственными предприятиями и для восстановления государственных санэпидемстанций.

В то же время необходимо подчеркнуть, что сохранилась последовательная работа в отношении иммунопрофилактики столбняка, анатоксин которого широко применяется в составе АКДС, АДС, АС, БУБО-М.

Однако такое грозное смертельное заболевание, как анаэробная клостридиальная раневая инфекция, в настоящее время абсо-

лютно не рассматривается вопросами прививочной профилактики. Снижение летальности и инвалидности раненых при осложнении ранений анаэробной клостридиальной инфекцией на современном уровне наших знаний достигается своевременной диагностикой, качественно выполненным хирургическим вмешательством с привлечением методов гипербарической оксигенации, антибиотикотерапии и полноценной трансфузионно-инфузионной терапии.

Однако существенный прогресс в борьбе с этой инфекцией может быть достигнут только с помощью своевременной активной иммунопрофилактики.

Авторы считают, что систематизированное изложение данных об этиологии, эпидемиологии, патогенезе и основных клинических признаках клостридиозов, об этапах развития средств вакцинопрофилактики клостридиальных инфекций, экспериментальных и клинико-иммунологических исследованиях наиболее известных полианатоксинсодержащих иммунобиологических лекарственных препаратов явится основой для дальнейших теоретических изысканий и практических мероприятий в борьбе с этой инфекцией.

Таким образом, целью работы явилось рассмотрение актуальных проблем иммунопрофилактики анаэробной инфекции и изложение перспектив ее развития.

Многолетние исследования, результаты которых изложены в настоящей монографии, выполнены под руководством заслуженного деятеля науки РФ, лауреата Государственной премии СССР и премии Правительства РФ, доктора медицинских наук, профессора, генерал-майора К.Г. Гапочко, заслуженного врача РФ, заслуженного деятеля науки, лауреата премии Совета Министров СССР, доктора медицинских наук, профессора В.Н. Мельникова.

Авторы приносят глубокую благодарность коллективу научных сотрудников, принимавших в разные годы непосредственное участие в проведенных исследованиях: Ю.А. Шаронову, Р.Г. Дашкину, Ф.Ф. Чекминой, Е.Н. Воробьевой, Р.А. Афанасьевой, А.А. Пушкареву, Г.А. Атамановой, В.Я. Яковлевой, М.А. Мугиновой, С.Ю. Бикбулатовой, В.П. Царапкину, В.Ш. Хасановой, Л.М. Веркиной, В.И. Гончарову, С. И. Коновалову, М.А. Мисниковой, В.Б. Мокроусову, О.Д. Семенову, Н.В. Пак, И.А. Добрыниной, О.В. Хлопуновой, Н.А. Рязанцевой, Т.С. Титовой, В.А. Харитоновой, А.И. Шевченко.

Особую благодарность авторы выражают Ю.В. Лобзину, А.Р. Мавзютову, а также О.В. Чубарю за помощь на завершающем этапе работы над книгой.

ГЛАВА 1

ЭПИДЕМИОЛОГИЯ КЛОСТРИДИАЛЬНЫХ ИНФЕКЦИЙ

Клостридиальные инфекции составляют многочисленную группу (более 90 видов) анаэробных микроорганизмов, обладающих рядом весьма характерных общих свойств, и вследствие этого их таксономическое объединение представляется оправданным [1].

Объединение рассматриваемых микроорганизмов в пределах рода базируется на принципиальном сходстве большого числа морфологических, тинкториальных, культуральных, физиологических и отчасти серологических свойств. Оно признается достаточно обоснованным и с точки зрения молекулярно-биологических критериев таксономии [2, 3].

Клостридиальные клетки относительно крупного размера, продолговатой формы, иногда нитевидные. Они образуют споры, нередко больших размеров, чем сама клетка. Если спора при этом расположена центрально, микробная клетка напоминает по форме веретено. На основании этого сходства для микроорганизмов данной группы предложено родовое название клостридии [1].

Клостридии окрашиваются по грамму. Многие из них подвижны, имеют жгутики. Характерной особенностью их физиологии является анаэробный характер энергетических процессов. Биохимически клостридии характеризуются отсутствием каталазы. Общими экологическими признаками всех видов рода являются способность к сапрофитическому существованию, высокая степень устойчивости к неблагоприятным воздействиям физико-химических условий среды, обеспечиваемая спорообразованием, а также убиквитарность.

Различные виды рода клостридий, как патогенные, так и непатогенные, являются родственными в антигенном отношении, хотя и имеют ряд очень существенных особенностей.

В литературе существует несколько подходов в плане классификации клостридиальных инфекций, но наиболее распространенной считается экологическая, объединяющая их в три группы:

1. Возбудители процессов брожения, около 40 видов клостридий. Обладают способностью сбраживать простые или сложные углеводы;

2. Возбудители процессов гниения, число видов этой группы достаточно велико (около 30); обе эти группы характеризуются тем, что в их составе нет патогенных представителей клостридий;

3. Сравнительно немногочисленную группу составляют патогенные клостридии. Они поражают как людей, так и различные виды сельскохозяйственных, домашних и диких животных.

Известна также классификация клостридиозов, основанная на эпидемиологических принципах [1]. Она выделяет энтеральные (ботулизм, некротический энтерит, клостридиальный гастроэнтерит, инфекционная энтеротоксемия, брадзот, клостридиальная дизентерия молодняка) и травматические (столбняк, травматические газовые инфекции, эмфиматозный карбункул) клостридиальные инфекции.

Перечень клостридиальных инфекций возглавляют ботулизм, столбняк и газовая гангрена. Известны также такие клостридиозы, как некротический энтерит, геморрагический энтероколит, брадзот, энтеротоксин и др., поражающие преимущественно животных.

Клостридии – возбудители ботулизма, газовой гангрены и столбняка, широко распространены в природе и представляют опасность для человека, поскольку естественный иммунитет к их токсинам у него отсутствует.

Заболевания, вызываемые этими токсигенными бактериями известны давно. Особую опасность они представляют во время военных действий.

Клостридиальные инфекции относятся к анаэробным инфекциям и считаются одним из самых тяжёло протекающих, зачастую со смертельным исходом, инфекционных заболеваний, которые приводят к развитию выраженной эндогенной интоксикации с поражением жизненно важных органов и систем.

Они выделяют токсины, являющиеся основными факторами вирулентности. Эти токсины отличаются различными механизмами

действия в макроорганизме и включают: цитотоксический некротизирующий фактор первого типа, ботулотоксин, столбнячный нейротоксин и др.

1.1. Общие сведения о клостридиальных инфекциях

Инфекционный процесс и инфекционная болезнь наступают тогда, когда адаптация является односторонней, и микроорганизм размножается и разрушает макроорганизм, который оказался не в состоянии предотвратить эти разрушения [4].

Несколько обособленно стоит группа инфекционных болезней, вызываемых не живым возбудителем, а продуктами его жизнедеятельности, накопленными вне организма в различных субстратах (например, ботулинический токсин в продуктах питания). В патогенезе этих состояний нет инфекционного процесса, а присутствует лишь его составная часть – процесс интоксикации, тяжесть которого определяется видом и количеством токсина [5].

По определению B. Finlay, S. Falkow, токсины – это секретируемые микробные протеины, обычно ферменты, которые убивают клетки хозяина в исключительно маленьких концентрациях [6].

Подлинная роль биологических токсинов в живой природе на сегодняшний день известна не до конца. Сложность и многофункциональность молекул токсинов свидетельствуют об их длительном эволюционном пути. Токсичность – это частное проявление первичной функции сигнальных молекул отдельных бактерий. В настоящее время выделяют 5 типов токсинов (повреждающие мембраны; ингибиторы белкового синтеза; активаторы путей вторичного мессинджера; активаторы иммунного ответа; протеазы) [7].

Одинаково направленное действие отбора привело к конвергентным гомологиям отдельных структур токсических молекул, а также выполняющих сходную функцию структур белков эукариотов и вирусов. Максимальная токсичность достигнута ботулиническим токсином за счет предельного увеличения размера и сложности молекулы.

Применительно к клостридиальным инфекциям особый интерес вызывают Clostridium perfringens, Clostridium botulinum, Clostridium difficile и Clostridium tetanus.

Таблица 1.1

Летальные дозы очищенных токсинов для белых мышей
(по Ванн Хайнингену, 1958) [1]

Вид токсина	Величина летальных доз в нг на 1 кг веса животного
Ботулинический токсин типа А	1,6
Столбнячный токсин	5,0
Нейротоксин Шига	1300,0
Рицин	78000,0
Дифтерийный токсин	286000,0
Нейротоксин гремучей змеи	380000,0

Ботулинический и столбнячный токсины (оба цинк-металлоэндопротеазы) в опытах на животных обнаруживают наименьшую из известных LD_{50} (табл. 1.1).

Удивительно, насколько различную клиническую картину дают поражения этими токсинами, имеющими столь значительное сходство в структуре, энзиматической активности и мишенях среди клеток нервной системы, но различающиеся путями проникновения в макроорганизм. Например, ботулинический токсин проникает в организм энтерально и вызывает вялые параличи периферических нервов. Столбнячный же токсин, образуясь на поверхностях ран, колонизированных Clostridium tetani, приводит к спастическим параличам через поражение ЦНС [6].

Эти самые сильные токсины имеют и наиболее сложную молекулу. Оба синтезируются в виде неактивных полипептидов массой 150 кДа и высвобождаются из лизировавшихся клеток. Затем они активируются посредством протеолитического расщепления открытой петли в структуре своей молекулы. Каждая активная молекула нейротоксина включает тяжелую (100 кДа) и легкую (50 кДа) цепи, связанные посредством межцепочечной дисульфидной связи. Тяжелые цепи обоих токсинов содержат два домена – регион, необходимый для транслокации токсина (N-терминальная последовательность) и регион, необходимый для связывания с клеткой (С-терминальная последовательность). Легкие цепи обоих токсинов содержат цинксвязывающий мотив, необходимый для цинкзависимой протеазы, активирующей молекулу [8].

Ботулинические токсины связываются с рецепторами на поверхности пресинаптической мембраны двигательных нейронов периферической нервной системы и вызывают протеолиз белков в нейронах. Это приводит к ингибированию высвобождения ацетилхолина и к предотвращению мышечных сокращений – возникает вялый паралич [9]. Столбнячный токсин сначала связывается с рецепторами на пресинаптической мембране моторных нейронов, но затем с помощью ретроградного везикулярного транспорта он перемещается в нейроны спинного мозга. Спастический паралич возникает из-за того, что рассечение везикуло-ассоциированных белков и синаптобревина в нейронах, нарушает высвобождение глицина и гамма-амино-битириковой кислоты, прекращающих мышечное сокращение [10].

В нашей работе рассмотрены структура, механизм действия и вклад токсинов в вирулентность, роль некоторых из них в передаче сигналов в эукариотических клетках, а также аспекты негативного влияния на организм человека и полезное использование токсинов и анатоксинов (токсоидов).

С тех пор, как Ру и Йерсен выделили в 1888 г. дифтерийный токсин, микробные токсины были признаны основными факторами вирулентности различных патогенных бактерий [11]. Бактериальные токсины были определены как растворимые вещества, которые изменяют нормальный метаболизм клеток хозяина и оказывают тем самым вредное влияние на макроорганизм [12].

Действительно, основные симптомы заболеваний, вызываемых Clostridium botulinum (ботулизм), Clostridium tetani (столбняк), являются результатом действия токсинов, продуцируемых перечисленными микроорганизмами. Знания о ведущей роли токсинов в возникновении симптомов этих и ряда других заболеваний позволили использовать инактивированные токсины (токсоиды) в качестве вакцин, что внесло большой вклад в сохранение и укрепление здоровья общества. Многие бактериальные экзотоксины (гиалуронидазы, коллагеназы и фосфолипазы) способны повреждать экстрацеллюлярные структуры или плазматическую мембрану эукариотических клеток с помощью ферментативного гидролиза или в результате формирования пор. Эти повреждения могут вызвать не только прямой лизис клеток, но также способствовать распространению бактерий в макроорганизме. Яркими представителями

этой группы являются альфа-токсин Clostridium perfringens, который действует подобно фосфолипазе С, а также клостридиальные коллагеназы [13, 14, 15].

В табл. 1.2 приведены отдельные бактериальные токсины в соответствии с механизмом их действия [8]:

– повреждающие клеточные мембраны;

– активирующие пути метаболизма, контролируемые вторичными мессенджерами;

– ингибирующие высвобождение нейромедиаторов;

– активирующие иммунный ответ макроорганизма.

Рассмотрены токсины, которые продуцируются Clostridium perfringens, Clostridium botulinum, Clostridium difficile и Clostridium tetanus.

Экзоэнзим С3 Cl.botulinum (С3) и токсины А и В Cl.difficile (CdA и CdB) вызывают соответственно рибозилирование или гликозилирование АДФ, что инактивирует Rho ГТФ-связывающие белки.

Организация и механизм действия токсической молекулы сводятся к следующему. Большинство токсинов представляют собой А-В структуру. Эта структура предполагает наличие двух компонентов – В-субъединицы, которая участвует в связывании токсина с рецептором на поверхности клетки хозяина и способствует транспортировке токсина в клетку хозяина; и А-субъединицы – проявляющей энзиматическую (токсическую) активность в клетке хозяина. Структура В-доменов зависит от структуры рецепторов-мишеней, с которыми взаимодействует токсин. А-субъединицы более консервативны чем В, особенно в участках, критических для их ферментативной активности [6].

Бактериальные токсины могут нарушать функции различных клеточных белков, не вызывая непосредственной гибели клеток. Активация или модификация вторичных мессенджеров под действием токсинов может обусловить значительные нарушения процессов передачи сигналов, имеющих критическое значение в поддержании разнообразных функций клеток.

Большинство токсинов этого семейства, включающего основные клостридиальные цитотоксины и С3-экзоэнзим Cl.botulinum, инактивируют Rho [16].

Нейротоксины Cl.botulinum (BoNT серотипов А и G) и Cl. tetani (TeNT) формируют другую категорию бактериальных токсинов

Таблица 1.2

Характеристика клостридиальных токсинов

Микро-организмы	Токсин	Механизм действия	Мишень	Заболевание	Роль в развитии инфекции
Повреждающие мембраны					
Clostridium perfringens	О-перфрин-голизин	Образование пор	Холестерин	Газовая гангрена *	?
Активаторы вторичных менеджеров					
Clostridium botulinum	Токсин С2	АДФ-рибо-зил-транс-фераза	Моно-мерный G-актин	Ботулизм	?
	Токсин С3	АДФ-рибо-зил-транс-фераза	Rho G-белок	Ботулизм	?
Clostridium difficile	Токсин А	Гликозил-трансфераза	Rho-белок	Диарея/псев-домембранный колит	(+)
	Токсин В	Гликозил-трансфераза	Rho-белок	Диарея/псев-домембранный колит	?
Протеазы					
Clostridium botulinum	Нейроток-син A-G	Zn-металло-протеазы	VAMP/ синап-тобревин, SNAP-25** синтаксин	Ботулизм	+
Clostridium tetanus	Столбняч-ный токсин	Zn-металло-протеазы	VAMP/ синап-тобревин	Столбняк	+

* Другие заболевания также связаны с данным микроорганизмом;
** VAMP – везикуло-ассоциированный мембранный белок; SNAP-25 – синаптосомально-ассоциированный белок.

на основании сходства структуры, ферментативной активности и мишеней – клеток нервной системы. Токсины BoNT наиболее часто связаны с ботулизмом у новорожденных и пищевым ботулизмом и существуют в природе в виде больших комплексов, включающих нейротоксин и один или несколько белков, которые, как полагают, обеспечивают защиту и стабильность молекулы токсина

в желудочно-кишечном тракте. TeNT, синтезируемый в ранах вегетативными формами C. tetani, не формирует комплексов с белками [17, 18].

Гены, кодирующие BoNT и TeNT, локализованы на плазмидах (TeNT, BoNT/A, G и, возможно, B) или в составе бактериофагов (BoNT/C, D, E, F). Нейротоксины синтезируются в виде неактивных полипептидов с молекулярной массой до 150 кДа [19]. Они высвобождаются при лизисе бактериальной клетки и активируются путем протеолитического расщепления незащищенной петли полипептида [20]. Каждая активная молекула нейротоксина состоит из тяжелой (100 кДа) и легкой (50 кДа) цепочек, соединенных единичной бисульфидной связью [17, 20]. Тяжелая цепочка BoNT и TeNT содержит два домена: участок, ответственный за транслокацию токсина в N-концевой части, и область на С-конце, регулирующую связывание токсина с клеткой [20, 21]. Легкие цепочки BoNT и TeNT содержат цинксвязывающие последовательности, необходимые для осуществления протеазной активности токсина, зависящей от ионов цинка [20, 21].

Клеточными мишенями BoNT и TeNT является группа белков, необходимых для стыковки и соединения синаптических пузырьков с пресинаптическими плазматическими мембранами с последующим высвобождением нейромедиаторов. BoNT связываются с рецепторами на пресинаптической мембране моторных нейронов периферической нервной системы. Протеолиз белков-мишеней в этих нейронах ингибирует высвобождение ацетилхолина, препятствуя, таким образом, мышечным сокращениям [22, 23]. BoNT/B, D, F и G разрушают везикуло-ассоциированный мембранный протеин и синаптобревин; BoNT/A и E поражают синаптосомально-ассоциированный белок SNAP-25; BoNT/C гидролизует синтаксин и SNAP-25 [17, 20, 21].

TeNT воздействует на центральную нервную систему, поражая два вида нейронов. Он первоначально связывается с рецепторами пресинаптической мембраны моторных нейронов, но затем с помощью обратного везикулярного транспорта перемещается в спинной мозг, где может внедриться в тормозные и вставочные нейроны [20, 22]. Расщепление везикуло-ассоциированного мембранного протеина и синаптобревина в этих нейронах приводит к высвобождению глицина и гамма-аминомасляной кислоты, которые в свою

очередь вызывают мышечные сокращения (контрактуры) [22, 23]. Различия в клинических проявлениях интоксикации BoNT и TeNT (пониженный тонус мышц и спастический паралич соответственно) являются прямым следствием воздействия данных токсинов на различные нейроны и блокирования различных нейротрансмиттеров [20, 21, 22].

Мощный ботулинический нейротоксин типа А (BoNT/A) имеет несколько клинических показаний [21, 24]. Один из них – лечение мышечной гиперактивности. Микродозы инъекций очищенного токсина в определенные точки вызывают паралич мышцы-мишени и устраняют мышечный спазм. Терапию следует постоянно продолжать, так как действие токсина продолжается только несколько месяцев. Впервые BoNT/A был применен для лечения нарушений функции глазодвигательных мышц [25]. Эффективность BoNT/A показана также при многих других расстройствах, включая дистонию мышц шеи и гортани, писчий спазм, гемифасциальный спазм, тремор и тик [21, 24]. BoNT/A используется и в косметических целях для уменьшения глубоких морщин, вызванных контрактурой мышц лица [26].

Вакцины, нацеленные на токсический компонент бактериальных патогенов, являются доказанным эффективным средством профилактики некоторых болезней. Большинство лицензированных токсоидных вакцин сравнительно мало очищены, однако эффективны. Такие вакцины состоят из частично очищенных токсинов, полученных из супернатанта культуры бактерий, в частности Cl. tetani. При изготовлении вакцин применяют формальдегид для устранения токсичности столбнячного токсина. Опытные образцы вакцины против ботулизма состоят из 5 неочищенных ботулинических анатоксинов. Препарат производится центрами по контролю и предупреждению заболеваний (CDC, США) и распространяется среди исследователей, работающих с токсином или микроорганизмом.

Антитоксины, полученные против анатоксинов столбняка и ботулизма, используются уже многие годы при лечении тяжелобольных.

Микробные токсины, способные прерывать или гиперстимулировать многие важные функции эукариотических клеток, эволюционируют вместе со своими бактериями-носителями. Вероятно, эти токсины выгодны бактериям либо на стадии взаимодействия «паразит – хозяин», либо в какой-либо экологической нише во внешней

среде, где встречаются данные бактерии. Некоторые бактериальные токсины приводят к необратимым повреждениям клеточной мембраны или изменяют нормальную передачу сигнала в клетке, другие проявляют ферментативную активность только лишь при попадании в цитоплазму чувствительных к ним клеток путем эндоцитоза. Кроме того, существуют токсины, выключающие или замыкающие нормальные функции клеток хозяина.

Вредные для чувствительных клеток при инфекции свойства некоторых бактериальных токсинов нашли применение в исследованиях биохимических реакций в эукариотических клетках и в медицине.

1.2. Эпидемиология, патогенез и основные клинические признаки ботулизма

Ботулизм (синонимы: ихтиизм, аллантиизм, аллантиазис (от гр. allantiksa – колбаса), ихтиозизм (от гр. ichtis – рыба); botulism, allantiasis, sausage-poisoning – англ.; botulisme, allantiasis – франц.; botulismus wurst-vergiftung, fleischvergtftung – нем.) – острая инфекционная болезнь, обусловленная поражением токсинами бактерий ботулизма нервной системы, преимущественно продолговатого и спинного мозга, характеризующаяся парезами и параличами поперечно-полосатой и гладкой мускулатуры, иногда в сочетании с офтальмоплегическим и бульбарным синдромами.

Ботулинические токсины (botulinum toxins) – бинарные нейротоксины, образуемые грамположительной анаэробной спорообразующей бактерией Clostridium botulinum и некоторыми ее близкородственными видами (Cl. butyricum, Cl. baratii, Cl. argentines).

Предполагается, что ботулизмом люди болеют на протяжении всего периода существования человечества. Так, византийский император Лев VI запретил употребление в пищу кровяной колбасы из-за опасных для жизни последствий [24]. Однако документально заболевание было зафиксировано только в 1793 г., когда в Вюртемберге (Германия) заболели 13 человек, употреблявших в пищу кровяную колбасу, 6 из которых умерли. Название ботулизм – от лат. botulinus, т.е. колбаса. Отсюда болезнь и получила своё название [28, 29].

Позднее, на основании наблюдений в 1817–1822 гг., Ю. Кернер сделал первое клинико-эпидемиологическое описание заболевания. Синдром, вызываемый ботулотоксином, упоминался в XIX в. как болезнь Ю.Кернера. В изданной монографии 1822 г. он описал симптомы ботулизма (недомогание, рвота, диарея и др.), а также предположил, что небольшие дозы ботулотоксина могут быть полезны в лечении гиперкинезов [30]. В России эта болезнь неоднократно описывалась в XIX в. под названием «ихтиизм» и связывалась с употреблением солёной и копчёной рыбы, а первое детальное исследование в России сделал Э.Ф. Зенгбуш [31].

В конце XIX в. в Бельгии 34 музыканта, готовившиеся играть на похоронах, съели сырую ветчину домашнего приготовления. В течение суток у большинства музыкантов начали проявляться симптомы ботулизма. В результате 3 человека погибли, а ещё 10 находились в больнице в течение недели в тяжелом состоянии. Из остатков ветчины и из селезёнки пострадавших бактериолог Э. Ван-Эрменгем выделил возбудителя и назвал его Bacillus botulinus. Также он установил, что ботулизм вызывает водорастворимый токсин, который образуется не в организме больного, а в толще ветчины. В это же время была создана первая иммунная сыворотка для лечения ботулизма. Исследователь Алан Скотт в 1973 г. провёл первые испытания ботулотоксина на животных по снижению активности гиперкинетических мышц, а затем, в 1978 г., под его руководством начались испытания возбудителя на людях, по одобренному протоколу FDA [32].

В начале XX в. A.Tchitchkine предположил, что растворимым фактором, ответственным за развитие симптоматики ботулизма, является нейротоксин [32].

Известно 8 иммунологически отличных типов (серотипов) ботулинических токсинов (A, B, $C_{1,2}$, D, E, F и G) [33]. Из них A, B, E, F вызывают ботулизм у людей, C_1 и D – у животных и водоплавающих птиц. В свою очередь, тип A подразделяется на 5 субтипов (A_1–A_5).

Род Clostridium относится к группе Firmicute, которая делится на анаэробные Clostridia, облигатные или факультативные аэробы Bacilli, и Mollicutes – бактерии, не имеющие клеточной стенки вообще (среди них самый известный род – Mycoplasma). Насчитывается не менее 83 видов Clostridia.

Термин «токсин» в отношении рода Clostridia означает биологически активный белок, имеющий антигенную структуру, и его активность может быть специфически нейтрализована соответствующей антисывороткой [34]. Важно подчеркнуть, что токсины вырабатываются вегетативными формами. Генетически и фенотипически выделяют 4 группы клостридий. Однако их общей особенностью является синтез ботулинического токсина.

C. butyricum, C. baratii отдельные авторы относят к V и VI группам соответственно. Близкородственная бактерия C. tetani, продуцирующая столбнячный токсин, относится к отдельной консервативной кладке. Известен только один серотип столбнячного токсина [35].

Клостридии, возбудители ботулизма, – строгие анаэробные спорообразующие бактерии. На поверхности твердых питательных сред (кровяной агар, печеночный агар, желатина с глюкозой) они растут почти при полном удалении кислорода; остаточное давление воздуха допустимо от 3 до 10 мм рт. ст.

Хорошо растет C. botulinum и на жидких средах (мясопептонный бульон с кусочками печени или мясного фарша или пептонного бульона с кусками вареного куриного яйца). Оптимальные условия роста вегетативных форм – крайне низкое остаточное давление кислорода (0,40–1,33 кПа) и температурный режим в пределах 28–35 °С. В то же время прогревание при температуре 80 °С в течение 30 мин вызывает их гибель.

Возбудители ботулизма в окрашенных препаратах и в электронном микроскопе имеют вид палочек длиной от 4 до 8 мкм и шириной от 0,6 до 0,8 мкм с закругленными концами. Микробы имеют споры, располагающиеся субтерминально, редко центрально. Палочки со спорами имеют вид теннисных ракеток. Жгутики в количестве от 3 до 20 расположены по всему телу палочки.

Возбудители ботулизма обнаруживаются в почве, воде, траве, на листьях и плодах овощей, фруктов, в кишечнике человека и животных, в пыли домашних помещений. Наиболее обсеменены Cl. botulinum илистая и черноземная почвы, особенно на территории приусадебных участков. В неблагоприятных условиях во внешней среде вегетативные формы возбудителей ботулизма образуют споры. Они чрезвычайно устойчивы к различным физическим и химическим факторам, в частности, выдерживают кипячение

в течение 4–5 ч, воздействие высоких концентраций различных дезинфицирующих средств сохраняются в продуктах, содержащих до 18% поваренной соли. Интерес представляет феномен образования из вегетативных форм при недостаточном их прогревании так называемых «дремлющих спор», способных к прорастанию лишь через 6 мес. Споры устойчивы к замораживанию и высушиванию, к прямому ультрафиолетовому облучению. В анаэробных или близких к ним условиях возбудители ботулизма продуцируют специфический летальный нейротоксин, являющийся единственным, но исключительным по силе фактором патогенности.

Летальная доза для человека при пероральном применении составляет 30 нг, при ингаляционном – около 0,80–0,90 мкг, а при внутривенном введении – от 0,09 до 0,15 мкг. Ботулотоксины абсолютно нейроспецифичны, они не реагируют с другими субстратами в пресинаптических моторных нейронах. Заражение пищи и аэрозольное применение – два наиболее значимых пути, по которым они рассматриваются как потенциальные агенты биотерроризма [36].

Специально очищенный, доведенный до кристаллической формы, ботулотоксин может содержать миллионы летальных доз. Ботулинические токсины белковой природы в обычных условиях внешней среды сохраняются до одного года, в консервированных продуктах – несколько лет. Они устойчивы в кислой среде, не инактивируются ферментами пищеварительного тракта, а токсические свойства ботулотоксина Е под влиянием трипсина могут усиливаться в сотни раз. Ботулинические токсины выдерживают высокие концентрации (до 18%) поваренной соли, не разрушаются в продуктах, содержащих различные специи. Токсины сравнительно быстро инактивируются под влиянием щелочей, при кипячении полностью теряют свои токсические свойства в течение нескольких минут, а под воздействием небольших концентраций калия перманганата, хлора или йода – в течение 15–20 мин. Ботулотоксин в пищевых продуктах не изменяет их органолептических свойств.

В процессе жизнедеятельности происходит характерное для большинства клостридий газообразование (визуально на консервированных продуктах определяется как бомбаж – вздутие крышки или жестяной банки). Прогревание при температуре 80 °С в течение 30 мин вызывает гибель вегетативных форм, однако его споровые формы способны выживать в течение нескольких часов при

температуре 100 °С, и, попадая в благоприятную среду, переходить в вегетативные формы. Для полного уничтожения применяют дробную пастеризацию – тиндализацию. Ботулотоксин относится к полипептидам и при кипячении в течение свыше 30 мин инактивируется. Хорошо нейтрализуется в щелочной среде [37].

Ботулотоксин является одним из наиболее сильных природных ядов. Описаны продуцирующие ботулотоксин штаммы других видов – Clostridium butyricum и Clostridium baratii, но они чрезвычайно редки.

В современной медицине ботулотоксин является активным составляющим косметического средства Ботокс (известного также под названием Диспорт), использующегося для разглаживания морщин и уменьшения потоотделения. Диспорт с помощью инъекций вводится подкожно в мимические мышцы. Его также применяют для ослабления чрезмерной мышечной активности. Получить отравление нейротоксином практически невозможно, так как в косметологии используются крайне низкие концентрации яда. В случае передозировки может случиться летальный исход. На сегодняшний день Ботокс разрешен для клинического применения в 58 странах мира.

Несмотря на серологическую специфичность, ботулинические токсины идентичны по механизму патологического воздействия и его клиническим проявлениям. Возможны случаи отравления людей и животных сразу несколькими токсинами, продуцируемыми бактериями различных сероваров. Защитное действие антитоксических сывороток специфично, способность к гетерологической нейтрализации наблюдается лишь у типов C и D, E и F, но она выражена значительно слабее (в 4–10 раз).

Сейчас, как и раньше, ботулизм проявляется как в виде единичных отравлений, так и в виде групповых случаев. За 1818–1913 гг. в России было зарегистрировано 98 групповых вспышек пищевых отравлений, в которых пострадало 608 человек, то есть по 6,2 человека на одну вспышку. За период 1974–1982 гг. произошла 81 вспышка, на которую в среднем приходилось по 2,5 заболевших [27]. В последние десятилетия распространены случаи болезни, связанные с употреблением консервов домашнего изготовления [38].

Механизм передачи ботулизма – фекально-оральный или контактный (при раневом ботулизме). Пути передачи заболевания

могут быть пищевые, воздушно-пылевые (при ботулизме грудных детей) или контактно-бытовые. При этом иммунитет после перенесённого заболевания не развивается. В медицинской литературе описаны повторные случаи заболеваний ботулизмом у одних и тех же людей [39].

В соответствии с рекомендациями ВОЗ различают четыре категории ботулизма [31]:

– пищевой ботулизм (заболевание возникает после употребления в пищу продуктов, содержащих накопившийся ботулинический токсин);

– раневой ботулизм (развивается при загрязнении почвой раны, в которой создаются условия, необходимые для прорастания попавших из почвы Clostridium botulinum и последующего токсинообразования);

– ботулизм детского возраста (возникает у детей преимущественно до 6 месяцев, при инфицировании их спорами Clostridium botulinum);

– ботулизм неуточнённой природы (установить какую-либо связь возникшего заболевания с пищевым продуктом не удаётся).

По степени тяжести различают лёгкую, среднетяжёлую и тяжёлую форму болезни [38]. При лёгком течении у больных паралитический синдром ограничивается поражением глазодвигательных мышц; при среднетяжелом – глотки и гортани. Тяжёлое течение характеризуется дыхательной недостаточностью и тяжёлыми бульбарными нарушениями.

Вспышки ботулизма чаще всего обусловлены токсином типа A, реже – типами B, C, E, F. Токсин D вызывает заболевания только у животных и водоплавающих птиц [40, 41, 42, 43]. Естественным источником и резервуаром возбудителя является почва, тепло- и холоднокровные животные, поглощающие споры Clostridium botulinum с водой и кормом [37].

Возбудитель размножается в иле слабопроточных водоёмов, силосных ямах, трупах павших животных. Clostridium botulinum вырабатывает токсин после смерти животных при снижении их температуры тела до 20–25 °С.

Попадание в человеческий организм как вегетативных форм C. botulinum, так и спор обычно не вызывает заболевания, так как для продуцирования токсина нужны строго анаэробные условия.

Исключения составляют раневой ботулизм (развивается при загрязнении почвой раны, в которой создаются условия, необходимые для прорастания попавших из почвы C. botulinum и последующего токсинообразования), а также ботулизм новорождённых до 6 месяцев, в кишечнике которых также возможно размножение C. botulinum и токсинообразование из-за особенностей кишечной микрофлоры.

Отравление токсином возможно только при употреблении продуктов, в которых в анаэробных условиях произошли размножение возбудителя и накопление токсина. Анаэробные условия создаются в результате герметизации продуктов или потребления кислорода аэробной флорой (например, стафилококком). В настоящее время консервы фабричного производства редко являются причиной заболевания. В основном заражение происходит вследствие употребления грибов, овощей, рыбы и мяса домашнего консервирования, при этом мужчины болеют в два раза чаще, чем женщины [44, 45, 46, 47, 48]. Однако эпидемии ботулизма могут возникать и из более неожиданных источников, например, в июле 2002 г. на Аляске у 14 человек были установлены симптомы ботулизма после употребления китового мяса (muktuk), двум из пострадавших потребовался аппарат искусственной вентиляции лёгких. Существуют и другие источники отравления, например чеснок или приправы, сохраняемые в растительном масле без подкисления, перец чили, плохо вымытый тушёный в алюминиевой фольге картофель, рыба домашнего консервирования, в частности, ферментированная рыба, таранка и прочее.

В России около 50% случаев болезни связаны с грибами, второе место занимают мясные изделия [38]. Но, помимо пищевого ботулизма, регистрируются единичные случаи ботулизма у детей до года, находящихся на искусственном вскармливании питательными смесями, содержащими мёд, а их кишечная микрофлора еще не способна эффективно подавлять развитие C. botulinum. Предполагают, что споры заносятся с пылью в нектар, перерабатывающийся пчёлами в мёд, который впоследствии используют в питательных смесях [49]. Иногда возбудитель размножается в некротизированной ткани и обусловливает возникновение раневого ботулизма.

Возбудители ботулизма широко распространены в природе. Вегетативные формы и споры обнаруживаются в кишечнике различных

домашних и в особенности диких животных, водоплавающих птиц, рыб. Попадая во внешнюю среду (почву, ил озер и рек), они в спорообразном состоянии длительно сохраняются и накапливаются. Практически все пищевые продукты, загрязненные почвой или содержимым кишечника животных, птиц, рыб могут содержать споры или вегетативные формы возбудителей ботулизма.

Российские санитарно-эпидемиологические правила СП 1.3.2322-08 относят ботулинический токсин (БТ) ко 2-й группе патогенности. Для национальной безопасности США он относится к группе А.

БТ привлекает внимание специалистов в области химического (ХО) и биологического оружия (БО) с 1920-х гг. из-за высокой токсичности и кажущейся доступности получения и применения [50]. В годы Второй мировой войны и до конца 1960-х гг. БТ интенсивно изучался в США и Соединенном Королевстве в качестве возможного средства уничтожения живой силы противника. Токсин серотипа А состоял на вооружении армии США под шифром «Х». Были разработаны технологии их выделения в кристаллическом состоянии, промышленного производства и специальные боеприпасы для применения в боевых условиях. В настоящее время они не рассматриваются как БПА, пригодные для ведения БВ из-за нестабильности при производстве, хранении и диспергировании. Но в качестве агентов для осуществления биологических террористических актов, диверсий и действий криминального характера, вероятность их использования оценивается как весьма высокая [50, 51, 52]. В начале 1990-х гг. секта «Аум-Синрикё» пыталась осуществить в Японии серию террористических актов с использованием ботулинического токсина типа А.

В медицине БТ типов А и В используется для разработки обезболивающих и косметических препаратов [53].

По эпидемиологии случаи и вспышки ботулизма можно разделить на естественного и искусственного происхождения (табл. 1.3) [54].

В России пищевой (алиментарный) ботулизм наиболее часто вызывается возбудителями типов А и В. Наблюдается тенденция к распространению типа Е. Консервированные грибы, рыбные и мясные продукты, овощи и фрукты, приготовленные кустарным способом с нарушением требований пищевой гигиены, являются

Таблица 1.3

Эпидемиологическая классификация ботулизма

Форма болезни	Источник токсина	Клинические проявления	Преимущественно встречающийся серотип токсина
Естественного происхождения			
Пищевой	Консервированные грибы, рыбные и мясные продукты, овощи и фрукты, приготовленные кустарным способом	Симптомы поражения ЖКТ, офтальмоплегический и бульбарный синдромы, паралич дыхательных мышц	A, B, C, E и F
Раневой	Токсико-инфекционный процесс – токсин, выделяется в процессе роста C.botulinum в инфицированной ткани раны	Офтальмоплегический и бульбарный синдромы, паралич дыхательных мышц	A и B
Раневой ботулизм наркоманов	То же	То же	A и B
Ботулизм новорожденных	Токсико-инфекционный процесс – токсин образуется в кишечнике детей	Запор, офтальмоплегический и бульбарный синдромы, паралич дыхательных мышц	C, F и G
Искусственного происхождения			
Парентеральный	Инъекции при передозировке препаратов Dysport или Botox (более 40 ед/кг)	Офтальмоплегический и бульбарный синдромы, паралич дыхательных мышц	A, B
Ингаляционный	Экспонирование к аэрозолю ботулинического токсина	То же	Любой

БАШКИРСКАЯ ЭНЦИКЛОПЕДИЯ

главными источниками C. botulinum в нашей стране. Домашние консервы, отравленные токсином ботулизма, выглядят, как правило, совершенно доброкачественными, не меняют ни внешнего вида, ни запаха, ни вкуса. Единственным признаком размножения ботулинического микроба может быть вздутая крышка на герметично закрытой банке.

Раневой ботулизм развивается в результате попадания в рану почвы, контаминированной C. botulinum. Токсин выделяется в процессе роста C. botulinum в ткани инфицированной раны. В последние годы наблюдается новая эпидемиологическая разновидность болезни – раневой ботулизм наркоманов [55, 56].

У детей в возрасте 2–3 мес встречается ботулизм новорожденных [49]. Он развивается в результате колонизации желудочно-кишечного тракта спорами возбудителя ботулизма. Токсин образуется в кишечнике детей. Запор часто является первым признаком болезни и может опережать появление неврологических симптомов на три недели. К ранним симптомам детского ботулизма относятся ослабление способности сосать и ослабление крика.

Артифицированные (т.е. искусственные) формы ботулизма стали выделять в отдельную форму болезни после внедрения в клиническую практику лекарственных препаратов на основе ботулинического токсина. Осложнения возникают в результате передозировки препаратов Disport, Botox и др. [54]. К ним же целесообразно отнести и формы ботулизма, преднамеренно вызванные распространением аэрозоля ботулинического токсина.

В России пищевым ботулизмом болеют во все времена года, но максимум вспышек и единичных случаев приходится на осеннее и зимнее время (70% – октябрь, ноябрь, декабрь). Наблюдаемая сезонность не отличается строгой закономерностью и отражает изменения условий питания: в это время года больше, чем в другие месяцы, употребляют в пищу консервированные продукты домашнего приготовления. Кроме того, заболеваемость зависит от урожая грибов в том или ином регионе. 75,3% приходится на консервированные грибы, 5,8% – на вяленую рыбу, 5,1% – на сало, 2,5 % – на соленую рыбу, мясо и другие продукты (соленые грибы, рыба холодного копчения, консервированные помидоры, колбаса, консервированное мясо кур).

Естественные вспышки ботулизма, как правило, имеют групповой или семейный характер. По данным ряда авторов, в России

ботулизм наиболее часто вызывается токсином типа В (56%), реже – А (30%) и еще реже – типа Е (14% случаев) [52].

По L.C. Sellin из 766 случаев пищевого ботулизма, зарегистрированных в США, на период с 1899 по 1977 год 26% было вызвано типом А, 7,8% – типом В, 4,2 – типом Е, а 61,8% остались не идентифицированными [57, 58].

При внутрибрюшинном введении мышам наиболее высокий уровень токсичности отмечается у нейротоксина типа А. Из лабораторных животных наиболее чувствительным к действию БТ является морская свинка, для которой летальные дозы при внутрибрюшинном, ингаляционном и оральном введении равны $9{,}4\times10^{-7}$, $3{,}18\times10^{-5}$ и $1{,}87\times10^{-4}$ мг/кг соответственно.

Зафиксированная летальная доза БТ для человека при оральном введении находится в пределах от $1{,}43\times10^{-6}$ до $1{,}43\times10^{-5}$ мг/кг. Прогнозируемые величины летальных доз для человека:

– при парэнтеральном введении 3×10^{-9} мг/кг;
– при ингаляционном введении 3×10^{-8} мг/кг;
– при оральном введении 3×10^{-6} мг/кг.

Естественные отравления людей ботулотоксинами происходят в основном через пищу [59, 60]. Однако заболевание может возникнуть только при употреблении тех продуктов, которые хранились при анаэробных или близких к ним условиях без предварительной достаточной термической обработки. Это могут быть консервы, особенно домашнего приготовления, копченые, вяленые мясные и рыбные изделия, а также другие продукты, в которых имеются условия для развития вегетативных форм микробов и токсинообразования.

В России чаще регистрируются заболевания, связанные преимущественно с употреблением грибов домашнего консервирования, копченой или вяленой рыбы, в европейских странах – мясных и колбасных изделий, в США – бобовых консервов. Эти продукты чаще вызывают групповые, «семейные» вспышки заболеваний. Если инфицированный продукт твердофазный (колбаса, копченое мясо, рыба), то в нем возможны «гнездная» инфицированность возбудителями ботулизма и образование токсинов. Поэтому встречаются вспышки, при которых не все лица, употреблявшие один и тот же продукт, болеют. В настоящее время преобладают заболевания, обусловленные отравлениями токсинами А, В или Е. Больной

человек не представляет эпидемиологической опасности для окружающих лиц.

Своеобразной формой раневого ботулизма является ботулизм у наркоманов. Заражение осуществляется в результате инъекций или даже накожных скарификаций «черного героина» («черной смолы»), исходный материал для приготовления которого загрязнен почвой и таким образом контаминирован спорами. В случае абсцедирования мест инъекций создаются предпосылки развития заболевания, как и при раневом ботулизме.

Ботулизм младенцев наблюдается преимущественно у детей первых шести месяцев жизни. Большинство заболевших детей находились на частичном или полном искусственном вскармливании. При расследовании подобных случаев заболевания споры выделяли из меда, используемого для приготовления питательных смесей. Так же споры находили в окружающей ребенка среде – почве, бытовой пыли помещений и даже на коже кормящих матерей. Обращает внимание тот факт, что ботулизм младенцев регистрируется исключительно в социально неблагополучных семьях, проживающих в неудовлетворительных санитарно-гигиенических условиях.

Экспериментальные исследования и клинические наблюдения свидетельствуют о возможности заболевания в результате аэрогенного заражения ботулотоксинами. В таких случаях всасывание их в кровь происходит через слизистую оболочку дыхательных путей.

В естественных условиях подобные заболевания невозможны.

Таким образом, эпидемиология ботулизма весьма сложная. Болезнь может развиться вследствие попадания в организм только ботулотоксинов, токсинов и возбудителей или только спор. Следует отметить бурное размножение возбудителей в трупах погибших от ботулизма людей, тушках павших животных, которые становятся своеобразным резервуаром инфекции.

Естественно возникающий ботулизм (пищевой, раневой, новорожденных) обычно представляет собой токсико-инфекционный процесс [57, 58, 61, 62, 63]. При попадании в организм несмертельных порций токсина и ботулинического микроба происходит размножение последнего в организме, благодаря чему вырабатываются постоянно небольшие дозы токсина. В течение инкубационного периода, количество токсина накапливается, что приводит к развитию

типичной клиники ботулизма. Основная масса токсина при попадании в пищеварительный тракт всасывается через слизистую оболочку желудка и тонкой кишки. Ферменты ЖКТ активируют БТ, превращая протоксин в активную токсическую форму.

Токсин проникает первоначально в лимфатические пути, затем в общий кровоток, разносится током крови по всему организму, причем титр в лимфе всегда превышает титр в плазме крови. При избыточном количестве БТ в крови он в первые минуты после введения сорбируется, кроме β- и γ-глобулинов, и другими фракциями глобулинов.

Присутствие токсинов в крови больных ботулизмом людей и животных доказано экспериментально [64]. Чаще всего он обнаруживается на 2–3 сут, а иногда даже на 6–8 сут после появления первых симптомов болезни, что указывает на образование токсина в организме. Циркуляция токсина в крови может продолжаться от 9 до 25 сут и более. Быстрое обсеменение организма бактериями ботулизма было установлено при заражении животных через рот большими дозами спор, при этом животные погибали от токсина, образовавшегося в организме. Введение через рот небольших доз спор животным вызывает у них бессимптомную инфекцию, сопровождающуюся иммунологическими изменениями тканей органов.

Токсическое действие ботулотоксинов вызвано нарушением нейромышечной передачи вследствие блокады выделения ацетилхолина в синапсах. Они являются наиболее сильнодействующими из известных биологических токсинов. Их средняя летальная доза при разных способах введения колеблется от 5 до 50 нг/кг. Ингаляционная доза ботулотоксина для человека, выраженная величиной Lct_{50}, оценивается как 0,02–0,1 мг × мин/м^3. По этому показателю ботулотоксин не менее чем в 750 раз токсичнее зарина и в 100 раз токсичнее вещества VX. Смерть от отравления БТ наступает в результате развития «бульбарного синдрома», паралича дыхательных мышц, осложненных пневмонией и токсическим миокардитом. У людей наиболее высокая летальность наблюдается при отравлении токсинами типов А и Е [36, 52].

На сегодняшний день патогенез ботулизма ещё недостаточно изучен, существуют разногласия по вопросу действия токсина на центральную нервную систему, вегетативную нервную систему и другие структуры.

В то же время установлено, что ботулинический токсин прочно связывается нервными клетками. При этом поражаются и нервные окончания и мотонейроны передних рогов спинного мозга. Ботулотоксин избирательно воздействует на холинэргические отделы нервной системы, вследствие чего прекращается выделение ацетилхолина в синаптическую щель, а следовательно, нарушается нервно-мышечная передача возбуждений (парезы, параличи). Холинэстеразная активность в синапсах практически не изменяется. В первую очередь, нарушается иннервация мышц, находящихся в состоянии постоянной и высокодифференцированной функциональной активности (глазодвигательный аппарат, мышцы глотки и гортани). Результатом поражения мотонейронов является также и угнетение функции основных дыхательных мышц вплоть до паралича.

При ботулизме поражаются все черепные нервы, кроме чувствительных, такие как обонятельный, зрительный, преддверно-улитковый. Особой чувствительностью к ботулотоксину обладают мотонейроны спинного и продолговатого мозга, что проявляется развитием бульбарного и паралитического синдромов. Ботулотоксин блокирует освобождение ацетилхолина в холинергических синапсах, что обусловливает развитие периферических параличей. Холинэстеразная активность в синапсах практически не изменяется. Краткая характеристика клинических симптомов ботулизма и патогенетических механизмов представлены в табл. 1.4.

Воздействие ботулинических токсинов обратимо и со временем двигательная функция полностью восстанавливается. Угнетению холинэргических процессов предшествует повышение содержания катехоламинов. Вследствие нарушения вегетативной иннервации снижается секреция пищеварительных желез (выделение слюны, желудочного сока), развивается стойкий парез желудочно-кишечного тракта. Патогенное действие ботулинических токсинов в значительной степени усиливается при их повторном поступлении в кровь.

Парезы или параличи межреберных мышц, диафрагмы приводят к острой вентиляционной дыхательной недостаточности с развитием гипоксии и респираторного ацидоза. Нарушению вентиляции легких способствует угнетение функции мышц глотки и гортани, скопление густой слизи в над- и подсвязочном пространстве, аспирация

Таблица 1.4

Патогенез отдельных симптомов и синдромов при ботулизме

Симптомы	Патогенез
Нарушение дыхания (частое, поверхностное)	Парез мышц диафрагмы, брюшного пресса, межрёберных мышц, гипоксия
Мышечная слабость, парезы, параличи	Нарушение передачи нервных импульсов, гипоксия, метаболические нарушения
Тахикардия, повышение АД	Гипоксия, повышение активности симпатико-адреналовой системы (увеличение содержания катехоламинов)
Сухость во рту, нарушение глотания, гнусавость голоса, ограничение движения языка	Поражение ядер V, IX, XII черепных нервов
Нарушение конвергенции, птоз, диплопия	Поражение ядер III, IV черепных нервов
Широкие зрачки, нарушение зрения, аккомодации	Поражение n.m.ciliares
Амимия	Поражение лицевого нерва
Вздутие живота, запор	Угнетение функции блуждающего нерва, увеличение содержания катехоламинов
Рвота, одно- или двукратное послабление стула в начальный период	Местное действие ботулотоксина, действие другой флоры, содержащейся в продукте
Задержка мочеиспускания	Поражение вегетативной нервной системы, преобладание симпатической активности, снижение тонуса мочевого пузыря
Бледность кожи	Сужение капилляров кожи

рвотных масс, пищи, воды. При ботулизме вследствие опосредованного или прямого действия токсина развиваются все разновидности гипоксии – гипоксическая, гистотоксическая, гемическая и циркуляторная. Гибель обычно наступает от вентиляционной дыхательной недостаточности и иногда от внезапной остановки сердца.

Токсинемия вызывает угнетение ферментов пентозофосфатного шунта, ингибирование клеточных Na+K+ насосов и обусловливает развитие гемической гипоксии.В конечном итоге она и определяет

течение и исходы заболевания. При этом существенна и роль таких вторичных изменений, как аспирационные пневмонии, ателектазы. Из-за гипосаливации воспаляется слизистая оболочка ротоглотки, может развиваться гнойный паротит вследствие восходящей инфекции.

Ботулотоксин оказывает воздействие на парасимпатическую нервную систему, угнетая её активность, что проявляется мидриазом, сухостью слизистых оболочек и запорами. Редко встречающийся длительный инкубационный период (до 10 дней) объясняют прорастанием спор возбудителя в ЖКТ с последующим выделением экзотоксина вегетативными формами. Кроме того, установлена возможность развития вегетативных форм из спор в гнойных очагах или «карманах» при ранениях (раневой ботулизм). Эти механизмы поддерживают концентрацию токсина в организме больного в течение длительного времени, что следует учитывать при проведении сывороточной терапии.

Нервная система не является единственной мишенью для ботулотоксинов. Установлено, что они способствуют резкому угнетению фагоцитарной активности лейкоцитов, нарушению метаболизма в эритроцитах, нарушениям трофики.

Вместе с содержащей ботулинический токсин пищей в организм больного попадают и возбудители ботулизма, а также в случае соответствующей контаминации пищевых продуктов и другие анаэробы (C1. perfringens, Cl. aedematiens) и их токсические субстанции. Воздействием последних объясняются возможные кратковременные лихорадка и синдром гастроэнтерита в начальном периоде болезни у некоторых больных. Развивающиеся в разгаре болезни парез и угнетение секреции пищеварительных желез ведут к застою пищи и химуса, условиям, близким к анаэробным. При этом вегетативные формы возбудителей ботулизма могут продуцировать токсин, дополнительные поступления которого в кровь оказывают потенцированный токсический эффект. Возможно с этим и связаны случаи внезапной смерти больных даже при легком и среднетяжелом течении ботулизма. Следовательно, при обычном способе заражения ботулизм является по сути токсикоинфекцией.

Естественно, что при этом ведущее значение в развитии болезни принадлежит токсину, поступающему с инфицированными продуктами в желудочно-кишечный тракт.

Патогенез раневого ботулизма и ботулизма младенцев отличается тем, что заражение происходит спорами, которые прорастают в анаэробных условиях раны или вследствие особенностей флоры и ферментативной деятельности кишечника грудных детей в вегетативные формы, продуцирующие токсины. Поступление ботулотоксина в кровь дает типичную для ботулизма неврологическую картину заболевания. В таких случаях синдромы гастроэнтерита, общей инфекционной интоксикации отсутствуют. Пока что не изучены условия прорастания и продуцирования токсина в желудочно-кишечном тракте младенцев. Однако остается непреложным факт, что ботулизм как болезнь – следствие токсического поражения нервной системы, причем токсин, вероятно, действует как ферментный яд, что требует ничтожных его количеств для развития тяжелого отравления. Циркуляция ботулотоксина может продолжаться до трех недель. Наблюдаются случаи выявления токсина в крови при отсутствии или стертой клинической картине заболевания.

Патологоанатомические изменения при ботулизме неспецифичны. Обычно наблюдаются гиперемия и полнокровие внутренних органов, в том числе головного мозга и его оболочек. Выражены признаки нарушения микроциркуляции в головном мозге. Отмечаются умеренные деструктивные изменения нервных клеток всех уровней. Однако они не достигают такой степени, чтобы объяснить возникающие параличи. Довольно характерными для ботулизма являются дистрофические изменения в сосудистых стенках микроциркуляторного русла, множественные мелкие кровоизлияния в серозные и слизистые оболочки, преимущественно желудочно-кишечного тракта, которые скорее всего обусловлены гипоксией.

Инкубационный период при ботулизме продолжается до суток, реже до 2–3 дней и очень редко (в единичных описаниях) до 9 и даже 12 дней. Не исключено, что более длительный инкубационный период соответствует манифестации скрытых проявлений болезни из-за дополнительного поступления ботулотоксина из желудочно-кишечного тракта. При более коротком инкубационном периоде наблюдается, хотя и не всегда, более тяжелое течение болезни. Прием алкоголя, как правило, не сказывается на течении болезни, а опьянение может затушевывать первые проявления ботулизма, препятствуя его своевременной диагностике.

Клиническая картина ботулизма складывается из трёх основных синдромов: паралитического, гастроинтестинального и общетоксического.

Болезнь начинается остро, в продромальном периоде отмечается полиморфизм болезненных ощущений. Наиболее типичными ранними признаками ботулизма являются нарушения остроты зрения, сухость во рту и мышечная слабость. Больные жалуются на «туман в глазах», «сетку перед глазами», плохо различают близлежащие предметы, не могут читать сначала обычный шрифт, а затем – крупный. Появляется двоение в глазах. Развивается птоз различной степени выраженности. Изменяются высота и тембр голоса, иногда отмечается гнусавость. При прогрессировании болезни голос становится сиплым, охриплость может перейти в афонию. Довольно типичным признаком ботулизма является нарушение глотания. Появляются ощущение инородного тела в глотке («непроглоченная таблетка»), поперхивание, затруднение глотания вначале твердой, а затем и жидкой пищи, воды. В тяжелых случаях наступает полная афагия. При попытке проглотить воду, последняя выливается через нос. В этом периоде возможна аспирация пищи, воды, слюны с развитием аспирационной пневмонии, гнойного трахеобронхита.

Все вышеуказанные неврологические симптомы появляются в различных сочетаниях, последовательности и степени выраженности. Беспокоит боль в подложечной области, тяжесть в желудке, тошнота, рвота, понос или запор. Затем присоединяются неврологические симптомы: офтальмологический, парез жевательной и мимической мускулатуры, парез бульбарной группы мышц, парез скелетных мышц, парез дыхательной мускулатуры, вестибулоатактический синдром. Начальными, наиболее ранними и частыми симптомами, являются глазодвигательные – до 93,4%, вызванные нарушением функции внутренних (чаще) и наружных мышц глаза [57]. Обусловлено это тем, что БТ в организме человека имеет в качестве мишеней только пресинаптические нейроны. К числу глазодвигательных расстройств относятся нарушение аккомодации (75%) – ранний специфический признак ботулизма [57]. Больные жалуются на появление тумана и сетки перед глазами, предметы видны не четко, дрожат. Реже встречаются жалобы на полную потерю зрения. В ранней диагностике отравления БТ считают значимыми вялую реакцию зрачка на свет (70%), ослабление реакции

зрачков на конвергенцию (59%), птоз (58%), мидриаз (51%), снижение конъюнктивального рефлекса (51%), офтальмопарез (49%), диплопатию (48%), анизокорию (31%) и др.

Парез жевательной и мимической мускулатуры встречается у 96% больных. Больной не может поднять уголки губ. В сочетании с птозом век лицо больного выглядит сонным. При тяжелом отравлении лицо теряет выражение и становится маскообразным, застывшим. Из-за слабости напряжения мышц височной области с обеих сторон, нижняя челюсть отвисает, акт жевания нарушается.

Клиническими проявлениями ботулизма могут быть кратковременные симптомы острого гастроэнтерита и общей инфекционной интоксикации. В таких случаях больные обычно жалуются на острые боли в животе, преимущественно в эпигастральной области, после чего наступают повторная рвота и жидкий, без патологических примесей стул, не больше 10 раз в сутки, чаще 3–5 раз. Иногда на этом фоне появляются головная боль, недомогание, отмечается повышение температуры тела от субфебрильной до 39–40 °С. К концу суток гипермоторика желудочно-кишечного тракта сменяется стойкой атонией, температура тела становится нормальной. Начинают появляться основные неврологические признаки болезни. В редких случаях между гастроинтестинальным и неврологическим синдромами самочувствие больного может кратковременно оставаться вполне удовлетворительным и лишь при целенаправленном осмотре можно выявить признаки поражения нервной системы.

Некоторые из них могут отсутствовать. Однако обязательным фоном для них являются нарушение саливации (сухость во рту), прогрессирующая мышечная слабость и стойкий запор. Птоз, мышечная слабость могут в легких случаях болезни протекать в недостаточно манифестированной форме. Их можно выявить путем физической нагрузки (несколько раз плотно открыть и закрыть глаза, повторно измерять мышечную силу с помощью динамометра). Мышечная слабость нарастает соответственно тяжести болезни. В начале она наиболее выражена в затылочных мышцах, вследствие чего у таких пациентов голова может свисать и они вынуждены поддерживать ее руками. В связи со слабостью межреберных мышц дыхание становится поверхностным, едва заметным. При полном параличе межреберных мышц больные ощущают сжатие грудной клетки «как будто обручем». При осмотре в разгаре заболевания

больные вялые, адинамичные. Лицо маскообразное. Одно-, чаще двусторонний птоз. Зрачки расширены, вяло или совсем не реагируют на свет; возможны нистагм, косоглазие, нарушаются конвергенция и аккомодация. Высовывание языка происходит с трудом, иногда толчками. Ухудшается артикуляция. Слизистая оболочка ротоглотки сухая, глотки – ярко-красная. В надгортанном пространстве возможно скопление густой вязкой слизи, вначале прозрачной, а затем мутноватой. Отмечается парез мягкого неба, мышц глотки и надгортанника, голосовых связок, голосовая щель расширена. Вследствие пареза или паралича мышц диафрагмы нарушается отхаркивание мокроты, которая скапливается в подсвязочном пространстве. Густая, вязкая слизистая пленка в над- и подгортанном пространстве может привести к асфиксии. Из-за слабости скелетной мускулатуры больные малоподвижны. Маскообразное застывшее лицо, поверхностное дыхание, афония могут наводить на мысль об утрате сознания. При обследовании органов дыхания обращает внимание поверхностное дыхание. Кашель отсутствует, дыхательные шумы ослаблены, аускультативные феномены пневмонии могут не прослушиваться. Соответственно степени тяжести вентиляционной дыхательной недостаточности нарастает гиперкапния, респираторный ацидоз. Изменения сердечно-сосудистой системы обнаруживаются преимущественно при среднетяжелом и тяжелом течении болезни: тахикардия, артериальная гипотензия, а иногда гипертензия, метаболические изменения ЭКГ.

Для развернутой клинической картины ботулизма характерны выраженный парез желудочно-кишечного тракта, проявляющийся умеренным вздутием живота, резким ослаблением перистальтических шумов, упорными и продолжительными запорами. Со стороны других органов и систем каких-либо типичных для ботулизма изменений не определяется. Иногда может быть задержка мочевыделения.

Вслед за глазными симптомами, а нередко параллельно с ними, при прогрессировании заболевания появляются бульбарные расстройства. В клинической картине они являются основными и часто определяют прогноз болезни. У пациента появляются ощущение кома и сдавления в горле, першение, иногда жжение. Ранними признаками нарушения глотания бывают поперхивание и кашель во время еды. Далее развиваются более грубые дисфагические

расстройства: затруднение глотания сначала твердой, затем жидкой пищи и слюны.

При оценке функций мягкого нёба выявляются симптомы паралича нёбной занавески (провисание, понижение тонуса), гнусавость, поперхивание во время еды, жидкая пища выливается через нос, иногда аспирируется. Одновременно с дисфагией возникают фоноларингеальные симптомы, нарушается фонация: голос становится слабым, глухим, хриплым, изменяется его тембр и звучность. Легкие случаи ботулизма характеризуются стертостью или моносимптомностью неврологических проявлений. Чаще наблюдаются расстройства аккомодации, небольшой птоз, иногда изменения тембра голоса на фоне умеренной мышечной слабости, гипосаливации. Продолжительность от нескольких часов до нескольких суток. При среднетяжелом ботулизме имеются все клинические неврологические симптомы, степень выраженности которых неодинакова, а поражение мышц глотки, гортани не достигает степени афагии и афонии. Опасных для жизни дыхательных расстройств нет. Продолжительность болезни составляет 2–3 нед.

При тяжелом течении в связи с параличем мышц гортани у больных отмечается полная афония. Дисфагия и дисфония сопровождаются нарушением речи. В результате двустороннего поражения мышц языка движение его ограничивается: больной не может высунуть язык или испытывает при этом затруднение. Перемещение пищи в полости рта нарушается, акт жевания и глотания затрудняется или становится совершенно невозможным. Расстройства движений губ, языка, мягкого неба, наружных мышц глотки и гортани приводят к изменению речи – она становится гнусавой, смазанной, растянутой, без достаточной модуляции, непонятной для окружающих.

Температура тела в большинстве случаев не повышается. Больные жалуются на головную боль, головокружение. Отмечаются затрудненность движений, быстрая утомляемость, которая иногда очень быстро нарастает. Слабость в некоторых случаях бывает локальной в ногах или руках. Симптомы быстро прогрессируют. Значительно ухудшается работа сердца.

В заключительной фазе болезни главное место занимает нарушение дыхания. Оно становится затрудненным, частым и поверхностным, в тяжело протекающих случаях дыхание Чейна-Стокса. Больные принимают различные позы для усиления деятельности

вспомогательных дыхательных мышц. Смерть наступает от паралича дыхания на фоне продолжающейся сердечной недостаточности. Сознание не изменяется до наступления смерти, оно помрачается иногда только в агональном состоянии.

Иногда заболевание развивается катастрофически быстро: бурно нарастают офтальмологические симптомы, а присоединившиеся бульбарные и дыхательные расстройства в течение суток приводят к летальному исходу.

Исследования периферической крови не выявляют особых отклонений от нормы, за исключением моноцитоза, который встречается тоже не всегда. Лейкоцитоз, нейтрофилез, ускоренная СОЭ должны настораживать в отношении возможного гнойного осложнения ботулизма.

Выздоровление наступает медленно. Одним из ранних признаков улучшения является восстановление саливации. Постепенно регрессирует неврологическая симптоматика. Позже всех происходит полное восстановление остроты зрения и мышечной силы. Перемежающиеся расстройства зрения могут наблюдаться в течение нескольких месяцев. Несмотря на тяжелейшие, иногда несовместимые с жизнью неврологические расстройства, у переболевших ботулизмом не остается последствий и каких-либо стойких нарушений функций нервной системы или внутренних органов. В отношении исходов деление болезни по степени тяжести довольно условно, ибо даже при легком и тем более среднетяжелом течении заболевания наблюдаются случаи внезапной остановки дыхания.

Раневой ботулизм и ботулизм младенцев представляет собой токсико-инфекционный процесс, аналогичный тому, который развивается после инфицирования возбудителями столбняка или газовой гангрены. Тяжесть поражения зависит от количества попавшего в рану возбудителя ботулизма, его способности к токсинообразованию, типа токсина, хирургической обработки раны и общего состояния организма инфицированного. В обоих случаях отсутствуют гастроинтестинальный синдром и общая инфекционная интоксикация. При раневом ботулизме более продолжительные сроки инкубационного периода (4–14 дней). Для ботулизма характерна неврологическая симптоматика. Следует отметить, что у этих пациентов нет факта употребления продуктов, которые могли бы содержать ботулинический токсин. Ботулизм у грудных детей (ботулизм

младенцев) наблюдается чаще при искусственном вскармливании. Инкубационный период неизвестен и установить его не представляется возможным. Первыми проявлениями болезни могут быть вялость детей, слабое сосание или отказ от него, задержка стула. Появление офтальмоплегических симптомов, хриплый плач, поперхивание должны навести на мысль о возможности ботулизма с неотложным проведением соответствующих диагностических и лечебных мероприятий.

Для раневого ботулизма наркоманов характерны: анамнез пациента, следы инъекций на коже, наличие язв и абсцессов, вызванных введением наркотиков. Обычно у таких пациентов ранняя стадия болезни проявляется дизартрией, диплопией, дисфонией и нисходящим параличом. Болезнь протекает тяжело.

Отравления БТ у людей могут быть вызваны внутримышечным введением лекарственных препаратов, содержащих БТ: Botox® (Allergan Inc., США), Dysport® (Beafour-Ipsen-Speywood, Франция) и Xeomin® (Impfstoffwerk Dessau-Tornau, Gmbh, Германия) – на основе БТ типа А; и Myoblock®/Neuroblock® (Solstice Neurosciences, LLC, США) – на основе БТ типа В.

Препараты на основе БТ применяют для лечения цервикальной дистонии, блефароспазма, ахалазии кардии (атония нижнего пищеводного сфинктера) и других патологических состояний, вызванных мышечным спазмом, и в косметических целях. Всего в специальной литературе приводиться до 150 показаний для применения препаратов на основе БТ [65].

Препараты на основе БТ вводятся инъекционно в участки мышечного спазма (контрактуры) или морщин. Действие препарата наступает на 2–3 сут после инъекции и достигает максимума на 14–15 сут. Блокируя нервно-мышечную передачу, БТ вызывает расслабление мышцы-мишени, длящееся до 8 мес. Обычно такие препараты безопасны для пациента. Один флакон Botox содержит 100 ЕД (units, U) очищенного нейротоксического комплекса, 0,5 мг альбумина человека и 0,9 мг натрия хлорида. Рекомендованная доза для крупных мышц – 100–400 ЕД, в косметических целях используют мену чем 30 ЕД. Летальная доза Botox для человека массой 70 кг составляет 2500–3000 ЕД [65].

В картине ингаляционного поражения очищенным БТ присутствуют симптомы, входящие в бульбарный синдром Офтальмоло-

гический синдром проявляется минимально, гастроэнтерический – отсутствует.

Возникновение вспышки случаев нисходящего и прогрессивного бульбарного паралича у безлихорадочных больных может служить основанием для предположения о ботулинической интоксикации.

На искусственное применение БТ указывают:

– наличие большого числа случаев острого ботулизма, не имеющего связи с консервированными продуктами (в России основной источник ботулинического микроба – консервированные грибы);

– обнаружение в пище серотипов БТ, обычно не встречающихся в регионе, либо серотипов D-, F-, G- и E- типов без связи с продуктами водного происхождения;

– связь вспышки с каким-то общим географическим фактором (аэропорт, кинотеатр, метро, учреждение и др.), но без указаний на прием общей пищи;

– множество одновременно возникших вспышек без общего источника БТ.

Последние 2 позиции характерны для ингаляционного поражения.

Парентеральное отравление БТ можно предполагать при наличии в анамнезе пациента указаний на получение им каких-то царапин или инъекций в течение ближайших 48 ч. При умышленном внутривенном введении БТИ человеку в картине отравления первым специфическим симптомом будет птоз. Симптом появляется уже через несколько часов после введения токсина. Затем появляются проявления развития бульбарного синдрома и дыхательной недостаточности.

Поражение аэрозолем БТ можно предполагать, если связь вспышки болезни с контаминированными продуктами либо с инъекциями препаратов на основе БТ невозможно, в первоначальной симптоматике преобладают симптомы бульбарных нарушений, но симптомы расстройства ЖКТ отсутствуют. Аэрозолированный токсин обычно не поддается идентификации в сыворотке или испражнениях, хотя при пищевом ботулизме это возможно. Однако токсин может присутствовать на слизистых оболочках носа и может быть обнаружен методом ELISA в течение 24 ч после вдыхания [63, 64].

Ретроспективная диагностика отравления БТ иммунологическими методами затруднительна. Количество токсина, способное вызвать поражение человека, настолько мало, что антитела к нему не образуются.

Осложнения ботулизма. При ботулизме наблюдают фатальное развитие пневмоний, прежде всего вследствие уменьшения у больных объёма внешнего дыхания. Вместе с тем превентивное назначение антибиотиков при ботулизме не предотвращает наступление этого осложнения. Наиболее грозные осложнения, нередко ведущие к летальному исходу, – дыхательные расстройства, которые могут наступить в любой период ботулизма. В начальную стадию их отличают учащение дыхания до 40 в мин, двигательное беспокойство больного, втягивание межрёберных промежутков, паралич диафрагмы, вовлечение в процесс дыхания плечевой мускулатуры. Уже в эту стадию необходимо перевести больного на ИВЛ.

При введении гетерогенной противоботулинической сыворотки может развиться анафилактический шок, а в более поздние сроки (на 10–12-й день после её использования) – сывороточная болезнь. В последнее время появился ряд сообщений о достаточно часто возникающем миокардите в качестве осложнения ботулизма. Его течение по клиническим проявлениям и прогноз сходны с миокардитом при дифтерии. Без современных методов лечения летальность может составлять до 60% заболевших.

1.3. Эпидемиология, патогенез и основные клинические признаки столбнячной инфекции

Столбняк (Tetanus) – особо тяжёлая, острая, сапрозоонозная (обитатель почв) бактериальная инфекция с контактным механизмом передачи возбудителя, характеризующаяся выделением смертельного токсина, поражением нервной системы и проявляющаяся приступами генерализованных судорог на фоне мышечного гипертонуса.

Заболевание известно с древних времён, на связь между ранениями и развитием столбняка обратили внимание ещё врачи древнейших цивилизаций Египта, Греции, Индии и Китая.

Название болезни и первое описание её клинических проявлений дано Гиппократом, у которого от столбняка умер сын. Изучением

этого заболевания занимались Гален, Цельс, Аретей, Авиценна, Амбруаз Паре и другие знаменитые врачи древности и средневековья. Столбнячная палочка впервые обнаружена русским хирургом Н.Д. Монастырским (1883) в трупах умерших людей и немецким ученым А. Николайером (1884) в абсцессах при экспериментальном столбняке у животных. Чистую культуру возбудителя выделил японский бактериолог Ш. Китазато (1887). Позднее он получил столбнячный токсин (1890) и совместно с немецким бактериологом Э. Берингом предложил антитоксическую сыворотку для лечения столбняка. Французский иммунолог Г. Рамон разработал метод получения столбнячного анатоксина (1923–1926).

С начала XIX в. возбудителя столбняка стали активно изучать, так как заметили, что во время войн происходит массовое заражение с летальными исходами среди военнослужащих. Позднее был создан столбнячный анатоксин, применяемый для массовой профилактики, что позволило значительно снизить риск заболеваемости и смертности от столбняка.

Возбудитель столбняка – грамположительная, подвижная, облигатно анаэробная спорообразующая бактерия Clostridium tetani семейства Bacillaceae. Споры располагаются терминально, придавая бактериям вид «барабанных палочек» или «теннисных ракеток». По форме напоминает барабанные палочки или теннисные ракетки за счет располагающихся на конце спор, по бокам которых расположены до 20 длинных жгутиков (они обусловливают активное проникновение и дальнейшее передвижение по организму). Возбудитель имеет размеры: длина 4–8 мкм и ширина 0,3–0,8 мкм.

Во внешней среде возбудитель столбняка один из самых выносливых, так как образует спору при неблагоприятных условиях и при доступе кислорода.

В испражнениях, почве и на различных заражённых предметах споры сохраняются десятки лет, поэтому почва является неиссякаемым резервуаром столбняка. Выдерживают нагревание до 90 °С в течение 2 ч, при кипячении погибают только через 1–3 ч, в сухом состоянии переносят нагревание до 150 °С, в соленой морской воде живут до 6 мес. Гибнут в течение 14 ч от 1%-го раствора сулемы, формалина и 5%-го раствора фенола. К действию ультрафиолетового излучения (УФИ) устойчивы.

В анаэробных условиях, при температуре 37 °С, достаточной влажности и в присутствии аэробных бактерий (например, стафилококков) споры прорастают в вегетативные формы. Вегетативные формы столбнячной палочки погибают в течение нескольких минут при кипячении, через 30 мин – при 80 °С. Антисептики и дезинфектанты убивают возбудитель столбняка в течение 3–6 ч. В странах с тёплым климатом возможна вегетация спор непосредственно в почве.

Споры столбнячной палочки, попадая в благоприятные анаэробные условия через дефекты кожных покровов, прорастают в вегетативные формы и выделяют самый сильный экзотоксин, относящийся к высокомолекулярным протеинам. По силе он уступает лишь ботулиновому токсину. Его минимальная смертельная доза – 2 нг/кг. Этот токсин состоит из двух фракций – экзотоксин (тетаноспазмин), цитотоксин (тетанолизин или тетаногемолизин) и так называемой низкомолекулярной фракции, усиливающей синтез ацетилхолина (протеин, усиливающий синтез ацетилхолина) [61].

Тетанолизин (тетаногемолизин) – выделяется из клеток возбудителя с первых дней, но его роль в развитии патогенеза до сих пор не имеет однозначного объяснения. Известно лишь то, что он разрушает эритроциты, тем самым вызывая гемолиз, и подавляет фагоцитоз (пожирание клетками иммунной системы самого возбудителя) – эти два направления предопределяют быстрое проникновение возбудителя к цели (нервная система), что значительно сокращает инкубационный период и делает развитие симптомов более стремительным.

Тетанолизин проявляет гемолитическое, кардиотоксическое и летальное действия, вызывает развитие местных некротических поражений. В патогенезе заболевания этот токсин играет менее важную роль. Максимальное накопление токсина в культуре наблюдают уже через 20–30 ч. Процессы его образования не связаны с синтезом тетаноспазмина. Низкомолекулярная фракция усиливает секрецию медиаторов в нервно-мышечных синапсах.

Токсин гематогенным, лимфогенным и периневральным путями распространяется по организму и прочно фиксируется в нервной ткани. Тетаноспазмин – один из самых сильных биологических ядов. Представляет собой полипептид с «дистанцированным» механизмом действия, так как бактерии редко покидают пределы

первичного очага инфицирования. Токсин фиксируется на поверхности отростков нервных клеток, проникает в них (за счёт опосредованного лигандами эндоцитоза) и путём ретроградного аксонного транспорта попадает в ЦНС. Механизм действия связан с подавлением высвобождения тормозных нейромедиаторов (в частности, глицина и у-аминомасляной кислоты) в синапсах (токсин связывается с синаптическими белками синаптобревином и целлюбревином). Первоначально токсин действует на периферические нервы, вызывая местные тетанические сокращения мышц.

Тетаноспазмин – вторая составляющая экзотоксина, которая выделяется только при распаде (то есть после фагоцитоза) и действует по следующему принципу – избирательно поражает синаптобревин (трансмембранный белок-переносчик секреторных везикул-пузырьков клетки, участвующих в выбросе тормозных медиаторов в синапс), что приводит к неконтролируемым мышечным сокращениям, так как идут только процессы возбуждения без тормозных медиаторов. Токсин избирательно блокирует тормозящее действие вставочных нейронов на мотонейроны, нарушая координацию эфферентных рефлекторных дуг. Импульсы, спонтанно возникающие в мотонейронах, беспрепятственно проводятся к поперечнополосатым мышцам, обусловливая их тоническое напряжение. Судорожные сокращения мышц провоцируются афферентной импульсацией от тактильных, слуховых, обонятельных и других рецепторов. Длительные сокращения мышц приводят к развитию гипертермии и большим энерготратам, способствующим развитию метаболического ацидоза.

Ацидоз усугубляется дыхательной недостаточностью, вызываемой уменьшением минутного объема вентиляции легких за счет тонического напряжения диафрагмальных и межреберных мышц. Блокада нейронов ретикулярной формации ствола мозга способствует торможению парасимпатической нервной системы и может также приводить к поражению дыхательного и сосудодвигательного центров, с возможной остановкой дыхания и сердечной деятельности.

Возбудитель в виде спор проникает в организм человека через повреждённые кожные покровы и слизистые оболочки. При анаэробных условиях (глубокие колотые раны, раны с глубокими карманами или некротизацией размозжённых тканей) в ранах

происходят развитие и размножение вегетативных форм, сопровождающиеся выделением экзотоксина. По двигательным волокнам периферических нервов и с током крови тетаноспазмин проникает в спинной, продолговатый мозг и ретикулярную формацию ствола, где фиксируется главным образом во вставочных нейронах полисинаптических рефлекторных дуг. Связанный токсин не поддаётся нейтрализации. Развивается паралич вставочных нейронов с подавлением всех видов их синаптического тормозного действия на мотонейроны. Вследствие этого усиливается некоординированное поступление двигательных импульсов от мотонейронов к мышцам через нервно-мышечные синапсы. Пропускная способность последних повышается из-за усиления секреции ацетилхолина под действием низкомолекулярной фракции. Непрерывный поток эфферентной импульсации поддерживает постоянное тоническое напряжение скелетной мускулатуры.

Одновременно усиливается и афферентная импульсация в ответ на воздействие тактильных, слуховых, зрительных, обонятельных, вкусовых, температурных и бароразражителей. При этом периодически возникают тетанические судороги. Мышечное напряжение ведёт к развитию метаболического ацидоза. На его фоне усиливаются как тонические, так и тетанические судороги, ухудшается сердечная деятельность, создаются предпосылки для вторичных бактериальных осложнений. Сердечно-сосудистые расстройства (тахикардия, артериальная гипертензия, аритмия, фибрилляция желудочков) усугубляются за счёт развивающейся при столбняке гиперактивности симпатической нервной системы. Повышается возбудимость коры и ретикулярных структур головного мозга. Возможно поражение дыхательного и сосудодвигательного центров и ядер блуждающего нерва (бульбарный столбняк), что нередко приводит к смерти больных. Другие причины, обусловливающие летальный исход, могут быть связаны с асфиксией вследствие судорог и развитием осложнений (пневмонии, сепсиса).

От глубины и распространенности поражения нервной системы зависит тяжесть заболевания, органных нарушений, а также прогноз заболевания.

В обычных условиях входными воротами инфекции являются не тяжелые раны и ожоги, а мелкие бытовые травмы (проколы, ссадины и т.п.). Больные эпидемиологической опасности не представляют.

Попадание экзотоксина в желудочно-кишечный тракт не приводит к развитию болезни. Столбняк военного времени связан с обширными ранениями.

Восприимчивость к столбняку высокая. Столбняк встречается во всех регионах земного шара, но частота заболеваемости и процент летальных исходов возрастает по мере приближения к экватору. Нет ни сезонности, ни возрастных и половых ограничений, а относительно географических границ – повсеместное распространение – проблема имеет глобальное значение, смертность при заражении всегда оставляет высокую стабильность. Столбняк вызывается жизнедеятельностью бактерий, которые проникают в организм через раны и прочие повреждения кожного покрова. Самые благоприятные условия для размножения возбудителей столбняка формируются в жаркой и влажной среде, поэтому наибольшее количество смертей от столбняка регистрируется в экваториальных странах Африки, Азии и Латинской Америки. Впрочем, и в относительно благополучной Европе столбняк каждый год уносит тысячи жизней, поэтому говорить о ее безопасности для развитых регионов пока что не приходится.

В странах с невыраженной сменой сезонов (тропики и субтропики) заболевание встречается круглогодично, в странах с умеренным климатом имеет ярко выраженный сезонный характер (конец весны – начало осени).

Частота заболевания – 10–50 случаев на 100 000 населения в развивающихся странах и 0,1–0,6 в странах с обязательной иммунопрофилактикой.

80% случаев столбняка приходится на новорожденных (при инфицировании через пуповину), а также на мальчиков до 15 лет из-за их повышенного травматизма. Среди взрослых около 60% случаев столбняка приходится на лиц пожилого возраста. Наибольший процент заболевших и умерших наблюдается в сельской местности.

Чтобы понять всю тяжесть столбняка, достаточно знать о том, что от 30 до 50% пациентов умирают, даже если им сделана прививка против столбняка. В регионах, где медицинская помощь развита очень слабо, смертность пациентов может достигать 85–90%.

Даже применение современных методов лечения не позволяет снизить показатели смертности ниже 17–25% заболевших. Эти цифры сохраняются из-за развития в настоящее время осложнений,

таких как пневмония, сепсис и паралич сердца, вызываемый токсином бактерий [49]. В регионах, где отсутствуют профилактические прививки и квалифицированная медицинская помощь, смертность составляет около 80%, у новорожденных достигает 95%.

В мире ежегодно регистрируется около 61 000 смертей. Однако, учитывая возможность большого количества незарегистрированных случаев и невыраженных форм болезни (особенно у новорожденных), общие потери от столбняка на планете можно оценить в 350–400 тысяч человек ежегодно [50].

В культурах токсин появляется на 2 сут, достигая пика образования к 5–7 дню. Возбудитель приобретает патогенные свойства только при попадании на поврежденные ткани живого организма, лишённые доступа кислорода. Особенно опасны колотые или имеющие глубокие карманы раны, где создаются условия анаэробиоза.

Заболевание может развиться при глубоких ранениях и повреждениях кожи и слизистых оболочек (проколы, занозы, порезы, потёртости, размозжения, открытые переломы, ожоги, отморожения, укусы, некрозы, воспалительные процессы), ожогах и обморожениях, при родах, у новорожденных через пуповину, обрезанную нестерильным инструментом, а также при некоторых воспалительных заболеваниях, при которых создаётся контакт очага воспаления с окружающей средой (гангрена, абсцессы, язвы, пролежни и т.д.). Операционные раны, особенно на толстой кишке и ишемизированных конечностях, могут стать входными воротами для инфекции с последующим развитием послеоперационного столбняка. Вмешательства по поводу аборта вне медицинских учреждений могут стать причиной постабортального столбняка. Возможность передачи возбудителя от больного здоровому человеку отсутствует.

Частой причиной заражения бывают микротравмы нижних конечностей – ранения, уколы острыми предметами, колючками, даже занозы. Так, отец известного русского поэта В.В. Маяковского заразился столбняком через царапину, оставленную иголкой.

Также заболевание может быть вызвано укусами ядовитых животных, пауков и пр. (из пауков опасен род Poecilotheria).

В природе резервуаром и источником инфекции являются травоядные животные, грызуны, птицы и человек, в кишечнике которых

обитает возбудитель; последний выделяется во внешнюю среду с фекалиями. Столбнячная палочка также широко распространена в почве и других объектах внешней среды, где она может размножаться и долго сохраняться. Таким образом, возбудитель имеет два взаимосвязанных и взаимообогащаемых мест обитания, а следовательно, и два источника возбудителя – кишечник теплокровных и почву. Значимость того или иного источника, по-видимому, в значительной мере обусловлена климатогеографическими условиями местности. Наиболее благоприятны для вегетации и сохранения микроорганизма чернозёмные и краснозёмные, богатые гумусом почвы, а также почвы, хорошо удобренные органическими веществами. Из почвы с пылью бактерии могут попадать в любые помещения (в том числе перевязочные и операционные блоки), на различные предметы и материалы, применяемые в хирургической практике (различные порошки, гипс, тальк, лечебные глину и грязь, вату и др.).

Частота носительства спор столбнячной палочки человеком варьирует от 5–7 до 40%, причём повышенную степень носительства отмечают у лиц, профессионально или в быту соприкасающихся с почвой или животными (сельскохозяйственных рабочих, конюхов, доярок, ассенизаторов, работников парников и др.). C. tetani обнаруживают в содержимом кишечника коров, свиней, овец, верблюдов, коз, кроликов, морских свинок, крыс, мышей, уток, кур и других животных с частотой 9–64%. Обсеменённость помёта овец достигает 25–40%, что имеет особое эпидемиологическое значение в связи с использованием тонкой кишки овец для изготовления хирургического кетгута.

Заболеваемость столбняком – спорадическая, в виде не связанных друг с другом случаев. Зональное распространение инфекции обусловлено как климатогеографическими, так и социально-экономическими факторами. Сезонность заболевания весенне-летняя. Среди заболевших преобладают жители сельской местности, дети и лица пожилого возраста; именно в этих группах регистрируют большинство летальных исходов. В связи с широким проведением активной иммунизации в настоящее время столбняк новорождённых не регистрируют. Наличие постоянного резервуара инфекции в почве определяет возможность заражения в результате мелких бытовых травм. По-прежнему встречают случаи

внутрибольничного заражения столбняком при операциях на конечностях, гинекологических операциях.

Болеть могут все теплокровные животные.

Эпидемиологических мероприятий в очаге болезни не проводят. Иммунитет после болезни не развивается. Выздоровление после клинической формы столбнячной инфекции не обеспечивает защиты от нового заболевания. Небольшое количество столбнячного токсина, достаточное для развития заболевания, не обеспечивает продукцию необходимых титров антител. Поэтому все больные с клиническими формами столбняка должны быть обязательно иммунизированы столбнячным анатоксином – сразу же после постановки диагноза или после выздоровления.

Столбняк классифицируют в зависимости от характера входных ворот инфекции (посттравматический, поствоспалительный и криптогенный столбняк), а также от распространенности процесса (генерализованный и местный). Важно подчеркнуть, что местный столбняк является крайне редкой формой заболевания.

Инкубационный период столбняка может составлять от нескольких дней до месяца, но наиболее часто 3–14 дней. При этом, чем короче инкубационный период, тем тяжелее протекает болезнь. Этот момент считается от начала внедрения возбудителя до первых клинических признаков. Как только происходит контакт возбудителя с открытой раневой поверхностью, происходит его фиксация и размножения в месте внедрения, по ходу действия фагоцитоза происходит выделение из клеток возбудителя части экзотоксина – тетаноспазмина. Но длительность инкубационного периода объясняется тем, что тетаноспазмин не может непосредственно из крови достигнуть ЦНС, ему приходится проходить долгий этапный путь: из веток сосудов, которые кровоснабжают мышечные волокна, через кровь, происходит контакт с мионевральными синапсами (соединение между мышечными волокнами и двигательными нейронами). Тетаноспазмин связывается сначала с рецепторами, а потом с мембранами этих нервных клеток, проникая через неё непосредственно в клетку, продвигается по волокнам этих нервных клеток к следующим клеткам, достигая таким образом ЦНС (притом скорость продвижения этого токсина – 1 см/ч). После этапного прохождения ряда неврогенных структур возникает «судорожный период» с соответствующими симптомами и признаками [66].

Иногда заболевание начинается с продромальных явлений (напряжение и тремор мышц в области проникновения инфекции, головная боль, потливость, раздражительность), но, как правило, первым признаком столбняка является боль тупого, тянущего характера в месте попадания в организм возбудителя, даже если рана полностью зажила. Затем развиваются характерные симптомы столбняка: тризм (судорожное сокращение и напряжение жевательной мускулатуры, затрудняющее открывание рта), дисфагия (затруднение глотания), ригидность затылочных мышц (не сопровождающаяся другими менингеальными симптомами), «сардоническая улыбка» (специфическое напряжение мимической мускулатуры: наморщенный лоб, суженные глазные щели, губы растянуты, уголки рта опущены).

Сочетания тризма, дисфагии, «сардонической улыбки» и напряженности затылочных мышц является типоспецифическим симптомокомплексом, позволяющим безошибочно поставить или хотя бы заподозрить столбняк на ранних стадиях [67].

Разгар заболевания характеризуется тоническими, довольно болезненными судорогами мышц туловища и конечностей. Напряжение мускулатуры становится постоянным (даже во сне). На третий-четвертый день заболевания происходит одеревенение мышц брюшной стенки, движение в конечностях ограничено (ноги вытянуты), дыхание учащенное, приобретает поверхностный характер за счет спазма межреберных мышц и диафрагмы. Дефекация и мочеиспускание затруднены, что также связано с напряжением мышц тазового дна, кишечника и мочевыводящих путей.

В результате тотального болезненного напряжения мышц спины развивается опистотонус – вид максимально разогнутого тела: больной выгибается в положении на спине с запрокинутой головой, в результате гипертонуса мышц разгибателей поясница выгибается в виде дуги таким образом, что между ней и постелью можно просунуть руку.

При этом в напряженных мышцах периодически возникают внезапные тетанические судороги, первоначально продолжающиеся несколько секунд, с прогрессированием заболевания, удлиняющиеся до нескольких минут. Лицо больного приобретает цианотичный оттенок, контуры мышц четко прорисовываются, опистотонус усиливается. В это время больные испытывают интенсивные боли и затруднение дыхания (одышка), часто стонут, хватаются руками

за края кровати. Температура тела повышается (особенно на лице), возникает усиленное потоотделение, слюнотечение. При физикальном обследовании отмечают тахикардию, иногда артериальную гипертензию. При этом больной все время находится в ясном сознании, нарушения сознания (спутанность и бред) возникают незадолго до летального исхода.

Судороги при столбняке часто называют тонико-клоническими. На момент этих судорожных приступов возникает полная скованность, судороги очень болезненны, возможность движения сохраняется только в кистях и стопах – это ещё один важный дифференциально-диагностический признак, но уже на более поздних этапах. Эти судороги могут возникнуть в результате любых, даже самых незначительных раздражителей – тактильных, слуховых, зрительных. И самое страшное в этом заболевании то, что на момент этих невероятно болезненных судорожных приступов человек остаётся в полном сознании и при присоединении декомпенсации со стороны органов и систем наступает медленная и мучительная смерть, но человек до самого конца остаётся в сознании.

Наиболее опасным периодом для жизни больного является 10–14-й день болезни. В это время нарастающий метаболический ацидоз вызывает гипертермию, гиперсаливацию и повышенное потоотделение, способствует развитию полиорганной недостаточности. Возникают тяжелые нейрогенные нарушения в связи с глубоким токсическим поражением мозга, высока вероятность паралича сердечной мышцы, асфиксии. В связи с нарушением вентиляции легких нередко присоединение инфекции и развитие вторичных пневмоний. Частые судороги способствуют возникновению изнуряющей бессонницы.

В случае перенесения критической фазы заболевания происходит постепенное стихание клинических признаков и наступает фаза реконвалесценции, продолжающаяся около полутора-двух месяцев до полного исчезновения симптоматики.

Столбняк может протекать с различной степенью тяжести, которая определяется по совокупности и выраженности признаков.

Легкое течение характеризуется инкубационным периодом более 20 дней, умеренным опистотонусом и выраженностью мимического спазма, отсутствием тонических судорог (или незначительной их интенсивностью и частотой). Температура при этом

сохраняется в нормальных или субфебрильных пределах. Нарастание симптоматики заболевания обычно занимает 5–6 дней.

При среднетяжелом течении инкубационный период составляет 15–20 дней, нарастание признаков занимает от 3 до 4 сут, несколько раз в сутки возникают судороги, отмечается субфебрильная температура и умеренная тахикардия.

Тяжелая форма столбняка проявляется укороченным инкубационным периодом (от одной до двух недель), быстрым нарастанием симптомов (в течение одного-двух дней), типичной клиникой с часто возникающими судорогами, выраженной потливостью, тахикардией, лихорадкой. Тоническое напряжение захватывает межрёберные мышцы, диафрагму и голосовую щель. С этого момента высок риск летального исхода из-за остановки дыхания в результате спазма дыхательной мускулатуры или в результате непосредственного поражения дыхательного и сосудодвигательного центра в продолговатом мозге.

Формирование полиорганной недостаточности возможно как на высоте клинических проявлений, так и в виде следствия после перенесённого заболевания. Изменения наблюдаются со стороны кислотно-щелочного состояния крови, также со стороны сердечно-сосудистой и дыхательной систем:

– повышается АД, развивается тахикардия с возможным развитием аритмии;

– из-за остановки дыхания развивается цианоз, а если приступы слишком частые, то постепенно формируется ацидоз, что усугубляет общее состояние и замыкает сформировавшийся порочный круг, а именно делает возбудимость ещё более лёгкой и ещё больше поражают центр продолговатого мозга, усугубляются дыхательные и сердечно-сосудистые нарушения. Также встречается очень тяжелая форма столбняка (молниеносная), при которой инкубационный период составляет не более недели, клиника развивается в течение нескольких часов, тонические судороги возникают каждые 3–5 мин, выраженные нарушения со стороны органов и систем, цианоз, угроза асфиксии, паралича сердца и т.д.

Особенно тяжелое течение отмечают при бульбарном, нисходящем столбняке Бруннера, при котором максимальное поражение охватывает мускулатуру лица, шеи, голосовых связок, дыхательные и глотательные группы мышц, диафрагму. При этой форме харак-

терно поражение дыхательного и сосудодвигательного ядер блуждающего нерва, что чревато нейрогенной остановкой сердца и дыхания.

Иногда (в редких случаях) может отмечаться восходящий столбняк, начинающийся с болезненных подергиваний периферических мышц и постепенно генерализующийся с развертыванием типичной симптоматики.

Также к редким формам относят местный столбняк, возникающий при ранениях головы и характеризующийся параличом лицевых мышц по типу «сардонической улыбки» с ригидностью затылочных мышц и двусторонним (иногда поражение стороны ранения выражено больше) парезом черепно-мозговых нервов (лицевой паралитический столбняк Розе).

Тяжелыми осложнениями столбняка с высокой вероятностью летального исхода является асфиксия и остановка сердца. Кроме того, столбняк может способствовать возникновению переломов костей, разрывов мышц, компрессионной деформации позвоночного столба. Нередким осложнением столбняка является пневмония, может развиться коронарный спазм и инфаркт миокарда.

Во время выздоровления иногда отмечаются контрактуры, параличи третьей, шестой и седьмой пар черепно-мозговых нервов.

В развивающихся странах столбняк новорожденных (заражение происходит при попадании столбнячной палочки в рану после усечения пуповины) является одной из распространенных причин младенческой смертности.

Столбняк новорождённых – отдельная форма заболевания, так как заболевание протекает стремительнее и смерть наступает ещё до наступления типичных клинических проявлений. Вначале у ребёнка нарушается акт глотания и сосания, наблюдается отказ от груди. Тетанические судороги сопровождаются криком, тремором нижней губы, подбородка и языка, присоединяется непроизвольное мочеиспускание и дефекация. Во время приступа также наблюдается цианоз и блефароспазм (спазм век – как сильное зажмуривание). Возникает у новорождённых, матери которых не были привиты, то есть те дети которые не получили пассивный иммунитет от матерей. У новорожденных столбняк может осложниться сепсисом.

Из осложнений столбняка на первое место чаще становятся переломы костей, отрыв и разрыв мышц, возникают мышечные

контрактуры, разрывы суставов. К менее опасным и возникающим на поздних этапах выделяют вторичные бактериальные инфекции (пневмония, пиелонефрит, сепсис, ателектаз лёгких). При обширных осложнениях возникают абсцессы и флегмоны в воротах инфекции. Но в повседневной жизни относительно ворот инфекции, картина диаметрально противоположная – ворота инфекции зачастую вообще невозможно найти.

1.4. Эпидемиология, патогенез и основные клинические признаки раневых клостридиозов (газовые гангрены Cl. perfringens, Cl. oedematiens, Cl. histoliticum, Cl.septicum)

Газовая гангрена (Gas gangrene, анаэробная гангрена, гнилостная инфекция, газовая флегмона, рожа фронтовая, злокачественный отёк, антонов огонь и др. – всего в перечне 67 названий) – чрезвычайно тяжелое острое сапронозное инфекционное заболевание с контактным механизмом передачи возбудителя, вызываемое рядом микробов – клостридий (Cl. perfringens, Cl. septicum, Cl. oedematiens, Cl. histolyticum и др.), развивающихся без доступа кислорода [69, 70, 71, 72, 73]. Возникает в глубоких рвано-ушибленных или огнестрельных, размозженных обширных ранах с карманами и углублениями при нарушении местного кровообращения, а также при открытых переломах, поражениях толстого кишечника и пр. Даже небольшая рана может осложниться анаэробной инфекцией. Вероятность возникновения увеличивается при массивном разрушении мышц, а также при загрязнении раневой поверхности землей, пылью или обрывками одежды. Особенно часто встречается в военное время, почти исключительно на конечностях (обычно на нижних).

Хотя газовая гангрена в мирных условиях встречается редко, о ней всегда нужно помнить при любых ранениях как конечностей, так и туловища. Наиболее вероятно развитие газовой гангрены при транспортных и шахтных травмах с локализацией ранений в области бедер, ягодиц; у лиц, обслуживающих крупный рогатый скот, свиней, овец, коз, особенно если несчастный случай произошел в том месте, где содержатся животные, и рана загрязнена навозом.

Газовая гангрена, как специфическое осложнение ран, известна еще со времен Гиппократа. О ней много сказано в описаниях всех войн в истории, главным образом из-за ее драматических проявлений и очень высокой смертности, с ней связанной.

В литературе есть утверждение, что трагическая смерть гениального французского писателя Оноре де Бальзака, возможно, была следствием газовой гангрены ноги [69]. Академик Б.В. Петровский обосновал версию анаэробной инфекции как непосредственной причины смерти А.С. Пушкина [70]. Кстати, герой романа И.С. Тургенева «Отцы и дети» Базаров, судя по описанию, также умер от анаэробной гангрены [69].

Точной, официальной обобщенной статистики частоты возникновения раневых осложнений, летальности и уровня инвалидности, вызванных анаэробной клостридиальной инфекцией, не существует, так как публикация статистических сведений была запрещена [69].

Частота развития анаэробной газовой гангрены в огнестрельных ранах во время Первой мировой войны колебалась в зависимости от времени года, характера боевых действий, местности, на которой велись бои, организации медицинской помощи и составляла, в среднем, у 1,5–2,0% раненых. Число жертв от анаэробной газовой инфекции во время Первой мировой войны, по данным Н.Н. Бурденко, приближается к 200 000.

Во время Великой Отечественной войны масштабы людских потерь от газовой гангрены в абсолютных цифрах были очень значительны, поэтому главный хирург Советской армии академик Н.Н. Бурденко признал анаэробную газовую инфекцию стратегической [69]. Так от анаэробной инфекции конечностей погибали 30–35% пациентов, а ампутации конечностей были выполнены 50% раненым.

Точных сведений о частоте развития анаэробной клостридиальной инфекции, летальности и инвалидности во время Второй мировой войны в доступной литературе не опубликовано. По данным некоторых авторов, погибли от газовой гангрены более 22 000 раненых [69].

По данным Т.Л. Симаковой, в период Великой Отечественной войны при обследовании 262 раненых в нижние конечности в 123 случаях была обнаружена Cl. perfringens типа А, у 77 раненых упомянутый возбудитель выделялся в ассоциации с другими патогенными анаэробами, Cl. oedematiens были выделены у 62 человек.

Из 262 обследованных клиническая картина РАИ развивалась у 135 человек. Эти микроорганизмы выделялись из содержимого ран в 20–80% случаев [74, 75, 76, 77]. При этом следует отметить, что наибольшее значение в развитии РАИ придается Cl. perfringens типа А, которые идентифицируются в 80–100% случаев развития данной инфекции [75, 76, 77].

В естественных условиях газовая инфекция в 80% случаев вызывается ассоциациями анаэробных и аэробных бактерий, причем патологический процесс обусловливается комплексным действием входящих в ассоциацию бактериальных тел, их токсинов и ферментов, а также ядовитыми продуктами распада бактерий и тканей организма [2]. Попадающие в рану вместе с возбудителями газовой инфекции сопутствующие микробы могут подавить их развитие, но могут способствовать их размножения и отягощать заболевание.

В мирное время раневая клостридиальная газовая инфекция встречается редко. Однако следует помнить, что она является наиболее опасным для жизни и тяжелым осложнением ран любого происхождения. Если анаэробная газовая инфекция своевременно не распознана и не начато адекватное лечение, погибают от 70 до 100% заболевших [69].

Возбудитель – спорообразующая анаэробная бактерия из семейства Bacillaceae рода Clostridium, постоянно обитающая в кишечнике человека и домашних травоядных животных. Может высеваться с кожи и из фекалий практически здоровых лиц. У раненых обычно обнаруживают четыре анаэробные клостридии: Cl. perfringens, Cl. oedematiens, Cl. histoliticum, Cl. septicum. Возбудитель открыт в 1861 г. Л. Пастером (выделил из трупа коровы) [69]. В 90% случаев возбудителем газовой гангрены является Clostridium perfringens, которая дифференцируется по серологическим типам (A, B, C, D, E, F, G), отличающимся по антигенным свойствам. Наибольшее значение имеют Cl. perfringens типа А.

В организме человека и животных клостридии образуют капсулу, а в окружающей среде – спору. Больной человек непосредственной эпидемической опасности не представляет.

Источниками этих микроорганизмов являются различные объекты окружающей среды, а также человек [80, 81, 82, 83]. Из пищеварительного тракта человека и животных микробы с экскрементами

попадают в почву и рассеиваются во внешней среде. В эпидемиологии клостридиозов ведущее место занимает почва, особенно унавоженная, разлагающиеся органические соединения, сточные воды, в которых клостридии, преимущественно в споровой форме, выявляются в 100% случаев [84, 85, 86]. Контаминированная возбудителем почва представляет наибольшую опасность в засушливые сезоны года, особенно в период интенсивных ветров. Споры чрезвычайно устойчивы в окружающей среде, выдерживают кипячение более 30 мин, однако встречаются термоустойчивые варианты, выдерживающие кипячение в течение нескольких часов [87].

П.Н. Бургасов и С.Н. Румянцев относят патогенные клостридии в основном к почвенным микроорганизмам и приводят данные о частоте их обнаружения в почве и на ранах (табл. 1.5) [1].

Попав в рану, споры клостридий прорастают и начинают размножаться, продуцируя ферменты, токсины, нейраминидазу, сиалидазу и другие активные метаболиты [88, 89, 90, 91]. Воздействуя на определенные структуры, эти метаболиты нарушают жизнедеятельность организма, обусловливая развитие весьма опасных для жизни патологических состояний [92, 93, 94, 95]. Основными факторами вирулентности возбудителей РАИ являются продуцируемые ими экзотоксины – биологически активные белки, играющие ведущую роль в патогенезе этой инфекции. Наиболее значимым из которых является альфа-токсин (α) (лецитиназа С), обладающий лецитиназным, летальным, дермонекротическим, гемолитическим действием [2, 84, 88, 89]. Энзимная активность альфа-токсина клостридий заключается в способности расщеплять биологические субстанции, входящие в состав клеточных мембран (сфингомиелин, фосфатидилэтаноламин, лецитин), увеличивая их проницаемость

Таблица 1.5

Частота обнаружения патогенных клостридий в почве и ранах

Вид клостридий	Частота обнаружения клостридий, %		
	в почве	в ранах	
		осложненных	неосложненных
Cl. perfringens	100	64	32
Cl. oedematiens	49	42	3
Cl. histoliticum	16	12	2
Cl. septicum	1	2	1

[89, 96, 97]. Гемолитическое действие альфа-токсина клостридий приводит к инактивации Na^+-K^+-зависимой аденозинтрифосфатазы, в результате чего возникает ионный дисбаланс между клеткой и внеклеточной средой [97]. Некротизирующий эффект заключается в активации тромбообразования в сосудах, вследствие чего развивается ишемия и образуется некроз тканей [80, 81, 94]. Помимо этого, альфа-токсины обладают способностью подавлять лейкоцитарную реакцию, разрушать лейкоциты и тучные клетки в очаге повреждения, а также угнетать фагоцитарную активность лейкоцитов, следствием чего является понижение защитных сил организма [88, 89]. В последнее время в развитии РАИ определенное значение придают и другим, продуцируемым клостридиями, токсинам, а именно: лямбдатоксину (λ) (протеиназа), каппа-токсину(u) (коллагеназа), мю-токсину(η) (гиалуронидаза), ни-токсин (ν) (дезоксирибонуклеаза), эпсилон-токсин (ε) (протеиназа), бэта- и тау- (β, τ) токсины, гамма- и эта(γ, η)-токсины, тэта и дельта-токсины (θ, δ) [2,98].

Каждый из возбудителей газовой гангрены вырабатывает не одно, а несколько токсических веществ, большинство из которых практически не отличаются от ферментов. Природа и действие некоторых токсинов изучены недостаточно.

Большую роль в развитии РАИ играют активные метаболиты клостридий, которые способствуют удалению кислорода из тканей, в результате чего угнетается фагоцитоз, разрушаются фибрин и энерговырабатывающие системы клеток – сукциноокcидазы, магнезиоактивный аденин, трифосфатазы мышечных клеток [84, 89, 92, 99].

Возникновению РАИ способствует также сниженная сопротивляемость организма, локализация и характер ранения, обширность поражения, степень связанных с ним функциональных расстройств и нарушений кровообращения, наличие инородных тел в ране. По мнению большинства исследователей, наличие в ране возбудителей этой инфекции является необходимым, но не обязательным фактором ее развития. По мере накопления клинических данных было показано, что патогенные клостридии обнаруживаются в ранах военного и мирного времени сравнительно часто (до 90% случаев), но практически не участвуют в патогенезе раневого процесса. У пострадавших отсутствует клиника «классической» РАИ, а раневой процесс протекает по типу обычной (банальной) гнойной инфекции [100, 101]. Определяющее значение

имеют состояние реактивности организма и степень местных нарушений в ране [83, 102]. Наиболее отчетливо значимость этих факторов наблюдается при огнестрельных ранениях, которые чаще осложняются РАИ ввиду исключительной тяжести этого вида повреждений. Наступающие в этом случае обширные разрушения окружающих тканей и нарушения кровообращения способствуют подавлению функции системы мононуклеарных фагоцитов, снижению хемотаксиса лейкоцитов, бактерицидной активности сыворотки крови и нейтрофилов, уровня естественных противомикробных антител и комплемента [93, 98]. Естественно, все это способствует возникновению и прогрессированию РАИ.

Наиболее благоприятной средой размножения клостридий является отсутствие кислорода, температура выше 39 °С, наличие белка и глюкозы, pH 7,2–7,4.

Возбудитель поражает все мягкие ткани, но главным образом жировую клетчатку и мышцы. При газовой гангрене классические признаки воспаления отсутствуют.

Процесс характеризуется прогрессирующим отёком, зловонным отделяемым, газообразованием в тканях, общим тяжёлым состоянием, омертвением тканей организма, вызванным отравлением специфическими токсинами возбудителей болезни, а также продуктами распада тканей.

По клиническому течению различают анаэробную инфекцию молниеносную (с быстрым смертельным исходом), острую и подострую.

Для газовой гангрены характерно раннее бурное начало. Симптомы обычно появляются на 1–3-й день после травмы. Ткани вокруг раны отекают, появляется зловонное отделяемое с пузырьками газа. Отек стремительно распространяется на соседние участки, состояние больного быстро ухудшается, отмечаются признаки отравления организма продуктами распада тканей. Без специализированной медицинской помощи смерть наступает в течение 2–3 сут с момента начала болезни.

Особенности местных и общих проявлений зависят от вида возбудителя.

Как уже было отмечено, существенное значение в развитии газовой гангрены принадлежит Cl. perfringens, являющейся бактериальным видом, способным продуцировать одновременно все

известные гангренозные токсины (α-, β-, γ-, δ-, ε-, η-, τ-, θ-, ι-, λ-, μ-, ν-токсины) [2].

Для Clostridium perfringens характерно фибринолитическое, токсико-гемолитическое и некротическое течение, сопровождающееся отеком, некрозом тканей, гемолизом эритроцитов, формированием кровянистого экссудата и эмфиземой.

Clostridium oedematiens вырабатывает α-, β-, γ-, δ-, ε-, η-, τ-, θ-токсины, которые вызывают образование большого количества газа и при этом оказывают также гемолитическое воздействие на организм.

Clostridium septicum продуцирует α-, β-, μ-токсины, которые вызывают серозно-кровянистый отек тканей, малое количество выделяемого газа и интенсивное разрушение эритроцитов, а также некроз мышц.

Clostridium histolitycum вырабатывает α-, β-, γ-токсины, которые отличаются особой агрессивностью по отношению к живым тканям. Всего в течение 10–12 ч они способны разрушить соединительную и мышечную ткань, превращая их в кровянистую жидкость.

Температура тела повышена до 38–40 °С, отмечается снижение артериального давления, тахикардия, учащенное дыхание, жажда, озноб, мучительная бессонница, головная боль, ломота в мышцах. Пациент возбужден, говорлив или, напротив, подавлен. Постепенно развивается вначале олигурия (уменьшение количества выделяемой мочи), а затем и анурия (отсутствие мочи). В тяжелых, прогностически неблагоприятных случаях возможно понижение температуры тела и гематурия.

Разрушение эритроцитов становится причиной быстро развивающейся анемии и гемолитической желтухи. В анализах крови выявляется снижение количества эритроцитов, снижение уровня гемоглобина, лейкоцитоз со сдвигом формулы влево и преобладанием юных форм нейтрофилов.

Анаэробная инфекция поражает преимущественно раны с большой зоной повреждения тканей, так как для ее развития важно присутствие в ране большого количества нежизнеспособных тканей, лишенных кровоснабжения, а значит, и кислорода. В таких тканях возбудители анаэробной инфекции свободно размножаются, выделяя токсины, обусловливающие тяжелую общую реакцию организма. Наиболее подвержены анаэробной инфекции раны об-

ластей, богатых мышечной тканью (ягодица, бедро). Процесс особенно быстро распространяется в мышцах и по ходу сосудистых пучков, может переходить с конечности на туловище. При пулевых ранениях развитию анаэробной инфекции способствует наличие в раневом канале кусков одежды, обуви и т.п., увлеченных пулей или осколками снаряда. Развитию анаэробной инфекции способствуют также кровопотеря, истощение, наложение жгута на раненую конечность.

Анаэробная инфекция в мирное время возможна при обширных рваных ушибленных ранах, сильно загрязненных землей. Встречаются осложнения анаэробной инфекции после криминальных абортов.

Начальными симптомами анаэробной инфекции являются высокая температура, сильные распирающие боли в ране и по ходу сосудов, отек, бледность кожных покровов. При осмотре пораженной области видны ясно выраженные подкожные вены, синие пятна или бронзовые полосы на коже. Общие симптомы обусловливаются тяжелейшей интоксикацией: больной бледен, с заостренными чертами лица, кожные покровы желтушной окраски. Отмечаются беспокойство и страх, пот, увеличение кровяного давления, малый и частый пульс. Больной сохраняет сознание, но находится в состоянии полной апатии, иногда эйфории. При ощупывании пораженной области возникает ощущение «хруста снега» (крепитация). Этот признак обусловлен наличием пузырьков газа в тканях. На коже могут появиться пузырьки, наполненные жидкостью (отечная жидкость проникает в эпидермальный слой и приподнимает его). При разрезе рана почти не кровоточит, сосуды тромбированы, мышечная ткань имеет вид вареной телятины. При глубоких разрезах из раны выделяются ихорозно-кровянистая жидкость и пузырьки газа.

К числу наиболее постоянных местных симптомов относится отек окружающих тканей, образование газа, разрушение мышечной ткани и отсутствие классических признаков воспаления.

С учетом местных проявлений выделяют четыре формы газовой гангрены.

Классическая или эмфизематозная форма. Наблюдается умеренный отек, постепенно сменяющийся омертвением тканей с выделением большого количества газа. Гной отсутствует. Раневая

поверхность сухая, выявляются обширные очаги некроза. Грануляций нет, на дне виднеется омертвевшая серо-зеленая, не кровоточащая мышечная ткань с трупным запахом. При надавливании из раны выделяется газ и сукровичная жидкость. Кожа в зоне поражения холодная, бледная, покрытая буроватыми пятнами. По мере прогрессирования инфекции боли в ране сначала резко усиливаются, затем чувствительность теряется. Пульс на периферических артериях исчезает, конечность приобретает бурую окраску и омертвевает.

Отечно-токсическая форма. Сопровождается обширным, быстро распространяющимся отеком, нарастающим буквально в течение каждой минуты. Рана без гнойного отделяемого, газ выделяется в малых количествах или отсутствует. Из-за быстро нарастающего отека мышцы сдавливаются и выбухают из раны. Подкожная клетчатка зеленоватая, желеобразная, мышечная ткань бледная, кожные покровы вокруг раны холодные, блестящие, резко напряженные. По мере развития воспаления периферический пульс исчезает, конечность становится бурой, развивается омертвение.

Флегмонозная форма. Протекает более благоприятно, может развиваться на ограниченном участке. Отек окружающих тканей умеренный или незначительный, на дне раны – розовые мышцы с участками некроза. Из раны выделяется гной и пузырьки газа. Кожа вокруг раны теплая, без пятен. Пульс на периферических артериях сохранен.

Гнилостная или путридная форма. Развивается в результате симбиоза анаэробных и гнилостных микроорганизмов. В отличие от других форм чаще возникает не на конечностях, а на туловище. Характеризуется молниеносным течением с бурным распадом тканей. Инфекция быстро распространяется по клетчаточным пространствам, вызывая омертвение клетчатки, мышц и фасций. Из раны выделяется газ и зловонное гнилостное отделяемое с кусочками разрушенных тканей. Скорость развития инфекции объясняется симбиозом аэробных и гнилостных бактерий. Присоединение гнилостной инфекции обусловливает разрушение стенок сосудов, поэтому при этой форме газовой гангрены часто наблюдаются вторичные кровотечения. Из общих симптомов заболевания можно выделить ряд наиболее типичных признаков газовой гангрены:

– снижение артериального давления;
– подавленность или, наоборот, чересчур сильное возбуждение;
– тахикардия;
– повышение температуры тела до 38–39 градусов;
– мучительная бессонница;
– обезвоживание;
– учащенное дыхание;
– быстроразвивающаяся анемия.

Газовая гангрена характеризуется рядом специфических симптомов, некоторые из которых являются патогномоничными; большинство из них направлено на выявление образующегося газа:

– симптом лигатуры (симптом Мельникова) – при наложении лигатуры на участок конечности уже через 15–20 мин нить начинает впиваться в кожу из-за распухания конечности.

– симптом шпателя – при постукивании металлическим шпателем по поражённой области слышен характерный хрустящий, с тимпаническим оттенком звук. Такой же звук может быть слышен при бритье кожных покровов вокруг раны (симптом бритвы);

– симптом пробки шампанского – при извлечении тампона (салфетки) из раневого хода слышен хлопок;

– симптом Краузе – межмышечные скопления газа на рентгеновском снимке визуализируются в виде «ёлочек».

Заболевание протекает очень бурно, и при несвоевременно начатом лечении быстро (в течение 2–3 сут) наступает смерть. Иногда смерть наступает намного быстрее (так называемая «мгновенная» газовая гангрена). В последнем случае человека спасет только срочное оперативное вмешательство и квалифицированный медицинский уход.

Изложенные в главе краткие сведения об анаэробной клостридиальной инфекции свидетельствуют о тяжести вызываемых ею заболеваний, высокой летальности и инвалидности. Указанные обстоятельства побудили ученых всего мира в XX в. сосредоточить свои усилия на разработке средств специфической профилактики этой грозной инфекции, что и послужило основанием для написания следующей главы.

Литература

1. *Бургасов, П.Н.* Эволюция клостридиозов / П.Н. Бургасов, С.Н. Румянцев. – М.: Медицина, 1974. – 246 с.

2. *Мельников, В.Н.* Анаэробные инфекции (клостридиозы) / В.Н. Мельников, Н.И. Мельников. – М.: Медицина, 1973. – 288 с.

3. *Lee, W.* Correlation of toxic and non-toxic strains of Cl. Botulinum by DNA composition and Homology / W. Lee, H. Riemann // J. gen. Microbiol. – 1970. – 60. – P. 117.

4. *Адо А.Д.* Вопросы общей нозологии. – М., 1985. – 463 с.

5. *Покровский, В.И.* Приобретенный иммунитет и инфекционный процесс / В.И. Покровский, М.М. Авербах, В.И. Литвинов и др. – М., 1979. – 250 с.

6. *Finlay, B.* Common themes in microbial pathogenicity / B.Finlay, S. Falkow // Microbiol Rev. – 1989. – Vol. 53, № 2. – P. 210–230.

7. *Супотницкий М.В.* Микроорганизмы, токсины и эпидемии. – М., 2005. – 376 с.

8. *Schmitt, C.K.* Bacterial toxins: Friedens or foes? / C.K. Schmitt, K.C. Meysick, A.D. Brien // Emerg. Infect. Dis. – 1999. – V.5, № 2. – P. 224–234.

9. *Halpern, J.* Neurospecific binding, internalization and retrograde axonal transport / J. Halpern, E. Neale // Curr Top Microbiol Immunol. – 1995. – Vol. 195, № 1. – P. 221–241.

10. *Arnon, S.* Human tetanus and human botulism // In: The clostridia: molecular biology and pathogenesis. San Diego: Academic Press, 1997. – P. 95–115.

11. *Roux, E.* Contribution a l'etude de la diphtherie. – Ann Inst Pasteur, 1888. – P. 629–631.

12. *Schlessinger, D.* Bacterial toxins // In: Mechanisms of microbial disease. Baltimore: Williams and Wilkins, 1993. – P. 162–75.

13. *Songer, J.G.* Bacterial phospholipases and their role in virulence // Trends Microbiol. – 1997. – №.5. – P. 156–161.

14. *Lottenberg, R.* Capturing host plasmin(ogen): a common mechanism for invasive pathogens? / R. Lottenberg, D. Minning-Wenz, M.D. Boyle // Trends Microbiol. – 1994. – №2. – P. 20–24.

15. *Harrington, D.J.* Bacterial collagenases and collagendegrading enzymes and their potential role in human disease // Infect Immun. – 1996. – № 64. – P. 1885–1991.

16. *Oswald, E.* Cytotoxic necrotizing factor type 2 produced by virulent Escherichia coli modifies the small GTP-binding proteins Rho involved in

assembly of actinstress fibers / E. Oswald, M. Sugai, A. Labigne et al. // Proc Nati Acad Sci USA. – 1994. – № 91. – P. 3814–3818.

17. *Singh, B.R.* Botulinum versus tetanus neurotoxins: why is botulinum neurotoxin but not tetanus neurotoxin a food poison? / B.R. Singh, B. Li, D. Read // Toxicon. – 1995. – № 33 – P. 1541–1547.

18. *Jahn, R.* Botulinum and tetanus neurotoxins: emerging tools for the study of membrane fusion / R. Jahn, H.I. Hanson, H.Otto et al. // Cold Spring Harb Symp Quant Biol. – 1995. – № 60. – P. 329–335.

19. *Henderson, I.* The genetic basis of toxin production in Clostridium botulinum and Clostridium tetani. The clostridia: molecular biology and pathogenesis / I. Henderson, T. Davis, M. Elmore. – San Diego: Academic Press, 1997. – P. 261–264.

20. *Schiavo, G.* The structure and mode of action of botulinum and тetanus toxins. The clostridia: molecular biology and pathogenesis. – San Diego: Academic Press,1997. – P. 295–322.

21. *Kessler, K.R.* Botulinum toxin: from poison to remedy / K.R. Kessler, R. Benecke // Neurotoxicology. – 1997. – № 18. – P. 761–770.

22. *Halpern, J.L.* Neurospecific binding, internalization and retrograde axonal transport / J.L Halpern, E.A. Neale // Curr Top Microbiol Immunol. – 1995. – № 195. – P. 221–234.

23. *Arnon, S.S.* Human tetanus and human botulism. The clostridia: molecular biology and pathogenesis. – San Diego: Academic Press, 1997. – P. 95–115.

24. *Wheeler, A.H.* Therapeutic uses of botulinum toxin // Am Fam Physician. – 1997. – № 55. – P. 541–548.

25. *Averbuch-Heller, L.* Medical treatments for abnormal eye movements: pharmacological, optical and immunological strategies / L. Averbuch-Heller, R.J. Leigh // Aust NZJ Ophthalmol. – 1997. – № 25. – P. 7–13.

26. *Carter, S.R.* Cosmetic botulinum toxin injections / S.R. Carter, S.R. Seiff // Int Ophthalmol Clin. – 1997. – № 37. – P. 69–79.

27. *Никифоров, В.Н.* Ботулизм / В.Н. Никифоров, Никифоров В.В. – Л.: Медицина, 1985. – 212 с.

28. *Мазо, Е.Б.* Ботулинический токсин в урологии / Е.Б. Мазо, Г.Г. Кривобородов, М.Е. Школьников // Consilium Medicum. – 2006. – Т. 8. – № 4. – С. 17–19.

29. *Тимербаева, С.Л.* Клиническая жизнь ботулинических токсинов // Атмосфера. Нервные болезни. – 2004. – № 2. – С. 34.

30. Руководство по инфекционным болезням / под ред. Ю. В. Лобзина. – СПб.: Фолиант, 2000. – 932 с.

31. *Возианова, Ж.И.* Инфекционные и паразитарные болезни: В 3 т. Т. 1. – Киев: Здоров'я, 2000. – С. 433–457.

32. *Pearce, L.B.* Pharmacologic characterization of botulinum toxin for basic science and medicine / L.B. Pearce, E.R. First, R.D. Maccallum et al. // Toxin. – 1997. – V. № 9. – P. 1373–1412.

33. *Foran, P.G.* Evaluation of the therapeutic usefulness of botulinum neurotoxin B, C1, and F compared with the long lasting type A. Basis for distinct durations of inhibition of exocytose in central neurons / P.G. Foran, N. Mohammed, G.O. Lisk et al. // J. Biol. Chem. – 2003. – P. 71–75.

34. *Hateway, C.L.* Toxigenic Clostridia // Clinical. Microbiol. Rev. – 1990. – V.3. – № 1. P. 66–98.

35. *Hill, K.K.* Recombination and insertion events involving the botulinum neurotoxin complex genes in Clostridium botulinum types A, B, E and F and Clostridium butyricum type E strains / K.K. Hill, C. Xie, B.T. Foley et al. // BMC Biol. – 2009. – V.7. (doi:10.1186/1741-7007-7-66).

36. *Dhaked, R.K.* Botulinum toxin: Bioweapon & magic drug / R.K. Dhaked, M.K. Singh, P. Singh // Indian J. Med. Res. – 2010. – № 132 (5). – P. 489.

37. *Шувалова, Е.П.* Инфекционные болезни. – М.: Медицина, 2001. – С. 128–132.

38. *Ящук, Н.Д.* Инфекционные болезни / Н.Д. Ящук, Ю.Я.Венгеров. – М.: Медицина, 2003. – С. 226–232.

39. *Тимченко, В.Н.* Инфекционные болезни у детей / В.Н. Тимченко, Л.В. Быстрякова. – СПб.: СпецЛит, 2001. – С. 519–525.

40. *Jang, I.* Occurrence of avian botulism in Korea during the period from June to September 2012 / I. Jang, M.S. Kang, H.R. Kim et al. // Avian Dis. – 2014. – № 58 (4). – P. 9.

41. *Souillard, R.* Investigation of Clostridium botulinum in commercial poultry farms in France between 2011 and 2013 / R. Souillard, C. Woudstra, C.Le Maréchal et al. // Avian Pathol. – 2014. – № 43 (5). – P. 64.

42. *Defilippo, F.* Outbreak of type C botulism in birds and mammals in the Emilia Romagna region, northern Italy / F. Defilippo, A. Luppi, G. Maioli G et al. // J. Wildly Dis. – 2013. – № 49 (4). – P. 6.

43. *Anza, I.* The same clade of Clostridium botulinum strains is causing avian botulism in southern and northern Europe / I. Anza, H. Skarin, D. Vidal et al. // Anaerobe. – 2014. – № 20 (3). – P. 16.

44. *Czerwiński, M.* Food borne botulism in Poland in 2012 / M. Czerwiński, M.P. Czarkowski, B. Kondej // Przegl Epidemiol. – 2014. – № 68 (2). – P. 9.

45. *Viray, M.A.* Outbreak of type A forborne botulism at a boarding school, Uganda, 2008 / Viray M.A., Wamala J., Fagan R et al. // Epidemiol Infect. – 2014. – № 142 (11). – P. 301.

46. *Wangroongsarb, P.* Molecular characterization of Clostridium botulinum isolates from foodborne outbreaks in Thailand, 2010 / P. Wangroongsarb, T. Kohda, C. Jittaprasartsin et al. – 2014. – № 27 (9). – P. 10.

47. *Shahcheraghi, F.* Identification of botulinum toxin type in clinical samples and foods in Iran / F. Shahcheraghi, S. Nobari, M.M. Aslani. // Arch Iran Med. – 2013. – № 16 (11). – P. 6.

48. *Czerwiński, M.* Forborne botulism in Poland in 2011 / M. Czerwińsk, M.P. Czarkowski, B. Kondej // Przegl Epidemiol. – 2013. – № 67 (2). – P. 2.

49. *López-Laso, E.* Infant botulism in Andalusia (Southern Spain) / E. López-Laso, I. Roncero-Sánchez-Cano, E Arce-Portillo et al. // Eur J. Paediatr Neurol. – 2014. – № 18 (3). – P. 6.

50. *Franz, D.R.* Clinical recognition and management of patients exposed to biological warfare agents / D.R. Franz, P.B. Jahring, A.M. Friedlander // JAMA. – 1997. – V. 278. – № 5. – P. 399–411.

51. *Антонов, Н.С.* Химическое оружие на рубеже двух столетий. – М., 1994. – 213 с.

52. *Dhaked, R.K.* Botulinum toxin: biowearon & magic drug / R.K. Dharked, M.K. Singh, S. Singh et al. // Indian. J. Med. Res. – 2010. – V.132. – № 5. – P. 489–503.

53. *Laskavi, R.* The use of botulinum toxin in head and face medicine: An interdisciplinary field // Head & Face Medicine. – 2008. – V. 4. – № 5. (doi: 10,1186/1746-1 60X-4-5).

54. *Crowner, B.R.* Iatrogenic botulism due to therapeutic botulinum toxin a injection in a pediatric patient /B.R. Crowner, J.E. Brunstrom, B.A. Racette // Clin. Neuropharmacol. – 2007. – V. 30. – № 5. – P. 310–313.

55. *Mac Donald, E.* Outbreak of wound botulism in people who inject drugs, Norway, October to November 2013 / E.Mac Donald, T.M. Arnesen, A.B. Brantsaeter et al. // Euro Surveill. – 2013. – № 7.– P. 18.

56. *Rowlands, R.E.* Botulism in Brazil, 2000–2008: epidemiology, clinical findings and laboratorial diagnosis / R.E. Rowlands, C.A. Ristori, G.I. Lopes et al. // Rev Inst Med Trop Sao Paulo. – 2010. – № 52 (4). – P. 6.

57. *Попелянский, Я.Ю.* Поражение нервной системы при ботулизме // Я.Ю. Попелянский, М.А. Фокин, С.Г. Пак. – М., 2000.

58. *Sellin, L.C.* Botulism – an update // Milit. Med. – 1984. – V. 149. – № 1. – P. 12–16.

59. *Marks, J.D.* Medical aspects of biologic toxins // Anesthesiol. Clin. N. Am. – 2004. – V. 22. – P. 509–522.

60. *Hill, K.K.* Recombination and insertion events involving the botulinum neurotoxin complex genes in Clostridium botulinum types A, B, E and F and Clostridium butyricum type E strains /K.K. Hill, C. Xie, B.T. Foley et al. // BMC Biol. – 2009. – V. 7. (doi:10.1186/1741-7007-7-66).

61. *Singh, B.R., Li B., Read D.* Botulinum versus tetanus neurotoxins: why is botulinum neurotoxin but not tetanus neurotoxin a food poison? / B.R. Singh, B. Li, D. Read // Toxicon. – 1995. – № 33:1541. – P. 7.

62. *Супотницкий, М.В.* Биологическая война: введение в эпидемиологию искусственных эпидемических процессов и биологических поражений. – М.: Русская панорама; Кафедра, 2013. – 1135 с. (Библиотека БЖД и ЧС).

63. *Wells, C.L.* Clostridia: Sporeforming Anaerobic Bacilli / C.L. Wells, T.D. Wilkins // Baron's Medical Microbiology. – Univ of Texas Medical Branch, 1996. – P. 34–42.

64. *Lozano, R.* Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010 // Lancet. – 2012. – № 380. – P. 128–143.

65. *Vandelaer, J.* Tetanus in developing countries: an update on the Maternal and Neonatal Tetanus Elimination Initiative / J. Vandelaer, M. Birmingham, F. Gasse et al. // Vaccine. – 2003. – Vol. 21 (24). – P. 112–123.

66. *Brauner, J.S.* Changes in severe accidental tetanus mortality in the ICU during two decades in Brazil / J.S.Brauner, S.R. Vieira, S.R. Bleck T.P. // Intensive Care Medicine. – 2002. – № 28. – P. 17–23.

67. *Farrar, J.J.* Tetanus / J.J. Farrar, L.M. Yen, T. Cook et al. // Journal of Neurology, Neurosurger, and Psychiatry. – 2000. – Vol. 69. – P. 33–36.

68. *Горшков, С.З.* Анаэробная клостридиальная раневая газовая инфекция. – М.: Медицина, 2007. – 128 с.

69. *Петровский, Б.В.* Ранение на дуэли и смерть А.С. Пушкина с позиции современной хирургии. Communicatio ad Istoria arios medicinae. – Будапешт: Orvostortemetz kozlemenyer, 1983. – С. 36.

70. *Ефуни, С.Н.* Клостридиальная раневая инфекция / С.Н. Ефуни, Т. И. Лыскин // Раны и раневая инфекция. – М., 1990. – 687 с.

71. *Астрожников, Ю.В.* Современные аспекты лечения газовой гангрены / Ю.В. Астрожников, А.М. Феноменов, Г.В. Еремина // Научный обзор. – М.:ВНИИМИ, – 1981. – 66 с.

72. *Goulon, M.* Les gangrenes gazeuzes / M. Goulon, P. Gajdos, M. Siguier et al. // Chirurgue. – 1976. – Vol.102, № 3. – P. 560–566.

73. *Бадиков, В.Д.* Микробиология боевой хирургической травмы: автореф. дисс. ... докт. мед. наук. – СПб.: ВМедА, 2000. – 40 с.

74. *Беркутов, А.Н.* Об анаэробной инфекции огнестрельных ран // Воен.-мед. журн. – 1972. – № 4. – С. 14–20.

75. *Воронов, Н.С.* Анаэробная инфекция после Второй мировой войны // Воен. мед. журн. – 1972. – № 3. – С. 89–91.

76. *Медуницин, Н.В.* Вакцинология. – М.: Триада, 1999. – 279 с.

77. *Воробьев, А.И.* Состояние медицинской помощи раненым в войсках антиправительственных сил в Афганистане // Воен. мед. журн. – 1992. – № 4. – С. 77–81.

78. *Ефимова, М.Г.* Разработка способа получения конъюгатов рибосомы – антитоксин клостридиум перфрингенс типа А // Актуальные вопросы медицинской биотехнологии: Мат-лы науч. конф. – Томск, 1991. – С. 116–117.

79. *Арапов, Д.А.* Анаэробная газовая инфекция. – М.: Медицина, 1972. – 216 с.

80. *Ефимова, Н.Л.* Научные достижения в области производства анатоксинов // Журн. микробиол. – 1998. – № 2. – С. 28–31.

81. *Зеленова, Е.Г.* Микрофлора полости рта: норма и патология / Е.Г. Зеленова, М.И. Заславская, С.П. Рассанов // НГМА. – 2004. – 247 с.

82. *Задорожный, А.А.* Раневая газовая инфекция (экспериментальные и клинические данные об этиопатогенезе, ранней диагностике, лечении и профилактике) / А.А. Задорожный, Н.Ф. Калиниченко, Ю.Д. Чиркин и др // Научный обзор. – М.: ВНИИМИ, 1979. – 119 с.

83. *Кузин, М.И.* Раны и раневая инфекция / М.И. Кузин, Б.М. Костюченок. – М.: Медицина, 1981. – 688 с.

84. *Сергеева, Т.И.* Перспективы создания единой системы иммунопрофилактики раневых клостридиозов // Журн. микробиол. – 1994. – № 4. – С. 111–116.

85. *Черкасский, Б.Л.* Инфекционные и паразитарные болезни человека: Справочник эпидемиолога. – М.: Медицинская газета, 1994. – 617 с.

86. *Воробъев, А.А.* Анатоксины / А.А. Воробьев, Н.Н. Васильев, А.Т. Кравченко. – М.: Медгиз, 1965. – С. 488.

87. *Выгодчиков, Г.В.* Экспериментальное изучение иммуногенных свойств ассоциированных анаэробных анатоксинов. Сообщение 5: Иммуногенные свойства комбинированного полианатоксина при первичной

иммунизации животных / Г.В. Выгодчиков, А.А. Воробьев, И.А. Ларина (и др.) // Журн. микробиол. – 1963. – №10. – С. 51–57.

88. *Семенов, О.Д.* Современные представления о этиологии, патогенезе, микробиологии и профилактике раневой анаэробной инфекции / О.Д. Семенов, А.В. Степанов, И.А. Добрынина и др. // Микробиология: от микроскопа до нанотехнологий: тез. докл. науч.-практ. конф. – СПб., 2013. – С.17.

89. *Грицанов, А.И.* Система патогенетического лечения газообразующей раневой инфекции при минновзрывных (МВР) и огнестрельных ранах / А.И. Грицанов, И.Л. Миннулин и др. // Воен.-мед. журн. – 1967. – № 2. – С. 24–27.

90. *Аносов, И.Я.* Морфологические и некоторые гистохимические изменения в организме морских свинок, вызванные гиалуронидазой Cl. erfringens типа А. / И.Я. Аносов, Л.В. Климачева // Журн. микробиол. – 1971. – № 9. – С. 133–137.

91. *Беляков, В.Д.* Госпитальная инфекция / В.Д. Беляков, А.П. Колесов, П.Б. Остроумов. – Л.: Медицина, 1976. – 229 с.

92. *Вишневский, А.А.* Военно-полевая хирургия / А.А. Вишневский, М.И. Шрайбер. – М.: Медицина, 1975. – 33 с.

93. *Bartlett, I.C.* Gas Gangrene in Principles and Practices of infection diseases. – Edinburgh, 1990. – P. 1850–1860.

94. *Семенов, О.Д.* Изучение возможных механизмов формирования невосприимчивости организма к раневой анаэробной инфекции при иммунизации полианатоксинами / О.Д. Семенов, А.В. Степанов, В.А. Харитонова и др. // Достижения науки и практики в обеспечении санитарно-эпидемиологического благополучия Вооруженных сил Российской Федерации: Сб. мат-лов 3-го съезда военных врачей. – СПб., 2010. – С. 170–171.

95. *Willis, A.T.* Host factors predisposings to anaerobic infections // Scand J. Infect. Dis. – 1985. – № 5, suppl. 46. – P. 18–26.

96. *Дерябин, И.И.* Принципы профилактики раневой инфекции на этапах медицинской эвакуации // Воен.-мед. журн. – 1972. – № 4. – С. 22–25.

97. *Adler, G.O.* Early diagnosis and immediate therapy of gas gangrene // Med. Welt. – 1977. – V. 28, № 35. – P. 1387–1391.

98. *Колкер, И.И.* Иммунологические аспекты проблемы «Раны и раневая инфекция» / И.И. Колкер, Г.К. Вандеев // Научный обзор. – М.: ВНИИМИ, 1976. – Вып. 2. – С. 51–91.

99. *Черкас, Г.П.* Активная иммунизация против газовой гангрены / Г.П. Черкас, О.И. Овчаренко, Л.Г. Подгорная // Актуальные вопросы борьбы с инфекционными болезнями. – Харьков, 1965. – С. 100–105.

100. *Кулешов, С.Е.* Раневая инфекция при синдроме длительного раздавливания / С.Е. Кулешов, Л.А. Блатун, О.Л. Борисова // Анаэробная инфекция в гнойной хирургии. – Тернополь, 1990. – С. 111–112.

101. *Мельников В.Н.* Исследования по вопросам повышения качества и разработки метода изготовления сорбированного столбнячного анатоксина: автореф. дисс. ... д-ра мед. наук. – М., 1965.

102. *Магазов Р.Ш.* Разработка сорбированного оптимально сбалансированного секстаанатоксина для профилактики анаэробных инфекций: дисс. ... д-ра мед. наук. – Уфа, 1985.

ГЛАВА 2

ЭТАПЫ РАЗВИТИЯ И СОЗДАНИЯ СРЕДСТВ ВАКЦИНОПРОФИЛАКТИКИ КЛОСТРИДИАЛЬНЫХ ИНФЕКЦИЙ

2.1. Историческая справка о развитии средств вакцинопрофилактики клостридиальных инфекций

Проблема специфической профилактики инфекционных болезней человека, имеющая огромное значение для медицинской практики с давних пор привлекает внимание ученых. Бурное развитие этой области знаний в XX в. обогатило медицину большим числом разнообразных средств специфической защиты от важнейших инфекций, в том числе клостридиальной этиологии.

Широкая распространенность патогенных для человека клостридий в окружающей среде, ежегодная регистрация вызываемых ими болезней с высокой летальностью, отсутствие способов санации почвы и воды от их споровых форм, а также недостаточная эффективность и высокая аллергенность гетерологичных антитоксических сывороток породили настоятельную необходимость в разработке вакцинных препаратов для плановой профилактики анаэробных инфекционных заболеваний у населения как единственно надежного средства в борьбе с анаэробными пищевыми интоксикациями и раневыми инфекциями [1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8].

До начала XX в. не имелось сведений об этиологии клостридиальных инфекционных заболеваний и поэтому не было эффективных средств борьбы с ними. Открытие столбнячного антитоксина, последовавшего вслед за установлением инфекционной природы столбняка, положило начало серопрофилактике, которая, несмотря на недостатки, до 1923 г. занимала доминирующее положение [9]. Создание метода активной иммунизации стало возможным после получения G. Ramon нового препарата, названного анатоксином [10].

Наименование «анатоксин» (anatoxinum) происходит от греческих слов «an» – отрицание и «toxo» – отравляю. В данном случае подразумевается получение вакцинного препарата, сохранившего антигенные и иммуногенные свойства, но полностью лишенного токсичности.

Бактерийные анатоксины относятся к числу наиболее эффективных препаратов, используемых в целях иммунопрофилактики. Почти столетний период интенсивных исследований в области изготовления, усовершенствования и практического применения бактерийных анатоксинов увенчался значительными успехами. Разработан целый ряд анаэробных и аэробных анатоксинов, в основном удовлетворяющих современным требованиям иммунопрофилактики.

Необходимо отметить, что окончательно утвердилось мнение о том, что сорбированные препараты являются наиболее рациональной формой анатоксинов. Высокая эффективность сорбированных анатоксинов привела к быстрому их распространению и вытеснению из практики применения нативных анатоксинов.

Успех в разработке очищенных, концентрированных, сорбированных анатоксинов обеспечил возможность получения ассоциированных полианатоксинсодержащих препаратов.

Ассоциированные (комбинированные) вакцины заняли прочное место в практике здравоохранения на всех континентах земного шара. Они содержат два или более активных компонентов (антигенов) и вспомогательные вещества. Основными действующими веществами могут быть антигены, вызывающие иммунный ответ к различным инфекциям, или разные стереотипы одного вида микроорганизма, обусловливающие развитие иммунного ответа к одной инфекции (поливалентные вакцины) [11]. В качестве активных компонентов ассоциированных вакцин могут быть микроорганизмы, инактивированные физическим или химическим способами, антигены (токсины), продуцируемые микроорганизмами или извлеченные из них, а также полученные методами синтеза или по технологии генной инженерии, объединенные в различных сочетаниях.

Ассоциированные вакцины могут быть получены путем смешивания моновалентных адсорбированных антигенов, последовательной сорбции при внесении неадсорбированных антигенов в раствор сорбента или одновременном образовании адсорбированной

комбинированной вакцины путем совместной инкубации смеси неадсорбированных антигенов и исходных компонентов для образования сорбента [11].

Преимуществом ассоциированных иммунобиологических лекарственных препаратов (ИЛП) является резкое сокращение числа инъекций при сохранении количества антигенов. Кроме того, при неблагоприятной эпидемической ситуации с помощью ассоциированных ИЛП можно создать у прививаемых контингентов стойкий иммунитет за короткий срок одновременно к нескольким инфекциям и комбинировать набор антигенов по конъюнктуре эпидемиологического прогноза или внезапно сложившейся эпидобстановке [12].

Экспериментальными исследованиями и практикой применения ассоциированных вакцин доказана возможность одновременного получения полноценного иммунитета ко всем вводимым антигенам. При этом установлено, что основное значение имеют не столько физиологические возможности макроорганизма отвечать на комплекс вводимых антигенов, сколько качество ассоциированного препарата, его состав и способ конструирования [11].

Из ассоциированных отечественных ИЛП, содержащих в своем составе хотя бы один из клостридиальных анатоксинов, в разные годы наиболее широкое практическое применение нашли адсорбированный дифтерийно-столбнячный анатоксин (АДС, АДС-М), адсорбированная коклюшно-дифтерийно-столбнячная вакцина (АКДС), адсорбированный очищенный полианатоксин (трианатоксин, тетраанатоксин, пентаанатоксин, секстаанатоксин, октаанатоксин), брюшнотифозная вакцина с секстаанатоксином (БТС), вакцина комбинированная гепатита В и анатоксин дифтерийно-столбнячный с уменьшенным содержанием антигенов (БУБО-М – вакцина), вакцина химическая сорбированная тифо-паратифозно-столбнячная (ТАВТе), вакцина химическая против брюшного тифа, паратифов А и В, дизентерии Флекснера и Зонне, холеры и столбняка (поливакцина НИИСИ).

В настоящее время из вышеперечисленных ИЛП в противоэпидемической практике применяются АКДС, АДС, АДС-М, три- и тетраанатоксин, БУБО-М. По-видимому, с некоторой натяжкой к ассоциированным ИЛП можно отнести вакцину полиомиелитную пероральную 1, 2, 3 типов, вакцину менингококковую групп А и С, вакцину гриппозную поливалентную полимерсубъединичную

Гриппол, вакцину сибиреязвенную комбинированную жидкую, вакцину сыпнотифозную комбинированную живую, вакцину холерную бивалентную химическую таблетированную и вакцину холерную (холероген-анатоксин +О-антиген). Отличительной особенностью этой группы ИЛП является то, что при конструировании используются либо аттенуированные штаммы различных серологических типов (серогрупп) одного вида возбудителя, либо фрагменты микробной клетки родственных микроорганизмов.

Мы специально уделили много внимания ассоциированной иммунизации потому, что наибольшие успехи были достигнуты в области конструирования анатоксинсодержащих ассоциированных вакцинных препаратов. Именно этот раздел вакцинопрофилактики накопил богатый теоретический, экспериментальный и производственный опыт.

В нашей стране первые публикации о возможности иммунизации ассоциированными ИЛП против ботулизма и раневых анаэробных инфекций связаны с именами И.М. Великанова и В.И. Цып [13, 14].

Важно отметить, что зарубежные и отечественные авторы в эти годы использовали для иммунизации нативные анатоксины и добивались положительных результатов только при многократном введении смеси антитоксинов.

После внедрения сорбентов в технологический процесс конструирования ИЛП заметно выросло число работ по испытанию на животных и на людях сложных ассоциаций из анатоксинов различных возбудителей ботулизма и раневых инфекций.

Наиболее обстоятельно и серьезно проблема конструирования ассоциированных вакцинных препаратов для профилактики анаэробных инфекций разрабатывалась в 1954–1985 гг. лабораториями, руководимыми Г.В. Выгодчиковым, К.И. Матвеевым, А.Т. Кравченко, В.Н. Мельниковым, Р.Ш. Магазовым, Г.П. Черкас, И.И. Рогозиным и В.Д. Беляковым, А.И. Углевой и др.

В работе А.А. Воробьева и соавт. «Анатоксины» подробно рассмотрены принципы конструирования ассоциированных анатоксинов [3]. В библиографическом плане более полной является монография И.И. Рогозина и В.Д. Белякова [15].

За рубежом ассоциированные вакцинные препараты также получили свое развитие. Многими зарубежными авторами (Райс,

1947; Фиок, 1962; Баррон и Рид, 1954; Апплтон и Райт, 1959; Ламанна, 1959; Фиок и Карделла, 1960; Тайтл и Логан, 1947; Бернгаймер, 1947 и др.) в эксперименте были изучены ассоциированные сорбированные полианатоксины различной сложности против ботулизма типов А, В, С, Д, Е и ряда раневых анаэробных инфекций (столбняк, перфрингенс, эдематиенс) [15, 16, 17, 18].

В Российской Федерации зарегистрированы и получили разрешение к применению следующие ИЛП зарубежного производства: Тетракокк (коклюш, дифтерия, столбняк, полиомиелит – Франция), ДТ-вакс (дифтерия и столбняк – Франция), Инфанрикс (коклюш и столбняк – Бельгия) и др.[11].

Процесс создания качественных ИЛП, направленных на профилактику клостридиальных инфекций, претерпел значительные изменения. После всестороннего изучения микробиологических, биохимических и иммунологических свойств возбудителя были разработаны подходы к конструированию анатоксинов, включающие методы изготовления и оценки качества готовой продукции.

Для этого были решены ряд актуальных проблем. Прежде всего это касается поиска и внедрения в практику сорбированных очищенных концентрированных анатоксинов. При этом технологическая схема получения таких анатоксинов была основана на наработке нативных токсинов, очистке и концентрированию их, обезвреживанию и сорбции очищенного и концентрированного анатоксина.

Для получения высокоактивных токсинов одним из определяющих факторов является выбор питательной среды, ее состав и качество.

Питательная среда является тем необходимым субстратом, от которого во многом зависит успех производства анатоксинов. Составу питательных сред и технологии их изготовления посвящены многие исследования, результаты которых изложены в специальной литературе. Мы в своей работе отметим только некоторые положения. Важно подчеркнуть, что питательная среда является составной частью ИЛП и поэтому наличие в нем веществ, способных вызвать токсические или аллергические реакции, недопустимо.

Клостридии ботулизма, столбняка и газовой гангрены растут и продуцируют токсин на самых разнообразных мясных, рыбных и растительных средах. Соответственно питательные среды

подразделяют на мясные, рыбные, рыбно-казеиновые, растительные полусинтетические и синтетические [9].

Многие исследователи для получения ботулинических токсинов использовали мясные среды, приготовленные на основе пептического, панкреатического и триптического переваривания мясных продуктов [6, 19, 20, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29]. Хороший рост и токсинообразование получали при культивировании клостридий на средах из солянокислотного гидролизата рыбной и кукурузной муки [30, 31, 32].

Поиски наиболее дешевой питательной среды для изготовления ботулинических анатоксинов в производственных условиях привели к созданию сред на основе ферментативного перевара казеина с добавлением в качестве ростового фактора кукурузного экстракта [20, 33, 34, 35, 36, 37].

Ряд исследователей установили, что полнота расщепления белков до пептидов и аминокислот, а также аминокислотный состав питательной среды (цистин, лейцин, пролин) может усиливать или, наоборот, тормозить рост и токсинообразование микроорганизмов [38, 39]. C.E. Clifton показал, что возбудители ботулизма типов А и В потребляют аминокислоты питательных сред с дезаминированием, декарбоксилированием и образованием этанола и уксусной кислоты [40].

W.G. Roessler et al. установили, что для роста клостридий ботулинум типов А и В на среде из гидролизата желатины требовался лейцин, изолейцин, валин, аргинин, фенилаланин, триптофан, тирозин, метионин. При этом было указано, что нуклеиновые кислоты были более необходимы для роста и токсинообразования клостридий ботулинум типа А, чем для клостридий ботулинум типа В [41].

Опытами J. Mager et al. было доказано, что бактерии ботулизма типов А и В дают быстрый и обильный рост в среде, где содержатся все витамины группы В [42].

В.Р. Савин установил, что выращивание возбудителей ботулизма типов А и В в среде, содержащей аминокислоты L-аспарагин, dL-валин, dL-лейцин, dL-лизин солянокислый, dL-норвалин, dL-норлейцитин, dL-орнитин солянокислый, dL-серин, способствовало токсинообразованию [43].

Разными авторами были проведены исследования по получению ботулинических токсинов типов А и В на средах с основой

из гидролизатов казеина. В качестве ростового фактора к среде добавляли кукурузный экстракт или дрожжевой экстракт. Все авторы отмечали увеличение выработки токсинов при добавлении к среде глюкозы [44, 45, 46].

J.H. Mueller et al. предложили для производства столбнячного анатоксина полусинтетическую питательную среду, состоящую из панкреатического гидролизата казеина, настоя бычьего сердца, L-цистина, L-тирозина, пантотената кальция, урацила, пиридоксина, тиамина, рибофлавина, биотина, глюкозы, восстановленного железа и ряда солей [47]. Несмотря на преимущества, выражающиеся в получении среды с заведомо известным составом необходимых для данного микроорганизма питательных веществ, полусинтетические среды не нашли широкого применения в условиях производства столбнячного анатоксина из-за сложности изготовления и высокой стоимости [43].

И.Н. Виноградова и соавт. для получения ботулинических и столбнячных токсинов использовали кислотные гидролизаты пищевого казеина [48]. Для производства ботулинических токсинов и анатоксинов типов А и В была рекомендована казеиново-грибная среда, состоящая из ферментативного гидролизата казеина, полученного путем обработки последнего протеазой культуры Aspergillus, дрожжевого и кукурузного экстрактов [49]. Позднее К.И. Матвеев с соавт. предложили более простую среду, содержащую солянокислотный гидролизат казеина и 3% кукурузный экстракт [49].

Вторая половина 50-х гг. прошлого столетия характеризовалась коренными изменениями в производстве анатоксинов для активной иммунизации людей. В этот период при изготовлении дифтерийного и столбнячного анатоксинов стали применять методы их концентрации и очистки с целью последующей сорбции на геле гидроокиси алюминия. Новые методы производства анатоксинов повлекли за собой повышение требований к качеству нативных токсинов и к выбору дешевого доступного сырья для изготовления питательных сред.

В эти годы Т.И. Булатова, А.А. Воробьев, К.И. Матвеев с соавт. провели серию исследований по получению ботулинических анатоксинов с применением в качестве основы питательных сред гидролизата рыбной муки [50, 51].

В результате этих исследований был составлен и утвержден временный регламент производства очищенного сорбированного ботулинического бианатоксина (типов А и В).

Согласно этому регламенту, кормовую рыбную муку подвергали воздействию соляной кислоты в течение 3 ч при pH 3,1±0,1 и температуре 132±1 °С. К разбавленному питьевой водой гидролизату добавляли 5% кукурузного экстракта и 1% глюкозы. При культивировании клостридий ботулинум типа А к среде добавляли раствор хлорного железа. Использование этой среды позволило получать высокоактивные токсины, обезвреживание которых 0,8% формалином при температуре 37±0,2 °С в течение 3 сут приводило к образованию недообезвреженных формолкультур, содержащих в 1 мл 30 ЕС анатоксина типа А и 25 УС анатоксина типа В.

Одновременно делались попытки использовать комбинированные среды с основой из двух гидролизатов: рыбной муки и казеина [35].

Л.Г. Ивановой с соавт. было предложено для культивирования клостридий ботулинум и клостридий перфрингенс применение в качестве основы питательной среды гидролизата китовой муки [52]. Используя среду, содержащую, кроме гидролизата китовой муки, печень и экстракт дрожжей, они изучили изменение ее состава в процессе культивирования клостридий ботулинум. Выращивание штаммов средней токсигенности (типа А-Memphis и № 98, типа В – Nevin и № 175), по данным авторов, сопровождалось потреблением пептона, а также аминокислот: лизина, гистидина, аргинина и серина. Одновременно с этим в культуральной жидкости шло нарастание треонина, аланина, глютамина, глицина, аспарагина, тирозина и лейцина. Результаты, полученные авторами, подтверждают более ранние данные литературы и указывают на тот факт, что наличие в питательной среде аминокислот – серина, аргинина, лейцина, гистидина играет важное значение в процессе роста и токсинообразования клостридий ботулинум типов А и В [42, 53].

Использование питательной среды из гидролизата рыбной и китовой муки позволило в 1967–69 гг. в Уфимском НИИВС освоить производство очищенных сорбированных ботулинических анатоксинов типов А, В, Е.

Большое влияние на токсиногенез клостридий оказывает наличие в питательной среде ростовых факторов, к которым в первую

очередь относятся витамины группы В [42, 43, 54, 55, 56, 57, 58]. В качестве ростовых факторов широкое распространение получили водные экстракты пекарских и пивных дрожжей, а также кукурузный экстракт.

Важные и обстоятельные исследования были проведены Л.Н. Полещук с соавт. и С.М. Прегер с соавт., которые подробно изучали влияние факторов роста на токсиногенез клостридий ботулизма типов А и В [59, 60, 61, 62, 63, 64]. Они установили взаимосвязь между содержанием биотина и пантотеновой кислоты в средах и активностью вырабатываемых токсинов. Наименьшее содержание их выявлено на средах из кислотного гидролизата казеина, а наибольшее – в китово-кукурузной среде. Добавление этих витаминов к казеиновой среде и среде Глузмана существенно повышало токсиногенез клостридий. Оптимальная концентрация биотина в среде, по данным С.М. Прегер и соавт., составляет 0,5–2,0 мкг %, а пантотеновой кислоты – 5–150 мкг %.

В этот период были проведены исследования по изучению влияния микроэлементов в питательной среде на токсинообразование клостридиальных инфекций. В частности, А.А. Воробьев с соавт. при изготовлении очищенного ботулоанатоксина типа А в промышленных условиях в среду с основой из гидролизата рыбной муки добавляли хлорное железо в количестве 12 мг на литр [3, 30, 50]. Позднее Н.Б. Альбицкая с соавт. при культивировании клостридий типа А и В на среде Глузмана выявили снижение концентрации в ней ионов железа, меди и кобальта. По их данным, оптимальными концентрациями микроэлементов в этой среде являются: железы – 280–400, меди – 20–25, кобальта – 20–30 мкг % [65, 66].

Существенное влияние на активность токсинообразования оказывают углеводы. Добавление к питательной среде 2 % глюкозы значительно усиливало токсиногенез [67, 68, 69, 70, 71]. По данным Г.Е. Синельникова с соавт., наилучшее токсинообразование клостридий ботулизма имело место при добавлении к среде 1% глюкозы и 1% мальтозы [72, 73].

Определенное влияние на процесс токсинообразования оказывает величина pH питательной среды. По данным ряда авторов, ботулинический токсин не продуцируется при pH менее 4,6 или более 8,5 [74, 75]. В то же время ряд авторов отмечали, что величина pH питательной среды в процессе культивирования существенно

снижалась [67, 76]. Было принято, что оптимальной величиной pH при культивировании клостридий следует считать 7,35± 0,35 [3, 77, 78, 79, 80].

Как уже отмечалось ранее в многочисленных исследованиях, посвященных получению клостридиальных токсинов на различных средах, было использовано сырье животного происхождения: мясные среды, рыбо-костная мука, китовая мука и казеин. О применении в качестве белковой основы среды гидролизатов продуктов растительного происхождения имеются лишь единичные сообщения [81, 82, 83, 84].

Таким образом, многочисленными исследованиями было установлено, что для получения высокоактивных клостридиальных токсинов при культивировании необходим ряд условий: наличие в среде пептона, аминокислот, микроэлементов, витаминов, углеводов и pH близкой к 7.

Известно, что для получения высокоактивных токсинов наряду с выбором питательных сред важную роль играет подбор токсигенных штаммов. Дело в том, что высокотоксигенные штаммы не всегда имеют преимущества в антигенном отношении перед слаботоксигенными штаммами. Между токсичностью фильтратов бульонных культур Cl. botulinum и их антигенными свойствами не существует параллелизма, что особенно наглядно проявляется на тех токсинах, которые поддаются активации (Cl. botulinum типов B и E) [85]. Соответствие между токсичностью и антигенностью имеется лишь при идентичных условиях выращивания данного штамма, на одной и той же среде и при аналогичной технологической схеме получения анатоксинов. Важно подчеркнуть, что между спорообразованием и токсинообразованием существует определенная связь. Чаще всего высокотоксигенные штаммы имеют слабо выраженную способность к спорообразованию и наоборот [86].

Поэтому отработка процесса получения ботулинических токсинов в Уфимском НИИВС была начата со сравнительной оценки токсигенных штаммов. В частности, изучению были подвергнуты штаммы типа А № 98, 501, типа В – № 255, 346, 364, типа С – № С-91, типа Е – № 153 и типа F – № 470 [87]. Наиболее токсигенными оказались штаммы типа А № 501 и типа В № 364. При их выращивании на китово-кукурузной среде в течение 7 сут при температуре 34,5±0,5 °С авторы регулярно получали токсин типа А,

содержащий в 1 мл 1,2–1,5 млн Dlm и 170–200 L+, а типа В – 800 тысяч – 1 млн Dlm и 40–50 L+.

В производстве столбнячного анатоксина наибольшее распространение получили штаммы Колле 154, № 54, 288, 471 и 473. По данным зарубежных авторов, наиболее активным является штамм Гарвард (№ 49205) [9]. Известны также штаммы раневых клостридиозов – № 28 BP_6K, 59, 79, 277, 794 и др.

Важным этапом в конструировании противоклостридиальных вакцинных препаратов явились исследования по разработке методов очистки и концентрации токсинов ботулизма, газовой гангрены и столбняка.

Первые попытки по очистке ботулинического токсина типа А принадлежат L. Brieger и N. Kempner [88]. Для этого они применяли методы осаждения хлористым цинком и высаливания сульфатом аммония. Позднее, P.T. Shipe и H. Sommer для очистки ботулинических токсинов применили метод кислотного осаждения в изоэлектрической зоне [89].

Высокоочищенный токсин типа А в кристаллической форме был впервые получен C. Lamanna с соавт. и A. Abrams с соавт. [90, 91, 92]. Для очистки и кристаллизации токсина они использовали методы, широко применявшиеся в то время для очистки различных белков: осаждение соляной кислотой при pH 3,5; переосаждение ацетатом натрия в присутствии хлористого натрия, встряхивание с хлороформом, высаливание сернокислым аммонием. После чего концентрированный очищенный препарат при длительном осаждении кристаллизовался. В 1947 г. C. Lamanna и H. Glassman получили высокоочищенный ботулинический токсин типа А методом осаждения соляной кислотой [93].

До конца 50-х гг. прошлого столетия методы очистки ботулинических токсинов разных типов основывались главным образом на первоначальном кислотном осаждении их из культуры при pH 3,75±0,25 с последующим выделением токсина их преципитата и высаливанием сульфатом аммония или переосаждением этанолом. Этими методами достигали освобождения от балластных веществ до 90% и более ботулинических токсинов [33, 78, 94].

В исследованиях Д.М. Горфункель с соавт. было проведено сравнительное изучение метода очистки ботулинического анатоксина типа В с помощью высаливания антигена сульфатом аммония,

осаждения в изоэлектрической точке соляной или трихлоруксусной кислотами, а также адсорбции на гидроокиси алюминия. Было показано, что наиболее эффективным как по степени очистки, так и по выходу антигена является метод кислотного осаждения, причем трихлоруксусная кислота не имела преимуществ перед соляной [95, 96].

Важно подчеркнуть, что для осаждения специфического антигена ботулинических токсинов использовали различные кислоты, в том числе метафосфорную [97, 98, 99, 100, 101].

В начале 60-х гг. XX в. для разделения белковых смесей стали широко применяться методы ионообменной хроматографии и гельфильтрации. С целью очистки ботулинических токсинов типов А и В был использован метод хроматографии на ДЭАЭ – целлюлозе [102,103]. В.И. Драченников с соавт. отмечали, что при фракционировании препаратов анатоксина типа А на ДЭАЭ – целлюлозе удельная активность увеличивалась в 1,5–2 раза [104].

Изучая константу седиментации высокоочищенных ботулинических токсинов, E.J. Schantz и L. Spero установили , что у токсина типа А она составляла 19S, а у токсина типа В – 16S [105].

Для определения молекулярной массы ботулинических токсинов и анатоксинов широкое применение получил метод фракционирования на декстрановых гелях. С его помощью удалось установить возможность получения ботулинических токсинов высокой степени очистки с помощью гельфильтрации на сефадексах [106, 107, 108, 109, 110].

Метод хроматографии на подкисленной ДЭАЭ-целлюлозе или ДЭАЭ-сефадексе для выделения нейротоксинов типа А применяли также B.R. DasGupta с соавт., а типа В – B.R. DasGupta с соавт., W.H. Beers с соавт.

По их данным, нейротоксины типов А и В имели молекулярную массу 150000 и 167000 соответственно. Это были нейротоксины, освобожденные от гемагглютинина [111, 112, 113, 114].

Технологически сложный метод выделения ботулотоксинов типа А был разработан S. Sugii с соавт. [115]. При этом токсин, полученный на мясной питательной среде, осаждали серной кислотой 3N с pH 4,0. Экстрагированный из осадка фосфатным буфером белок переосаждали сульфатом аммония, затем обрабатывали протамином для удаления РНК, диализировали против ацетатного

буфера с pH 4,25±0,25. Диализированный материал хроматографировали на колонке с SP-сефадексом, уравновешенным к pH 4,25±0,25. Токсические фракции вновь подвергали концентрированию путем высаливания сульфатом аммония или ультрафильтрацией, а затем пропускали через колонку с сефадексом G-200.

Многоэтапные методы очистки, в которых кислотное или солевое фракционирование чередовалось с использованием хроматографических методов, описаны при получении высокоочищенных гомогенных ботулинических токсинов типа Е в исследованиях M. Kitamura с соавт.; токсинов типа В – в работах S. Kozaki с соавт., S. Miyazaki с соавт. и В.В. Ключевой, а токсина типа F – в публикациях И.М. Михайловой с соавт., Т.И. Булатовой, В.П. Царапкина, В.А. Благовещенского с соавт. и Р.Н. Уваровой с соавт. [49, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124].

Не менее сложной является методика получения очищенного токсина типа А, предложенная И.Д. Виноградовой с соавт. [57]. Согласно ее, нативный токсин осаждали сульфатом аммония. Экстрагированный из осадка раствор белка наносили на колонку с сефадексом G-100, уравновешенный к pH 5,6. Фракции первого пика для удаления РНК подвергали ионообменной хроматографии на ДЭАЭ-целлюлозе, затем переосаждали сульфатом аммония. Полученный осадок растворяли в натрий фосфатном буфере с pH 6,6. Для разделения нейротоксина и гемагглютинина раствор пропускали через колонку с сефадексом G-200. Окончательную очистку токсина осуществляли на сефадексе G-25, а затем на ДЭФЭ-сефадексе А-5.

Все эти сложные и трудоемкие методы очистки ботулинических нейротоксинов широко использовались в лабораторных условиях с целью изучения их физико-химических, биохимических и патогенетических свойств. Одновременно они были рекомендованы для получения очищенных анатоксинов в промышленном производстве иммунобиологических лекарственных препаратов. В то же время, как было показано работами Р.Ш. Магазова, достаточно высокая степень очистки токсинов может быть достигнута при сочетании нескольких различных методов [125].

Существуют три принципиально отличных схемы получения очищенных концентрированных токсинов:

– из полностью обезвреженных фильтратов бульонных культур микроорганизмов;

– из недообезвреженных токсинов;
– из частично обезвреженных культур или их фильтратов.

Первая из перечисленных схем не пригодна для производства вакцин, так как процесс полного обезвреживания нативных токсинов длится 25±3 суток и поэтому в крупном производстве потребовал бы использования множества сосудов для прогревания нативных препаратов с формалином. Кроме того, при длительном воздействии формалина происходит прочное связывание специфического белка с балластными азотистыми веществами и, следовательно, делает невозможным удаление их в процессе очистки.

Вторая схема концентрации и очистки ботулотоксинов в условиях промышленного производства в нашей стране впервые была предложена А.А. Воробьевым [50, 51]. Согласно этой схеме, полученные токсины подлежат осаждению соляной кислотой в присутствии 0,2% гексаметафосфата натрия с последующим повторным переосаждением этой же кислотой. Очищенные таким способом токсины обезвреживаются прогреванием при температуре 37,0±0,2 °С с 0,3% (дробно до 0,5%) формалина. К недостаткам этого метода можно отнести опасность работ с большими объемами токсина [125].

И, наконец, третья из предложенных схем очистки частично обезвреженных токсинов была использована при разработке технологии производства ботулинических анатоксинов в Уфимском НИИВС им. И.И. Мечникова [125, 126, 127, 128]. К полученным токсинам авторы рекомендовали добавлять 0,4% формалина с последующим прогреванием их при температуре 37±0,2 °С в течение 3 сут. Недообезвреженные токсины концентрировали в 20 раз путем осаждения их соляной кислотой в присутствии 0,2% гексаметафосфата натрия. Концентраты вновь переосаждали соляной кислотой и дообезвреживали в течение 12 сут при температуре 30±0,2 °С в присутствии 0,2% формалина. Этот метод очистки концентрированных препаратов получил практическое распространение после исследований Е.Н. Воробьевой [129, 130, 131]. Она провела повторное осаждение антигена соляной кислотой по способу А.А. Воробьева и переосаждение ацетоном при температуре 0 °С. В первом случае осадок, полученный после первого осаждения, автор растворяла в 0,1 М фосфатном буферном растворе, а во втором – в недообезвреженном токсине по методике, предложенной В.Н. Мельниковым, для очистки столбнячного токсина

[4]. Результаты этих опытов показали, что двукратное осаждение соляной кислотой частично обезвреженных ботулинических токсинов типов А и В вело к меньшим потерям в них единиц связывания, чем однократное с переосаждением ацетоном. По этой причине в технологию изготовления ботулинических анатоксинов Уфимского НИИВС им. И.И. Мечникова был включен метод очистки недообезвреженных ботулотоксинов типов А и В путем двукратного кислотного осаждения.

В соответствии с регламентом производства ботулинического трианатоксина, разработанного в Уфимском НИИВС им. И.И. Мечникова, метод очистки и концентрирования токсинов типов А и В, хотя и незначительно, но отличается от способа А.А. Воробьева. Эти отличия заключаются в использовании частично обезвреженных токсинов вместо нативных. Кроме того, в технологию получения анатоксинов был внедрен дополнительный этап очистки препаратов – сорбция балластных белков на каолине. Он заключался в суспендировании 2% каолина в очищенный недообезвреженный токсин при нейтральном pH с последующим выдерживанием суспензии при температуре 20±2 °С в течение часа. После чего каолин удаляется путем сепарирования. Очищенные таким образом токсины дообеззараживаются 0,2% формалином в течение 15 сут при температуре 37±0,2 °С.

Метод изготовления очищенных ботулинических анатоксинов, разработанный в Уфимском НИИВС им. И.И. Мечникова, использовался и в других учреждениях страны. Он позволяет получать анатоксины, отвечающие требованиям на очищенный сорбированный трианатоксин.

В данном обозрении мы рассмотрели способы очистки ботулотоксинов, которые в большинстве случаев являлись лабораторными и в силу своей сложности, трудоемкости и необходимости применения дефицитных и дорогостоящих компонентов не могут быть использованы в крупномасштабном производстве анатоксинов.

Особое значение имеет правильный выбор условий обезвреживания (детоксикации) клостридиальных токсинов. При отсутствии балластных веществ питательной среды, играющих роль своеобразных защитных буферных систем при детоксикации, более четко проявляются свойства собственно токсина (антигена) [124]. При несоблюдении указанного обстоятельства получаемые

продукты не будут обладать необходимыми качествами (максимальная специфичность, антигенность и полная безвредность).

По мнению Н.Н. Васильева, в качестве детоксицирующих веществ применялись самые разнообразные химические соединения (перекись водорода, йод, галоидозамещающие углеводороды, азотистая кислота, кетен, нингидрин, различные альдегиды, лактоны и т.д.), определяющие протекание окислительных процессов или реакций ацетилирования с участием тех функциональных групп, которые играют существенную роль в построении активных центров токсина [124]. Наилучшими детоксицирующими веществами являются соединения, в которых реагирующая функциональная группа (например, карбонильная или лактонная) связана с простым радикалом. В противоположном случае низкая реакционноспособность реагирующей с токсином группировки не обеспечивает достаточной детоксикации, а включение в молекулу антигена сложного радикала может отрицательно влиять на свойства антигенной специфичности [124].

Практика применения анатоксинов убедительно подтвердила тот факт, что наилучшим обезвреживающим агентом до настоящего времени является формальдегид.

Очищенные и обезвреженные клостридиальные анатоксины по сути являются полуфабрикатами ассоциированных ИЛП, предназначенных для специфической профилактики ботулизма и раневых инфекций. Они не применяются для профилактических целей из-за слабо выраженной иммунологической эффективности. Важное значение в этом вопросе приобретают депонирующие вещества. Депонированные анатоксины являются наиболее эффективной формой препаратов для подкожного применения. Их можно подразделить на сорбированные и эмульгированные. Более перспективными для изготовления и применения являются сорбированные препараты. Из депонирующих веществ важное значение имеют минеральные сорбенты, которые обладают выраженным адъювантным действием и оказывают стимулирующее влияние на иммуногенез [134]. Кроме того, они обеспечивают периодическое поступление антигена в макроорганизм за счет замедления процесса всасывания.

Являясь одним из компонентов вакцинных препаратов, сорбент должен отвечать следующим требованиям: быть безвредным, обладать максимальной избирательной сорбцией, иметь высокую

сорбционную способность, длительно и прочно удерживать антиген в сорбированном состоянии, вызывать умеренную местную реакцию, быть стандартным [3].

В качестве сорбента биологических препаратов применяют гидроокись алюминия, фосфат алюминия и фосфат кальция. В нашей стране предпочтение отдано гидроокиси алюминия, наиболее полно отвечающей указанным требованиям [9].

Наиболее широкое применение в практике производства адсорбированных вакцинных препаратов получили метод Вилштеттера в модификации М.К. Измайловой и метод К.К. Иванова в модификации К.К. Мачульской [135, 136].

В заключение рассматриваемой проблемы хотелось бы еще раз подчеркнуть, что вопросы конструирования клостридиальных анатоксинов остаются актуальными до настоящего времени. Очевидно, что их решение заключается в создании ассоциированных полианатоксинсодержащих ИЛП, что согласуется с всемирной вакцинной инициативой, которая «…поставила своей идеальной целью создание комбинированной вакцины, способной защитить от 25–30 инфекций, вводимой однократно внутрь в самом раннем возрасте, без побочных явлений» [18].

2.2. Разработка и создание иммунобиологических лекарственных препаратов против ботулизма

Как уже было отмечено в предыдущем разделе главы, проблема ассоциированной иммунизации занимала умы ученых и практических работников здравоохранения многие десятилетия. Полноценность иммунологического ответа организма на одновременное введение различных антигенов убедительно была доказана не только многочисленными экспериментальными исследованиями, но и широким применением в противоэпидемической практике ассоциированных вакцинных препаратов.

На основании собственных экспериментальных данных и материалов специальной литературы Б.Г. Трухманов сделал два основных вывода [137]:

– все бактерийные вакцинные препараты, в том числе и самые сложные 18–20-компонентные мультиантигены, являются достаточно

ареактогенными и имеют значительный запас толерантности. При этом автор отмечает явление интерференции поствакцинальных реакций, вызываемых монопрепаратами;

– сложные и очень сложные вакцины являются иммунологически полноценными препаратами и достигнутый с их помощью иммунитет обеспечивает должную защиту организма в отношении значительного количества соответствующих инфекций.

Как отмечал В.Н. Мельников с соавт., принятые методы оценки ассоциированных вакцин основаны на определении эффективности входящих в них отдельных компонентов без достаточного учета сложности их взаимоотношений в организме иммунизированных людей [138, 139]. Между тем исследования показывают, что одни из компонентов ассоциированных препаратов способны подавлять или, наоборот, стимулировать действие других [11, 140].

Авторы справедливо выдвигают перед иммунологами вопрос о создании соответствующих эталонов ассоциированных вакцин, эффективность которых должна быть выяснена на людях с тем, чтобы определение специфической эффективности ассоциированных препаратов, предназначенных для иммунизации людей, можно было производить путем сравнения с такими эталонами [125].

Н.В. Попов с соавт. считают, что использование ассоциированных препаратов или одновременное введение нескольких вакцин (при разумном их сочетании), безусловно, предпочтительнее, чем многократные иммунизации разными антигенами. Во-первых, достигается большая специфическая эффективность (взаимостимуляция); во-вторых, исчезают опасения, что каждое последующее введение антигена приведет к снижению титров антител к ранее введенным антигенам, и, наконец, что, возможно, самое существенное, уменьшается опасность аллергизации и аутоиммунизации [141].

В этом плане перспективными являются ассоциированные химические вакцины, которые обладают строгой антигенной направленностью и содержат минимальное количество балластных веществ, стабильны при хранении и могут применяться со средствами экстренной профилактики. При этом подлежат более точному дозированию и не контаминируют с вирусами и микоплазмами.

Почти полвека потребовалось ученым всего мира, чтобы в ходе интенсивных исследований в области разработки, изготовления,

усовершенствования и практического применения добиться значительных успехов в создании средств профилактики ботулизма.

После работ Г. Рамона по разработке препаратов для ассоциированной иммунизации против ботулизма приоритет таких исследований принадлежит M. Weinberg и P. Goy, которые впервые изготовили нативные ботулинические анатоксины типов А, В и применили их для вакцинации морских свинок, кроликов и лошадей [142].

Однако потребовались значительные усилия, чтобы технологическая схема изготовления анатоксинов, включающая методы выращивания клостридий, их очистке от балластных веществ и остатков питательной среды, обезвреживании, концентрировании и сорбировании, в полной мере отвечала бы требованиям практической медицины.

Приготовление анатоксинов типов А и В путем обеззараживания формалином фильтрата культур описано в работах C. Nigg et al., Hottle et al., а нативного анатоксина типа F – в сообщении W.K. Harrell et al. [45, 144, 145].

В работе C.E. Frice с соавт. было показано, что в комбинации ботулинических анатоксинов типов А и В анатоксин А повышает иммуногенность анатоксина типа В [46].

A.L. Barron с соавт. в опытах на мышах показали, что комплекс анатоксинов типов А, В, Е существенно повышает степень защиты животных от токсинов, чем при иммунизации моноантигенами [70].

В. Денчев с соавт. в опытах на морских свинках изучили иммуногенность трианатоксина, содержащего в прививочной дозе по 100 ЕС ботулинических анатоксинов типов А, В и 7 Lf столбнячного. После второй инъекции препарата установлено подавление ботулиническими анатоксинами типов А и В образования столбнячного анатоксина. Титры ботулинических анатоксинов типов А, В и столбнячного анатоксина равнялись соответственно 5:2:1, что, по мнению авторов, объясняется большой концентрацией ботулинических анатоксинов в вводимых дозах.

H.R. Reames с соавт. при иммунизации 100 человек ботулиническим дианатоксином типов А и В отметили, что образование антитоксинов к ботулиническому анатоксину типа В было более высоким, чем при иммунизации моноанатоксином [146].

M.A. Fiock с соавт. провели иммунизацию 150 человек ботулиническим дианатоксином типов А и В. Все привитые через 87±4 сут после первой прививки имели титры антитоксина А – 0,02 МЕ/мл и типа И – 0,005 МЕ/мл [147]. Эти титры они считали защитными, ссылаясь на данные M.N. Adams [148]. Позднее M.A. Fiock с соавт. провели испытания на людях очищенного сорбированного ботулинического пентаанатоксина (A, B, C, D, E) [149]. Трехкратная прививка обеспечивала у 90–100 % вакцинированных образование минимальных защитных титров (А – 0,02, В – 0,005, С – 0,02, D – 0,16 и Е – 0,00125 МЕ/мл).

В нашей стране иммунизация людей ботулиническими анатоксинами типов А и В впервые была проведена И.М. Великановым в 1934 г., который использовал нативный дианатоксин для иммунизации добровольцев [143]. При этом эффективность прививок оказалась низкой: только после пяти подкожных инъекций кровь привитых в объеме 0,5 мл была способна нейтрализовать 2 DLM токсинов.

В результате экспериментальных исследований были сконструированы эффективные препараты против ботулизма: вначале трианатоксин типов А, В, С, а затем пентаанатоксин типов А, В, С, Д, Е [133].

Полученный пентаанатоксин в одной прививочной дозе (0,5 мл) содержал 100 ЕС анатоксина типа А, по 50 ЕС анатоксинов типа В, С и D и 25 ЕС анатоксина типа Е. Указанные количества антигенов были сорбированы на гидроокиси алюминия, количество которой не превышало 4 мг.

Испытание иммуногенности пентаанатоксина на белых мышах, морских свинках и кроликах показало, что все компоненты вакцины обладали выраженными иммунизирующими свойствами. Это подтверждалось уровнем антитоксинообразования и устойчивостью иммунизированных животных при введении им специфических токсинов.

Экспериментальные исследования показали, что наиболее эффективными были анатоксины В и С и наименее эффективным – типа D [133]. Анатоксин типа А занимал промежуточное положение.

Иммунизация людей была проведена троекратно путем подкожного введения в подлопаточную область пентаанатоксина

с интервалом между инъекциями в 30 сут последующей ревакцинацией через 1 год.

Проверка показателей местной и общей реактогенности, а также результаты клинического обследования привитых позволили характеризовать изучаемый ассоциированный препарат как безвредный и слабореактогенный.

При испытании на людях сорбированный ботулинический пентаанатоксин после трехкратной прививки обусловливал формирование выраженного иммунитета. У большинства обследованных содержание антитоксинов типов А, В, Д было выше 1 АЕ/мл, а типов С и Е – выше 0,5 АЕ/мл. После ревакцинации, проведенной через год, содержание антитоксинов у подавляющей части обследованных сохранялось на достаточно высоком уровне и в большинстве случаев превышало 10 АЕ/мл для типов А и С и 20 ЕС/мл – для типов D и Е. Относительно ниже было содержание антитоксина типа В: из общего числа исследованных сывороток титры более 10 АЕ/мл составляли 23%, у остальных они колебались в пределах 10-1 АЕ/мл [133].

А.А. Воробьев и соавт. установили, что увеличение дозировки одного из анатоксинов в 10 раз не вызывает угнетающего действия на иммуногенность других антигенов при условии, если они являются равноценно сильными [3, 133]. В их опытах уровень антитоксинов у кроликов и морских свинок, привитых пентаанатоксином, был ниже, а устойчивость животных к токсинам выше, чем при иммунизации теми же дозами моноанатоксинов. Поэтому авторы считают, что более низкие титры антитоксинов при иммунизации пентаанатоксином еще не свидетельствуют о наличии конкурентных взаимоотношений между антигенами [85].

В последующем К.И. Матвееву удалось создать полианатоксин против ботулизма А, В, С, Е, который после успешной экспериментальной проверки был испытан на добровольцах и при трехкратной иммунизации формировал напряженный иммунитет в отношении всех компонентов, за исключением перфрингенс [6].

В 1956–1963 гг. в лаборатории Г.В. Выгодчикова были созданы и испытаны сорбированные ассоциированные препараты: трианатоксин против столбняка и газовой гангрены (перфрингенс, эдематиенс), пентаанатоксин (трианатоксин и ботулинические анатоксины типов А и В) и секстаанатоксин (трианатоксин и ботулинические

анатоксины типов А, В, С), а также октаанатоксин, включающий упомянутый трианатоксин и ботулинический пентаанатоксин [153, 154, 155, 156, 157, 158].

Изучение пентаанатоксина на обезьянах показало, что отдаленная ревакцинация весьма эффективна, особенно в отношении ботулотоксина типов А и В [159]. Особенно эффективной оказалась отдаленная ревакцинация пентаанатоксином через 9 мес после первичного грундирования.

И.И. Рогозин и В.Д. Беляков испытали этот препарат на людях и наблюдали у 29,7% привитых развитие лихорадочных реакций, большинство из которых протекало в легкой форме; средние реакции были зарегистрированы у 4,7% вакцинированных [160].

При экспериментальном изучении октаанатоксина на обезьянах было установлено, что первичная иммунизация (двукратная с интервалом 25–50 сут) оказалась слабореактогенной и слабоиммуногенной; между тем ревакцинация обеспечивала отчетливое накопление и длительное сохранение защитных титров антител [157].

Дальнейшее изучение этого препарата на людях, которое проводилось группой ученых в составе Г.В. Выгодчикова, И.И. Рогозина и В.Д. Белякова, подтвердило, что октаанатоксин хорошо переносится, слабо реактогенен и вызывает у 13–24 % привитых поствакцинальные реакции без утраты трудоспособности. Наилучший иммунологический эффект с созданием длительного иммунитета давала схема из трех прививок, включавшая двукратную вакцинацию с интервалом 30 сут и последующую отдаленную ревакцинацию через 90 сут.

В 1966 г. ряд институтов МЗ СССР приступил к освоению промышленного производства ассоциированного препарата, содержащего сорбированную химическую брюшнотифозную вакцину, сорбированные ботулинические анатоксины типов А, В, Е, гангренозные анатоксины типа перфрингенс, эдематиенс и столбнячный анатоксин.

Логическим итогом многолетних исследований по конструированию оптимального полианатоксинсодержащего препарата явилось принятие в противоэпидемическую практику химической сорбированной вакцины с очищенным сорбированным секстаанатоксином (БТС). Серийный выпуск ее был начат в 1969 г. в Уфимском

НИИВС им. И.И. Мечникова. Препарат состоял из 7 компонентов для профилактики брюшного тифа, ботулизма (А, В, Е), столбняка и газовой гангрены [161].

Однако жидкая сорбированная брюшнотифозная вакцина с секстаанатоксином обладала рядом существенных недостатков, что препятствовало ее широкому применению в противоэпидемической практике. Следует отметить, что уже на этапах комиссионных испытаний и в последующем при применении БТС регистрировалась высокая реактогенность препарата. Так, различные серии БТС вызывали развитие средних и сильных общих поствакцинальных реакций (ПВР) у 19–65% привитых. При этом прививки приводили к кратковременному снижению и утрате трудоспособности у 4–12% [3, 45]. В специально проведенных исследованиях было установлено, что реактогенные (токсические) свойства различных серий БТС определяет наличие прежде всего брюшнотифозного компонента [162]. Кроме того, существенную роль в развитии местных ПВР играет сорбент – гидроокись алюминия. Причем степень выраженности этих реакций находится в прямо пропорциональной зависимости от концентрации сорбента ИЛП.

Брюшнотифозный компонент, по мнению создателей препарата, помимо непосредственного участия в выработке иммунитета к возбудителю брюшного тифа, являлся неотъемлемой частью ассоциированного препарата, так как обладал ярко выраженным адъювантным действием.

С целью снижения реактогенности была обоснована возможность и на практике доказана целесообразность уменьшения вводимого объема БТС-вакцины до 0,5 мл без существенного ущерба для иммуногенности препарата [163].

Однако, несмотря на некоторое снижение реактогенности по количеству средних и сильных ПВР, вакцина не соответствовала требованиям, действующим в тот период времени МРТУ-42.

Кроме того, профилактическое применение химической сорбированной брюшнотифозной вакцины не требовало той кратности прививок в отношении брюшнотифозного компонента. В силу этого многократное введение БТС-вакцины для достижения иммунологического эффекта в отношении компонентов ботулизма и раневых инфекций приводило к неоправданной сенсибилизации больших контингентов людей.

Существенным недостатком БТС-вакцины являлось агрегатное состояние препарата. ИЛП выпускался в жидком виде с ограниченным сроком хранения (2 года), не был пригоден для хранения и транспортировки при отрицательных температурах, а также имел в своем составе консервант – мертиолят натрия. Последнее обстоятельство делало непригодным применение препарата в ассоциациях с живыми вакцинами.

В связи с перечисленными недостатками БТС-вакцины возникла необходимость создания нового модернизированного полианатоксинсодержащего препарата, выпускаемого в сухом виде, не содержащего брюшнотифозного компонента и консервантов, имеющего длительный срок годности при хранении в условиях экстремальных температур, облегченного в антигенном отношении и с минимально возможной концентрацией сорбента.

В Уфимском НИИВС им. Мечникова под научным руководством Р.Ш. Магазова в 1979 г. был создан сухой очищенный сорбированный секстаанатоксин, содержащий аналогичный с БТС-вакциной набор анатоксинов. Новая лекарственная форма препарата определяла длительный срок хранения (5 и более лет), способность сохранять свои свойства при экстремальных температурах и не содержала в своем составе консервантов. Эти положительные качества препарата существенно расширили диапазон его использования.

Широкие испытания производственных серий на людях показали, что новый секстаанатоксин являлся безвредным, малореактогенным и высокоиммуногенным препаратом. Он представлял собой ассоциированный препарат, включающий смесь сорбированных на гидроксиде алюминия очищенных концентрированных анатоксинов клостридий ботулизма типов А, В, Е, столбняка, перфрингенс типа А и эдематиенс. На его основе был налажен выпуск пентаанатоксина (был исключен столбнячный анатоксин), тетраанатоксин (смесь ботулинических анатоксинов А, В, Е и столбнячного анатоксина) и трианатоксин (смесь сорбированных ботулинических анатоксинов типов А, В, Е).

Иммунизация полианатоксином сопровождалась развитием общих и местных реакций. Общие реакции начинали проявляться у части привитых через 6–8 ч, достигали максимума развития через 12–18 ч и проявлялись в виде недомогания, головной боли, чувства разбитости. Температурные реакции регистрировались у 20–35%

привитых, проявлялись в основном в легкой форме (37,2–37,5 °С) и лишь в отдельных случаях (менее 3% привитых) достигали 37,5–38,5 °С. Исчезали они через 24–36 часов.

Местные ПВР в месте введения препарата появлялись в первые сутки и проявлялись в виде гиперемии, инфильтрата, иногда массивного отека подкожной клетчатки. Чаще эти реакции развивались после введения препарата безыгольным инъектором и протекали по типу умеренно выраженных инфильтратов воспалительно-травматического характера. Выражением местной реакции являлись также регионарный лимфаденит подмышечных узлов, протекающий в легкой форме и возникающий не более, чем у 25% привитых. Острые местные проявления ПВР исчезали на 3–5 сут. Средние и сильные местные реакции развивались не более, чем у 10% вакцинированных. На месте введения препарата формировалось подкожное уплотнение (депо вакцины) диаметром 1–2 см, которое постепенно рассасывалось в течение 2–3 недель.

Иммунитет ко всем входящим в полианатоксин компонентам начинал формироваться с 7–10 дня после ревакцинации (через 6–9 месяцев после двукратной с интервалом 25–30 сут первичной иммунизации) и достигал максимума к 21 сут, сохраняя защитные титры в течение 5 и более лет.

Однако, несмотря на явные преимущества перед БТС, секстаанатоксин, хотя и в меньшей степени, оставался достаточно реактогенным, обладал недостаточной иммунологической эффективностью в отношении компонента перфрингенс [151].

Местная реактогенность этого препарата при подкожно-безыгольном введении и в ряде случаев характеризовалась развитием обширных инфильтратов и массивных отеков и была связана с частичным попаданием сорбента – гидроокиси алюминия внутрикожно.

В серийно выпускаемом секстаанатоксине недостаточно учитывалось взаимное влияние антигенов на иммуногенность друг друга. Этим самым в недостаточной степени был реализован один из основных принципов конструирования ассоциированных препаратов – принцип наиболее рациональной количественной компоновки антигенов, входящих в вакцину. По высказыванию А.А. Воробьева, до настоящего времени принцип сбалансирования антигенных дозировок решается, главным образом, эмпирически и не нашел исчерпывающего теоретического обоснования [164].

В 1984 г. в результате оптимизации антигенного состава секстаанатоксин был модернизирован за счет количественного изменения антигенного состава и принят в противоэпидемическую практику с 1985 г.

Иммунизирующая доза нового препарата содержала следующие количества активных веществ:

- ботулинический типа А анатоксин – 5 ЕС;
- ботулинический типа В анатоксин – 3 ЕС;
- ботулинический типа Е анатоксин – 3 ЕС;
- столбнячный анатоксин – 2,5 ЕС;
- перфрингенс анатоксин – 15 ЕС;
- эдематиенс анатоксин – 2,5 ЕС.

Несмотря на высокую иммунологическую эффективность всех компонентов секстаанатоксина (кроме перфрингенс) и его практическую значимость, из-за экономических затруднений в стране в 1996 г. секстаанатоксин был снят с производства.

В настоящее время отечественная промышленность в ограниченных партиях выпускает только тетра(три)анатоксин.

Тетра(три)анатоксин очищенный адсорбированный жидкий предназначен для профилактики ботулизма (типов А, В, Е) и столбняка (трианатоксин только для профилактики ботулизма А, В, Е) у взрослых.

Препарат представляет собой смесь адсорбированных на геле алюминия гидроксида ботулинических (типов А, В, Е) и столбнячных токсинов, обезвреженных формалином и теплом. Консервант мертиолят (100±20) мкг/мл. Содержит формальдегид – не более 100 мкг/мл, алюминия гидроксид (сорбент) – не более 1, 2 мкг/мл. Представляет собой суспензию желтовато-белого цвета, разделяющуюся при отстаивании на прозрачную надосадочную жидкость и рыхлый осадок. Выпускается в ампулах по 1 мл (1 доза) или 3 мл (3 дозы).

Схема иммунизации тетра(три)анатоксином состоит из трех последовательных прививок. Первичную двукратную вакцинацию осуществляют с интервалом от 25 до 30 сут. Отдаленная ревакцинация проводится через 6–9 мес. Последующие прививки проводят через каждые 5 лет или по показаниям. Вызывает формирование специфического антитоксического иммунитета продолжительностью не менее 5 лет.

Препарат вводят подкожно в подлопаточную область с помощью шприца или безыгольного инъектора.

После иммунизации в течение 1–2 сут могут развиваться общие и местные поствакцинальные реакции. Общие реакции выражаются в недомогании и незначительном подъеме температуры. Местная реакция на подкожное введение анатоксина характеризуется появлением в месте введения препарата гиперемии, отека подкожной клетчатки и инфильтрата, а в отдельных случаях – регионарного лимфаденита. В течение недели острые воспалительные изменения исчезают, на месте введения анатоксина формируется уплотненный инфильтрат диаметром 10–30 мм, который полностью исчезает через 15–30 сут. Производитель: ФГУП «НПО «Микроген» МЗ РФ, г. Москва (НПО «Иммунопрепарат», г. Уфа).

2.3. Разработка и создание иммунобиологических лекарственных препаратов против столбняка

К числу немногих ИЛП, имеющих значимость препаратов массового применения, относится очищенный и адсорбированный столбнячный анатоксин (АС). Он используется как монопрепарат, так и входит в состав ряда ассоциированных вакцин.

Впервые в эксперименте на животных В.И. Цып с соавт. показали принципиальную возможность ассоциированного препарата против столбняка и газовой гангрены перфрингенс [31].

В последующем были выполнены многочисленные исследования, направленные на конструирование ассоциированных ИЛП, включавших столбнячный анатоксин. При этом изучались различные сочетания его как с анатоксинами ботулизма различных типов, так и анатоксинами раневых инфекций. Были проведены исследования иммуногенности и иммунологической эффективности ассоциированных препаратов и комплексных прививок в опытах на животных и при испытаниях на людях.

При этом важно подчеркнуть, что столбнячный анатоксин использовался не только в составе ассоциированных вакцин, но и применялся при комплексных прививках.

Так, для плановой вакцинации взрослого населения в СССР в 30-е годы прошлого столетия была обоснована и внедрена

в практику схема прививок против брюшного тифа, паратифов А и В и столбняка [165]. В последующем для этих целей использовалась вакцина химическая против брюшного тифа, паратифов А и В, дизентерии Флекснера и Зонне, холеры и столбняка (поливакцина НИИСИ). Однако из-за недостаточной иммуногенности отдельных компонентов поливакцины НИИСИ ее заменила вакцина тифопаратифозно-столбнячная химическая сорбированная жидкая – ТАВТе (Vaccinum typhosum – paratyphosum – tetanicum chemicum adsorbate liqide-TABte).

Наряду с созданием ИЛП против кишечных инфекций (ТАВТе, поливакцина НИИСИ) столбнячный анатоксин использовался и при создании вакцин против коклюша и дифтерии (АКДС, АДС), ботулизма и газовой гангрены (БТС, САТ, тетра(три)анатоксин).

В настоящее время в практике в целях активной иммунизации против столбняка широко применяется очищенный столбнячный анатоксин, адсорбированный на гидроокиси алюминия – Anatoxinum tetanicum purificatum aluminio hydroxydatum adsorptum, что соответствует международному наименованию «Toxoidum tetani».

Очищенный и адсорбированный столбнячный анатоксин является жидким препаратом, представляющим собой беловатую или слегка желтоватую гомогенную суспензию, оседающую при стоянии и не содержащую при встряхивании грубых неразбивающихся частиц и хлопьев. Основным действующим началом препарата является очищенный от балластных белков токсин столбнячной палочки, обезвреженный и сорбированный на гидроокиси алюминия. В качестве консерванта препарат может содержать 0,01% мертиолята или 0,25% фенола.

Очищенный и адсорбированный столбнячный анатоксин (АС) должен быть стерильным, безвредным, иммуногенным, содержать в 1 мл 20 ЕС, иметь pH 6,8–7,6 и удельную активность не менее 500 ЕС на 1 мг белкового азота, содержать не более 0,02% формалина на 20 ЕС. Разовая прививочная доза анатоксина 0,5 мл (10 ЕС). АС широко применяется в противоэпидемической практике и входит в состав ряда иммунобиологических лекарственных препаратов.

Препараты, применяемые для активной профилактики столбняка при плановых прививках и прививках по эпидемическим показаниям:

– вакцина коклюшно-дифтерийно-столбнячная адсорбированная жидкая (АКДС-вакцина), содержащая 10 ЕС столбнячного анатоксина в 1 мл;

– анатоксин дифтерийно-столбнячный очищенный адсорбированный жидкий (АДС-анатоксин), содержащий 20 ЕС столбнячного анатоксина в 1 мл;

– анатоксин дифтерийно-столбнячный очищенный адсорбированный с уменьшенной концентрацией антигена жидкий (АДС-М-анатоксин), содержащий 10 ЕС столбнячного анатоксина в 1 мл;

– анатоксин столбнячный очищенный адсорбированный жидкий (АС-анатоксин), содержащий 20 ЕС столбнячного анатоксина в 1 мл;

– вакцина комбинированная гепатита В и анатоксин дифтерийно-столбнячный с уменьшенным содержанием антигенов (5 ФЕ дифтерийного и 5 ЕС столбнячного), сорбированных на алюминия гидроксиде (БУБО-м-вакцина).

В производственной практике для получения столбнячного токсина используют высокотоксигенные штаммы, обладающие, как правило, и высокоиммуногенными свойствами [9]. В Каталоге штаммов 1963 г. сохраняется более 50 штаммов столбнячной палочки, однако заслуживают внимания только штаммы № 54 и 288. Для получения столбнячного токсина применяют мясные питательные среды: Легру, Рамона и гидролизную среду Глузмана [54].

2.4. Разработка и создание иммунобиологических лекарственных препаратов против раневых инфекций

Принципиальная возможность создания активного иммунитета против анаэробной инфекции путем применения анатоксинов убедительно показана многочисленными исследованиями отечественных и зарубежных авторов [33, 132, 158, 159, 166].

В связи с этим были развернуты интенсивные работы по созданию вакцинных препаратов против наиболее часто встречающихся возбудителей газовой гангрены, а именно Cl. perfringens и Cl. oedematiens.

Несложный по составу ассоциированный препарат из очищенных концентрированных анатоксинов газовой гангрены перфрингенс и эдематиенс в экспериментах на животных и в исследованиях

на людях обстоятельно была изучена Г.П. Черкасс с сотрудниками [16]. В экспериментах на животных была показана безвредность и ареактогенность препарата, установлен способ введения препарата в организм и подобрана оптимальная доза вакцины. При этом авторы отмечали, что при чрезмерном увеличении антигенов в прививочной дозе (эдематиенс до 500 ЕС, перфрингенс до 200 ЕС) наблюдалось угнетение иммунитета.

В работе А.И. Углевой с соавт. рассмотрены результаты изучения сорбированного тетраанатоксина (перфрингенс, эдематиенс, септикус, тетанус) на животных [132]. Было отмечено, что наибольшая эффективность тетраанатоксина наблюдалась при двукратной иммунизации животных с интервалом в 30 сут. При этом отмечалось, что в ассоциированном ИЛП оптимальные иммунизирующие дозы несколько ниже, чем в монопрепаратах.

В 1956–1963 гг. в лаборатории Г.В. Выгодчикова были созданы и испытаны сорбированные ассоциированные препараты: трианатоксин против столбняка и газовой гангрены (перфрингенс, эдематиенс), тетраанатоксин (трианатоксин и анатоксин септикум).

Проведенные испытания разработанных ИЛП показали, что наилучший иммунологический эффект с созданием длительного иммунитета давала схема из трех прививок, включавшая двукратную вакцинацию с интервалом 30 сут и последующую отдаленную ревакцинацию через 90 сут [157, 166].

Однако в противоэпидемическую практику анатоксины Cl. perfringens и Cl. oedematiens были приняты в составе полианатоксинсодержащего препарата – химической сорбированной брюшнотифозной вакцины с очищенным сорбированным секстаанатоксином (БТС), включавшем ботулоанатоксины типов А, В, Е, столбнячный и гангренозные анатоксины. Из-за высокой реактогенности БТС была снята с производства и заменена на модернизированный сухой очищенный сорбированный секстаанатоксин, в составе которого были сохранены анатоксины Cl. perfringens и Cl. oedematiens.

Как уже отмечалось выше, из-за экономических затруднений в стране в 1996 г. секстаанатоксин был снят с производства. С этого момента вакцинопрофилактика поражений гангренозными токсинами в стране не проводится.

Литература

1. *Берман, В.М.* Ботулизм // Курс частной эпидемиологии. – Л., 1936. – С. 130–140.

2. *Великанов, И.М.* Экспериментальная иммунизация человека против ботулизма // Клиническая медицина. – 1934. – № 11–12. – С. 1802–1806.

3. *Воробьев, А.А.* Анатоксины / А.А. Воробьев, Н.Н. Васильев, А.Т. Кравченко. – М.: Медицина, 1965. – 488 с.

4. *Мельников, В.Н.* Анаэробные инфекции / В.Н. Мельников, Н.И. Мельников. – М.: Медицина, 1973. – 288 с.

5. *Кравченко, А.Т.* Распространение возбудителей ботулизма и столбняка на территории СССР. – М.: Медицина, 1970. – 200 с.

6. *Матвеев, К.И.* Ботулизм. – М.: Медгиз, 1959. – 407 с.

7. *Kull, K.E.* Die Haufigkeit des Botulismus bei Futtervergiftungen des Nerves in Schweden / K.E. Kull, K. Moberg // Nord. veterinarmed. – 1952. – № 4. – S. 771–779.

8. *Mann, J.M.* Laboratory diagnosis in a large outbreak of type A botulinum Confirmation of the value of coproemination / J.M. Mann, T.M. Gardiner // Amer. J. Epidemiol. – 1982. – V. 115. – № 4. – P. 598–605.

9. Руководство по вакцинному и сывороточному делу // под ред. П.Н. Бургасова. – М.: Медицина, 1978. – 440 с.

10. *Рамон, Г. (Ramon, G.)* Сорок лет исследовательской работы / пер. с франц. – М.: Медгиз, 1962. – 459 с.

11. *Савельев, А.П.* Ассоциированная и комплексная иммунизация: состояние и перспективы / А.П. Савельев, Р.Ш. Магазов, О.П. Мисников и др. – Уфа: Гилем, Башк. энцикл., 2014. – 424 с.

12. *Гапочко, К.Г.* Вакцины, поствакцинальные реакции и функциональное состояние организма привитых / К.Г. Гапочко, Р.Ш. Магазов, В.С. Матковский и др. – Уфа: Башк. кн. изд-во, 1986. – 200 с.

13. *Великанов, И.М.* Ботулизм // Журн. микробиол. – 1934. – Т.12, вып. 2. – С. 211–231.

14. *Цып, В.Н.* Активная иммунизация против столбняка и газовой гангрены / В.Н Цып, Д.Н. Захарина, Л.А. Черная // Труды четвертого анаэробного совещания. – М.: Биомедгиз, 1936. – С.31.

15. *Рогозин, И.И.* Ассоциированная иммунизация и экстренная профилактика / И.И. Рогозин, В.Д. Беляков. – М.: Медицина, 1968. – 248 с.

16. *Черкас, Г.П.* Изучение иммуногенных свойств гангренозного дианатоксина на людях // Ассоциированная иммунизация. – М., 1959. – С. 145–151.

17. *Акатов, А.К.* К вопросу о закономерностях комплексной иммунизации очищенными сорбированными анатоксинами эдематиенс и столбнячным // Журн. микробиол. – 1960. – № 8. – С. 81–87.

18. Иммунопрофилактика: справочник / под ред. В.К.Таточенко, Н.А. Озерецковского. – М., 1998. – 136 с.

19. *Атаманова, Г.С.* Влияние солей кальция в культуре ботулинической палочки типа Е на изготовление и очистку ее токсина / Г.С. Атаманова, Е.Н. Воробьева // Научные основы производства бактерийных и вирусных препаратов: мат-лы всес. научной конференции. – Уфа, 1969. – С. 35–37.

20. *Голшмид, В.К.* Сравнительное иммунохимическое изучение ботулинических токсинов А и С, полученных на мясных и казеиновых средах // Вакцины и сыворотки: Материалы по производству. – М., 1967. – Т.7. – С. 118–126.

21. *Кондратьева, В.Ф.* Биохимические особенности некоторых анаэробов из рода Клостридиум // Журн. микробиол. – 1963. – Вып. 6. – Т. 32. – С. 929–935.

22. *Кушнир, Е.Д.* Рост и токсинообразование клостридий ботулинум Е в смешанных культурах // Труды Омского института эпидемиологии и микробиологии – Омск, 1952. – Т.1. – С. 157–162.

23. *Albrycht, H.* Badania nad Clostridium botulinum typ B / H. Albrycht, D.Pyrkiewicz // Med. dosw. i mikrobiol. – 1965. – T. XV11. – №.1. – S. 21–26.

24. *Dolman, C.E.* Clostridium botulinum type F with recent observations on other types // J. Infect. Dis. – 1961. – V.109. – № 2. – P.107–128.

25. *Duff, J.T.* Studies on the immunity to toxins of Clostridium botulinum. 11. Production and purification of type B toxin for toxoid // J.T. Duff, J. Klerer, R.H. Bilder et al. // J. Bacteriol. – 1957. – V. 73. – №. 5. – P. 597–601.

26. *Eales, C.E.* Description of Clostridium botulinum type D recovered from soil in South Australia / C.E. Eales, A.W. Turner // J. Exptl Biol. And Ved. Sci. – 1952. –V. 30. – P. 294–300.

27. *Hazen, E.L.* Differential characteristics of two strains of Clostridium botulinum type E. Action of toxins in chickens.// Proc. Soc. Exptl Biol. And Med. – 1942. – V. 50. – № 1. – P. 112–114.

28. *Sterne, M.* A new method for the largescale production of high – titre botulinum – toxoid C and B / M. Sterne, J.H. Wentzel // J. Immunol. – 1956. – V.65. – № 2. – P. 175–183.

29. *Wentzel, L.M.* Effect of calcium on production of botulinus D toxin // L.M. Wentzel, M. Sterne // Nature. – 1946. – V.158. – №. 28. – P. 446.

30. *Воробьев, А.А.* Изучение ботулинических анатоксинов. Сообщение IV. Ботулинический анатоксин типа Е. / А.А. Воробьев, Н.Н. Васильев, Л.М. Самородов и др. // Журн. микробиол. – 1962. – №. 1. – С. 72–79.

31. *Воробьев, А.А.* Изучение ботулинического анатоксина. Сообщение V. Ботулинический трианатоксин типов А, В, С / А.А. Воробьев, А.П. Лабинский // Журн. микробиол. – 1962. – № 5. – С. 91–95.

32. *Матвеев, К.И.* Приготовление столбнячного токсина и анатоксина на немясных средах / К.И. Матвеев, Е. А. Щеконина, Г.С. Сойкина и др. // Тезисы докл. межинститутской научной конференции по проблеме «Анаэробы». – М., 1956. – С. 31–32.

33. *Матвеев, К.И.* Концентрированный адсорбированный анаэробный полианатоксин / К.И. Матвеев, А.Т. Кравченко, З.М. Волкова и др. // Анаэробные инфекции: труды межинститутской конференции. – М.,1960. – Т. 9. – С. 293–306.

34. *Воробьев, А.А.* Изучение ботулиновых анатоксинов. Сообщение IV. Ботулиновый анатоксин типа Д / А.А. Воробьев, Н.Н. Васильев, В.М. Шевелев // Журн. микробиол. – 1963. – № 9. – С. 87–92.

35. *Корнев, И.С.* Немясные питательные среды для изготовления ботулиновых анатоксинов А и В / И.С. Корнев, В.М. Еничев, А.А. Мордуева и др. // Вакцины и сыворотки: мат-лы по производству. – 1963. – Вып. 1. – С. 3–11.

36. *Булатова, Т.И.* Получение ботулинических токсинов и анатоксинов типов А, В, С, Е на казеиновогрибной среде / Т.И. Булатова, И.Н. Виноградова // Вакцины и сыворотки: мат-лы по производству. – М., 1965. – Вып. 5. – С. 185–188.

37. *Ненашев, В.П.* Изучение пептидного состава гидролизатов казеина, используемых для получения токсинов анаэробных микроорганизмов / В.П. Ненашев, В.Д. Артеменко, Т.Н. Баранова и др. // Научные основы вакцинно-сывороточного производства: мат-лы конференции, посвященной 60-летию Ташкентского НИИВС. – Ташкент, 1968. – С. 164–165.

38. *Burrows, W.* Growth of Clostridium botulinum on synthetic mediums // J. Infect. Dis. 1933. – V. 52. – P. 126–137.

39. *Elberg, S.S.* The nutritional reguirements of Clostridium parabotulinum A. / S.S. Elberg, K.F. Meyer // J. Bacteriol. – 1939. – V.37. – № 4. – P. 429–445.

40. *Clifton, C.E.* The utilization of amino acids and of glucose by Clostridium botulinum // J. Bacteriol. 1940. – V. 39. – P. 485–497.

41. *Roessler, W.C.* Nutritional studies with Clostridium botulinum toxin types A and B / W.C. Roessler, C.R. Brewer // J. Bacteriol. – 1946. – V. 51. – P. 571–572.

42. *Mager, J.* Nutritional studies with Clostridium parabotulinum type A / J. Mager, S.H. Kindler, N. Grossowicz // J. Gen. Microbiol. – 1954. – №. 10. – P.134.

43. *Савин, В.Р.* Влияние некоторых аминокислот на рост, токсинообразование возбудителей ботулизма типов А, В, С, Е и их токсины // Журн. микробиол. – 1966. – № 7. – С. 66–69.

44. *Lewis, K.H.* Practical media and control measures for producing highly toxic cultures of Clostridium botulinum type A / K.H. Lewis, E.V. Hill // J.Bacteriol. – 1947. – V.53. – № 2. –P. 213–230.

45. *Nigg, C.* Studies on botulinum toxoid, types A, and B. 1.Production of alum precipitated toxoides / C. Nigg, G.A.Hottle, L.L.Coriell et al. // J. Immunol. – 1947. – V.55. – № 3. – P. 245–254.

46. *Rice, C.E.* Clostridium botulinum type A toxoids / C.E. Rice, E.F. Pallister, L.C. Smith et al. // Canad. J. Res.Sect. E. – 1947. – V.25. – № 4. – P. 167–174.

47. *Mueller, J.H.* Variable factors influencing production of tetanus toxin / J.H. Mueller, P.A. Miller // J. Bact. – 1954. – V. 67. – № 3. – P. 271–277.

48. *Виноградова, И.Н.* Производственные питательные среды // Руководство по микробиологии, клинике и эпидемиологии инфекционных болезней. – М., 1962. – Т.1. – С. 339–375.

49. *Булатова, Т.И.* Получение ботулинического анатоксина типа F и изучение его иммуногенных свойств / Т.И. Булатова, Е.В. Перова, В.А. Благовещенский и др. // Научные основы производства бактерийных и вирусных препаратов. – Уфа,1969. – С. 29–31.

50. *Воробьев, А.А.* Изучение ботулинических анатоксинов. Сообщение 1. Ботулиновый анатоксин типа А / А.А. Воробьев, Н.Н. Васильев, Т.Г. Патрикеев и др. // Журн. микробиол. – 1961. – № 9. – С. 31–36.

51. *Воробьев, А.А.* Изучение ботулинических анатоксинов. Сообщение 11. Ботулиновый анатоксин типа В / А.А. Воробьев, Н.Н. Васильев, В.М. Еничев и др. // Журн. микробиол. – 1961. – № 10. – С. 68–71.

52. *Иванова, Л.Г.* Сухая среда для диагностики пищевых отравлений, вызванных клостридиями ботулинум и клостридиями перфрингенс / Л.Г. Иванова, Т.И. Сергеева, Н.В. Плоскирев и др. // Лабораторное дело. – 1962. – № 4. – С. 33–36.

53. *Burrows, W.* Growth of Clostridium botulinum on casein hydrolisate and Hydrolisate preparations // J. Infect. Dis. – 1932. –V. 51. – P. 298–308.

54. *Козлов, Ю.А.* Питательные среды в медицинской микробиологии. – М.: Медицина, 1950. – 252с.

55. *Виноградова, И.Н.* Использование пищевого кислотного казеина в производстве питательных сред при приготовлении бактерийных препаратов / И.Н. Виноградова, Ф.Ф. Цуриков, Л.А. Третьякова и др. // Материалы по обмену опытом Минздрава ССР, Главного управления институтов вакцин и сывороток. – 1957. – Т. 453. – С. 54–64.

56. *Виноградова, И.Н.* Казеиново-растительные среды, методика их изготовления и применение в производстве анаэробных и аэробных токсино – анатоксинов возбудителей раневых инфекций / И.Н. Виноградова, В.А. Петренко, Ф.Ф. Цуриков и др. // Материалы по обмену опытом Минздрава ССР, Главного управления институтов вакцин и сывороток. – 1958. – Т. 453. – С. 32–47.

57. *Виноградова, И.Н.* Получение нейротоксина и гемагглютинина клостридий ботулинум типа А и характеристика нейротоксина / И.Н. Виноградова, Р.Н. Уварова, К.К. Иванов и др. // Биохимия. – 1983. – Т. 48, вып. 5. – С. 788–796.

58. *Labarre, G.* Etude des gas degages par Cl. edematiens cultive on millen an thioglycolate de sodium sous vide / G. Labarre, J. Bery // Ann. Inst. Pasteur. – 1969. – V. 117. – № 2. – P. 222.

59. *Полещук, Л.Н.* Влияние дополнительного введения пантотеновой кислоты и биотина на токсинообразование возбудителя типа А // В кн.: Биологические препараты и иммунологическая реактивность организма. – Томск, 1975. – Вып. 6. – С. 72–73.

60. *Полещук, Л.Н.* Биологические параллели между токсинообразованием клостридий ботулизма, содержанием кобальта и цианкобаламина / Л.Н. Полещук, Н.Б. Альбицкая // Биологические препараты и иммунологическая реактивность организма. –Томск, 1975. – Вып. 6. – С. 70–71.

61. *Полещук, Л.Н.* Стандартизация питательных сред при производстве ботулинических антигенов типов А и В по содержанию некоторых ростовых факторов. // Научные основы производства вирусологических и бактерийных препаратов. – Томск, 1977. – С. 228–231.

62. *Прегер, С.М.* Характеристика токсинообразования клостридий ботулизма типов А и В на обогащенных ростовыми факторами мясных питательных средах / С.М. Прегер, Л.Н. Полещук, Н.Б. Альбицкая // Вакцины и сыворотки. – М., 1974. – Вып. 22. – С. 86–88.

63. *Прегер, С.М.* Уровень биотина и пантотеновой кислоты в сфере культивирования при токсинообразовании возбудителя ботулизма типа В // Вакцины и сыворотки. – М.,1974. – Вып. 23. – С. 109–114.

64. *Прегер, С.М.* Норма содержания железа, меди и кобальта в питательных средах, используемых для получения антигенов ботулизма типов А и В / С.М. Прегер, Н.Б. Альбицкая, Л.Н. Полещук // Вакцины и сыворотки. – М., 1974. – Вып. 23. – С. 114–120.

65. *Альбицкая, Н.Б.* Динамика микроэлементов железа, меди и кобальта при токсинообразовании возбудителя ботулизма типов А и В / Н.Б. Альбицкая, С.М. Прегер, Л.Н. Полещук // Биологические препараты и иммунологическая реактивность организма: мат-лы XIII итоговой научной конференции Томского НИИВС. – Томск, 1972. – С. 67–70.

66. *Альбицкая, Н.Б.* Содержание меди и железа в микробных клетках при культивировании клостридий ботулизма типа В // Там же. – С. 71–73.

67. *Кушнир, Е.Д.* Влияние глюкозы, хлористого натрия и концентрации Н-ионов на рост и токсинообразование клостридий ботулинум Е // Труды Омского института эпидемиологии и микробиологии – Омск, 1952. – Т.1. – С. 1757–1800.

68. *Перова, Е.В.* Получение ботулинических токсинов и анатоксинов типа F и изучение их антигенных и иммуногенных свойств: автореф. дис. … канд. мед.наук. – М., 1970. – 20 с.

69. *Prevot, A.R.* Recherches sur la toxide l›anatoxine et l›antitoxine botulique D / A.R. Prevot, S.R. Brygoo // Ann. Inst. Pasteur – 1950. – V. 79. – № 1. – P. 1–13.

70. *Barron, A.B.* Clostridium botulinum type E toxin and toxoid / A.B. Barron, G.B. Reed // Canad. J. Microbiol. – 1954. –V.1. – № 2. – P. 108–117.

71. *Rymkiewicz, D.* Badania had Clostridium botulinum typ F. II. Otrzymanie wysoce antiwnej toksyny I jej wlasciwoaci // Med. dosw. i microbiol. – 1968. – T. 20. – № 3. – S. 281–287.

72. *Синельников, Г.Е.* Зависимость активности токсинов ботулинум А от выбора штамма и условий культивирования / Г.Е. Синельников, С.М. Прегер // Токсины и анатоксины. – М., 1977. – С. 33–41.

73. *Синельников, Г.Е.* Иммуноглобулины для лечения и профилактики ботулизма: автореф. дис. … д-ра биол. наук. – М., 1984. – 39 с.

74. *Bonvontre, P.F.* Physiology of toxin production by Clostridium botulinum types A and B. IV. Activation of the toxin / P.F. Bonvontre, L.L. Rempe // J. Bacteriol. – 1960. – V.79. – № 1. – P. 24–32.

75. *Townsend, S.T.* Inhibition of the growth of Clostridium botulinum by acidification / S.T. Townsend, L.Yee, W.A. Mercer // Food Research. – 1954. – V.19. – P. 536.

76. *Михайлова, И.М.* Возбудитель ботулизма типа F. Сообщение III. Изменение питательной среды в процессе выращивания ботулинического микроба типа F. / И.М. Михайлова, В.К. Голшмид // Вакцины и сыворотки. Материалы по производству. – М., 1966. – Вып. 6. – С.139–143.

77. *Winne E.S.* Germination of Clostridium spores in buffered glucose / E.S. Winne, D.A. Mehl, W.R. Schmieding // J. Bacteriol. – 1954. – V. 67. – P. 435–437.

78. *Cardiella, M.A.* Studies on immunity to toxine of Clostridium botulinum. IV. Production and purification of type C toxin for conversion to toxoid / M.A. Cardiella, J.T. Puff, J. Gottfried et al. // J. Bacteriol. – 1958. – V. 75. – P. 360–365.

79. *Маркин, А.П.* Изучение ботулинических анатоксинов. Сообщение II. Ботулинический анатоксин типа С / А.П. Маркин, Е.П. Лукин, Е.К. Петрова и др. // Журн. микробиол. – 1961. – № 12. – С. 96–99.

80. *Cone, P.D.* Differentiation of Clostridium botulinum types F, D and E by pyrolysis-gas-liquid chromatography / P.D. Cone, R.V. Lechowich // Appl. Microbiol. – 1970. – V. 19. – № 1. – P. 483–497.

81. *Дашкин, Р.Г.* Обезвреживание ботулинического токсина типа Е, полученного на полурастительной среде // Научные основы производства бактерийных и вирусных препаратов: мат-лы Всесоюзной научной конференции. – Уфа,1969. – С. 37–38.

82. *Дашкин, Р.Г.* Получение очищенного анатоксина типа Е из кратковременно формализованной культуры / Р.Г. Дашкин, Е.Н. Воробьева // Тезисы докладов научной конференции по вопросам иммунологии инфекционных и аллергических заболеваний. – Уфа, 1970. – С. 13–15.

83. *Дашкин, Р.Г.* Двухэтапное обезвреживание ботулинического токсина типа Е, полученного на полурастительной среде // Вакцины и сыворотки. – М., 1973. – Вып. 16. – С. 207–211.

84. *Козлов, Ю.А.* Получение ботулинового анатоксина типа Д / Ю.А. Козлов, Б.А. Предтеченский, М.И. Дербин и др. // Журн. микробиол. – 1979. – № 4. – С. 56–60.

85. *Воробьев, А.А.* Основные итоги и перспективы исследований в области разработки и усовершенствования бактерийных анатоксинов // Специфическая профилактика инфекционных заболеваний: труды межинститутской научной конференции. – М.: Медицина, 1964. – С. 59–72.

86. *Сергеева, Т.И.* Токсигенные свойства штаммов клостридиум тетании, выделенных из внешней среды / Т.И. Сергеева, М.И. Орзуев // Журн. микробиол. – 1965. – № 1. – С. 112–114.

87. *Шаронов, Ю.А.* Получение ботулиновых токсинов типов А, В и Е / Ю.А. Шаронов, Р.А. Афанасьева // Материалы конференции Московского НИИВС им. И.И. Мечникова. – М., 1969. – С. 110–11.

88. *Brieger, L.* Beitrag gur Lehre der Fleischvergiftung / L. Brieger, W. Kempner // Dtsch. med. Wochenschr. – 1897. – Bd. 33. – S. 521–522.

89. *Shipe, P.T.* Studies on botulinus toxin.3. Acid precipitation botulinum toxin / P.T. Shipe, H. Sommer // J. Infect. Dis. – 1928. – V. 43. – P. 152–160.

90. *Lamanna, C.* Botulinum toxin (type A); including a study of shaking with chloroform as a step in the isolation procedure / C. Lamanna, H.S. Eklund, O.E. McElroy // J. Bacteriol. – 1946. –V.52. – № 1. – P. 1–13.

91. *Lamanna, C.* The purification and crystallization of Clostridium botulinum type A toxin / C. Lamanna, O.E. McElroy, H.S. Eklund // Science – 1946. – V. 103. – № 2681. – P. 613–614.

92. *Abrams, A.* The purification of toxin from Clostridium botulinum type A / A. Abrams, G. Kegeles, G.A. Yottle // J. Biol.Chem. – 1946. – V. 164. – № 1. – P. 63–75.

93. *Lamanna, C.* The isolation of type B botulism toxin /C. Lamanna, H.N. Glasman // J. Bacteriol. – 1947. – V. 54. – № 4. – P. 575–584.

94. *Duff, J.T.* Studies on immunity to toxine of Clostridium botulinum. I. A simplified procedure for isolation of type A toxin / J.T. Duff, G.G. Wright, J. Klerer et al. // J. Bacteriol. – 1957. – V.73. – № 1. – P. 42–47.

95. *Горфункель, Д.М.* Получение очищенного ботулинического анатоксина типа В и изучение его антигенных и иммуногенных свойств / Д.М. Горфункель, Н.Я. Денисова, Ф.М. Кац и др. // Анаэробные инфекции: тезисы докладов межинститутской научной конференции по проблеме. – М., 1956. – С. 44–45.

96. *Горфункель, Д.М.* Получение очищенного и концентрированного ботулинового анатоксина типа В и изучение его антигенных и иммуногенных свойств / Д.М. Горфункель, Н.Я. Денисова, Ф.М. Кац и др. // Анаэробные инфекции: труды межинститутской конференции. – М., 1960. – Т. 9. – С. 132–140.

97. *Brygoo, E.* Essai de purification de la toxine botulique / D. Diplome studies superieures. – Paris: Fac. Sc., 1953. – P. 36.

98. *Raynaud, M.* Purification de la toxine botulinique C. / Raynaud, M., A.R. Prevot, J. Brygoo et al. // VI. Congr. Intern. Microbiol. Rome. – 1953. – V. VIII–XVI. – P. 591–592.

99. *Turpin, A.* Concentration de diverses toxines et anatoxines par l›acide metaphosphorique / A. Turpin, M. Raynaud, E.H. Relyveld // Ann. Inst. Pasteur. – 1954. – V. 87. – №. 1. – P. 25–37.

100. *Денчев, В.* Получение полианатоксина для специфической профилактики ботулизма. I. Разработка методов концентрации и очистки ботулинических анатоксинов типов А и В. / В. Денчев, М. Огнянова, Е. Райчева и др. // Труды НИИЭМ. – София, 1968. – Т.13. – С. 137–142.

101. *Ройтман, М.И.* Сравнительная оценка методов получения очищенных ботулинических анатоксинов типа С. // Тезисы докладов научной конференции по вопросам иммунологии инфекционных и аллергических заболеваний. – Уфа, 970. – С. 15–16.

102. *Gerving, J.* Isolation and characterization of a toxic moiety of low molecular weight from Clostridium botulinum type A / J. Gerving, C.E. Dolman, H.S. Bains // J. Bacteriol. – 1965. – V. 89. – P. 1383–1386.

103. *Gerving, J.* Purification and characterization of Clostridium botulinum type B toxin / J. Gerving, C.E. Dolman, D.V. Kason et al. // J. Bacteriol. – 1966.–V.91. – № 2. – P. 484–486.

105. *Schantz, E.J.* The reaction of botulinum toxin type A with ketene / E.J. Schantz, L. Spero. // J. Amer. Chem. Soc. – 1957. – V. 79. – P. 1623–1625.

106. *Фрейман, В.Б.* Изучение ботулинических токсинов и анатоксинов методом фильтрации через гель. Сообщение I. Исследование ботулинических токсинов и анатоксинов типов А и С фильтрацией через сефадекс G – 100 / В.Б. Фрейман, В.К. Голшмид // Журн. микробиол. – 1966. – № 5. – С. 52–58.

107. *Фрейман, В.Б.* Исследование ботулинических токсинов и анатоксинов методом фильтрации через гель. Сообщение II. Разделение нативных ботулинических токсинов типа А фильтрацией через гель сефадекса G – 200 / В.Б. Фрейман, В.К. Голшмид, И.М. Михайлова // Журн. микробиол. – 1967. – № 8. – С. 106–109.

108. *Фрейман, В.Б.* Исследование ботулинических токсинов и анатоксинов методом фильтрации через гель. Сообщение III. Разделение нативных ботулинических токсинов типов В и С через гель сефадекса G – 200 / В.Б. Фрейман, В.К. Голшмид, И.М. Михайлова и др. // Журн. микробиол. – 1967. – № 11. – С. 139–142.

109. *Голшмид, В.К.* Исследование ботулинического токсина типа А при помощи фильтрации через гель сефадекса / В.К.Голшмид, И.М. Михайлова // Журн. микробиол. – 1967. – № 1. – С. 46–49.

110. *Голшмид, В.К.* Изучение иммунохимических и биологических особенностей ботулинических анатоксинов типа А / В.К. Голшмид, В.И. Драченков, Ф.Ф. Резепов и др. // Журн. микробиол. – 1970. – № 8. – С. 44–49.

111. *DasCupta, B.R.* Chromatographic fractionation of the crystalline toxin of Clostridium botulinum type A / B.R. DasCupta, L.A. Boroff, E. Rothstein // Biochem. and Biophys. Res. Communs. – 1966. – V.22. – № 6. – P. 750–756.

112. *DasCupta, B.R.* Isolation of chromagraphically pare toxin Clostridium botulinum type B / B.R. DasCupta, L.A. Boroff, R. Cheong // Biochem. and Biophys. Res. Communs. – 1968. – V.32. – № 6. – P. 1057–1063.

113. *DasCupta, B.R.* Purification of Clostridium botulinum type A toxin / B.R. DasCupta, L.J. Berry, L.A. Boroff // Biochem. et biophys. acta. – 1970. – V. 214. – P. 343–349.

114. *Beers, W.H.* Isolation and characterization of Clostridium botulinum type B toxin / W.H. Beers, E. Reich // J. Biol. Chem. – 1969. – V. 244. – P. 4473–4479.

115. *Sugii, S.* Molecular construction of Clostridium botulinum type A toxins / S. Sugii, G. Saltaguchi // Infect. and Immun. – 1975. – V.12. – P. 1262–1270.

116. *Kitamura, M.* Purification and some properties of Clostridium botulinum type E toxin / M. Kitamura, S. Sakaguchi, G. Sakaguchi // Biochem. et biophys. acta. – 1968. – V. 168. – P. 207–217.

117. *Kozaki, S.* Purification and some properties of progenitor toxins of Clostridium botulinum type B / S. Kozaki, S.Sakaguchi, G.Sakaguchi // Infect. and Immun. – 1974. – V. 10. – P. 750–756.

118. *Miuazaki, S.* Comparison of profeniter toxines of nonproteolytic with those of proteolytic Clostridium botulinum type B. / S. Miuazaki, S. Kozaki, S. Sakaguchi // Infect. and Immun. – 1976. – V. 13. – P. 987–989.

119. *Михайлова, И.М.* Клостридий ботулинум типа F. Сообщение II. Биохимические свойства. Изучение токсино- и анатоксинообразование // Журн. микробиол. – 1965. – № 10. – С. 39–43.

120. *Михайлова, И.М.* Клостридий ботулинум типа F. Получение и свойства токсина, анатоксина и антитоксина: автореф. дисс. … канд. мед. наук. – М.,1966. – 16 с.

121. *Царапкин, В.П.* Изготовление очищенного сорбированного ботулинического анатоксина типа F. Сообщение II. Активность нативных токсинов и анатоксинов // Журн. микробиол. – 1971. – №. 11. – С. 105–107.

122. *Царапкин, В.П.* Очищенный сорбированный ботулинический анатоксин типа F: дисс. … канд. биол. наук. – Уфа, 1972. – 212 с.

123. *Благовещенский, В.А.* Получение и иммуно-химическое исследование токсического комплекса клостридий ботулинум типа F / В.А. Благовещенский, А.А. Никитина, Н.В. Хатунцев и др. // Журн. микробиол. – 1979. – № 12. – С. 28–32.

124. *Васильев, Н.Н.* О механизма обезвреживания формальдегидом бактерийных токсинов // Специфическая профилактика инфекционных заболеваний: труды межинститутской научной конференции. – М.: Медицина, 1964. – С. 162–171.

125. *Магазов, Р.Ш.* Разработка сорбированного оптимально сбалансированного секстаанатоксина для профилактики анаэробных инфекций: дисс. … д-ра мед. наук. –Уфа, 1986. – 250 с.

126. *Мельников, В.Н.* Изготовление комплексного препарата и входящих в него адсорбированных ботулинических анатоксинов и перспективы дальнейшего их совершенствования // Научные основы производства бактерийных и вирусных препаратов: мат-лы всесоюзной научной конференции. – Уфа, 1969. – С. 15–17.

127. *Воронцов, И.В.* Отработка условий получения сухих стабильных безвредных и стерильных ботулинических анатоксинов типов А и В. / И.В. Воронцов, В.Н. Мельников, М.К. Северцева и др. // Там же. – С. 17–20.

128. *Александров, Н.И.* Изучение условий заключительного этапа формольной детоксикации первичных концентратов частично обезвреженных ботулинических токсинов типов А и В / Н.И. Александров, В.Н. Мельников, И.В. Воронцов и др. // Там же. – С. 20–23.

129. *Воробьева, Е.Н.* Оценка некоторых методов концентрации и очистки ботулинических токсинов типов А и В // Там же. – С. 31–33.

130. *Воробьева, Е.Н.* Оценка некоторых методов концентрации и очистки ботулинического токсина типа Е. // Там же. – С. 33–35.

131. *Воробьева, Е.Н.* Исследования по очистке ботулинических токсинов типов А, В и Е: дис. … канд. биол. наук. – Уфа, 1976. – 168 с.

132. *Углева, А.И.* Изучение иммунологической эффективности очищенного сорбированного тетраанатоксина против раневых инфекций / А.И. Углева, И.М. Хаустова, В.О. Рождественская // Ассоциированная вакцинация. – М., 1959. – С. 145–151.

133. *Воробьев, А.А.* Реактогенность и иммуногенность очищенного сорбированного ботулинового пентаанатоксина при иммунизации людей // А.А. Воробьев, А.П. Лабинский, А.М. Коробов и др. // Специфическая профилактика инфекционных заболеваний: труды межинститутской научной конференции. – М.: Медицина, 1964. – С. 138–143.

134. *Воробьев, А.А.* Адъюванты / А.А. Воробьев, Н.И. Васильев. – М.: Медицина, 1969. – 231 с.

135. *Измайлова, М.К.* Технология приготовления суспензии гидрата окиси алюминия // Вакцины и сыворотки. – М., 1965. – Вып. 4. – С.191–193.

136. *Мачульская, К.В.* Приготовление гидроокиси алюминия для производства адсорбированных прививочных препаратов / К.В. Мачульская, Н.Н. Васильев // Химические ассоциированные вакцины. – М., 1975. – С. 157–162.

137. *Трухманов, Б.Г.* Ассоциированные вакцины. – М.: Медицина, 1964. – 275 с.

138. *Мельников, В.Н.* Основы профилактики анаэробных инфекций / В.Н. Мельников, Н.И. Мельников, У.С. Еникеева. – Уфа, 1971. – 191 с.

139. *Мельников, В.Н.* Совершенствование химической сорбированной брюшнотифозной вакцины с секстанатоксином / В.Н. Мельников, Ю.А. Шаронов, Р.А. Афанасьева // Вопросы прикладной иммунологии. – Уфа, 1978. – С. 6–7.

140. *Василенко, А.Ж.* Совместимость вакцин при комплексной и ассоциированной иммунизации /А.Ж. Василенко, М.А. Мисникова, А.П. Савельев и др. // под ред. К.Г. Гапочко и Р.Ш. Магазова. – Уфа: Гилем, 1996. – 405 с.

141. *Попов, В.Р.* Возможные пути совершенствования вакцинных препаратов против инфекционных болезней / В.Р. Попов, Н.К. Кекчеева // Вопросы противоэпидемической защиты населения. – М., 1979. – Вып. 29. – С. 222–227.

142. *Weinberg, M.* De l ‹anatoxine botulinique / M. Weinberg, P. Goy // Compt. Rend. Soc. Biol. – 1924. – V. 91. – P. 148.

143. *Великанов, И.М.* Ботулизм // Журн. микробиол. – 1934. – Т.12. – Вып. 2. – С. 211–231.

144. *Hottle, G.A.* Studies on botulinum toxoids, types A and B. II. Methode for determining Antigenicity in animals. / G.A. Hottle, C. Higg, J.A. Lichty // J. Immunol. – 1947. – V.5. – № 3. – P. 255–262.

145. *Harrel, W.K.* Preparation evalution and use of Cl. Botulinum antitoxine / W.K. Harrel, J.H. Green, J.F. Winn // In. «Botulinum», Proc. Gympos. Publ. Health. – Cincinati, 1964. – P. 165–174.

146. *Reames, H.R.* Studies on botulinum toxoids, types A and B. III. Immunization of man / H.R. Reames, R.D. Housewright, J.B. Wilson et al. // J. Immunol. – 1947. – V. 55. – № 4. – P. 167–174.

147. *Fiock, M.A.* Studies on immunity to toxins of Clostridium botulinum. VIII. Immunological response of man to purified bivalent A, B botulinum toxoid / M.A. Fiock, B.F. Define, E.F. Gearinger et al. // J. Immunol. – 1962. – V. 88. – № 3. – P. 277–283.

148. *Adams, M.N.* Antigenicity of gas gangrene toxoid in guinea piga, mice and human being // J. Immunol. – 1947. – V.56. – №1 – P. 323–325.

149. *Fiock, M.A.* Studies on immunity to toxins of Clostridium botulinum. IX. Immunologic response of man to purified pentavalent A, B, C, D, E botulinum toxoid / M.A. Fiock, M.A. Gardella, N.F.Gearinger // J. Immunol. – 1963. – V.90. – №5. – P. 697–702.

150. *Рогозин, И.И.* Ассоциированная иммунизация и экстренная профилактика / И.И. Рогозин, В.Д. Беляков. – М: Медицина, 1968.– 248 с.

151. *Агафонов, В.И.* Комплексная и ассоциированная иммунизация массовыми методами / В.И. Агафонов, Т.И. Булатова, Х.П. Гамлешко и др. – Алма-Ата: Наука, 1983. – 164 с.

152. *Воробьев, А.А.* Изучение ботулиновых анатоксинов. Сообщение V. Ботулиновый трианатоксин типов А, В и С / А.А. Воробьев, А.В. Лабинский // Журн. микробиол. – 1961. – № 5. – С. 91–95.

153. *Выгодчиков, Г.В.* Экспериментальное изучение иммуногенных свойств ассоциированных анаэробных анатоксинов. Сообщение V. Иммуногенные свойства комбинированного полианатоксина при первичной иммунизации животных / Г.В. Выгодчиков, А.А. Воробьев, И.А. Ларина // Журн. микробиол. – 1963. – № 10. – С. 51–57.

154. *Воробьев, А.А.* Изучение реактогенности ботулиновых анатоксинов типов А, В, С, D и Е / А.А. Воробьев, Е.П. Лукин, В.М. Еничев и др. // Вакцина и сыворотки: материалы по производству. – М., 1963. – Вып. 1. – С. 40–47.

155. *Пономарев, А.В.* Иммунологическая характеристика трианатоксина / А.В. Пономарев, В.А. Брызгалов // Анаэробные инфекции. – М., 1960. – С. 20–27.

156. *Акатов, А.К.* К вопросу о закономерностях комплексной иммунизации очищенными сорбированными анатоксинами эдематиенс и столбнячным // Журн. микробиол. – 1960. – № 8. – С. 81–87.

157. *Выгодчиков, Г.В.* Основы построения ассоциированной вакцинации против анаэробных и кишечных инфекций / Г.В. Выгодчиков, А.А. Воробьев, Р.А. Салтыков // Журн. микробиол. – 1963. – № 3. – С. 9–14.

158. *Выгодчиков, Г.В.* Экспериментальное изучение иммуногенных свойств ассоциированных анатоксинов. Сообщение 2. Изучение иммунологической эффективности октаанатоксина при отдаленной реиммунизации / Г.В. Выгодчиков, А.А. Воробьев, Р.А. Салтыков и др. // Журн. микробиол. – 1961. – № 7. – С.74–77.

159. *Выгодчиков, Г.В.* Экспериментальное изучение иммуногенных свойств ассоциированных анатоксинов. Сообщение 3. Изучение иммунологической эффективности октаанатоксина при первичной иммунизации

животных / Г.В. Выгодчиков, И.А. Ларина, А.А. Воробьев и др. // Журн. микрбиол. – 1962. – № 8. – С. 79–83.

160. *Выгодчиков, Г.В.* Экспериментальное изучение иммуногенных свойств ассоциированных анатоксинов. Сообщение 4. Изучение иммунологической эффективности октаанатоксина при отдаленной ревакцинации / Г. В. Выгодчиков, А.А. Воробьев, Р.А. Салтыков // Журн. микробиол. – 1963. – № 1. – С. 127–132.

161. *Зелевинская, С.А.* Изучение иммунологической эффективности комплексной иммунизации против газовой гангрены, столбняка и ботулизма в опытах на обезьянах / С.А. Зелевинская, Т.И. Булатова, И.А. Ларина // Бюллетень экспер. биол. и мед. – 1962. – № 6. – С. 59–62.

162. *Александров, Н.И.* Активная специфическая профилактика инфекционных заболеваний и пути ее усовершенствования / Н.И. Александров, Н.Е. Гефен. – М.: Медицина, 1962. – 392 с.

163. *Гапочко, К.Г.* Токсические и аллергические свойства некоторых ассоциированных вакцин / К.Г. Гапочко, Т.А. Салтыкова, Л.М. Струкова // Журн. микробиол. – 1977. – № 11. – С. 61–63.

164. *Воробьев, А.А.* Анализ некоторых клинических, морфологических и биохимических реакций при вакцинации с позиций нормы и патологии / А.А. Воробьев, А.С. Пригода // Журн. микробиол. – 1976. – № 12. – С. 10–15.

165. *Агафонов, В.И.* Массовая комплексная иммунизация и ее влияние на трудоспособность / В.И. Агафонов, К.Г. Гапочко, И.Д. Кудрин и др. – Алма-Ата: Наука, 1979. – 168 с .

166. *Выгодчиков, Г.В.* Комбинированные препараты для активной иммунизации против анаэробных инфекций / Г.В. Выгодчиков, С.А. Зелевинская, З.М. Волкова и др. // Анаэробные инфекции: труды межинститутской конференции. – М., 1960. – Т.9. – С. 3–13.

ГЛАВА 3

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ КЛОСТРИДИАЛЬНЫХ АНАТОКСИНОВ

3.1. Доклиническое изучение полианатоксинсодержащих иммунобиологических лекарственных препаратов

Как уже было отмечено, в XX в. произошло бурное развитие вакцинологии в области разработки средств иммунопрофилактики клостридиальных инфекций. Особенно интенсивно решалась проблема профилактики анаэробных инфекций и, в первую очередь, ботулизма. Однако из всех перспективных научных разработок лишь единичные вакцинные препараты были внедрены в практику здравоохранения. Это касается, в первую очередь, брюшнотифозной вакцины с секстаанатоксином (БТС).

Объяснить этот факт можно тем, что действующий в то время порядок внедрения в практику медицинских лекарственных препаратов, средств и методов вакцинопрофилактики был достаточно строг. Он требовал от авторов многочисленных сложных и абсолютно достоверных данных, полученных на этапах доклинических и клинических исследований, а также во время производства и хранения препаратов.

3.1.1. Экспериментальная оценка иммунологической эффективности брюшнотифозной вакцины с секстаанатоксином

Принятие в противоэпидемическую практику химической брюшнотифозной вакцины с очищенным сорбированным секстаанатоксином положило начало созданию поливакцины против брюшного тифа, ботулизма и раневых инфекций. Серийный выпуск

ее был начат в 1969 г. в Уфимском НИИВС им. И.И. Мечникова Министерства здравоохранения СССР. Препарат состоял из 7 компонентов для профилактики брюшного тифа, ботулизма (А, В, Е), столбняка и газовой гангрены (перфрингенс и эдематиенс). Действующим началом вакцины являлись комплексный О- и Ви-антигены брюшнотифозных бактерий и очищенные концентрированные анатоксины клостридий ботулизма типов А, В, Е, столбняка и газовой гангрены (перфрингенс и эдематиенс), сорбированные на гидроокиси алюминия и консервированные мертиолятом. Это был первый ассоциированный препарат против анаэробных инфекций, сочетающийся с брюшнотифозным компонентом. Он послужил основой для дальнейшего развития направления ассоциированной и комплексной иммунизации против клостридиозов, являющегося единственно надежным средством в борьбе с анаэробными пищевыми интоксикациями и раневыми инфекциями.

При иммунизации экспериментальных животных шприцевым методом использовался коммерческий препарат производства Уфимского НИИВС им. И.И. Мечникова. В 1 мл БТС содержалось 0,2 мг химического брюшнотифозного антигена, по 10 ЕС анатоксинов эдематиенс и столбнячного, по 30 ЕС ботулинического анатоксина А и анатоксина перфрингенс, по 6 ЕС ботулинических анатоксинов типов В и Е. Схема иммунизации включала две прививки с интервалом в 45 сут и отдаленную ревакцинацию через 9 мес.

В опытах на животных была доказана переносимость, безвредность и удовлетворительная иммунологическая эффективность БТС. Регистрировалась повышенная реактогенность, особенно при первичной иммунизации. В специальных исследованиях токсических и аллергических свойств вакцины было отмечено, что ботулинические, столбнячный и гангренозные токсины, обезвреженные формалином и превращенные в анатоксины, практически утрачивают токсические свойства и при первичной вакцинации не вызывают частых и сильных общих поствакцинальных реакций [1]. Между тем брюшнотифозный антиген является эндотоксином брюшнотифозной палочки и отличается выраженными токсическими свойствами.

Изучение иммунологической эффективности БТС показало, что защитного уровня достигали только антитоксины ботулизма типов А, В, Е, столбняка и эдематиенс. В то же время у морских свинок не удалось обнаружить антител к брюшнотифозному микробу

даже после трехкратной иммунизации. Кроме того, в эти сроки титры антитоксинов перфрингенс не достигали защитного уровня.

Уже первые комиссионные испытания БТС на людях выявили ее существенный недостаток – высокая реактогенность. При массовой иммунизации людей шприцевым методом общие температурные реакции были зарегистрированы у 47% привитых. При этом сумма средних и сильных температурных реакций (свыше 37,6 °С) достигала 18 % случаев. Количество средних и сильных местных реакций (инфильтраты, диаметром свыше 2,5 см) достигало 88%. У 4–12% вакцинированных наблюдалась потеря или снижение трудоспособности.

Высокая реактогенность прививок БТС, в том числе и при комплексной (ассоциированной) иммунизации, а также неудовлетворительная иммунологическая эффективность брюшнотифозного и перфрингенс компонентов послужили основанием для проведения последующей модернизации вакцины.

Нужно подчеркнуть, что к «заслугам» БТС можно отнести то обстоятельство, что она послужила основой для обоснования и разработки безыгольного метода иммунизации сорбированными ассоциированными вакцинными препаратами. Безыгольные инъекторы характеризуются чрезвычайно высокой производительностью (до 1000 чел./ч). При этом существенно экономится время на проведение прививок, существенно снижаются материальные затраты на иммунизацию и уменьшается занятость медицинского персонала. Важная заслуга в решении этой проблемы принадлежит В.И. Агафонову, Т.И. Булатовой, А.А. Воробьеву, К.Г. Гапочко, В.А. Лебединскому и др. [2, 3, 4, 5].

Установление факта, что брюшнотифозный антиген определяет выраженную реактогенность ассоциированного препарата и обладает слабой иммунологической эффективностью, послужило основанием для пересмотра теории конструирования полианатоксинов. Дело в том, что при создании жидкой БТС имелось в виду, что брюшнотифозный антиген, являясь неотъемлемой частью препарата, будет служить адъювантом, стимулирующим иммуногенность остальных анатоксинов. Но поскольку полианатоксины обладают высокой иммунологической и протективной активностью и без брюшнотифозного антигена, включение его в состав вакцины оказалось неоправданным. Кроме того, схема профилактического

применения жидкой химической сорбированной брюшнотифозной вакциной не требует той кратности прививок, которые предусмотрены схемой введения жидкой брюшнотифозной вакцины с секстаанатоксином.

Важно подчеркнуть, что все жидкие вакцинные препараты имеют ряд существенных недостатков:

– срок годности их ограничивается двумя-тремя годами;

– при хранении и транспортировке необходимо соблюдение определенных условий;

– наличие в составе препарата консерванта (мертиолята) ограничивает его использование в ассоциации с другими вакцинами.

Поэтому в 1971–1972 гг. в Уфимском НИИВС им. И.И. Мечникова была начата разработка технологии получения сухой вакцины БТС без консерванта. При этом был отработан режим высушивания вакцины, обеспечивающий сохранение иммуногенности всех ее компонентов. Проверка иммуногенности препарата в течение 4 лет показала отсутствие в ней негативных изменений [6, 7, 8].

В последующих разработках под руководством В.Н. Мельникова и Р.Ш. Магазова был изготовлен сухой сорбированный секстаанатоксин (С), предназначенный для введения с помощью безыгольного инъектора. Разработанная технология обеспечивала получение препарата с удовлетворительными физическими свойствами и иммуногенностью. Как показали наблюдения, проведенные в Уфимском НИИВС им. И.И. Мечникова, иммуногенность всех компонентов сухого сорбированного секстаанатоксина стабильно сохранялась в течение 5 лет.

Целесообразность включения брюшнотифозного антигена в состав секстаанатоксина была изучена при сравнительном испытании препаратов на людях [9].

Сравнительной оценке были подвергнуты 6 вариантов ИЛП: коммерческая жидкая брюшнотифозная вакцина, сухая сорбированная БТС, сухой сорбированный секстаанатоксин с обычной дозой всех компонентов без брюшнотифозного антигена, секстаанатоксин с дозой анатоксинов, увеличенной в 4 раза, и ботулинический трианатоксин, содержащий в прививочной дозе 15 ЕС анатоксина типа А и по 3 ЕС анатоксинов типов В и Е.

Через 12 ч после иммунизации наиболее сильные реакции были зарегистрированы у привитых препаратами, содержащими

брюшнотифозный антиген: общее количество температурных реакций отмечено у 70,8–91,1% привитых, средние и сильные реакции наблюдали у 41,6–60,4%, в том числе сильные – 6,5–10,0%. В то же время все испытанные препараты секстаанатоксина показали относительно невысокую реактогенность, которая была достоверно ниже, чем в группах привитых БТС. При этом при иммунологическом обследовании привитых не было установлено адъювантного действия брюшнотифозного антигена.

Эти обстоятельства послужили основанием для исключения из состава брюшнотифозной вакцины с секстаанатоксином компонента – химической брюшнотифозной вакцины.

Замена жидкой химической сорбированной брюшнотифозной вакцины с секстаанатоксином на сухой сорбированный секстаанатоксин позволила значительно сократить число ПВР и применять последний в качестве базового препарата при ассоциированной иммунизации. В то же время реактогенность этого препарата при ассоциированных прививках оставалась еще относительно высокой. Кроме того, при проверке иммунологической эффективности С в крови привитых выявлялась резкая разница в уровне антитоксинов к его компонентам. Особенно высокими были титры ботулинического антитоксина типа А (до 10 МЕ/мл), а также столбнячного и эдематиенс анатоксинов. В то же время титры антитоксина перфрингенс не достигали уровня медико-биологических требований. Все это обусловило проведение исследований, направленных на изменение прививочных доз некоторых компонентов с целью «облегчения» секстаанатоксина, преодоления антигенной перегрузки отдельных компонентов и угнетающего влияния сильных антигенов на слабые.

3.1.2. Экспериментальная оценка иммунологической эффективности сухого сорбированного секстаанатоксина

3.1.2.1. Теоретическое обоснование оптимизации компонентов сорбированного секстаанатоксина методом математической теории эксперимента

При конструировании ассоциированных препаратов для исключения отрицательного взаимодействия компонентов необходима их балансировка, которая, по мнению А.А. Воробьева, еще

не получила теоретического обоснования и осуществляется, как правило, эмпирически [10].

Между тем в последние годы для теоретического обоснования оптимизации состава сложных систем появились исследования по применению методов математической теории эксперимента (МТЭ), предназначенные для построения количественных моделей, описывающих комбинированное воздействие комплекса факторов, варьирующих в достаточно широких пределах, на реакции сложных объектов [11, 12, 13, 14].

В Уфимском НИИВС им. И.И. Мечникова на основании МТЭ совместно с Г.И. Разореновым был предложен способ составления многокомпонентных защитных рецептур.

Для исследователей медико-биологического профиля методы МТЭ особенно привлекательны: во-первых, они наиболее эффективны при работе со сложными системами (объектами), для которых не существуют жесткие количественные модели процессов, протекающих в них при многофакторных воздействиях; во-вторых, они не критичны к значительному индивидуальному разбросу характеристик исследуемых параметров; и, в-третьих, эти методы достаточно экономичны.

Для построения моделей требуется поставить сравнительно небольшое число опытов, варьируя от одного к другому одновременно всеми факторами по определенной схеме, обоснованной планом эксперимента.

Для построения моделей требуется поставить сравнительно небольшое число опытов, варьируя от одного к другому одновременно всеми факторами по определенной схеме, называемой планом эксперимента. При традиционных схемах экспериментирования в многофакторных ситуациях, как правило, ставится много лишних опытов, математическая обработка данных, полученных по интуитивным планам, в значительной степени затруднена, и практически всегда нет гарантии, что в результате обработки полученных данных будет получена наилучшая компоновка рецептуры.

Разработанная методика оптимизации состава многокомпонентной защитной рецептуры состоит из двух этапов. На первом этапе с использованием методов МТЭ строятся математические модели, описывающие влияние факторов-компонентов рецептуры

на показатели ее эффективности – отклики изучаемого объекта. В нашем случае факторы x_i, i = 1, 2, …, 6 – концентрация компонентов секстаанатоксина, изменяющаяся в пределах от нуля до одной эталонной дозы, т.е. $0 \le x_i \le 1$ (эталонная доза), i = 1, 2, …, 6; откликами y_m, m = 1, 2, …, 6 являются титры антитоксинов в крови экспериментальных животных, определяемые по окончании схемы иммунизации.

Методы МТЭ позволили на основе специальной обработки данных исследования, проведенного по плану МТЭ, получить математическое описание влияния компонентов вакцины x_i на каждый из откликов y_m в виде:

$$\begin{aligned} y_m = {} & b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_3x_3 + b_4x_4 + b_5x_5 + b_6x_6 + \\ & + b_{12}x_1x_2 + b_{13}x_1x_3 + b_{14}x_1x_4 + b_{15}x_1x_5 + b_{16}x_1x_6 + \\ & + b_{23}x_2x_3 + b_{24}x_2x_4 + b_{25}x_2x_5 + b_{26}x_2x_6 + \\ & + b_{34}x_3x_4 + b_{35}x_3x_5 + b_{36}x_3x_6 + \\ & + b_{45}x_4x_5 + b_{46}x_4x_6 + b_{56}x_5x_6 + \\ & + b_{11}x_{12} + b_{22}x_{22} + b_{33}x_{32} + b_{44}x_{42} + b_{55}x_{52} + b_{66}x_{62} \end{aligned} \qquad (3.1)$$

Большим достоинством методов МТЭ является наличие критериального аппарата, позволяющего оценивать качество моделей, их адекватность исследуемому процессу, а также определять достоверность отличия коэффициентов моделей от величины отклика и исключить из моделей близкие к нулю члены.

Коэффициенты «b» модели характеризуют «направление» и «силу» влияния факторов x и их взаимодействия (произведений $x_i\ x_j$) на значения каждого из откликов «y_m»; чем больше абсолютная величина коэффициента, тем сильнее влияет фактор (или взаимодействие факторов). Знак «+» у коэффициента свидетельствует о том, что увеличение фактора приводит к увеличению отклика (титра антител). Знак «–» у коэффициента свидетельствует о том, что увеличение фактора приводит к уменьшению отклика.

Анализируя знаки и величины коэффициента, получили качественную картину взаимного влияния ингредиентов многокомпонентных защитных рецептур для каждого из откликов, т.е. взаимное влияние анатоксинов на иммунологическую эффективность друг друга.

На втором этапе производится собственно оптимизация состава рецептуры. В общем виде любой процесс оптимизации сводится к поиску такого набора значений факторов, при котором

критерий (или целевая функция) оптимизации достигает максимума. Однако улучшение одних показателей (например, защитной эффективности) может сопровождаться ухудшением других (например, показателей переносимости). Поэтому задача поиска наиболее эффективной рецептуры осложняется тем, что на показатели переносимости налагаются ограничения, т.е. требуется, чтобы эти показатели не превышали заданных пределов:

$$y_i \le y_{i\,max} \tag{3.2}$$

или

$$y_{i\,min} \le y_i \tag{3.3}$$

или же не выходили за пределы диапазона

$$y_{i\,min} \le y_i \le y_{i\,max} \tag{3.4}$$

Одним из примеров задачи оптимизации можно назвать следующий: найти набор значений факторов $x_i^{опт}$, при котором защитная эффективность будет максимальная, а один или несколько показателей переносимости будут удовлетворять ограничениям (3.2), т.е. ни один из показателей не перейдет заданной границы $y_{i\,max}$.

Для решения задачи оптимизации при ограничениях существует ряд математических методов, называемых методом математического программирования. Для нашего случая, когда целевая функция и ограничения – полиномы (3.1), задача решается методом нелинейного программирования.

Задачу оптимизации формулировали следующим образом.

Факторами эксперимента явились дозы x_i компонента секстаанатоксина: x_1 – доза ботулинического анатоксина типа А, x_2 – доза ботулинического анатоксина типа В, x_3 – доза ботулинического анатоксина типа Е, x_4 – доза столбнячного анатоксина, x_5 – доза гангренозного анатоксина эдематиенс, x_6 – доза гангренозного анатоксина перфрингенс.

Откликами являются титры $y_1 \div y_6$ соответствующих антитоксинов в крови морских свинок.

Известно, что факторы-компоненты секстаанатоксина поразному взаимодействуют, влияя на показатели $y_1 \div y_6$. Например, наиболее слабым является фактор x_6, титры антител для которого (y_6) желательно сделать как можно выше. Для этого пришлось уменьшить значения тех факторов, которые отрицательно влияют на y_6, увеличивать значения факторов, положительно влияющих

на y_6. Уменьшение факторов, однако, привело к уменьшению соответствующих титров антител, которые не должны стать меньше требуемых уровней, а увеличение других факторов могло привести к ухудшению переносимости. В этом – смысл процесса «балансировки» состава секстаанатоксина.

На языке оптимизации этот процесс формируется следующим образом: найти набор значений факторов-компонентов вакцины $x_1^{опт} – x_6^{опт}$, при которых титр антител y_6 максимален, а значения остальных откликов – титры антител $y_1–y_5$ не опускаются ниже допустимых значений $y_{i\,доп}$, определенных МБТ:

$$\begin{aligned} y_1 &\geq y_{1\,доп} = 0{,}75\ МЕ/мл \\ y_2 &\geq y_{2\,доп} = 0{,}20\ МЕ/мл \\ y_3 &\geq y_{3\,доп} = 0{,}50\ МЕ/мл \\ y_4 &\geq y_{4\,доп} = 2{,}50\ МЕ/мл \\ y_5 &\geq y_{5\,доп} = 0{,}75\ МЕ/мл \end{aligned} \qquad (3.5)$$

На свободу выбора значений факторов налагаются ограничения

$$0 \leq x_i \leq x_{i\,max},\ i = 1 \div 6, \qquad (3.6)$$

смысл, которых заключается в том, что дозы всех компонентов не могут быть отрицательными числами и не должны превышать некоторых заданных максимальных значений $x_{i\,max}$. В данном исследовании $x_{i\,max} = 1$ эталонной дозе; $i = 1 \div 6$.

В более общем случае при оптимизации состава сложных вакцинных препаратов представляется возможность установить верхние границы для показателей переносимости вакцин и допустимые границы для снижения показателей работоспособности.

В самом общем случае в список факторов, кроме доз компонентов, включаются другие показатели схемы вакцинации – кратность иммунизации, интервал времени между прививками и интервал времени от окончания схемы иммунизации до заражения. В качестве отклика берутся показатели защитной эффективности, значения титров антител, показатели реактогенности, а также показатели переносимости вакцины и работоспособности привитых. Проводя многофакторный эксперимент по одному из планов МТЭ, для каждого из откликов получают модель типа (3.1) и оценки ее качества. Выбрав значение целевой функции – критерий оптимизации (например, показатель защитной эффективности) и установив

ограничения (3.2) – (3.4) для значений остальных откликов и ограничения (3.6) для значений факторов, с помощью соответствующих методов нелинейного программирования находят оптимальные значения схемы иммунизации – дозы компонента, кратность и временные характеристики вакцинации. Очень важно, что в случае постановки нереальных ограничений, метод оптимизации «сигнализирует» об этом и указывает на ограничения, которые не могут быть выполнены.

Для построения моделей, описывающих поведение откликов при различных комбинациях значений (доз анатоксинов), в Уфимском НИИВС им. И.И. Мечникова провели эксперимент по плану МТЭ.

В опытах использовали схему двукратной иммунизации морских свинок с интервалом 21 сут 45 препаратами, скомпонованными в соответствии с планом МТЭ.

Титрование шести антитоксинов в сыворотке крови животных всех 45 групп проводили через 14 суток после второй прививки. В каждую группу включали 6 – 8 морских свинок. Титрование проводили на белых мышах по методу ГНИИСК им. Л.А. Тарасевича.

В плане эксперимента факторы x_i – концентрации анатоксинов – представлены в кодированном виде $x_{i\,код}$, произведенном по формулам

$$x_{i\,код} (x_i - S_i) / W_i,\ i = 1, 2, \ldots 6, \qquad (3.7)$$

где $S_i = 0{,}5\ (x_{i\,max} + x_{i\,min})$ – середина интервала варьирования,
$W_i = 0{,}5\ (x_{i\,max} - x_{i\,min})$ – половина интервала варьирования,
$x_{i\,max}$, $x_{i\,min}$ – минимальное и максимальное значение фактора, ограничивающие диапазон варьирования.

Декодирование значений факторов, т. е. переход от безразмерной (кодированной) формы к естественному виду производили по формуле

$$x_i = S_i + W_i\, x_{i\,код} \qquad (3.8)$$

Такое кодирование, принятое в МТЭ, предназначено для исключения маскирующего влияния единиц измерения факторов на значения коэффициентов модели (3.1), по которым судят о направлении и силе фактора, а также для удобства ранжирования факторов по силе их влияния.

Для нашего случая, когда $x_{i\,min} = 0$ и $x_{i\,max} = 1$ эталонной дозе, формулы (3.7) и (3.8) имеют вид:

$$x_{i\,код} = 2\,x_i - 1 \qquad (3.9)$$

$$x_i = 0{,}5\,(1 + x_{i\,код}),\ i = 1 \div 6. \qquad (3.10)$$

В соответствии с (3.9) и (3.10), устанавливающими однозначное соответствие между x_i и $x_{i\,код}$, построена кодирующая шкала (рис. 3.1), позволяющая переходить от x_i и $x_{i\,код}$ и обратно без каких-либо вычислений.

0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9	1	1,1	1,2	$x_{i\,эт.\,доз}$
-1	-0,8	-0,6	-0,4	-0,2	0	0,2	0,4	0,6	0,8	1	1,2	1,4	$x_{i\,код}$

Рис. 3.1. Кодирующая шкала для факторов

Таким образом, в кодированном виде минимальному значению фактора соответствует «-1», среднему – «0», а максимальному – «+1».

Для качественного анализа взаимного влияния компонентов препарата на титры $y_1 \div y_6$ построили таблицу (табл. 3.1), имеющую следующую структуру: по строкам располагаются отклики $y_1 \div y_6$ (титры антитоксинов), по столбцам – факторы (анатоксины) и их взаимодействия. Если увеличение факторов (доз анатоксина) значимо приводит к увеличению отклика (титр антитоксина), то на пересечении строки $y_к$ и столбца x_i (или $x_i\,x_j$) ставится знак «↑», если к уменьшению отклика – знак «↓», при статистически незначимом влиянии делается пробел.

Таблица 3.1

Влияние компонентов секстаанатоксина на титры антитоксинов в эксперименте на лабораторных животных

Факторы и их воздействие	Отклики					
	y_1	y_2	y_3	y_4	y_5	y_6
1	2	3	4	5	6	7
x_1	↑	↑	↓	↑	↓	↓
x_2	↓	↑				↓

Окончание табл. 3.1

1	2	3	4	5	6	7
x_3			↑	↑		
x_4			↑	↑		↑
x_5		↓	↓	↑	↑	↓
x_6	↑		↓	↑	↓	↑
$x_1 x_2$	↓	↓	↑	↑	↑	
$x_1 x_3$		↓	↓			
$x_1 x_4$						
$x_1 x_5$			↑			
$x_1 x_6$						↓
$x_2 x_3$	↑				↑	
$x_2 x_4$						
$x_2 x_5$						
$x_2 x_6$		↑		↑	↑	
$x_3 x_4$			↓		↓	
$x_3 x_5$		↓				
$x_3 x_6$		↑	↓			
$x_4 x_5$						
$x_4 x_6$	↑				↑	
$x_5 x_6$		↑			↓	

БАШКОРТ ЭНЦИКЛОПЕДИЯНЫ • БАШКИРСКАЯ ЭНЦИКЛОПЕДИЯ

3.1.2.2. Оптимизация (балансировка) секстаанатоксина

В соответствии с общей схемой (3.1) на втором этапе исследования произвели оптимизацию состава секстаанатоксина: максимировался критерий y_6 при ограничениях (3.5) для двух вариантов ограничений диапазонов варьирования факторов $x_i \div x_6$ – доз компонентов препарата:

1) $0{,}1 \le x_i \le 1$, $i = 1, 2, \ldots, 6$;

2) $0{,}1 \le x_i \le 1{,}2$ $i = 1, 2, \ldots, 6$.

Оптимизацию секстаанатоксина проводили по специально разработанной программе ЭВМ. В результате получили:

– для первого варианта ограничений факторов оптимальные дозы компонента препарата равны:

$$x_{1\,опт} = 0{,}33, \quad x_{2\,опт} = 0{,}83, \quad x_{3\,опт} = 1,$$
$$x_{4\,опт} = 1, \quad x_{5\,опт} = 0{,}54, \quad x_{6\,опт} = 1 \qquad (3.11)$$

от эталонной дозы, т.е. оптимальные концентрации анатоксинов в прививочной дозе:

$$x_{1\,опт} \approx 5\ ЕС, \quad x_{2\,опт} \approx 2{,}5\ ЕС, \quad x_{3\,опт} \approx 3\ ЕС,$$
$$x_{4\,опт} \approx 5\ ЕС, \quad x_{5\,опт} \approx 2{,}5\ ЕС, \quad x_{6\,опт} \approx 15ЕС; \qquad (3.12)$$

при этих значениях факторов (дозах анатоксинов) отклики (титры антитоксинов) равны следующим расчетным величинам:

$$y_{1\,опт} = 0{,}75\ МЕ/мл, \quad y_{2\,опт} = 0{,}20\ МЕ/мл, \quad y_{3\,опт} = 1{,}17\ МЕ/мл,$$
$$y_{4\,опт} = 3{,}78\ МЕ/мл, \quad y_{5\,опт} = 7{,}65\ МЕ/мл, \quad y_{6\,опт} = 0{,}16\ МЕ/мл, \qquad (3.13)$$

Таким образом, получили защитные титры y_1 –y_5, удовлетворяющие заданным ограничениям (3.5), при этом y_6 имеет сравнительно высокий уровень;

– для второго варианта ограничений факторов (с увеличенной верхней границей интервала варьирования) оптимальные дозы компонентов препарата равны следующим величинам:

$$x_{1\,опт} = 0{,}28, \quad x_{2\,опт} = 0{,}82, \quad x_{3\,опт} = 1{,}1,$$
$$x_{4\,опт} = 1{,}1, \quad x_{5\,опт} = 0{,}48, \quad x_{6\,опт} = 1{,}0 \qquad (3.14)$$

от стандартной дозы, т. е. с фактическими концентрациями анатоксинов:

$$x_{1\,опт} = 5\ ЕС, \quad x_{2\,опт} = 2{,}5\ ЕС, \quad x_{3\,опт} = 3{,}3\ ЕС,$$
$$x_{4\,опт} = 5{,}5\ ЕС, \quad x_{5\,опт} = 2{,}5\ ЕС, \quad x_{6\,опт} = 15\ ЕС$$

при этих значениях факторов отклики равны следующим величинам:

$$y_{1\,опт} = 0{,}75\ МЕ/мл, \quad y_{2\,опт} = 0{,}20\ МЕ/мл, \quad y_{3\,опт} = 0{,}82\ МЕ/мл,$$
$$y_{4\,опт} = 4{,}35\ МЕ/мл, \quad y_{5\,опт} = 8{,}0\ МЕ/мл, \quad y_{6\,опт} = 0{,}29\ МЕ/мл \qquad (3.15)$$

Анализ результатов оптимизации показывает, что оба варианта ограничений дали примерно одинаковый состав секстаанатоксина, удовлетворяющие нормативам МБТ-78.

Таким образом, в результате эксперимента оптимальным по критерию максимума титров антитоксина перфрингенс при ограничениях МБТ-78 является секстаанатоксин в следующем составе:

– ботулинический А и столбнячный компоненты (x_i и x_4) по 5 ЕС;

– ботулинический В и эдематиенс компоненты (x_2 и x_5) по 2,5 ЕС;

– ботулинический Е компонент 3 ЕС, перфрингенс – 15 ЕС.

Отсюда следует, что расчетный вариант секстаанатоксина существенно отличается от коммерческого препарата содержанием ботулинического анатоксина типа А и анатоксина эдематиенс. Это значит, что доза первого из них может быть снижена в секстаанатоксине в 3 раза, а второго – в 2 раза.

Приведенные данные свидетельствуют о том, что теоретически обосновано создание оптимально сбалансированного секстаанатоксина. Однако лишь результаты дальнейших испытаний такого препарата на людях могли позволить сделать окончательное заключение о правильности теоретического расчета.

3.1.2.3. Разработка технологии получения ботулинических анатоксинов с использованием гидролизата эприна в качестве основы питательной среды

Наряду с оптимизацией прививочных доз компонентов секстаанатоксина были проведены исследования, направленные на обеспечение стабильности его производства путем замены дефицитного сырья, являющегося основой питательной среды для культивирования клостридий ботулинум.

В предыдущей главе отмечалось, что одним из основных требований для получения ботулинических токсинов является содержание в питательной среде белков и аминокислот. Многочисленные попытки многих авторов получить токсины на растительных питательных средах, хотя иногда и заканчивались успешно, но ни одно из этих исследований не было доведено до промышленной технологии и не явилось основой производства ботулинических анатоксинов.

Первой нормативно-технической документацией на изготовление в производственных условиях ботулинических анатоксинов

в нашей стране являлся разработанный в НИИ санитарии Министерства обороны СССР временный регламент производства очищенного концентрированного сорбированного ботулинического бианатоксина типов А и В, утвержденный в 1965 г. В этом документе для получения токсинов предусматривалось использование питательной среды с основой из гидролизата рыбо-костной муки.

Следующая нормативно-техническая документация производства ботулинического трианатоксина была разработана в Уфимском НИИВС им. И.И. Мечникова и утверждена в 1969 г. Она отличалась от предыдущего регламента тем, что для получения ботулинических токсинов было рекомендовано применение питательной среды с основой из гидролизата китовой муки. Этот метод получил широкое распространение и использовался на производстве в течение ряда лет. Однако из-за резкого сокращения промысла китов гидролизат китовой муки превратился в чрезвычайно дефицитный и дорогостоящий вид сырья. В связи с этим было необходимо в короткий срок решить вопрос с заменой китовой питательной среды на среду из доступного и дешевого сырья.

Выбор был сделан в пользу питательной среды из гидролизата кормовых дрожжей. Однако настораживал тот факт, что для их производства применялись отходы нефтеперерабатывающих заводов – жидкие парафины.

Поэтому в нашей работе были использованы кормовые дрожжи производства Уфимского экспериментального завода белково-витаминных концентратов. Для их производства использовался эприн, не содержащий углеводородов нефти.

Для сравнительной оценки аминокислотного состава разных сред были изготовлены по 5 серий солянокислотных гидролизатов китовой муки и эприна. С этой целью 80% суспензию китовой муки или эприна подвергали автоклавированию в присутствии 1,4% соляной кислоты. Гидролиз вели при температуре 130±2 °С и давлении 0,2 МПа в течение 2 ч. Выпавший осадок при pH 4,6±0,1 отфильтровывали через полотно диагональ. Полученные гидролизаты доводили питьевой водой до содержания в них аминного азота 90–100 мг, добавляли 5% кукурузного экстракта (25% раствор) и 1% глюкозы, а затем подвергали стерилизации при температуре

Таблица 3.2

Содержание аминокислот в сравниваемых питательных средах

Аминокислота (микромоль/мл)	Питательная среда с основой из гидролизата	
	Китовой муки (M±m)	Эприна (M±m)
Таурин	следы	следы
Аспарагиновая кислота	11,71±0,96	7,24±1,80
Треонин	1,8 ±0,12	0,68±0,15
Серин	1,55±0,12	0,98±0,32
Аспарагин	следы	следы
Глютаминовая кислота	2,69±0,37	2,93±0,60
Пролин	1,68±0,17	1.31±0,38
Глицин	4,75±0,37	1,88±0,45
Аланин	4,92±0,45	3,42±0,62
Валин	1,22±0,11	1,04±0,38
Метионин	0,75±0,08	0,32±0,13
Изолейцин	1,01±0,11	0,48±0,22
Лейцин	3,00±0,31	0,90±0,04
β -аланин	0,75±0,04	0,57±0,20
Тирозин	0,86±0,07	0,50±0,07
Фенил-аланин	1,08±0,12	0,75±0,04
γ-аминомасляная кислота	следы	0,67±0,20
Орнитин	следы	0,23±0,07
Лизин	2,00±0,21	1,00±0,08
Гистидин	0,51±0,06	0,19±0,08
Аргинин	0,94±0,09	0,45±0,05
α-аминомасляная кислота	следы	следы

110±2 °С в течение 20 минут. Определение содержания аминокислот в полученных средах проводили с помощью аминокислотного анализатора. Результаты этих исследований представлены в табл. 3.2.

Из табл. 3.2 следует, что в составе аминокислот, содержащихся в обеих средах, много сходства. Так, в них отсутствует таурин, аспарагин и α-аминомасляная кислота. Имеющиеся в среде с основой из гидролизата китовой муки 17 других аминокислот выявлены и в среде с основой из гидролизата эприна. В то же время в последней обнаружены γ-аминомасляная кислота и орнитин, которые практически отсутствуют в среде с основой из гидролизата китовой муки.

Таблица 3.3

Изменение содержания аминокислот в питательных средах при культивировании клостридий ботулинум типа А

Аминокислота (микромоль/мл)	Питательная среда с основой из гидролизата китовой муки		Питательная среда с основой из гидролизатаэприна	
	в среде	в токсине	в среде	в токсине
Аспарагиновая кислота	11,7±0,96	8,10±2,61	7,24±1,80	0,92±0,28*
Треонин	1,18±0,12	0,14±0,05	0,68±0,15	следы
Серин	1,55±0,12	0,20±0,15	0,98±0,32	следы
Глютаминовая кислота	2,69±0,37	2,85±1,16	2,98±0,60	2,51±0,53
Пролин	1,68±0,17	следы	1,31±0,38	следы
Глицин	4,75±0,37	следы	1,68±0,45	следы
Аланин	4,92±0,45	14,19±3,61	3,42±0,62	7,51±1,96
Валин	1,22±0,11	2,04±0,91	1,04±0,38	0,30±0,05*
Метионин	0,75±0,08	4,71±0,03	0,32±0,13	3,01±0,39
Изолейцин	1,01±0,11	1,46±0,57	0,48±0,22	0,31±0,05
Лейцин	3,00±0,31	2,71±1,12	0,90±0,04	0,35±0,07*
β-аланин	0,75±0,04	0,68±0,40	0,57±0,20	следы*
Тирозин	0,86±0,07	0,14±0,09	0,50±0,07	следы
Фенил-аланин	1,08±0,12	следы	0,75±0,04	следы
γ-аминомасляная кислота	следы	1,81±0,60	0,67±0,20	2,50±0,41
Лизин	2,00±0,21	5,24±1,13	1,00±0,08	3,85±0,72
Гистидин	0,51±0,06	1,34±0,65	0,19±0,08	0,36±0,06
Аргинин	0,94±0,09	следы	0,45±0,05	следы
α-аминомасляная кислота	следы	2,42±0,64	следы	0,44±0,09

* Различия статистически достоверны при $P \leq 0,05$.

Существенная разница установлена в количественном содержании аминокислот. В среде из китовой муки содержание аспарагиновой кислоты, треонина, серина, глицина, аланина, метионина, изолейцина, лейцина, тирозина, фенил-аланина, лизина, гистидина и аргинина было существенно больше, чем в эприновой.

Для того чтобы выявить значение этой разницы, были проведены исследования по потреблению аминокислот в процессе культивирования клостридий на этих средах. Полученные данные приведены в табл. 3.3 и 3.4.

Таблица 3.4

Содержание аминокислот в сравниваемых питательных средах

Аминокислота (микромоль/мл)	Содержание аминокислот (M±m)	
	в эприновой среде	в токсине, полученном на эприновой среде
Аспарагиновая кислота	2,33±0,63	2,21±1,02
Треонин	0,90±0,48	следы
Серин	1,24±0,75	0,06±0,01
Глютаминовая кислота	3,09±0,60	1,50±1,07
Пролин	1,13±0,33	следы
Глицин	2,50±1,09	0,40±0,20
Аланин	4,18±1,44	14,66±2,45
Валин	0,86±0,52	0,77±0,26
Метионин	0,21±0,13	0,35±0,02
Изолейцин	0,62±0,42	0,63±0,02
Лейцин	1,3±0,74	0,53±0,55
β -аланин	следы	следы
Тирозин	0,37±0,22	следы
Фенил-аланин	0,50±0,10	следы
γ-аминомасляная кислота	0,86±0,64	4,04±1,52
Лизин	2,83±0,51	2,35±0,30
Гистидин	0,17±0,07	0,49±0,20
Аргинин	0,43±0,10	следы
α-аминомасляная кислота	следы	1,40±0,30

При анализе данных таблиц можно заключить, что при культивировании клостридий ботулинум как типа А, так и типа В основные изменения в аминокислотном составе среды заключались в поглощении треонина, серина, пролина, глицина, тирозина, фенил-аланина и аргинина. Именно эти аминокислоты в питательной среде из эприна содержатся в меньшем количестве, чем в китовой среде. Можно предположить, что их концентрация оказывает серьезное влияние на процесс токсикогенеза. Питательная среда из эприна беднее метионином и лизином. Однако количество этих аминокислот в среде нарастает в процессе культивирования. Поэтому их концентрация в среде, очевидно, имеет

Таблица 3.5

Антитоксинсвязывающая активность ботулинических токсинов, полученных на разных питательных средах

Питательная среда с основой из гидролизата	Число посевов	Титры токсинов в L^+/мл	
		типа А	типа В
Эприна	10	100÷250 130±33,15	10÷30 23,5±4,5
Китовой муки	10	100÷150 125±18,7	10÷30 19,5±3,84

второстепенное значение, как и других аминокислот, концентрация которых не изменяется, или изменяется незначительно.

При анализе табл. 3.3 и 3.4 обращает на себя внимание различие в потреблении некоторых аминокислот на разных средах. Так, при культивировании клостридий в китовой среде их потребляется больше, чем при культивировании в среде из эприлина. Снижение количества аспарагиновой кислоты, лейцина и β-аланина в среде из эприна при культивировании клостридий типа А происходит более интенсивно, чем в китовой. Снижение их концентрации в питательной среде из эприна статистически значимо, а в китовой – недостоверно. При культивировании клостридий типа В этого не наблюдалось.

Результаты проведенных исследований послужили теоретическим обоснованием для использования эприновой питательной среды при изготовлении ботулинических токсинов типов А и В. Опыты культивирования клостридий ботулинум на средах, изготовленных на гидролизатах эприна и китовой муки, показали результаты, представленные в табл. 3.5.

Из табл. 3.5 следует, что антитоксинсвязывающая активность токсинов, полученных на разных средах, не имела существенных различий. Средний титр токсинов, изготовленных на эприновой среде составил: типа А – 130 ± 33,15, типа В – 23,5 ± 4,5 L^+/мл, а на китовой среде соответственно – 125 ± 18,7 и 19,5 ± 3,84 L^+/мл.

Эти исследования подтвердили мнение, что на эприновой среде, несмотря на сниженную концентрацию в ней наиболее потребляемых аминокислот, можно получать токсины, не уступающие по активности, изготовленным на китовой среде.

Для выяснения влияния концентрации этих аминокислот на токсиногенез были проведены исследования, в которых в питательную

Таблица 3.6

Активность ботулинического токсина типа А при обогащении эприновой среды аминокислотами

Питательная среда	Число опытов	Активность токсина (L^+/мл)
Опытная (обогащенная)	5	200÷250
Среднее		180±34,7
Контрольная	5	100÷150
Среднее		120±22,4
t-критерий		3,24

среду с основой из гидролизата эприна перед заражением культурой ботулинум типа А внесли ряд аминокислот в следующих количествах из расчета: треонина 0,13; серина 0,9; пролина 0,10; глицина 0,20; тирозина 0,10; фенил-аланина 0,10; аргинина 9,15 г на 1 л. Эти количества позволяли компенсировать недостающее содержание их в китовой среде. Контролем являлся посев культуры в эту же среду без добавления аминокислот. Результат учитывался через 8 сут культивирования.

Данные по токсинообразованию в опытной и контрольной средах приведены в табл. 3.6.

Проведенные исследования показали, что обогащение питательной среды аминокислотами вызывало повышение антитоксинсвязывающей активности фильтратов культур: на обогащенной среде токсины содержали через 6 сут культивирования 100–150 L^+/мл, а через 8 сут – 200–250 L^+/мл. Между тем в контрольной среде титры токсинов составляли через 6 сут 50–70 L^+/мл, а через 7 сут – 100 – 150 L^+/мл.

Эти исследования показали, что обогащение эприновой питательной среды необходимыми аминокислотами позволяет повысить активность получаемого токсина. Однако было необходимо разобраться в экономической целесообразности обогащения аминокислотами питательных сред в условиях промышленного производства. Дело в том, что простое увеличение концентрации гидролизата эприна в питательной среде не давало положительного результата.

Указанное обстоятельство обусловило необходимость в проведении специальных исследований. При анализе содержания аминокислот в питательных средах и динамики их изменения в процессе

культивирования было обращено внимание на присутствие в среде из эприна γ-аминомасляной кислоты и орнитина. В китовой и рыбной средах эти аминокислоты отсутствовали. Однако в последующих исследованиях удалось установить, что присутствие орнитина в питательных средах не является препятствием для образования токсина.

Для проверки предположения о наличии у γ-аминомасляной кислоты способности к ингибированию токсиногенеза была проведена серия исследований, в которой не было подтверждено это подозрение. Таким образом, было установлено, что наличие в питательной среде γ-аминомасляной кислоты не влияет на токсинообразование клостридий ботулинум.

На основании проведенных исследований была разработана технология приготовления питательной среды для получения ботулинических токсинов типов А и В, в которой в качестве белковой основы был утвержден гидролизат эприна.

Утверждение регламента производства очищенного сорбированного ботулинического трианатоксина имело большое практическое значение для промышленного производства прививочных препаратов против клостридиальных инфекций.

3.1.2.4. Разработка методов концентрации, обезвреживания и очистки ботулинических токсинов

Технология приготовления гидролизата эприна сводится к следующему:

На 500 л питьевой воды использовали 50 кг эприна и 14 кг 30%-й соляной кислоты. Гидролиз проводится при температуре 134±2,0 °С в течение 2 ч. По окончании гидролиза содержимое реактора с помощью 20%-го раствора едкого натрия доводится до pH 4,4±0,1. Выпавший осадок подлежит фильтрации через полотно-диагональ.

Полученный гидролизат должен содержать 280±40 мг% аминного азота, 2–3 г% хлоридов и может быть использован в течение трех суток.

Для приготовления питательной среды гидролизат эприна разбавляется питьевой водой до содержания аминного азота 155±5 мг%. После подщелачивания 20%-м раствором гидроксида натрия до pH 7,1±0,1 в раствор добавляется 5% кукурузного экстракта и 1% глюкозы. При приготовлении среды для культивирования клостридий

Таблица 3.7

Титры токсинов в L^+/мл, полученных при культивировании клостридий на разных средах в промышленных условиях

Питательная среда	Тип А		Тип В	
	число серий	титры токсина в L^+	число серий	титры токсина в L^+
Эприновая	10	150±40,8	8	21,2±8,3
Китовая	10	145±15,8	10	22,0±7,9
t-критерий	0,36		0,2	

типа А на 1 л среды добавляется 12 мг хлористого или сернокислого железа. Далее среда стерилизуется при температуре 110±2 °С в течение 20 мин.

В нашей работе по описанной технологии было изготовлено в промышленных условиях 18 серий питательной среды. Культивирование клостридий ботулинум типов А и В производили при температуре 35±0,2 °С в течение 10 сут. Результаты токсиногенеза представлены в табл. 3.7.

Из табл. 3.7 следует, что титры токсинов, полученных при культивировании клостридий, изготовленных на двух питательных средах, практически не отличались друг от друга. Это указывает на то, что эприновая питательная среда по своим свойствам не уступает китовой среде и вполне может быть использована для получения токсинов в условиях производства.

Важным пунктом разработанного регламента являлись технические условия, регламентирующие методы концентрирования, очистки и обезвреживания ботулинических токсинов, полученных на питательной среде с основой из гидролизата эприна.

Согласно регламенту, токсины в течение 3 сут подвергали обезвреживанию при температуре 37±0,2 °С в присутствии 0,4% формалина, затем двукратно осаждали 9% соляной кислотой с 0,2% гексаметафосфата натрия. После этого дообезвреживали в течение 15 сут с 0,2% формалина при температуре 37±0,2 °С. Результаты представлены в табл. 3.8.

Из табл. 3.8 следует, что очищенные анатоксины обладали достаточно высокими антитоксинсвязывающими титрами, которые у ботулотоксина типа А составляли 510±80 ЕС/мл, а типа В – 130±20 ЕС/мл. В то же время нагрузка ЕС на мг белкового азота

Таблица 3.8

Результаты очистки и обезвреживания ботулинических токсинов А и В по регламентированному способу

Тип токсина	Число серий	Средний титр анатоксина в ЕС/мл	% выхода при очистке и обезвреживании	Нагрузка ЕС/мг белкового азота	Оптическая плотность
А	10	510±80	28,5±6,5	1110±340	0,9±0,2
В	10	130±20	41,7±15,0	880±440	1,1±0,2

в некоторых сериях оказалась ниже требований технических условий (тип А ниже 1000, тип В ниже 500 ЕС/мг белкового азота). Кроме того, анатоксины имели темно-коричневый цвет, и оптическая плотность составляла 0,9±0,2–1,1±0,2.

Таким образом, степень очистки препарата в некоторых сериях была неудовлетворительной и возникла новая проблема по разработке способа очистки гидролизата эприна от балластных и пигментных веществ.

В практике изготовления питательных средств распространен способ их осветления с помощью активированного угля. В нашей работе гидролизаты эприна подвергали кипячению в течение 1–2 мин в присутствии 1 % активированного угля при pH 3,6. Затем уголь отделяли фильтрацией через диагоналевое полотно.

Проверка оптической плотности гидролизатов на фотоэлектрокалориметре показала, что уголь сорбирует на себя менее одной трети пигментных веществ и оптическая плотность после обработки углем снижается незначительно (с 1,6 до 1,1).

Вместе с тем обработка гидролизатов углем вела к значительному снижению содержания в них азотистых веществ. Изменение азотистого состава гидролизатов после обработки углем приведена в табл. 3.9.

Из табл. 3.9 следует, что в осветленных гидролизатах аминный азот снизился с 246 до 158 мг %, белковый азот – с 30 до 1,2 мг %. Статистически значимо уменьшилось и содержание всех пептидных фракций.

Таким образом, обработка гидролизатов эприна активированным углем не влекла за собой практически значительного снижения в них пигментных веществ и, как показала последующая работа в условиях производства, оказалась нерациональной.

Таблица 3.9

Изменение азотистого состава гидролизатов эприна после обработки активированным углем

Гидролизат	Число опытов	Азот, мг %			Пептидные фракции, мг %		
		общий	аминный	белков	1	2	3
До осветления	15	462±36 (452÷480)	246±12 (210÷268)	30,2±3,5 (20÷37)	18,5±3,5 (9÷19)	16,7±2,8 (14,2÷19)	42,9±7 (38,8÷49)
После осветления	10	315±70 (171÷394)	158±18 (140÷171)	1,2±0,3 (0÷4,2)	1,4±0,4 (0÷4,2)	2,6±1,8 (0÷4,6)	14,2±7 (8,7÷21)
t-критерий		6,1	13,5	32,2	19,0	15,7	9,9

Следующим этапом наших исследований являлся выбор и отработка другого способа очистки ботулинических токсинов, пригодного для промышленного производства токсинов. При этом этот метод очистки должен быть достаточно простым учитывая большие объемы нарабатываемого токсина.

Наиболее результативными методами разделения белковых смесей является хроматографический. Однако он оказался труднодоступным и дорогостоящим при обработке больших объемов токсинов (750±250 л). Положительное решение данной проблемы заключалось в уменьшении получаемых объемов токсинов за счет концентрирования препаратов. Применение метода осаждения белков соляной кислотой в присутствии гексаметафосфата натрия позволило сократить промышленный объем токсина до 20 раз.

Согласно регламенту производства ботулинического триана-токсина № 180-80, вторым этапом очистки предварительно сконцентрированного, частично обезвреженного ботулинического токсина являлось извлечение из него балластных веществ с помощью сорбции на каолине. Для этого к концентрированному токсину при нейтральном pH добавляется 2% каолин. Смесь подлежит перемешиванию, выдерживается 1 ч при температуре 11±1 °С, а затем осадок отделяется сепарированием. Такой способ позволяет освободить от 20–30% балластных белков при небольшой потере антитоксинсвязывающей активности препарата.

В дальнейших исследованиях были изучены сорбционная активность каолина в зависимости от кислотности питательной

среды, испытан бач-метод хроматографической очистки токсинов на порошковой отечественной ДЭАЭ-целлюлозе. Для этого целлюлозу уравновешивали 0,1 М фосфатным буфером с pH 7,0 и смешивали с концентрированными токсинами в соотношении 2,25±0,25 г сухого ионообменника на 1 г белка токсина. Смесь выдерживали при температуре 20±2 °С в течение 40 мин, после чего целлюлозу выделяли на воронке Бюхнера через бумажный фильтр.

Изготовленные очищенные токсины подлежали дообезвреживанию с 0,2% формалина при температуре 37±0,2 °С в течение 15 сут. Результаты исследований представлены в табл. 3.10.

Из представленных в табл. 3.10 данных следует, что обработка концентрированных недообезвреженных токсинов порошковой ДЭФЭ-целлюлозой с помощью бач-метода не во всех опытах позволяла получать препарат с необходимой нагрузкой ЕС на мг белкового азота, отвечающий требованиям технических условий. Из 4 серий анатоксина А, очищенных бач-методом, 2 имели нагрузку ниже 1000, а из 3 серий анатоксина типа В одна была с нагрузкой меньше 500. Две серии препаратов, очищенных сорбционно-элюционным методом, по нагрузке ЕС/мг белкового азота отвечали требованиям технических условий. В то же время обработка концентратов ДЭФЭ-целлюлозой позволяла в значительно большей

Таблица 3.10

Показатели очистки обезвреживания ботулинических токсинов типов А и В на ДЭФЭ-целлюлозе и каолине

Тип токсина	Способ очистки	Активность (ЕС/мл)	Содержание белк. азота в мг%	Нагрузка ЕС на мг белк. азота	Оптическая плотность	Выход антигена в %
А	Хроматография на ДЭАЭ-целлюлозе	400±262	46,1±27,6	950±777	0,35±0,2	26±12
	Сорбция-элюция на каолине	575±152	37,2±5,6	1670±216	0,5±0,13	40,8±25,7
В	Хроматография на ДЭАЭ-целлюлозе	100±66	14,7±12,2	720±591	0,28±0,13	44,3±17,2
	Сорбция-элюция на каолине	155±105	20,9±19,6	840±407	1,06±0,15	79±12,5

степени освободиться от пигментных веществ, чем сорбция на каолине с последующей элюцией.

Особенно отчетливо разница в степени пигментности проявлялась при изготовлении очищенных анатоксинов типа В. Оптическая плотность при обработке концентратов этого антигена ДЭАЭ-целлюлозой колебалась от 0,29 до 0,35, а в препаратах, очищенных сорбционно-элюционным методом, – от 0,96 до 1,18.

Таким образом, оптическая плотность при первом методе очистки была во всех опытах в три с лишним раза ниже, чем при втором. В то же время выход антигена типа В при очистке на каолине были выше, чем при хроматографии на порошковой ДЭФЭ-целлюлозе.

Одновременно с этими исследованиями был проведен ряд опытов по очистке методом хроматографии на порошковой ДЭАЭ-целлюлозе концентрированных ботулинических токсинов типа А, изготовленных на китовой питательной среде. Сравнительные данные, полученные при использовании этого метода для очистки токсинов типа В, изготовленных на разных средах, приведены в табл. 3.11.

Из табл. 3.11 следует, что показатели очистки на порошковой ДЭАЭ-целлюлозе и обезвреживании ботулинических токсинов типа В, изготовленных на эприновой среде, были хуже, чем при очистке этим способом токсинов, полученных на китовой среде. Антитоксинсвязывающая активность анатоксинов была ниже, а нагрузка ЕС/мл белкового азота не всегда отвечала требованиям нормативно-технической документации. По этой причине очистка бач-методом с применением порошковой ДЭФЭ-целлюлозы оказалась непригодной для токсинов, полученных на эприновой среде.

Таблица 3.11

Показатели очистки на порошковой ДЭАЭ-целлюлозе и обезвреживания ботулотоксинов типа В, изготовленных на разных питательных средах

Питательная среда	Число опытов	Активность (ЕС/мл)	Сожержание белкового азота	Нагрузка ЕС на мг белкового азота	Выход антигена в %
Эприновая	4	110±65	14,8±12,2	720±591	44,3±17,2
Китовая	8	230±110	37,2±36,2	620±110	50,0±11
t-критерий		2,5	1,6	0,3	0,6

При кратковременном обезвреживании нативных ботулинических токсинов, принятом в условиях промышленного производства, происходит конденсация балластных белков с молекулами антигена. Предстояло изучить, как это метод, удобный с точки зрения техники безопасности, может влиять на степень чистоты получаемых препаратов. С этой целью было необходимо определить, как влияет предварительное трехсуточное обезвреживание формалином токсина типа А на степень его последующей очистки. Для этого несколько серий недообезвреженного и частично обезвреженного токсинов концентрировали путем осаждения соляной кислотой в присутствии гексаметафосфата натрия, а затем сорбировали на каолине при pH 5. После выдерживания в течение 18 ч при температуре 6,5±1,5 °С надосадочную жидкость удаляли, а сорбированный антиген элюировали в сукцинатно-боратном буферном растворе с pH 7,2 и обезвреживали или дообезвреживали при температуре 37±0,2 °С с 0,2% формалина в течение 15 сут. Полученные результаты приведены в табл. 3.12.

Анатоксины, изготовленные из частично обезвреженных токсинов, имели светло-коричневую, а из нативных токсинов – темно-коричневую окраску и нагрузку 1220–1960 ЕС на мг белкового азота. Выход антигена был несколько ниже, чем при очистке недообезвреженного токсина и составлял 25–35% против 31,3–50%.

Таким образом, предварительное частичное обезвреживание не оказывало заметного влияния на степень очистки препарата. Поэтому в дальнейшей работе было решено использовать частично обезвреженные токсины.

Таблица 3.12

Показатели очистки ботулинического токсина типа А методом сорбции-элюции на каолине

Концентрация и очистка токсина	№ серий	Титр в ЕС/мл	Нагрузка ЕС на мг белкового азота	Оптическая плотность	Выход антигена при очистке и обезвреж. в %
Недообезвреженный	8б	600	1740	0,18	50,0
	14/5	500	1960	0,10	35,7
	31/1	250	2800	0,12	31,3
Нативный	12/7	700	1790	0,59	35,0
	14/3	500	1220	0,49	25,0

Проверку отработанного метода проводили в условиях промышленного производства. К культуре ботулинум, полученной в объеме 450 л, добавляли 0,4% формалина и выдерживали в реакторе при температуре 37±0,2 °С в течение 3 сут. Перед концентрацией формализированную культуру подвергали стерилизующей фильтрации через асбестовые пластины.

Освобожденные от микробных клеток недообезвреженные токсины подвергали 20-кратной концентрации путем осаждения 9% соляной кислотой при pH 3,5 в присутствии 0,2% гексаметафосфата натрия. Концентрированные недообезвреженные токсины сорбировали на каолине, а затем элюировали описанным выше способом. Очищенные токсины подвергали стерилизующей фильтрации через бактериальные свечи Ф-5 и дообезвреживали 0,2% раствором формалина в течение 15 сут.

Характеристика производственных серий очищенных анатоксинов типов А и В приведена в табл. 3.13, из которой следует, что качество изученных серий препаратов соответствовало требованиям ТУ.

Титры анатоксина типа А колебались от 250 до 1000 ЕС/мл, а нагрузка ЕС/мг белкового азота – от 1000 до 3300. Процент выхода антигена при очистке и обезвреживании составлял от 31,3 до 62,6%.

Титры анатоксина типа В колебались от 130 до 320 ЕС/мл, а нагрузка от 500 до 690 ЕС/мг белкового азота.

Выход антигена при очистке и обезвреживании был довольно высоким и составлял от 38,5 до 66%. Оптическая плотность свидетельствовала о том, что анатоксины типа В по сравнению с анатоксинами типа А имели более выраженную окраску (1,2±0,37 против 0,60±0,16).

Таблица 3.13

Характеристика ботулинических анатоксинов типов А и В, очищенных в производственных условиях методом сорбции элюции на каолине

Тип токсина	Число серий	Титры в ЕС/мл	Нагрузка ЕС на мг белкового азота	Оптическая плотность	Выход антигена в %
А	12	250÷1000	1000÷3300	0,42÷0,86	31,3÷62,6
		500±121	1460±422	0,60±0,16	43,4±12,5
В	12	130÷320	500÷690	0,80÷1,4	38,5÷66,0
		204±39	570±47	1,2±0,37	53,5±10,2

Приведенные данные свидетельствуют о том, что для очистки ботулинических токсинов типов А и В, изготовленных на эприновой среде, оптимальным является сорбционно-элюционный метод с применением каолина, который позволяет получать анатоксины, не уступающие по своим препаратам, изготовленным по существовавшим ранее регламентированным технологиям.

Однако в анатоксинах, очищенных по новой технологии, концентрация пигментных веществ оставалась высокой. Поэтому предстояло провести дополнительные исследования по поиску эффективных способов очистки концентрированных токсинов. Выбор был сделан в пользу способа очистки с применением хроматографических колонок с волокнистой ДЭАЭ-целлюлозой отечественного производства. Для этого ботулотоксины типа В, предварительно сконцентрированные путем осаждения соляной кислотой в присутствии гексаметафосфата натрия, подвергали очистке на колонках с ДЭАЭ-целлюлозой. Очищенные препараты обезвреживали в присутствии формалина в течение 15 сут. Результаты исследований представлены в табл. 3.14.

Из таблицы следует, что препараты, очищенные методом хроматографии на волокнистой ДЭАЭ-целлюлозе, по удельной активности, белковому азоту и уровню нагрузки ЕС на мг белкового азота вполне отвечали техническим условиям и содержали соответственно 155±50 ЕС/мл, 26,5±4,4 мг% и 650±205 ЕС на мг белкового азота. Вместе с тем анатоксины были значительно меньше пигментированы (оптическая плотность – 0,04).

Таблица 3.14

Сравнительная характеристика ботулоанатоксинов типа В, очищенных разными методами в лабораторных условиях

Способ очистки	Количество серий	Активность ЕС/мл	Содержание белкового азота по Несслеру, Мг %	Нагрузка ЕС на мг белкового азота	Оптическая плотность
Хроматография на ДЭАЭ-целлюлозе	6	155±50	26,5±4,4	650±205	0,04±0,019
Сорбция-элюция на каолине	6	220±50	29,6±9,1	750±115	0,2±0,14

Таблица 3.15

Характеристика ботулинических анатоксинов типа А и В, очищенных в производственных условиях методом хроматографии на волокнистой ДЭАЭ-целлюлозе

Тип анатоксина	№ серии	Активность ЕС/мл	Содержание белкового азота в мг%	Нагрузка ЕС на мг белкового азота	Оптическая плотность	Выход антигена в %
А	174	500	43,4	1150	0,38	38
	176	350	18,2	1920	0,17	34,5
	179	700	68,6	1020	0,22	45
В	77	120	23,9	500	0,24	46,2
	90	160	30,8	520	0,3	62
	92	300	56	536	0,3	61

Полученные результаты позволили провести испытания хроматографического способа очистки в производственных условиях. С этой целью ботулинические анатоксины типа А и В, наработанные в ферментерах объемом 240±16 л, концентрировали вышеописанным методом (в 40 раз), пропускали через колонки с волокнистой ДЭАЭ-целлюлозой и обезвреживали с 0,3% формалина при температуре 37±0,2 °С в течение 15 сут. Характеристика изготовленных анатоксинов приведена в табл. 3.15.

Из таблицы следует, что анатоксины типа А и В имели нагрузку 1020–1920 ЕС/мг, а типа В – 500–536 ЕС/мг белкового азота. Полученные препараты отвечали требованиям технических условий и были менее пигментированы, чем препараты, очищенные сорбционно-элюционным способом на каолине. Оптическая плотность колебалась в пределах от 0,7 до 0,38.

Таким образом, проведенные исследования позволили рекомендовать для очистки концентрированных ботулинических токсинов типа А и В метод колоночной хроматографии на волокнистой ДЭАЭ-целлюлозе. Он позволяет получать препараты, отвечающие требованиям технических условий по всем показателям. Однако окончательное мнение могло быть составлено только после изучения иммуногенности очищенных ботулинических анатоксинов типа А и В. С этой целью из первых производственных серий очищенных монопрепаратов были изготовлены три серии сорбированного на гидроокиси алюминия ботулинического трианатоксина

Таблица 3.16

Иммуногенность ботулинических анатоксинов типа А и В, полученных по новой технологии в сорбированных трианатоксинах

Тип анатоксина	№ серии анатоксина	Выживаемость животных в группе*	
		опытной	контрольной
А	41/1	10/12	0/4
	57/2	12/12	0/4
	91	11/11	0/4
В	43	12/12	0/4
	45	10/10	0/4
	48	10/10	0/4

* В числителе – число выживших животных, в знаменателе – число животных в группе.

(типы А, В, Е). Сорбцию проводили в соответствии с требованиями регламента производства. Очищенные компоненты и серии сорбированного трианатоксина были отконтролированы в отделе биологического контроля Уфимского НИИВС им. И.И.Мечникова и соответствовали требованиям технических условий. Иммуногенность сорбированных препаратов была высокой (табл. 3.16).

После введения 25 DLM токсина типа А из 12 иммунизированных белых мышей в двух сериях препарата выжили все мыши, а в одной серии – 10 из 12. При отравлении 50 DLM токсина типа В выжили все иммунизированные животные. В контрольных группах (неиммунизированные животные) все животные погибли после введения 1 DLM токсинов.

Анализ сравнительных данных технико-экономических показателей и нагрузки ЕС/мл белкового азота, полученных при использовании изученных питательных сред и методов очистки, представлен в табл. 3.17 и свидетельствует о том, что выход прививочных доз с одного литра среды и качество препаратов практически оказались одинаковыми.

В результате проведенной работы для культивирования клостридий ботулинум типа А и В в Уфимском НИИВС им. И.И. Мечникова разработан и внедрен в промышленную практику новый способ изготовления питательной среды, содержащей в качестве белковой основы гидролизат эприна. Получаемые на этой среде токсины подлежат очистке сорбционно-элюционным методом

Таблица 3.17

Сравнительная оценка разработанного метода изготовления очищенных ботулинических анатоксинов типов А и В в промышленных условиях

Питат. среда	Число серий	Анатоксин А		Число серий	Анатоксин В	
		выход доз* с 1 литра питат. среды	нагрузка ЕС/мг белк. азота		выход доз* с 1 литра питат. среды	нагрузка ЕС/мг белк. азота
Эприновая	25	220±86	1220±265	9	380±88,4	525±44
Китовая	20	270±127	1246±210	10	340±95,5	530±90,1
Рыбная	12	287±128	1250±259,8	–	–	–

* Количество доз измеряется в тысячах.

с применением каолина или хроматографическим методом на колонках с отечественной волокнистой ДЭАЭ-целлюлозой.

Новая технология позволяет получать анатоксины, отвечающие требованиям научно-технической документации, и исключает зависимость их производства от наличия дефицитного и дорогостоящего сырья – китовой или рыбной муки. Она послужила основанием для составления изменений к регламенту производства ботулинического трианатоксина.

Таким образом, в результате проведенных исследований был решен вопрос о замене дефицитного сырья – китовой муки для изготовления питательных сред в производстве ботулинических анатоксинов типа А и В на гидролизат эприна. Для очистки полученных на эприновой среде токсинов предложен метод сорбции антигенов на каолине или хроматографической колонке с волокнистой ДЭАЭ-целлюлозой.

Разработанная технология позволяет получать очищенные концентрированные анатоксины типов А и В, не уступающие по своим качествам препаратам, изготовленным по ранее регламентированной технологии.

3.1.2.5. Авторские испытания нового оптимизированного секстаанатоксина

Теоретическое обоснование изменений соотношения компонентов секстаанатоксина и введение в его состав ботулинических анатоксинов типа А и В, изготовленных по новой технологии Уфимского НИИВС им. И.И. Мечникова, позволили провести

испытания разработанного ассоциированного препарата в авторских испытаниях на людях.

Целью испытаний явилось изучение реактогенности и иммунологической эффективности сбалансированного секстаанатоксина, содержащего ботулинические антигены типов А и В, приготовленные по новой технологии, и антиген перфрингенс, полученный из очищенного токсина по способу Пермского НИИВС.

В соответствии с программой испытаний были изготовлены серии сорбированного на гидроокиси алюминия секстаанатоксина, содержащего в прививочной дозе (1 мл) следующие количества компонентов: ботулинического типа А – 5 ЕС, ботулинического типа В – 3 ЕС, ботулинического типа Е – 3 ЕС, столбнячного – 2,5 ЕС, эдематиенс – 2,5 ЕС, перфрингенс – 15 ЕС, Al203 (1,9±0,1мг).

Следует подчеркнуть, что по данным МТЭ, доза столбнячного анатоксина составляла 5 ЕС, а не 2,5. Мы сознательно сократили эту дозу в 2 раза понимая, что все контингенты, подлежащие прививке ассоциированным препаратом, состоят из лиц, ранее иммунизированных АКДС-вакциной и АДС-анатоксином.

Испытания проводили по программе, согласованной с ГИСК им. Л.А.Тарасевича, комиссионно, в условиях шифрованного опыта. Иммунизации подвергали лиц, не имеющих медицинских противопоказаний, находящихся в одинаковых условиях размещения, питания, быта и физических нагрузок.

В соответствии со схемой применения препарата отобранный контингент подвергали первичной двукратной иммунизации с интервалом в 25–30 сут и ревакцинации через 6 мес. Все прививки изучаемым препаратом проводили подкожно-безыгольным методом. Для сравнения вакцину вводили в два места организма: в плечо и под лопатку.

Реактогенность прививок изучали с помощью специально организованного медицинского наблюдения за привитыми людьми через 12, 24, 48, 72 ч (телесный осмотр и термометрия) по наличию и степени выраженности общих (повышение температуры тела, изменение самочувствия) и местных (инфильтраты, отеки, лимфадениты) реакций, а также по данным углубленного клинического и лабораторного изучения статуса привитых. Оценку степени тяжести поствакцинальных реакций (ПВР) проводили в соответствии с ТУ 42.14.169-80 на сорбированный секстаанатоксин.

Углубленному медицинскому обследованию подвергали группы привитых опытным и контрольными препаратами с изучением функционального состояния сердечно-сосудистой системы (измерение частоты пульса, артериального давления, снятие электрокардиограммы) и анализом лабораторных данных (общий анализ крови и мочи, биохимические исследования крови) до прививки, на высоте температурной реакции и в период восстановления.

Максимальное количество общих поствакцинальных реакций наблюдалось через 24 ч после прививки. Результаты исследований представлены в табл. 3.18. Проведенные исследования позволили установить разницу в количестве слабых и средних температурных реакций, инфильтратов, отеков средней величины и лимфаденитов (табл. 3.19). При этом важно подчеркнуть, что при иммунизации опытным препаратом они выявлялись реже, чем при иммунизации контрольным. В большинстве случаев эта разница была статистически

Таблица 3.18

Показатели общей реактогенности секстаанатоксина

Шифр препарата и место введения	Температурные реакции, %		
	всего	из них	
		средние (37,5–38,5 ^{O}C)	сильные (> 38,5 ^{O}C)
С опытн. в плечо	25,6	3,1	0
С опытн. под лопатку	24,0	5,3	0
С контр. в плечо	37,3	11,2	0,4
С контр. под лопатку	36,2	7,8	0

Таблица 3.19

Показатели местной реактогенности секстаанатоксина

Шифр препарата и место введения	Местные реакции, %						
	Инфильтраты			Отеки			Лимфадениты
	всего	средних	сильных	всего	средних	сильных	
С опытн. в плечо	22,5	20,2	2,3	22,2	20,2	2,0	9,9
С опытн. под лопатку	0	0	0	2,9	2,9	0	0
С контр. в плечо	56,6	40,5	16,1	40,2	29,2	11,0	1,7
С контр. под лопатку	34,4	22,5	11,9	22,5	20,2	2,3	1,2

достоверна. Сильные реакции (общие и местные) наблюдались лишь в единичных случаях.

По результатам проведенной работы следует отметить один характерный факт – показатели общей реактогенности секстаанатоксина мало зависели от места его введения, в то время как местные реакции развивались значительно чаще при аппликации препаратов в плечо. Так, при введении С контр. под лопатку инфильтраты диаметром более 2,5 см возникали в 34,4%, при этом инфильтраты диаметром более 5 см – в 11,9% случаев. Введение этого же препарата в плечо приводило к развитию аналогичных ПВР у 56,6%, а сильных – 16,1%. Такую же картину регистрировали и при прививках С опытн. Однако абсолютные цифры прививочных реакций в этом случае были существенно ниже.

Углубленные клинико-лабораторные исследования показали, что в поствакцинальном периоде оцениваемые показатели изменялись разнонаправленно и в большей степени зависели от выраженности поствакцинальной реакции, чем от вида испытываемого иммунопрепарата.

Изменения лейкоцитарной формулы в сегменте белой крови представлены в табл. 3.20. Из представленных данных видно, что у привитых опытным препаратом отмечались существенные изменения только в содержании моноцитов. Так, через 24 ч после прививки

Таблица 3.20

Формула белой крови у привитых секстаанатоксином

Форменные элементы крови	Препарат	Единица измерения	Показатели		
			до прививки	после прививки, через	
				24 часа	7 суток
Лейкоциты	С опытн.	тыс.	8,5±2,3	8,5±3,0	7,4±5,8*
	С контр.	тыс.	8,9±2,4	13,0±2,3*	5,47±1,3*
Палочко-ядерные	С опытн.	%	3,3±1,88	3,7±2,06	3,5±4,4
	С контр.	%	2,6±1,1	2,6±0,56	2,2±1,62
Сегменто-ядерные	С опытн.	%	58,0±6,9	58,1±7,3	55,0±9,5
	С контр.	%	53,8±7,0	58,1±5,4*	54,7±4,1
Моноциты	С опытн.	%	6,0±1,14	9,0±2,1*	7,0±4,4
	С контр.	%	8,2±2,6	9,2±1,6	7,0±5,1
Лимфоциты	С опытн.	%	25,0±8,9	26,6±7,1	29,5±8,5*
	С контр.	%	33,2±6,34	24,2±5,2*	34,0±3,2

* Различие статистически значимо при $P \leq 0,05$.

их содержание увеличивалось с 6,0±1,14 до 9,0±2,1, через 7 сут восстанавливаясь до 7,0±4,4.

У привитых контрольным препаратом изменения были зарегистрированы в количестве лейкоцитов (палочкоядерных и сегментоядерных). Средняя арифметическая числа лейкоцитов через 24 ч после прививки увеличивалась с 8,9±2,4 до 13,0±2,3 тыс. в мл, а процент сегментоядерных форм возрос с 53,8±7,0 до 58,1±5,4%. Содержание лимфоцитов через 7 сут после прививки снизилось с 3,2±6,34 до 24,2±5,2%. При оценке этих показателей по критерию с достоверностью 95% была установлена статистически значимая разница. Через 7 сут после первой прививки количество лейкоцитов существенно снизилось, а средняя величина оказалась даже меньше, чем до первой прививки (5,47±1,3). Содержание лимфоцитов через 7 сут после вакцинации восстанавливалось и средняя величина его составила 34,0±3,2%.

Анализ показателей красной крови (НВ %, СОЭ мм/ч, количество эритроцитов) не установил существенных различий между изучаемыми препаратами как при сравнении между собой, так и по отношению к фоновым значениям.

Вакцинация опытным и контрольным секстаанатоксинами не приводила к существенным изменениям биохимических показателей крови. Результаты исследований представлены в табл. 3.21 и 3.22.

Таблица 3.21

Биохимические показатели крови у привитых

Биохимический показатель	Изучаемый препарат					
	С опытный			С контрольный		
	Время обследования после прививки			Время обследования после прививки		
	фон	24 ч	7 сут	фон	24 ч	7 сут
Белок	7,8±0,52	7,7±0,34	7,6±0,70	8,3±0,63	7,9±0,03	7,9±0,17
Билирубин	0,38±0,13	0,39±0,12	0,30±0,00	0,36±0,17	0,44±0,14	0,51±0,10
Холестерин	223,5±55	233,8±71	237,6±46	226,4±38	283,4±78	206,0±20
Сулемов. реакция	1,90±0,03	1,90±0,08	1,86±0,16	1,86±0,11	1,90±0,21	1,85±0,16
Мочевина	26,2±7,03	23,5±2,40	21,6±5,2	22,6±2,42	21,8±3,00	21,8±4,40
Остаточ. азот	24,5±6,8	21,3±1,8	20,8±2,7	22,4±3,9	20,8±0,87	20,9±2,2

Среднеарифметические данные содержания в крови привитых общего белка, билирубина, холестерина, мочевины, остаточного азота, альбумина и глобулиновых фракций во все сроки наблюдения оставались одинаковыми в обеих группах.

При лабораторном исследовании мочи, определении величины артериального давления, измерении частоты пульса и электрокардиографическом обследовании достоверных изменений показателей после прививки в обеих группах выявлено не было.

Результаты определения титров антитоксинов в сыворотке трехкратно привитых опытным и коммерческим секстаанатоксинами приведены в табл. 3.23.

Анализ данных табл. 3.23 показал, что уменьшение прививочной дозы ботулинического анатоксина типа А привело к снижению титра

Таблица 3.22

Биохимические показатели крови у привитых (глобулиновые фракции)

Наименование фракции	Изучаемый препарат	Время обследования после прививки		
		фон	через 24 ч	Через 7 сут
А (%)	С опытный	52,8±3,7	54,3±2,6	53,6±9,0
	С контрольн.	51,8±6,45	51,2±6,8	52,5±7,0
$А_1$	С опытный	9,7±3,8	8,0±1,3	6,7±3,7
	С контрольн.	9,2±2,6	8,8±2,3	8,0±2,5
$А_2$	С опытный	9,2±2,4	9,2±1,7	9,0±7,2
	С контрольн.	9,8±10,5	10,2±3,4	9,2±2,0
β	С опытный	10,2±1,23	12,0±3,2	9,0±2,5
	С контрольн.	11,8±0,78	12,6±0,0	13,2±6,5
γ	С опытный	18,2±6,4	17,5±2,6	21,6±8,5
	С контрольн.	17,4±5,9	15,8±3,2	18,7±5,4

Таблица 3.23

Среднегеометрические титры антитоксинов в МЕ/мл через 15 сут после ревакцинации

Препарат	Ботулинические титры			Столбнячные титры	Гангренозные титры	
	А	В	Е		эдематиенс	перфринг.
С опытн.	3,34	1,34	3,58	5,25	1,52	0,20
С контр.	6,29	1,80	3,87	4,87	1,95	0,12
Защитный титр	0,75	0,20	0,50	2,50	0,50	0,20

анатоксина типа А почти в два раза. Этот титр, однако, у привитых опытным секстаанатоксином оставался достаточно высоким – 3,34 МЕ/мл, что в 100 раз превышает защитный титр, регламентированный соответствующими ТУ. Титр ботулинических антитоксинов типа В и Е, антитоксинов эдематиенс и столбнячного существенно не изменились, несмотря на то, что доза двух последних компонентов в опытном препарате была снижена в два раза.

В свою очередь, снижение дозировки анатоксинов ботулинического типа А, столбнячного и эдематиенс благоприятно отразилось на выработке анатоксина перфрингенс. Его средний титр у привитых опытным препаратом составил 0,20 против 0,12 МЕ/мл у привитых контрольным секстаанатоксином.

Таким образом, авторские испытания на людях оптимизированного секстаанатоксина показали его переносимость, умеренную реактогенность и высокую иммунологическую эффективность. Уменьшение в сорбированном секстаанатоксине дозы ботулинического компонента типа А в 3 раза, а дозы столбнячного и эдематиенс анатоксинов в 2 раза благоприятно отразились на выработке антитоксина перфрингенс.

Проверка иммунологической эффективности препаратов подтвердила правильность теоретического соотношения компонентов секстаанатоксина. На основе проведенных исследований был создан сорбированный оптимально сбалансированный иммунобиологический лекарственный препарат – секстаанатоксин, обладающий высокой иммунологической эффективностью всех шести компонентов и умеренной реактогенностью.

3.2. Экспериментальное обоснование включения оптимизированного секстаанатоксина в состав вакцинных комплексов

В Уфимском НИИВС им. И.И. Мечникова под руководством В.Н. Мельникова и Р.Ш. Магазова был создан качественно новый, сухой полианатоксинсодержащий препарат – сухой сорбированный секстаанатоксин (С), не содержащий брюшнотифозного компонента. Остальной набор анатоксинов был таким же, как и в коммерческой БТП-вакцине, и предназначался для профилактики ботулизма

(типов А, В, Е), столбняка и газовой гангрены (перфрингенс, эдематиенс).

Новая, сухая, форма ИЛП обеспечивала длительный срок годности (≥ 5 лет), способность сохранять свои свойства при экстремальных температурах окружающего воздуха, не требовала включения в состав препарата консерванта. Эти качества существенно расширяли возможности его хранения и использования в различных климатических условиях, а отсутствие консерванта позволяло применять его в смеси с живыми вакцинами. Кроме того, исключение из состава препарата реактогенного брюшнотифозного компонента должно было значительно снизить реактогенность прививок, уменьшить сенсибилизацию прививаемых контингентов.

Экспериментальное изучение и клинико-иммунологические исследования на людях показали, что испытанные производственные серии секстаанатоксина обладали умеренно выраженной общей реактогенностью, которая имели тенденция к снижению в отдаленные сроки ревакцинации (через 9–11 мес).

Динамика развития, частота и степень выраженности местных поствакцинальных реакций нового ИЛП не отличались какими-либо особенностями и были характерны для сорбированных препаратов при их введении подкожно-безыгольным методом.

Трехкратная иммунизация секстанатоксином характеризовалась удовлетворительной иммунологической эффективностью в отношении всех компонентов препарата, за исключением перфрингенс.

С появлением нового, более совершенного полианатоксинсодержащего ИЛП у авторов появилась возможность о его включении в разработанную ранее схему комплексно-ассоциированной иммунизации вместо БТС. Включение в схему иммунизации менее реактогенного ИЛП позволяло надеяться на снижение реактогенности комплексных прививок [2].

На экспериментальном этапе был изучен вопрос о взаимном влиянии ИЛП друг на друга in vitro после смешивания еще до введения их в организм животных. Было установлено, что вирус оспавакцины и живые чумные микробы при смешивании С с ВОЖС и ВЧЖС сохраняли активность и жизнеспособность в течение 1 ч при температуре 18–20 °С. Безвредность, реактогенность и иммунологическая эффективность были изучены на морских свинках и кроликах. При этом авторы не отметили развития общих реакций.

Местные реакции в области введения схемы проявлялись в виде инфильтрата, который полностью рассасывался в течение месяца. Двукратная (с интервалом в 30 сут) иммунизация вызывала отчетливую иммунологическую перестройку организма в отношении всех компонентов схемы, кроме перфрингенс.

После экспериментального обоснования усовершенствованных схем комплексно-ассоциированной иммунизации авторы провели клинико-иммунологическое изучение их на людях.

В соответствии со схемой 1 секстаанатоксин вводился в составе ассоциации с ВОЖС и ВЧЖС подкожно-безыгольным методом в одной инъекции под лопатку.

По схеме 2 смесь С и ВОЖС вводилась также под лопатку, а вакцинация ВЧЖС осуществлялась аэрозольным методом.

Результаты изучения показали, что через 12 ч после прививки по схеме 1 было зарегистрировано 54,5% общих реакций, из них 45,4% составляли слабые и 9,1% – средние температурные реакции. Сильных реакций и утраты трудоспособности не отмечено. Через 24 ч после иммунизации количество слабых реакций сократилось до 26,9%, а средних – до 7,7%. Через 48 ч после прививки общие реакции отсутствовали.

При иммунизации по схеме 2 показатели общей реактогенности были почти в 2 раза ниже, чем при использовании схемы 1. При этом через 12 ч количество слабых реакций составляло 12,5%, а количество средних – 2,5%. Через 24 ч после вакцинации были зарегистрированы только слабые реакции – 3,6%, которые полностью исчезали к 48 часам.

Усовершенствованные схемы комплексной и ассоциированной иммунизации отличались также значительно меньшим количеством местных реакций. При этом авторы отмечали, что более низкая местная реактогенность прививок регистрировалась у вакцинированных по схеме 2.

Ассоциированная иммунизация по схеме 1 и комплексно-ассоциированная иммунизация по схеме 2 приводили к отчетливой иммунологической перестройке в организме в отношении всех компонентов (за исключением перфрингенс). При этом авторы отметили, что совместное применение трех ИЛП заметно усиливало иммуногенность чумного и оспенного компонентов. Ингаляционное применение чумной вакцины в виде жидких высокодисперсных

аэрозолей оказалось иммуногенным и менее реактогенным по сравнению с подкожно-безыгольным введением ее [2].

Тем не менее реактогенность разработанных схем комплексно-ассоциированной иммунизации, хотя и расценивалась как допустимая, была относительно высокой (особенно схемы 1) и была обусловлена в основном реактогенностью базового препарата – секстаанатоксина. В связи с этим возникла необходимость дальнейшего его совершенствования. Как уже было отмечено в начале главы, в 1984 г. в результате модернизации с помощью метода математической теории эксперимента антигенный состав секстаанатоксина был оптимизирован и препарат принят в противоэпидемическую практику с 1985 г.

При изучении общей реактогенности ассоциированной иммунизации по схеме 1 с модернизированным секстаанатоксином показало, что через 12 и 24 ч после прививки общее количество температурных реакций составляло 24,7%, а количество средних и сильных – 2,1%. Таким образом ассоциированное введение модернизированного препарата С с ВОЖС и ВЧЖС привело к существенному снижению частоты развития и степени тяжести общих реакций. При этом важно подчеркнуть, что значимых изменений показателей местной реактогенности выявлено не было.

Положительные результаты экспериментальных исследований на животных позволил провести клинико-иммунологическое изучение полианатоксинсодержащих иммунобиологических лекарственных препаратов при их ассоциированно-комплексном применении на людях.

Литература

1. *Гапочко, К.Г.* Токсические и аллергические свойства некоторых ассоциированных вакцин / К.Г. Гапочко, Т.А. Салтыкова, Л.М. Струкова // Журн. микробиол. – 1977. – № 11. – С. 61–63.

2. *Агафонов, В.И.* Комплексная и ассоциированная иммунизация массовыми методами / В.И. Агафонов, Т.И. Булатова, Г.П. Гамлешко и др. – Алма-Ата: Наука, 1983. – 164 с.

3. *Агафонов, В.И.* Безыгольный метод иммунизации ассоциированными сорбированными вакцинами / В.И. Агафонов, Е.И. Бабкин, Т.И. Булатова и др. // Военн.- мед. журн. – 1974. – №.12. – С. 44–48.

4. *Воробьев, А.А.* Безыгольный (струйный) способ введения биопрепаратов в организм / А.А. Воробьев, И.Л. Некрасов, Л.Ф. Байдаков. – М.: Медицина, 1972. – 143 с.

5. *Воробьев, А.А.* Массовые способы иммунизации / А.А. Воробьев, В.А. Лебединский. – М.: Медицина, 1977. – 256 с.

6. *Шаронов, Ю.А.* Материалы по изготовлению сухих ассоциированных вакцин / Ю.А. Шаронов, Р.Г. Дашкин, В.Ш. Хасанова // Вопросы иммунологии бактериальных и вирусных инфекций. – Уфа, 1972. – С. 5–6.

7. *Шаронов, Ю.А.* Опыт изготовления сухой сорбированной брюшнотифозной вакцины с секстаанатоксином // Разработка препаратов против вирусных и анаэробных инфекций. – Томск, 1976. – С. 144–146.

8. *Селезнева, А.Н.* Изучение стабильности и свойств сухой сорбированной химической брюшнотифозной вакцины с секстаанатоксином в процессе хранения // Там же – С. 146–147.

9. *Агафонов, В.И.* Испытание на людях массовой ассоциированной иммунизации с помощью модернизированных брюшнотифозной вакцины с секстаанатоксином и секстаанатоксина / В.И. Агафонов, Т.И. Булатова, К.Г. Гапочко и др. // Вопросы противоэпидемической защиты населения. – М., 1981. – Вып. 3. – С. 383–392.

10. *Воробьев, А.А.* Оценка взаимоотношений между антигенами в ботулиническом пентаанатоксине на основе изучения различных показателей иммунитета у животных / А.А. Воробьев, А.П. Лабинский // Бюлл. экспер. биол. и мед. – 1961. – № 6. – С. 55–59.

11. *Адлер, Ю.П.* Введение в планирование эксперимента. – М.: Металлургия, 1969. – 156 с.

12. *Налимов, В.В.*Теория эксперимента. – М.: Наука, 1971. – 207 с.

13. *Разоренов, Г.И.* Математические методы анализа чувствительности организма к комбинированному действию комплекса факторов // Математические методы в эпидемиологии и микробиологии: труды института им. Пастера. – Л., 1979. – Т.541. – С.12–33.

14. *Сидняев, Н.И.* Теория планирования эксперимента и анализ статистических данных: учебное пособие / Н.И. Сидняев. – М.: Изд-во «Юрайт»; ИД «Юрайт», 2011. – 399 с.

15. *Рогозин, И.И.* Ассоциированная иммунизация и экстренная профилактика / И.И. Рогозин, В.Д. Беляков. – М.: Медицина, 1968. – 248 с.

16. *Агафонов, В.И.* Массовая комплексная иммунизация и ее влияние на трудоспособность / В.И. Агафонов, К.Г. Гапочко, И.Д. Кудрин и др. – Алма-Ата: Наука, 1979. – 166 с.

17. *Агафонов, В.И.* Эффективность комплексной иммунизации брюшнотифозной вакциной с полианатоксином в сочетании с чумным и оспенным антигенами / В.И. Агафонов, Т.И. Булатова, Х.П. Гамлешко // Воен.-мед. журн. – 1978. – №10. – С. 51–54.

18. *Александров, Н.И.* Изучение условий заключительного этапа фермольной детоксикации первичных концентратов частично обезвреженных ботулинических токсинов типов А и В / Н.И. Александров, В.Н. Мельников, И.В. Воронцов и др. // Научные основы производств бактерийных и вирусных препаратов: мат-лы всесоюз. конф. – Уфа, 1969.

19. *Атаманова, Г.С.* Влияние солей кальция в культуре ботулинической палочки типа Е на изготовление и очистку ее токсина / Г.С. Атаманова, Е.Н. Воробьева // Там же. – С. 35–37.

20. *Афанасьева, Р.А.* Получение очищенных ботулинических анатоксинов типов А и В с использованием в качестве основы испытательной среды гидролизата кормовых дрожжей: дисс. ... канд. биол. наук. – Уфа, 1984.

21. *Воробьева, Е.Н.* Оценка некоторых методов концентрации и очистки ботулинических токсинов типа А и В // Научные основы производств бактерийных и вирусных препаратов: мат-лы всесоюз. научн. конф. – Уфа, 1969. – С. 31–33.

22. *Воробьева, Е.Н.* Хроматографическое разделение очищенных ботулинических анатоксинов типов А, В, Е на ионообменниках // Там же. – С. 33.

23. *Мельников, В.Н.* Сухой сорбированный секстаанатоксин / В.Н. Мельников, Ю.А. Шаронов, Ф.Ф. Чекмина и др. // Вопросы прикладной иммунологии. – Уфа, 1980. – С. 11–12.

24. *Мельников, В.Н.* К вопросу о соотношении прививочных доз компонентов сорбированного секстаанатоксина / В.Н. Мельников, Ф.Ф. Чекмина, С.Ю. Бикбулатова и др. // Там же. – С. 17–19.

25. *Чекмина, Ф.Ф.* Иммунологическая эффективность адсорбированного ботулинического трианатоксина при испытании на добровольцах // Научные основы производств бактерийных и вирусных препаратов: мат-лы всесоюз. науч. конф. – Уфа, 1969. – С. 7–8.

ГЛАВА 4

КЛИНИКО-ИММУНОЛОГИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ АССОЦИИРОВАННО-КОМПЛЕКСНЫХ ПРИВИВОК

Проведенные доклинические исследования оптимизированного секстаанатоксина и обоснование включения его в состав комплекса иммунобиологических лекарственных препаратов (КИЛП) показали удовлетворительную переносимость, умеренную реактогенность, выраженную иммунологическую эффективность и иммунологическую безопасность комплексно-ассоциированных прививок, что позволило приступить к очередному этапу исследований – клиническим испытаниям КИЛП на людях.

С этой целью был использован КИЛП, предназначенный для одновременного введения в организм животных секстаанатоксина (в одно место) и ассоциации живых оспенной и чумной вакцин (в другое место). При изложении результатов клинических исследований на людях указанного КИЛП мы провели сравнительную оценку его с другими комплексами, разработанными в другие сроки.

Иммунобиологические лекарственные препараты являются сильными внешними раздражителями, поэтому попадая во внутреннюю среду, они вызывают комплекс адаптационных реакций, связанных с иммунологической перестройкой организма.

Как известно, в организме непрерывно функционируют системы, которые поддерживают постоянство внутренней среды – гомеостаза [1, 2]. При воздействии внешних или внутренних факторов гомеостатические механизмы регулируют в определенных пределах функциональное состояние организма, под которым понимают интегральный комплекс энергетического, информационного, операционного, активационного и эффекторного обеспечения [3]. При этом предполагается наличие нескольких уровней оптимального состояния гомеостатического регулирования в зависимости

от характеристик механизмов мобилизации и развертывания физиологических резервов [4, 5, 6].

С физиологической точки зрения организм представляет собой комплекс гомеостатических и адаптационных реакций. Причем каждый организм обладает определенным диапазоном реакций, зависящим от особенностей его развития в условиях среды и адаптации к этим условиям [6, 7, 8, 9, 10].

Реализация адаптивных норм проходит не во всех случаях успешно, и гомеостатические реакции могут сводиться к состоянию адекватной мобилизации или к состоянию «динамического рассогласования» [1, 2].

При адекватной мобилизации имеется полное соответствие между степенью мобилизации функции и реальными требованиями, а при «динамическом рассогласовании» ответ организма либо не адекватен нагрузке, либо не превышает физиологические возможности организма.

Кроме того, под влиянием каких-то воздействий, в частности болезнетворных, возникают нормальные гомеостатические реакции, которые зачастую носят временный характер. Однако иногда новый гомеостатический уровень остается и после того, когда надобность в изменении отпала, формируясь в состояние, которое уже перестало быть закономерным обусловленным потребностям. Такое состояние определено как «устойчивое патологическое состояние» [11].

Это положение может быть отнесено к вакцинальной патологии и распространено на такие конкретные понятия, как «сенсибилизация организма», «иммунодефицитное состояние» и др. [12].

При этом необходимо оговорить, что эти понятия имеют отношение к прививочному делу не потому, что в редких случаях вакцинация является причиной такого состояния. Дело в том, что в настоящее время человек подвергается постоянному воздействию чужеродных веществ, так называемых «ксенобиотиков» [13]. Это, прежде всего, связано с загрязнением почвы, воды и воздуха химическими продуктами. А если учесть, что механизмы поддержания указанных устойчивых патологических состояний связываются с матрицами долгосрочной памяти, то рассматриваемая проблема становится очевидной [14].

Однако влияние вакцинации на организм мы рассматриваем и в прикладном плане. Нас интересует, как отражается вакцинация

на деятельности тех или иных конкретных систем и уровне работоспособности организма в целом. Этот вопрос, по нашему мнению, изучен недостаточно. В частности, имеются лишь единичные работы, в которых проводилась оценка влияния комплексных и ассоциированных прививок на функциональное состояние организма человека и его работоспособность [15, 16, 17, 18].

В данной работе мы ограничились рассмотрением влияния прививок на функциональное состояние тех систем организма, которые несут наибольшую нагрузку в обеспечении работоспособности человека.

Тем не менее, нами учитывалось, что полное представление о функциональном состоянии может быть создано только на основе интегральной оценки целого ряда функций организма, прямо или косвенно обусловливающих эффективность выполняемых человеком рабочих операций [19, 20, 21, 22].

Под термином «функциональное состояние организма» мы понимали «…совокупность характеристик физиологических функций и психологических качеств, определяющих уровень активности функциональных систем организма, особенно жизнедеятельности и состояние работоспособности человека» [9].

4.1. Переносимость и реактогенность комплексных и ассоциированных прививок

Рассматривая вопросы переносимости и реактогенности прививок невозможно не затронуть проблемы поствакцинальных (прививочных) реакций (ПВР). ПВР являются обязательным клиническим проявлением иммунного процесса, развивающегося в организме привитых. Они характеризуются определенным постоянством появления, характерным и стереотипным для данной вакцины течением, а также относительно быстрым и полным обратным развитием. При этом у отдельных вакцинированных могут возникнуть изменения различных функций организма, но они настолько нестойки и не резко выражены, что выявить их можно с помощью клинических, физиологических и инструментальных методов.

В нашей работе механизм развития и классификация поствакцинальных реакций не рассматриваются, подробное описание их

клинических проявлений и разработки способов профилактики и купирования подробно были рассмотрены нами в опубликованных ранее работах [18, 23, 24].

Бурное изучение ассоциированной и комплексной иммунизации в конце XX в. привели в нашей стране к разработке и внедрению в противоэпидемическую практику системы массовой комплексной и ассоциированной иммунизации, включающей ряд ассоциаций и комплексов, адаптированных к различным медико-географическим регионам страны и мира (табл. 4.1) [24].

В наших исследованиях анализу и обобщению будут подвергнуты данные о переносимости и реактогенности 5 вакцинных комплексов (ВК):

ВК № 1 – С+ (ВОЖС+ВЧЖС);
ВК № 2 – (С+БТВ+СТВ)(ВОЖС+ВЧЖС);
ВК №3 – (БТВ+ХВ)(ВОЖС+ВЧЖС)+Иг;
ВК №4 – (С+ХВ+ВЖЛ)(ВОЖС+ВЧЖС);
ВК №5 – С+(ВКЭ+ВОЖС+ВЧЖС).

Углубленное медицинское наблюдение показало, что в поствакцинальном периоде через 6–8 ч после иммунизации изучаемыми ВК у ряда привитых развивались ПВР, которые наряду с повышением температуры тела сопровождались субъективными клиническими симптомами.

На рис. 4.1 представлена их характеристика. Видно, что чаще всего вакцинированные жаловались на общее недомогание, слабость (37,1%), головную боль (37,3%), головокружение (16,3%), боли в мышцах и суставах (11,9%), диспепсические расстройства (3,0%) и предъявляли другие жалобы (8,9%).

Указанные клинические симптомы к 12 ч достигали максимума развития (53,3%) и практически полностью исчезали к 48 ч (рис. 4.2), при этом частота развития субъективных клинических признаков у привитых существенно отличалась в зависимости от состава вакцинного комплекса (рис. 4.3).

Так, иммунизация ВК № 2 (С+БТВ+СТВ)(ВОЖС+ВЧЖС) обусловливала развитие общей слабости, недомогания у 44,3%, головной боли – у 49,4% и головокружения – у 24,4% привитых.

Прививки ВК № 3 сопровождались появлением у 48,2% вакцинированных общего недомогания и слабости, у 41,1% – болей

Таблица 4.1

Комплексы иммунобиологических лекарственных препаратов и их ассоциации, разрешенные к применению в чрезвычайных эпидемических ситуациях

Ассоциация, комплекс ИЛП	Иммунизирующая доза ИЛП (смеси), мл, вводимая в одно место	Кратность иммунизации, количество мест введения ИЛП
(ВОЖС+ВЧЖС) + + (БТВ+СТВ+С)	(ВОЖС+ВЧЖС) – 1,0 (БТВ+СТВ+С) – 2,0	Однократно, два места
(ВОЖС+ВЧЖС) + + (ВЖЛ+ХВ+С)	((ВОЖС+ВЧЖС) – 1,0 (ВЖЛ+ХВ+С) – 1,0	Однократно, два места
(ВОЖС+ВЧЖС+ВВЭЛ) + + (ВЖЛ+ХВ+С)	((ВОЖС+ВЧЖС+ +ВВЭЛ) 1,0 (ВЖЛ+ХВ+С) – 1,0 ВВЭЛ – 1,0	Однократно, два места ВВЭЛ – двукратно: первая прививка – за 30 сут до или через 30 сут после введения ассоциации
(ВОЖС+ВЧЖС) + + (БТВ+ХВ) + + Иг	(ВОЖС+ВЧЖС) – 1,0 (БТВ+ХВ) – 1,0 Иг – 1,5	Однократно, три места
(ВОЖС+ВЧЖС +С) + + ВКЭ	(ВОЖС+ВЧЖС + +С) – 1,0 ВКЭ – 0,5	Однократно, два места ВКЭ – двукратно: первая прививка – за 2–7 мес до или 2–7 мес после введения комплекса
(ВОЖС+ВЧЖС +ВВЭЛ)	(ВОЖС+ВЧЖС+ +ВВЭЛ)– 1,0 ВВЭЛ – 1,0	Однократно, одно место ВВЭЛ – двукратно: первая прививка – за 30 сут до или через 30 сут после введения ассоциации
(ВОЖС+ВЧЖС +С)	1,0	Однократно, одно место
(БТВ+СТВ+С)	2,0	Однократно, одно место
(ВЖЛ+ХВ+С)	1,0	Однократно, одно место
(ВОЖС+ВЧЖС)	1,0	Однократно, одно место
(БТВ+ВОЖС)	1,0	Однократно, одно место
(БТВ+ХВ)	1,0	Однократно, одно место
(БТВ+СТВ)	1,0	Однократно, одно место
(БТВ+С)	2,0	Однократно, одно место
(СТВ+С)	1,0	Однократно, одно место
(ВЖЛ+ХВ)	1,0	Однократно, одно место
(ВЖЛ+С)	1,0	Однократно, одно место
(ХВ+С)	1,0	Однократно, одно место

Примечания. 1. Все ИЛП вводятся подкожно, за исключением иммуноглобулина, который применяют внутримышечно.

2. ЧВ можно применять аэрозольно.

3. Из состава вакцинных комплексов и ассоциаций ИЛП может быть исключен любой из препаратов.

Рис. 4.1. Частота развития субъективных клинических симптомов при иммунизации изученными вакцинными комплексами (усредненные показатели)

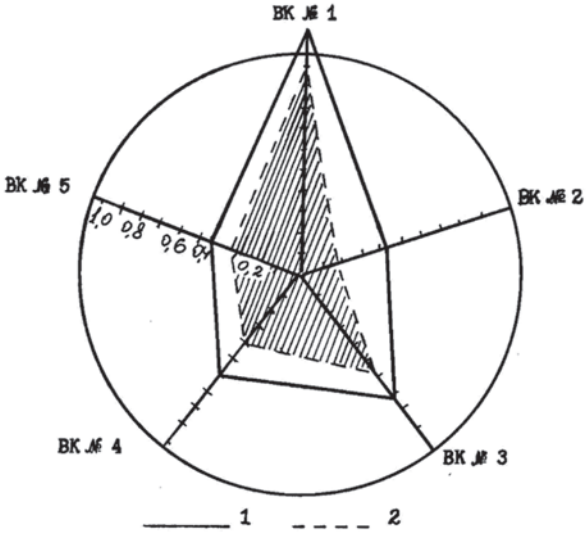

Рис. 4.2. Динамика развития клинических симптомов при иммунизации изученными вакцинными комплексами

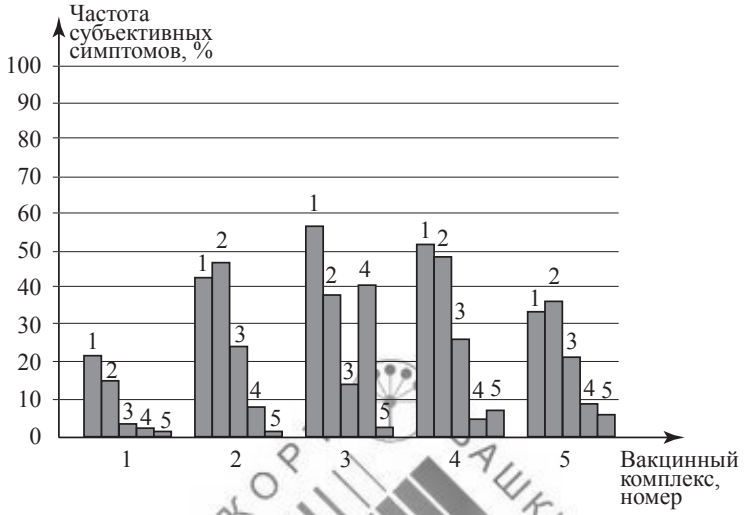

Рис. 4.3. Частота субъективных клинических симптомов через 12 ч после иммунизации изученными вакцинными комплексами: 1 – общее недомогание; 2 – головная боль; 3 – головокружение; 4 – боли в мышцах и суставах; 5 – диспепсические расстройства

в мышцах и суставах и у 38,4% – головной боли. 49,1% иммунизированных ВК №4 (С+ХВ+ВЖЛ)(ВОЖС+ВЧЖС) предъявляли жалобы на головную боль, 41,3% – на общую слабость и недомогание, а 25,0% – на головокружение. Показатели нарушения общего состояния у привитых ВК №5 были выражены менее значительно, однако 35,0% из них жаловались на головную боль, 30,3% – на общее недомогание и слабость, 19,9% – на головокружение. Введение ИЛП по схеме ВК № 1 С+(ВОЖС+ВЧЖС) приводило к появлению общей слабости и недомогания у 21,0% обследованных, головных болей – у 16,6%.

Частота проявления симптомов общей интоксикации у привитых возрастала пропорционально интенсивности лихорадочной реакции (рис. 4.4).

Вакцинированные, отреагировавшие развитием сильных температурных реакций (>38,5 °С), жаловались на общее недомогание и слабость (90%), головную боль (85%), головокружение, боли в мышцах и суставах (50%) диспепсические расстройства (15%).

Средние по тяжести течения ПВР (37,6–38,5 °С) сопровождались общим недомоганием и слабостью (75%), головной болью

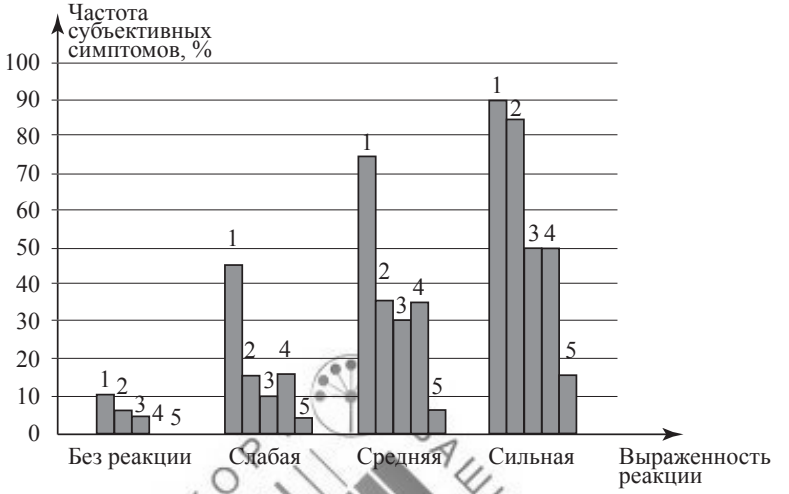

Рис. 4.4. Частота субъективных клинических симптомов в зависимости от выраженности температурной реакции: 1 – общее недомогание; 2 – головная боль; 3 – головокружение; 4 – боли в мышцах и суставах; 5 – диспепсические расстройства

(35%), головокружением (30%), болями в мышцах и суставах (35%) и диспепсическими расстройствами (5%).

У иммунизированных, отреагировавших развитием слабых ПВР (37,1–37,5 °С), в 45% случаев наблюдались общее недомогание и слабость, 15% – головная боль, 10% – головокружение и слабость и 15% – диспепсические расстройства.

Важно подчеркнуть, что 10% вакцинированных без температурных реакций предъявляли жалобы на общее недомогание и слабость, а 5% – на головную боль и головокружение.

При изучении особенностей клинических проявлений комплексно-ассоциированных прививок изучаемыми ВК установлено, что в поствакцинальном периоде развивался характерный симтомокомплекс. При осмотре у отдельных вакцинированных отмечались гиперемия кожи лица и инъекция сосудов конъюнктивы. Язык сухой, обложен сероватым налетом. В легких дыхание везикулярное, хрипы не прослушивались. При перкуторном и аускультативном обследовании сердца патологических изменений не выявлено. Частота сердечных сокращений в основном соответствовала

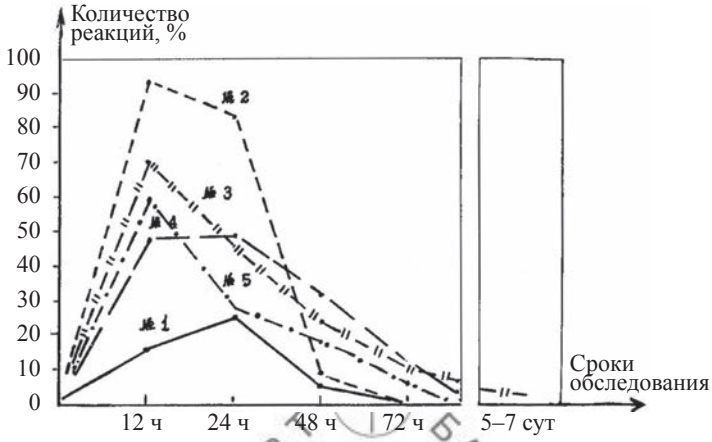

Рис. 4.5. Динамика развития общих поствакцинальных реакций при комплексной и ассоциированной иммунизации изученными вакцинными комплексами

выраженности температурной реакции. Живот мягкий, безболезненный; печень и селезенка не увеличены. Стул и мочеиспускание не нарушены.

Наряду с изучением субъективных показателей клинического течения поствакцинального периода была проведена оценка общей реактогенности изученных ВК по высоте температурной реакции.

На рис. 4.5 представлена динамика развития общих ПВР при комплексно-ассоциированной иммунизации изученными ВК. Из представленных данных видно, что наиболее реактогенным являлся ВК № 2, который через 12 ч после введения в организм обусловливал развитие общих ПВР у 92,5% привитых. Наименьшее количество реакций в этот срок наблюдения было зарегистрировано после инъекции ВК №1 – 14,3%. Промежуточное положение по реактогенности занимали комплексы №3 – 70,0%, №5 – 58,8% и № 4 – 47,8%.

Важно подчеркнуть, что динамика общих ПВР на введение изученных ВК существенно различалась. Так, через 24 ч после иммунизации ВК № 2, 3 и 5 количество общих ПВР снижалось до 82,2%; 46,3% и 49,4%, соответственно.

В то же время прививки комплексами № 1 и 4, напротив, обусловливали увеличение количества общих ПВР до 24,7% и 49,4% соответственно.

На показатели общей реактогенности комплексно-ассоциированных прививок существенное влияние оказывали особенности вакцинных препаратов, входящих в состав изучаемого комплекса, и методы их аппликации.

При ассоциированной иммунизации по схеме (С+ВОЖС+ВЧЖС) пик развития температурных реакций был зарегистрирован через 24 ч после прививки у 24,7% вакцинированных. При этом средние реакции отмечались лишь у 2,1% привитых лиц. Сильные ПВР отсутствовали.

Реактогенность монопрепаратов (секстаанатоксин, ВОЖС и ВЧЖС) при их введении подкожно-безыгольным методом по общему количеству температурных реакций достоверно не отличалась от реактогенности ВК №1 и колебалась в пределах 20,0–27,1% (рис. 4.6). В то же время ВЧЖС вызывала большее количество (12,5%) средних температурных реакций, чем ее ассоциированное применение в составе ВК №1.

В целом же ассоциированное введение трех вакцинных препаратов приводило к изменению частоты развития и тяжести общих реакций, характерных для отдельных монопрепаратов, входящих в изучаемый комплекс.

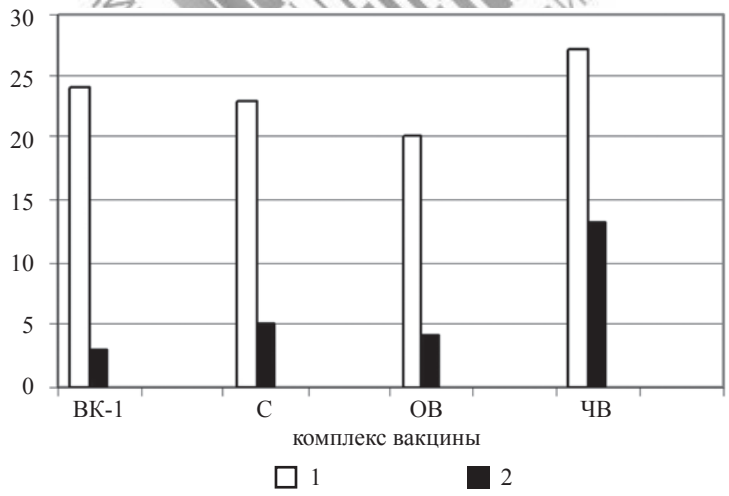

Рис. 4.6. Структура поствакцинальных реакций через 24 ч после иммунизации вакцинным комплексом № 1: 1 – общее количество поствакцинальных реакций, 2 – сумма средних и сильных реакций

Через 12 ч после инъекции ВК №1 температурные реакции регистрировались у 14,3% привитых, из них в средней по тяжести форме – у 4,2%. К 48 ч лихорадка отмечалась лишь у 4,7% привитых и проявлялась только в легкой форме, практически исчезая к 3 сут.

Иммунизация ВК №2 через 12 ч вызывала развитие ПВР у 92,5% привитых, причем практически половина из них (45,5%) относилась к средним. В этот срок было зарегистрировано 2,4% сильных температурных реакций (рис. 4.7). При этом количество случаев временной утраты трудоспособности привитых составляло 1,8% от общего числа иммунизированных изученным комплексом. Через 1 сут после комплексной иммунизации количество общих ПВР снизилось до 82%, большая часть из которых относилась к слабым. Через 48 ч после прививки температурный показатель у вакцинированных практически нормализовался.

Исследование реактогенности монопрепаратов, входящих в изучаемый комплекс, показало, что общие ПВР были наиболее выражены через 12 ч после иммунизации и относились в основном к слабым. Иммунизация смесями вакцин (С+БТВ+СТВ) и (БТВ+СТВ) характеризовалась более выраженной реактогенностью по сравнению с прививками монопрепаратами. Максимальное

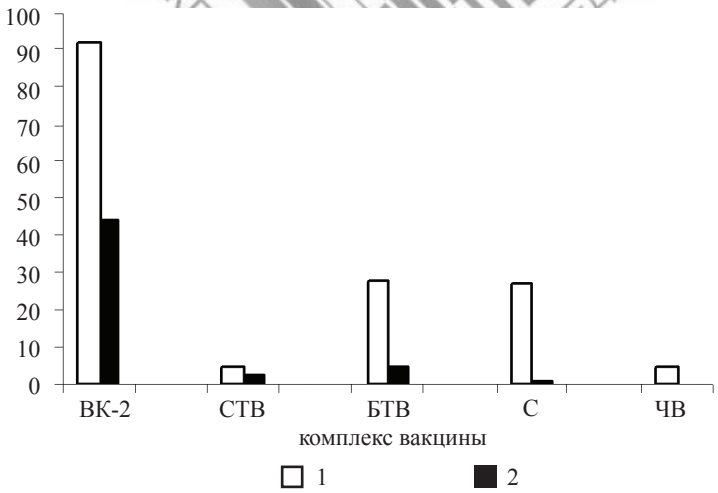

Рис. 4.7. Структура поствакцинальных реакций через 24 ч после иммунизации вакцинным комплексом № 2 (усл. обозн. см. на рис. 4.6)

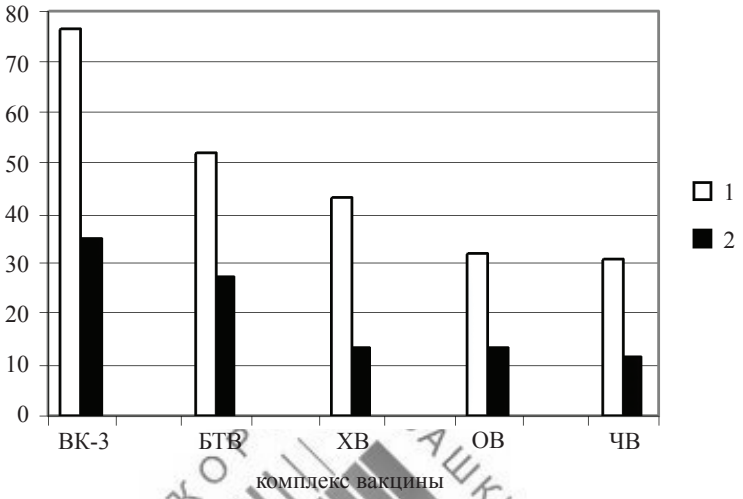

Рис. 4.8. Структура поствакцинальных реакций через 24 ч после иммунизации вакцинным комплексом № 3 (усл. обозн. см. на рис. 4.6)

количество температурных реакций также отмечалось через 12 ч (46,2% и 34,8%), из них в средней форме тяжести было зарегистрировано соответственно 33,3% и 1,8%. Спустя 24 ч количество общих ПВР существенно снизилось и через 2 сут отмечались лишь единичные случаи со слабыми температурными реакциями.

Максимальное количество общих ПВР у иммунизированных ВК 3 было зарегистрировано через 12 ч после прививки и составляло 70,0% (рис. 4.8). Причем у 47,3% вакцинированных они протекали в легкой форме тяжести и у 23,6% – в средней.

В последующие сроки наблюдения эти показатели снижались, полностью нормализуясь к пятым суткам. Сильных ПВР и утраты трудоспособности отмечено не было. Из всех ИЛП, входящих в ВК №3, наиболее реактогенной оказалась брюшнотифозная химическая сорбированная вакцина, вызывающая через 12 ч после введения развитие общих ПВР у 58,6% иммунизированных. Сумма сильных и средних реакций составила 30,2%, при этом сильные реакции – 1,3%. Через 24 ч после прививки БТВ количество общих ПВР снизилось до 36,0%, а средних – до 7,5%. Сильные реакции в этот период наблюдения отсутствовали. В дальнейшем общие ПВР не регистрировались.

Остальные монопрепараты (холерная, оспенная и чумная), входящие в изучаемый комплекс, при раздельном введении в организм также обусловливали повышение температуры тела у части привитых через 12 – 24–48 ч после иммунизации. Однако количество и интенсивность общих реакций в этом случае оказались ниже, чем при иммунизации БТВ. Вместе с тем отмечено, что через 12 ч после инъекции этих монопрепаратов у части привитых развивались сильные реакции (до 3%). Через 24 ч наблюдались только слабые и средние ПВР.

Сочетание БТВ+ХВ было наиболее реактогенным через 12 ч после введения в организм, когда у 46,1% привитых были зарегистрированы температурные реакции. При этом у 5,4% иммунизированных лиц отмечались сильные реакции. Через 24 ч наблюдалось существенное снижение количества общих ПВР (27,2%), сильные реакции при этом отсутствовали. Через 2 сут общее количество ПВР составляло 18,0%, причем все они протекали в легкой форме.

Ассоциированное применение живых чумной и оспенной вакцин (ВОЖС+ВЧЖС) вызывало через 12 ч развитие общих реакций у 4% вакцинированных, при этом у 7,3% они протекали в средней форме тяжести. Через 24 ч после иммунизации общее количество реакций в этой группе снизилось до 40,1%, а число средних, напротив, возросло до 14,5%. В последующие сроки наблюдались только слабые реакции и количество их существенно уменьшилось: через 2 сут их было 12,1%, через 3 сут – 9,0%, а через 5 сут – всего 3,0%.

Применение ВК № 4 сопровождалось развитием лихорадочной реакции, преимущественно слабой степени выраженности почти у половины привитых (рис. 4.9). Максимальное повышение температуры отмечали через 24 ч после прививки. Лихорадка продолжалась не более 12–48 ч и к третьим суткам температура тела практически нормализовалась. Общая реактогенность прививок ВК №4 через 24 ч после иммунизации составила 49,4%. При этом сильные общие реакции достигали 3,3%, а средние выявлялись в 23,2% случаев.

При изучении реактогенности монопрепаратов, входящих в изучаемый комплекс, установлено, что наиболее реактогенными являлись тетраанатоксин, холерная и оспенная вакцины, вызывавшие через 24 ч после иммунизации повышение температуры тела у 42,3%, 19,1% и 20,0% привитых (рис. 4.9). При этом сильные реакции отсутствовали во всех группах во все сроки наблюдения,

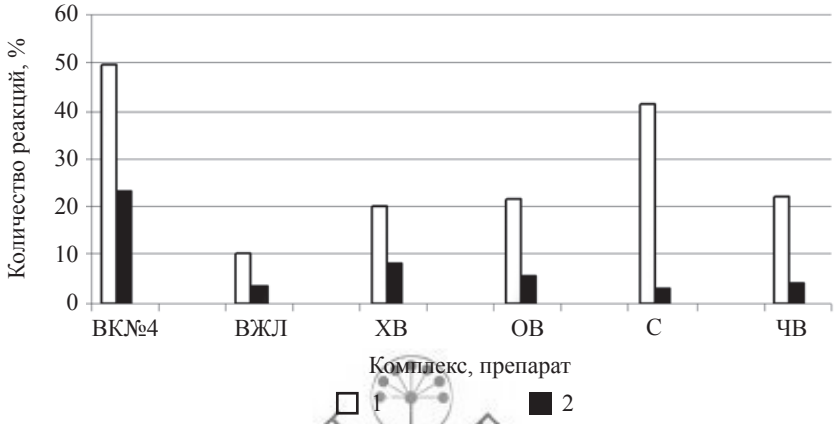

Рис. 4.9. Структура поствакцинальных реакций через 24 ч после иммунизации вакцинным комплексом №4 (усл. обозн. см. на рис. 4.6)

а средние отмечались в небольшом проценте случаев лишь через 12 и 24 ч.

Анализ реактогенности прививок монопрепаратами, ассоциациями из двух или трех вакцин, а также комплексом из пяти ИЛП позволил установить влияние отдельных препаратов на характер реактогенности ВК в целом. Так, реактогенность тройных сочетаний препаратов ВЖЛ+ВОЖС+ВЧЖС и ВЖЛ+ХВ+С была практически одинакова (41,5 и 37,8%), хотя количество температурных реакций в случае двойных ассоциаций (без включения ВЖЛ) существенно различалось: 28,3% и 43,4% ($P \leq 0,01$).

Следовательно, присоединение ВЖЛ к ВОЖС и ВЧЖС повышало реактогенность ассоциации; включение ее в состав смеси (ХВ+С) снижало реактогенность.

В то же время была зарегистрирована практически одинаковая реактогенность ВК № 4 с реактогенностью ассоциаций (ОВ+ЧВ) и (С+ХВ), количество общих реакций при которых составляло соответственно 49,4%, 40,3% и 45,7%. Этот факт свидетельствует о том, что ВЖЛ практически не оказывала влияния на реактогенность комплекса в целом.

С другой стороны, есть основание утверждать, что С является тем препаратом, который определяет степень реактогенности ВК. На это, в частности, указывает тот факт, что при иммунизации смесью

ВЖЛ+ХВ через 24 ч температурные реакции наблюдались в 4% случаев, а при введении С+ХВ они были зарегистрированы в 43,4% случаев.

Изучение динамики развития ПВР показало, что «пик» реактогенности ВК приходился на 24 ч после прививки, хотя высота и интенсивность их развития были различными. В дальнейшем выраженность общих ПВР уменьшалась, и полное их исчезновение происходило к 3–4 сут. Количество случаев кратковременной утраты работоспособности вакцинированных не превышало 2%.

Иммунизация ВК №5 – С+(ВОЖС+ВЧЖС) сопровождалась развитием лихорадочных состояний у 58,8% привитых, причем количество средних реакций составляло 28,8%, а сильных – 2,2% (рис. 4.10). Средняя продолжительность лихорадки колебалась от 13 до 16 ч.

При введении монопрепаратов, входящих в изучаемый ВК, преобладали слабые реакции, сильные температурные реакции отсутствовали, а средние отмечались в единичных случаях.

Иммунизация смесями ИЛП характеризовалась более выраженной реактогенностью по сравнению с прививками монопрепаратами, но определялась в основном составом вакцин, входящих

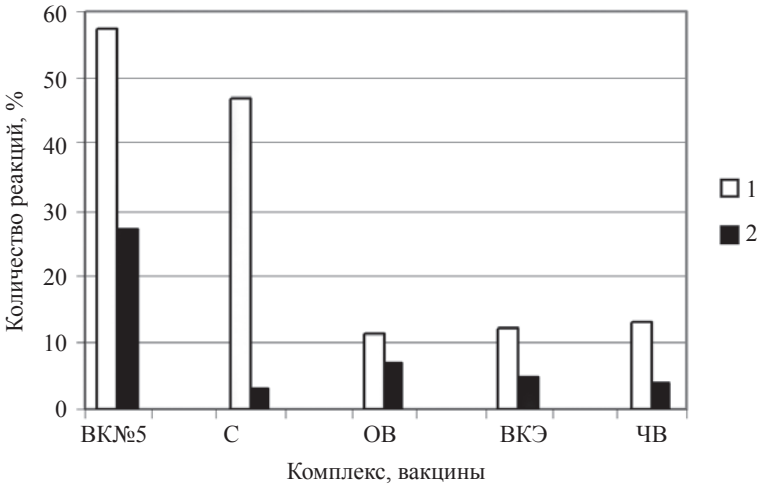

Рис. 4.10. Структура поствакцинальных реакций через 24 ч после иммунизации вакцинным комплексом № 5 (усл. обозн. см. на рис. 4.6)

в ассоциацию. Так, реактогенность С через 24 ч после вакцинации составляла 48,8%, ассоциации С+ВОЖС+ВЧЖС – 43,9%, а С+ВКЭ – 31,7%; через 48 ч – 4,9%, 17,0% и 0% соответственно.

Сильные температурные реакции (2,4%) были зарегистрированы только при иммунизации ассоциацией вакцин С+ВОЖС+ВЧЖС.

Таким образом, все изученные ВК характеризовались достаточно выраженной реактогенностью, однако она практически находилась на уровне реактогенности монопрепаратов, входящих в их состав. Проведенные исследования показали, что ИЛП, входящие в изучаемые ВК, отличались по показателям реактогенности, поэтому представлялось важным определить вклад каждого монопрепарата в общую реактогенность составленных из них комплексов. Результаты исследований представлены на рис. 4.11.

Как видно из рис. 4.11, наиболее значимыми в этом отношении являлись сорбированные на гидроокиси алюминия ИЛП. Так, на долю С приходилось 64,6%, БТВ – 69,4% и ХВ – 54,1% всех случаев реакций от общей реактогенности ВК. Вклад живых вакцин был

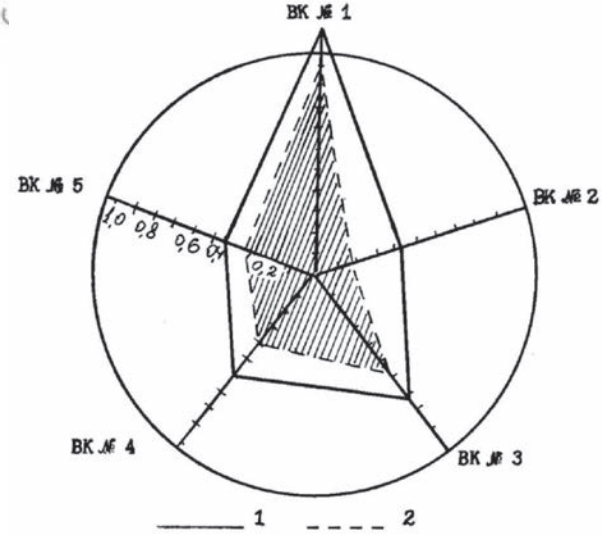

Рис. 4.11. Удельный вес монопрепаратов в общей реактогенности вакцинных комплексов: 1 – общее количество поствакцинальных реакций, отн. ед.; 2 – сумма средних и сильных реакций, отн. ед.

значительно меньшим: ВОЖС вызывала развитие ПВР у 28,6%, ВЧЖС – у 33,2% и ВЖЛ – у 16,6% обследованных. Удельный вес ВКЭ и СТВ был крайне низок. В частности, ВКЭ вызывала 18,1%, а СТВ – всего 6,9% реакций.

Ассоциированное применение вакцин, входящих в изучаемые ВК, обусловливало более высокие показатели общей реактогенности, чем использование их в виде монопрепаратов. Однако не всех случаях реактогенность ВК или ассоциаций ИЛП, входящих в них, определялась свойствами наиболее реактогенного монопрепарата. Это свидетельствует о том, что реактогенность комплексных или ассоциированных прививок представляет собой не сумму общих ПВР, а является сложной ответной реакцией организма, интимные механизмы которой нуждаются в специфическом изучении.

Наряду с изучением общей реактогенности комплексно-ассоциированных прививок анализу были подвергнуты местные ПВР, которые проявлялись в виде гиперемии, инфильтратов, отеков и регионарных лимфаденитов. Наблюдения были проведены через 12, 24, 36, 48, 72 ч, на 5 и 7 сут после иммунизации.

Общая характеристика и структура местных ПВР представлены на рис. 4.12. Наибольшее количество инфильтратов развивалось при подкожно-безыгольном введении ВК № 4 – 78% и № 5 – 55,6%. Отеки развивались в 36,3% случаев после инъекции ВК №1, а лимфадениты – 71,4% – ВК №3.

Анализ этих показателей свидетельствует о том, что местная реактогенность зависела как от состава ВК, так и особенностей входящих в него монопрепаратов и т.д.

В частности, частота и степень выраженности местных реакций при ассоциированной иммунизации ВК №1 определялась в основном локальными повреждениями при подкожно-безыгольном введении сорбированного С (рис. 4.13). Через 24 ч после иммунизации как С, так и ВК №1 у части привитых на месте введения препаратов развивались инфильтраты воспалительно-травматического характера. У большинства вакцинированных (32,0%) они проявлялись в легкой форме (< 2,5 см в диаметре) и лишь у 5,8% – в средней (размеры инфильтратов – 2,5–5,0 см). Сильных реакций по этому показателю зарегистрировано не было.

Через 12–24 ч после прививки у части вакцинированных развивались отеки кожи и подкожной клетчатки, которые отмечались

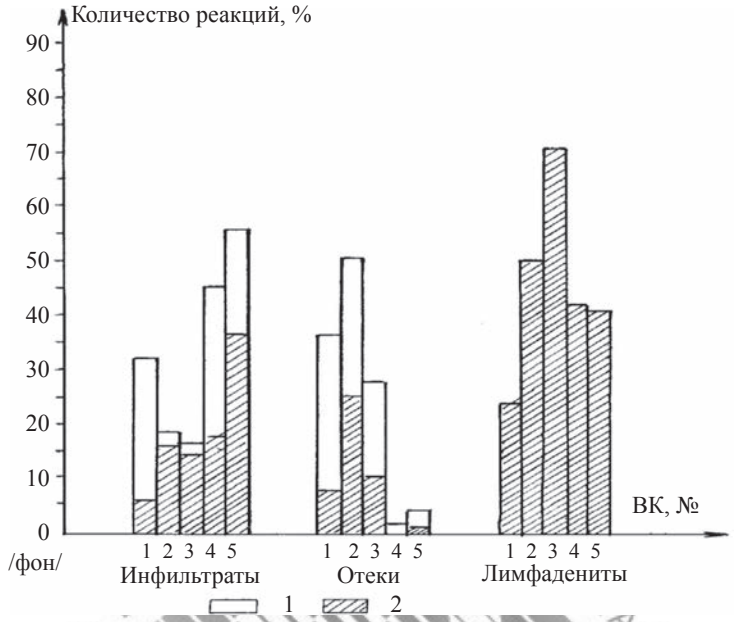

Рис. 4.12. Характеристика местных поствакцинальных реакций при иммунизации изученными вакцинными комплексами: 1 – общее количество реакций; 2 – сумма средних и сильных реакций

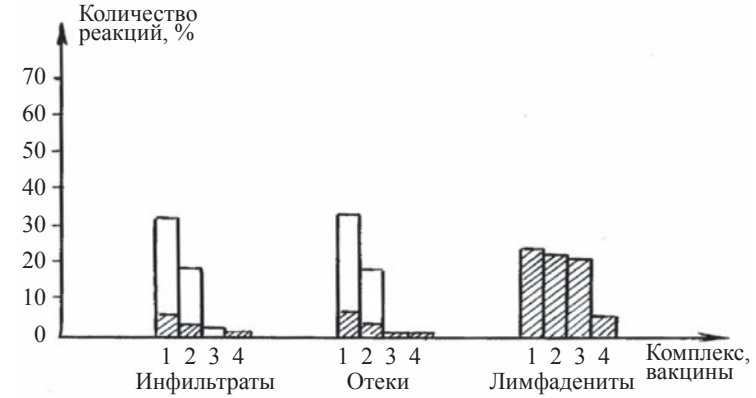

Рис. 4.13. Местная реактогенность вакцинного комплекса №1 через 24–48 ч после иммунизации: 1 – ВК № 1; 2 – секстаанатоксин; 3 – живая оспенная вакцина; 4 – живая чумная вакцина (усл. обозн. см. на рис. 4.12)

при введении С (19,2%) и ВК №1 – (36,3%). У незначительной части привитых (1,4%) выявлялись массивные отеки, превышающие в диаметре 10,0 см. Однако следует подчеркнуть, что даже выраженные местные изменения, которые полностью рассасывались к 3 сут, легко переносились вакцинированными и не оказывали существенного отрицательного влияния на работоспособность.

Регионарные подмышечные лимфадениты возникали относительно редко и регистрировались у иммунизированных ВК №1 (24,7%), а также монопрепаратами (С, ВОЖС) не более чем в 25,0% случаев, а при введении ВЧЖС – в 5,2%. Необходимо подчеркнуть, что местная реактогенность С при первичной ревакцинации (III прививка) была ниже, чем при первичной вакцинации.

Местные ПВР на комплексную иммунизацию ВК №2 по характеру и количеству наблюдаемых проявлений существенно не отличалась от реакций входящих в него ассоциаций (рис. 4.14). Так, через 24 ч после подкожно-безыгольного введения ассоциации (С+БТВ+СТВ) инфильтраты средних размеров (2,5–5,0 см в диаметре) наблюдались в 14,5% случаев, а более 5,0 см – в 13,5% случаев. Отеки размером от 5,0 до 10,0 см были зарегистрированы в 40,0% случаев, а более 10,0 см – 9,5 % случаев. Регионарные лимфадениты формировались у 33,3% привитых.

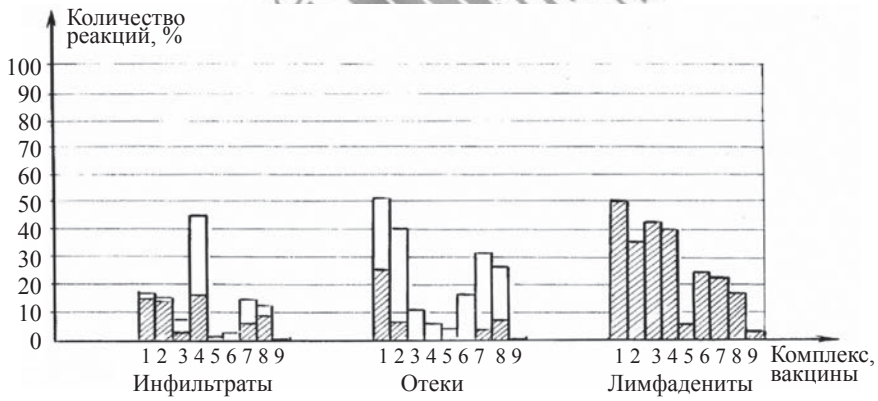

Рис. 4.14. Местная реактогенность вакцинного комплекса № 2 через 24 – 48 ч после иммунизации: 1 – ВК; 2 – С+БТВ+СТВ; 3 – БТВ+СТВ; 4 – ВОЖС+ВЧЖС; 5 – СТВ; 6 – БТВ; 7 – С; 8 – ВОЖС; 9 – ВЧЖС (усл. обозн. см. на рис. 4.12)

Одновременное введение в другое анатомическое место тела ассоциации (ВОЖС+ВЧЖС) вызывало у 46,3% привитых развитие инфильтратов размером от 2,5 до 5,0 см и у 16,6% – более 5,9 см. Отеки диаметром от 5,0 до 10,0 см развивались в 7,4% случаев, а более 10, 0 см – не выявлялись. Максимальное количество регионарных лимфаденитов, развивающихся в ответ на введение этой смеси ИЛП. Было отмечено через 2 сут после иммунизации у 40,7% привитых.

Прививки ВК №2 обусловливали у 50,0% вакцинированных развитие регионарных лимфаденитов, а у 8,8% – лимфангоитов.

У иммунизированных монопрепаратами местные ПВР, регистрируемые в виде подкожных инфильтратов, не превышали у большинства обследованных 0,2–0,5 см в диаметре. Через 12–24 ч после иммунизации наблюдались отеки кожи и подкожной клетчатки диаметром до 5,0 см у привитых С – 30,4%, БТВ – 17,5% и ВОЖС – 28,3% случаев. Среди вакцинированных в этих группах были отмечены единичные массивные отеки, превышающие в диаметре 10,0 см. К 7 сут после прививки отеки кожи и подкожной клетчатки полностью исчезали. У иммунизированных СТВ в первые сутки после прививки наблюдались лишь кратковременная гиперемия и незначительный отек кожи и подкожной клетчатки. Местные реакции на введение ВЧЖС были выражены слабо.

Подкожно-безыгольное введение ВК № 3 характеризовалось болезненностью в месте аппликации ИЛП, гиперемией и инфильтрацией кожи, подкожной клетчатки, отеками и регионарными подмышечными лимфаденитами (рис. 4.15). Инфильтраты развивались у 16,4%, отеки – у 27,8% и лимфадениты – у 70,4% привитых.

Совместное применение (ВОЖС+ВЧЖС) характеризовалось менее выраженными местными реакциями. Так, инфильтраты формировались у 9,4%, отеки – у 12,0% привитых. Однако эта смесь ИЛП также приводила к развитию большого количества лимфаденитов (61,0%).

При использовании химической сорбированной брюшнотифозной вакцины инфильтраты были зарегистрированы в 14,2% случаев, отеки – 21,2% и лимфадениты – в 65,4% случаев. При этом инфильтраты сохранялись у большинства иммунизированных в течение 7–12 сут, а у отдельных вакцинированных – до 30 сут.

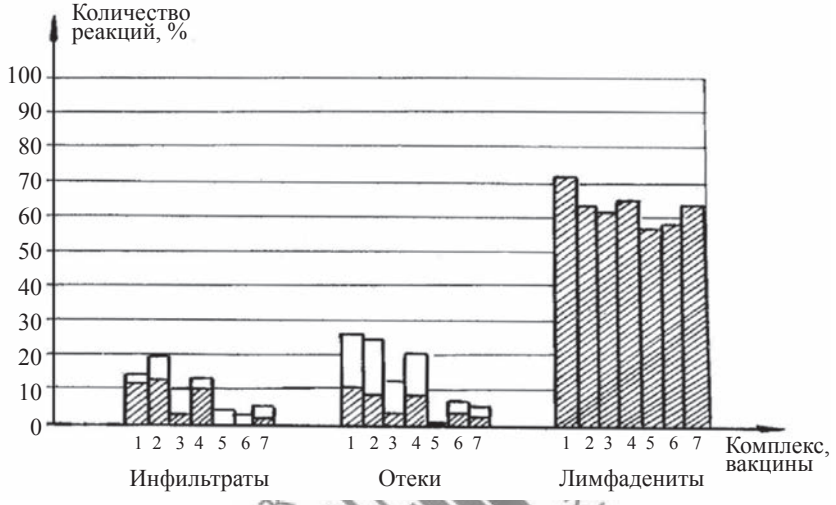

Рис. 4.15. Местная реактогенность вакцинного комплекса № 3 через 24–48 ч после иммунизации: 1 – ВК №3; 2 – БТВ+ХА; 3 – ВОЖС+ВЧЖС; 4 – БТВ; 5 – ХА; 6 – ВОЖС; 7 – ВЧЖС (усл. обозн. см. на рис. 4.12)

При применении несорбированных ИЛП (ВОЖС, ВЧЖС) инфильтраты воспалительно-травматического характера наблюдались у незначительного количества привитых в течение первых суток и у подавляющего большинства иммунизированных не превышали 0,3–0,5 см в диаметре. Количество лимфаденитов в группах привитых монопрепаратами было также достаточно большим и составляло для БТВ – 65,4%, ХВ – 58,5%, ВОЖС – 59,4% и ВЧЖС – 63,8%.

Местные ПВР при подкожно-безыгольной иммунизации ВК № 4 также развивались в виде инфильтратов воспалительно-травматического характера кожи и подкожной клетчатки (рис. 4.16). Максимального развития они достигали через 48 ч. При этом введение ВК № 4 (С+ХВ+ВЖЛ)(ВОЖС+ВЧЖС) вызывало развитие инфильтратов у 45,2%. В то же время отечность мягких тканей в месте ведения указанных ИЛП выявлялась в 1,6% случаев. Количество лимфаденитов составляло при иммунизации ВК №4 – 49,2%.

Ассоциация вакцин (С+ХВ+ВЖЛ) обусловливала развитие инфильтратов у 60,0% привитых, из них инфильтраты в диаметре $\geq$ 5,0 см составляли 27,1%. При инъекции смеси вакцин

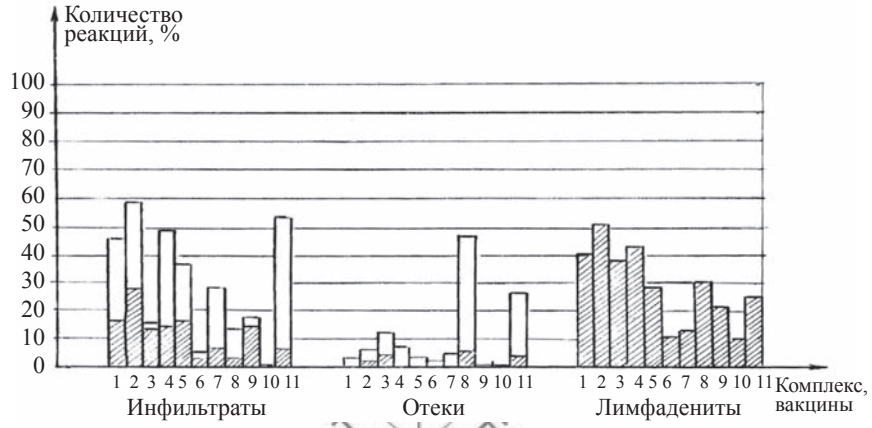

Рис. 4.16. Местная реактогенность вакцинного комплекса № 4 через 24–48 ч после иммунизации: 1 – ВК №4; 2 – С+ХА+ВЖЛ; 3 – ВОЖС+ВЧЖС; 4 – ВЖЛ+ВОЖС+ВЧЖС; 5 – С+ХА; 6 – ВЖЛ+ХВ; 7 – ВЖЛ; 8 – ВОЖС; 9 – ХВ; 10 – ВЧЖС; 11 – С (усл. обозн. см. на рис. 4.12)

(ВОЖС+ВЧЖС) инфильтраты были зарегистрированы у 50,8% иммунизированных.

Важно выделить тот факт, что перечисленные ассоциации ИЛП обусловливали минимальное развитие отеков. В то же время количество лимфаденитов было достаточно высоким и составляло при иммунизации смесью (С+ХВ+ВЖЛ) – 52,4%, (ВОЖС+ВЧЖС) – 37,5%, (ВЖЛ+ВОЖС+ВЧЖС) – 44,7%, (С+ХВ) – 29,7% и (ВЖЛ +ХВ) – 9,8%.

Из монопрепаратов наиболее выраженной местной реактогенностью обладал С. Его подкожно-безыгольное введение вызывало формирование инфильтратов у 54,3%, отеков – 28,8% и лимфаденитов – у 26,1% привитых. Наименее реактогенными оказались ВЧЖС и ВЖЛ.

Местные реакции, развивавшиеся после введения ВК №5, принципиально не отличались от таковых при описанных ранее ВК. Они также характеризовались гиперемией, инфильтратами, отеками и лимфаденитами. Комплексно-ассоциированное применение ИЛП в составе ВК №5 С+(ВКЭ+ВОЖС+ВЧЖС) обусловливало развитие инфильтратов у 55,6% привитых, причем у 36,7% обследованных они протекали в средней и сильной формах (рис. 4.17)

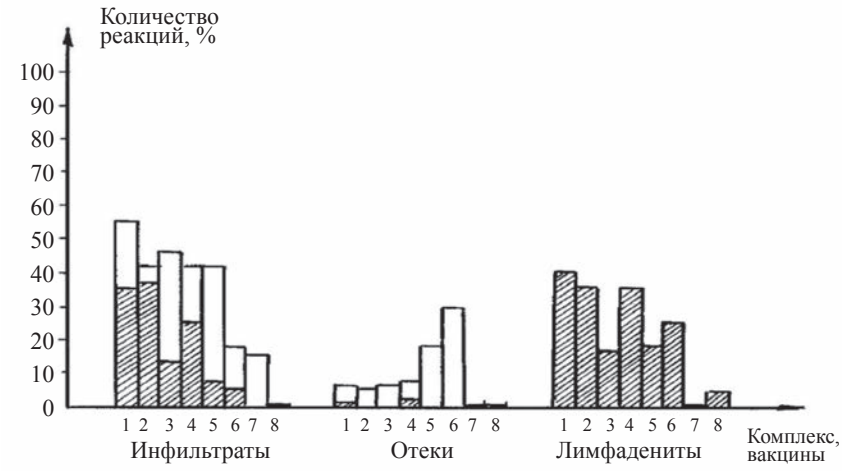

Рис. 4.17. Местная реактогенность вакцинного комплекса № 5 через 24–48 ч после иммунизации: 1 – ВК №5; 2 – С+ХА+ВЖЛ; 3 – ВОЖС+ВЧЖС; 4 – ВЖЛ+ ВОЖС+ВЧЖС; 5 – С+ХА; 6 – ВЖЛ+ХВ; 7 – ВЖЛ; 8 – ВОЖС; 9 – ХВ; 10 – ВЧЖС; 11 – С (усл. обозн. см. на рис. 4.12)

Отеки при иммунизации ВК №5 были выражены незначительно и регистрировались у 4,4% привитых, а количество лимфаденитов, напротив, возрастало до 41,1%. При иммунизации смесью ИЛП количество инфильтратов было достаточно высоким и составляло у привитых ассоциацией ВКЭ+ВОЖС+ВЧЖС 37,2%. Отечность тканей после введения указанной ассоциации ИЛП не наблюдалось.

У большинства привитых монопрепаратами (С, ВОЖС, ВЧЖС, ВКЭ) инфильтраты не превышали в диаметре 0,2–0,5 см. В то же время общее количество инфильтратов при иммунизации С составляло 41,5%, ВОЖС – 17,5% и ВКЭ – 14,3%.

Отеки в месте введения монопрепаратов формировались только после иммунизации С (19,5%) и ВОЖС (30,0%). Лимфадениты также развивались только у привитых С (17,0%) и ВОЖС (25,0%).

Таким образом, изученные ВК обусловливали развитие стереотипных местных ПВР, которые развивались, как правило, через 12–24 ч и полностью исчезали в течение 7–12 сут. Следует отметить, что у отдельных привитых инфильтраты сохранялись в течение 1 мес.

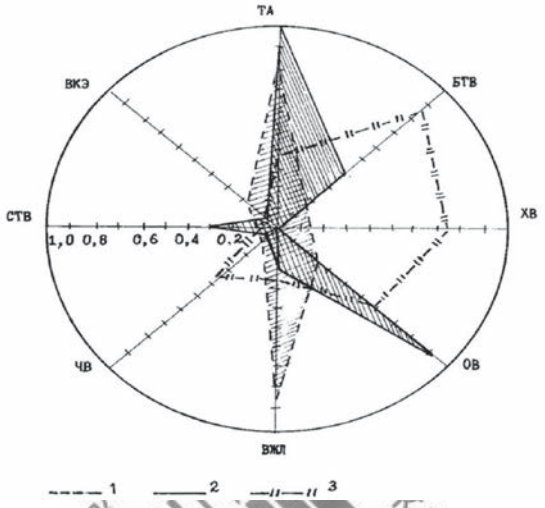

Рис. 4.18. Удельный вес монопрепаратов в местной реактогенности изученных вакцинных комплексов: 1 – инфильтраты, 2 – отеки, 3 – лимфадениты

Оценивая местную реактогенность в процессе изучения ВК можно отметить, что наибольший удельный вес в формировании инфильтратов имели С и ВЖЛ, в развитии отеков – С, ВОЖС и БТВ, а лимфаденитов – БТВ, ХВ и ВОЖС (рис. 4.18). Причем клиническая картина и динамика развития местных НВР были стереотипны для всех изученных вакцинных комплексов. К утрате трудоспособности местные реакции не приводили.

4.2. Функциональное состояние систем организма привитых изучаемыми вакцинными комплексами по данным инструментально-лабораторных исследований

4.2.1. Гематологические показатели и биохимический состав крови у лиц, привитых вакцинными комплексами

В нормальных физиологических условиях в организме неизменно поддерживается постоянство морфологического и химического состава, а также физико-химических свойств крови. Изменение

каких-либо ее показателей может отразиться на нормальном функционировании организма, деятельности тех или иных его систем и органов [25]. В свою очередь, выполняя функции, определяющие ее жизненно важное значение для организма, кровь является ценным диагностическим субстратом. Справедливым является мнение, что кровь в той или иной степени отражает, как в зеркале, многое из того, что происходит в организме [26].

Изучение картины периферической крови показало, что прививки изученными ВК приводили к изменениям только защитной и не влияли на дыхательную функцию крови. Так, во все сроки обследования в поствакцинальном периоде показатели красной крови (НВ и ЭР) как в контрольных (непривитых группах), так и у иммунизированных комплексами находились в пределах физиологической нормы и практически не различались в зависимости от наличия или отсутствия ПВР.

В то же время скорость оседания эритроцитов (СОЭ) статистически достоверно ($P \leq 0{,}001$) увеличивалась через 1 сут после вакцинации у привитых всеми изученными ВК и находилась на повышенном уровне в течение 5 сут. При этом степень увеличения показателя СОЭ находилась в прямой зависимости от степени тяжести ПВР (рис. 4.19).

Следует подчеркнуть, что изменения СОЭ были наиболее выражены после иммунизации ВК № 4, когда реакция оседания эритроцитов в поствакцинальном периоде ускорялась у лиц с повышенной температурой тела в 7 раз (без лихорадки – в 2 раза).

Рис. 4.19. Изменение СОЭ через 1 сут после иммунизации изученными вакцинными комплексами в зависимости от степени тяжести прививочных реакций

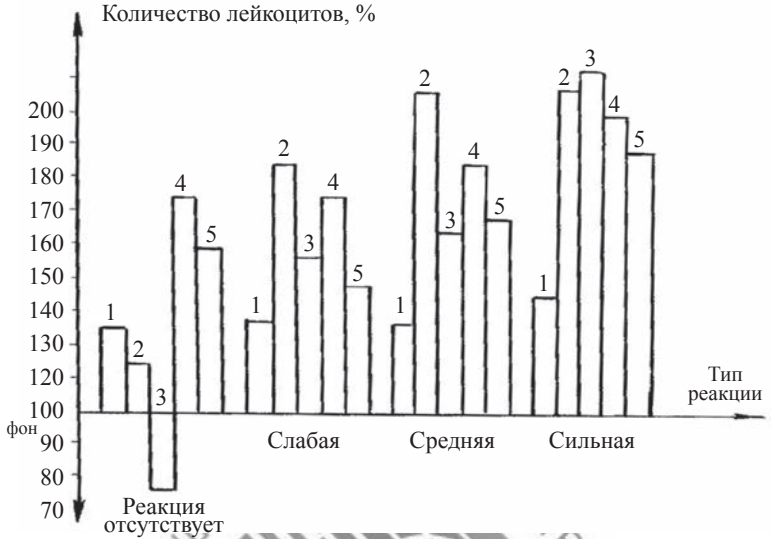

Рис. 4.20. Изменение общего количества лейкоцитов через 1 сут после иммунизации изученными вакцинными комплексами в зависимости от тяжести прививочных реакций: 1, 2, 3, 4, 5 – номера вакцинных комплексов

Общее количество лейкоцитов у вакцинированных изученными ВК достоверно изменялось через 1 сут после прививки в группах со слабой ($P \leq 0,05$), средней ($P \leq 0,01$) и сильной ($P \leq 0,001$) температурными реакциями (рис. 4.20).

Нужно отметить, что у лиц с нормальной температурной реакцией в поствакцинальном периоде также регистрировался лейкоцитоз. Исключение составили прививки ВК №3, при которых было обнаружено снижение общего количества лейкоцитов через 1 сут после иммунизации, хотя оно и не было статистически достоверным.

Через 5 сут после иммунизации во всех группах обследованных лейкоцитоз исчезал и общее количество лейкоцитов практически восстанавливалось до исходных значений.

Отмечались достоверные изменения и в лейкоцитарной формуле. Через 1сут после иммунизации ВК статистически значимо возрастало количество сегментоядерных нейтрофилов. Причем более выраженный нейтрофилез отмечался у привитых, отреагировавших развитием общих ПВР (рис. 4.21).

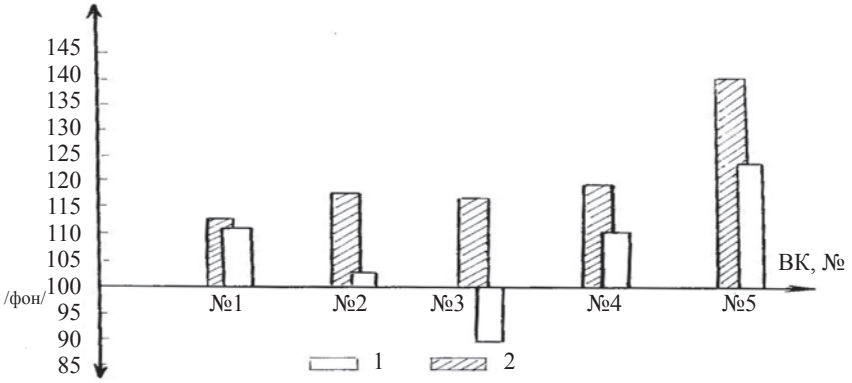

Рис. 4.21. Изменение количества сегментоядерных нейтрофилов через 1 сут после иммунизации изученными вакцинными комплексами: 1 – привитые с нормальной температурой тела (<37,1 °С); 2 – привитые с повышенной температурой тела (>37,1 °С)

Исключение составила группа иммунизированных ВК №3, в которой в поствакцинальном периоде не было отмечено повышения температуры тела. У этих привитых количество сегментоядерных нейтрофилов через 1 сут после иммунизации было снижено.

Через 5 сут содержание нейтрофилов в крови у привитых изучаемыми вакцинными комплексами снижалось до исходного уровня в группах с нормальной температурой тела, слабыми, средними реакциями, тогда как у вакцинированных с сильной реакцией этот показатель достоверно отличался от фонового значения ($P \leq 0,05$).

Иммунизация ВК приводила к существенным изменениям количества лимфоцитов крови. Так, через 1 сут после прививки количество лимфоцитов достоверно снижалось у всех иммунизированных с повышенной температурой тела ($P \leq 0,05$ – в группе со слабой реакцией; $P \leq 0,01$ – в группах привитых со средней и сильной температурной реакциями). В группах привитых с нормальной температурой тела этот показатель после прививки не изменялся (рис. 4.22).

Через 5 сут после иммунизации всеми изученными ВК в группах со средними и сильными температурными реакциями количество лимфоцитов оставалось достоверно сниженным по отношению к исходным значениям ($P \leq 0,05$).

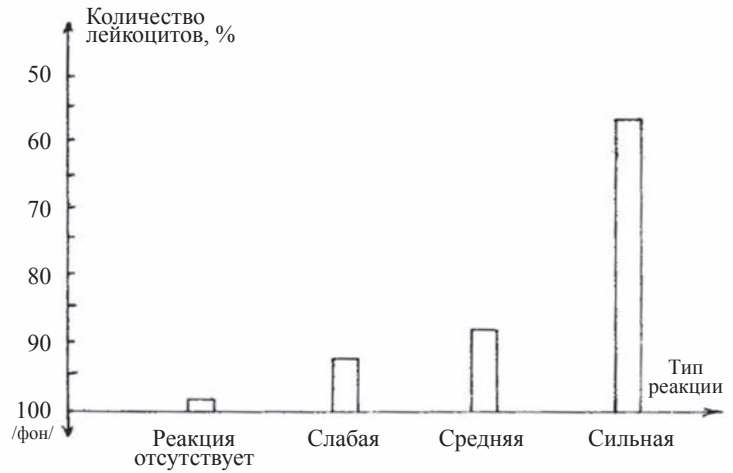

Рис. 4.22. Изменение количества лимфоцитов через 1 сут после иммунизации изученными вакцинными комплексами в зависимости от тяжести общих поствакцинальных реакций

Количество базофилов, эозинофилов и моноцитов в поствакцинальном периоде изменялось разнонаправленно, без статистически достоверных различий. Можно только говорить о тенденции развития моноцитоза и эозинофилии после комплексно-ассоциированной иммунизации изученными ВК.

Таким образом, через 1 сут после введения в организм изученные ВК обусловливали развитие стереотипных гематологических изменений, выражавшихся в существенном ускорении СОЭ, лейкоцитозе с нейтрофильным сдвигом и лимфопенией. Причем эти изменения были более выражены у привитых, отреагировавших на иммунизацию развитием общих ПВР. При этом через 5 сут после комплексных прививок полного восстановления гемограммы не наблюдалось.

Полученные данные о динамике гематологических показателей в поствакцинальном периоде в основном совпадают с данными литературы. Однако отдельные авторы отмечают лейкопению после иммунизации различными вакцинами [27, 28].

Биохимический состав крови отличается относительным постоянством, благодаря чему обеспечиваются достаточно стабильные условия для существования клеток организма. Всякое воздействие

из внешней или внутренней среды организма вызывает определенные биохимические изменения, направленные на восстановление нарушенного гомеостаза. Однако применительно к комплексным и ассоциированным прививкам этот вопрос мало исследован.

В отличие от гематологических биохимические показатели крови в поствакцинальном периоде изменялись разнонаправленно, без каких-либо закономерностей. Следует подчеркнуть, что все эти изменения находились в пределах физиологической нормы и ни у одного из обследованных не было выявлено патологических изменений изучавшихся показателей. По-видимому, комплексная и ассоциированная иммунизация не вызывает серъезных нарушений в физиологических процессах благодаря тому, что автоматическая саморегуляция ограничивает возникающие в организме отклонения в сравнительно узких пределах. А с другой стороны, обмен веществ, который в основном характеризует изученные показатели, в сложно устроенном живом организме защищен интегральной кооперацией ряда органов и физиологических систем.

В наших исследованиях изучение влияния прививок ВК №1 на биохимический состав крови показало, что после иммунизации изменялась только активность аланин- и аспартатаминотрансфераз, достоверно возрастая через 1 и 5 сут после введения комплекса (рис. 4.23).

Иммунизация ВК №2, напротив, через 24 ч вызывала статистически достоверное ($P \leq 0,05$) снижение в крови у вакцинированных содержания аланинаминотрансферазы и остаточного азота (рис. 4.24).

В то же время биохимический состав крови у иммунизированных ВК №3, хотя и изменялся в поствакцинальном периоде, однако статистически достоверных изменений изучаемых показателей установлено не было (рис. 4.25).

Изменение обмена веществ у иммунизированных ВК №4 носило разнонаправленный характер (рис. 4.26).

Важно отметить, что зависимость биохимических показателей от температуры тела у привитых в поствакцинальном периоде проявлялась более четко и существенно. Лихорадочные реакции обусловливали достоверное изменение активности в крови аспартатаминотрансферазы, содержания билирубина, креатинина и остаточного азота. Так, сильные ПВР приводили к достоверному снижению в крови ($P \leq 0,05$) активности аспартатаминотрансферазы и способствовали резкому увеличению концентрации билирубина, креатинина и сахара.

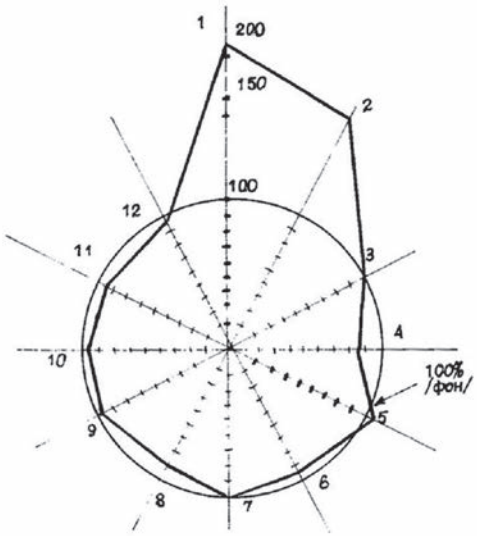

Рис. 4.23. Изменение биохимических показателей крови через 24 ч после иммунизации вакцинным комплексом № 1, % (фоновые значения – 100 %): 1 – аспартатаминотрансфераза; 2 – аланинаминотрансфераза; 3 – щелочная фосфатаза; 4 – билирубин; 5 – креатинин; 6 – остаточный азот; 7 – сахар; 8 – холестерин; 9 – общий белок; 10 – хлориды; 11 – калий; 12 – натрий

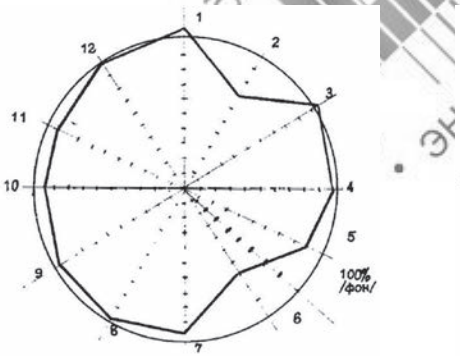

Рис. 4.24. Изменение биохимических показателей крови через 24 ч после иммунизации вакцинным комплексом № 2, % (фоновые значения – 100%); усл. обозн. см. на рис. 4.23

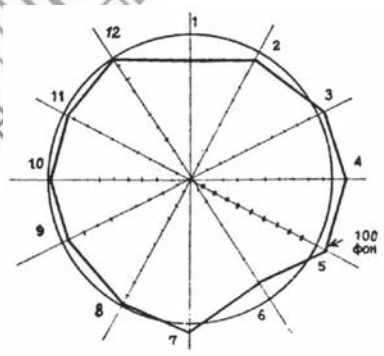

Рис. 4.25. Изменение биохимических показателей крови через 24 ч после иммунизации вакцинным комплексом № 3, % (фоновые значения – 100%); усл. обозн. см. на рис. 4.23

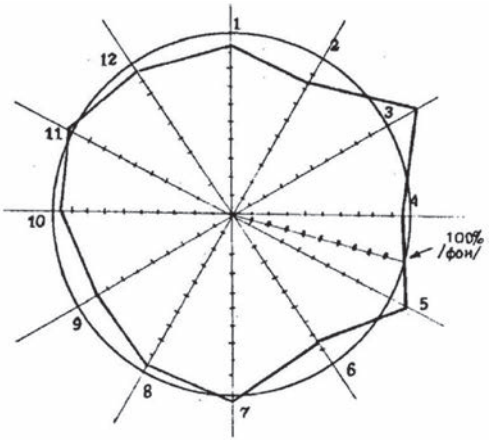

Рис. 4.26. Изменение биохимических показателей крови через 24 ч после иммунизации вакцинным комплексом № 4, % (фоновые значения – 100 %); усл. обозн. см. на рис. 4.23

У вакцинированных со слабыми и средними температурными реакциями отмечали снижение активности аланинаминотрансферазы и содержания остаточного азота и увеличение уровня билирубина.

Результаты биохимического исследования крови у привитых изучаемыми ВК через 5–6 сут после иммунизации свидетельствовали о том, что подавляющее большинство изученных показателей восстанавливалось до исходных значений.

Таким образом, изменения биохимических показателей крови после иммунизации ВК были кратковременны, стереотипны, не выходили за пределы физиологической нормы и носили компенсаторный характер. Более существенную роль в динамике изменений биохимических показателей крови у вакцинированных играла поствакцинальная лихорадка.

4.2.2. Характеристика сердечно-сосудистой системы у привитых вакцинными комплексами

Широкий диапазон приспособительных реакций системы кровообращения к измененным условиям внешней и внутренней среды обеспечивается совершенной и гибкой регуляцией со стороны нервной системы и гуморальных механизмов.

В то же время под влиянием различных факторов в системе кровообращения возникают заметные и легко определяемые изменения, которые часто имеют первостепенное значение как для характеристики функциональных сдвигов, так и особенно при диагностике различных патологических состояний организма.

В наших исследованиях при оценке деятельности сердечно-сосудистой системы (ССС) на фоне прививок ВК, проведенной путем измерения частоты сердечных сокращений (ЧСС) с помощью ритмокардиометра и величины артериального давления (АД) по методу Н.С. Короткова, а также анализа показателей электро- и механокардиограмм, патологических изменений выявлено не было.

Артериальное давление как систолическое, так и диастолическое в поствакцинальном периоде практически не изменялось. Снижение АД до уровня гипотонии (≤ 60–100 мм рт. ст.) было установлено только у 0,4% обследованных.

В то же время ЧСС в поствакцинальном периоде претерпевала более существенные изменения. Общие ПВР на высоте своего развития приводили к достоверному учащению пульса до 90 уд/мин у 38,8% привитых. При этом у лиц, иммунизированных ВК №1 и №3, но не отреагировавших подъемом температуры тела, ЧСС практически не менялась (рис. 4.27). Напротив, прививки ВК №2 и №4 вызывали развитие тахикардии у лиц с лихорадкой (20,0% и 35,3% соответственно).

У вакцинированных со слабыми температурными реакциями (37,1–37,5 °С) учащение пульса отмечалось в 18,7% случаев после введения ВК №1, 25,0% – ВК №3, 36,8% – ВК №4 и 45,0% – ВК №2. Лихорадочная реакция средней степени тяжести (37,6–38,5 °С), которая развивалась после введения изученных ВК, сопровождалась развитием тахикардии у 37,5% привитых ВК № 1 и № 3, 75,0 – ВК №4 и 80% – ВК №2. Сильные лихорадочные реакции (≤ 38,5 °С) приводили к тахикардии практически в 100% случаев.

Следовательно, учащение сердечных сокращений у привитых ВК коррелировало, прежде всего, с температурой и степенью тяжести ПВР. ЧСС нормализовалась в основном через 2 сут после иммунизации.

Электрофизиологические показатели у вакцинированных в поствакцинальном периоде практически не изменялись, хотя нередко регистрировалось укорочение интервала R–R и комплекса QRST,

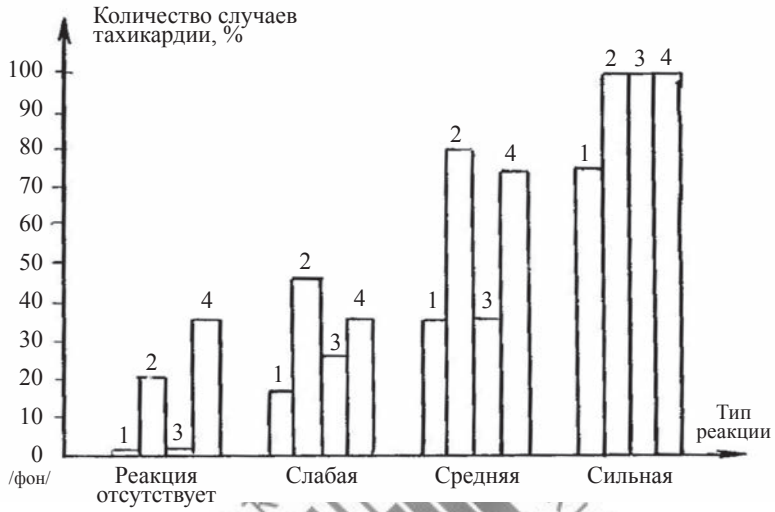

Рис. 4.27. Характер изменений ЧСС у привитых изученными вакцинными комплексами в зависимости от степени выраженности поствакцинальной реакции

обусловленное увеличением ЧСС. В ряде случаев были отмечены изменения амплитуды зубца Т (уплотнение и увеличение). Однако все эти изменения носили функциональный характер и не выходили за пределы физиологической нормы.

Изучение гемодинамических показателей позволило установить, что динамика изменений их в поствакцинальном периоде была практически одинаковой, независимо от антигенного состава.

До прививки основные гемодинамические показатели у всех обследованных находились в пределах физиологической нормы. Через 24 ч после вакцинации наблюдались характерные изменения длительности фаз сердечного цикла и энергетики сердечных сокращений, обусловленные в основном развившейся лихорадкой. Так, у лиц без клинически выраженных ПВР существенных изменений в гемодинамике не отмечено. В то же время у привитых со слабыми температурными реакциями отмечены статистически достоверные ($P \leq 0{,}05$) изменения минутного объема (МО), сердечного индекса (СИ), объемной скорости выброса крови левым желудочком (ОСВ), линейной скорости движения крови (ЛСДК) и удельного периферического сопротивления (УПС), характеризующие в основном

энергетику сердечных сокращений и периферическое сопротивление. Наряду с этим тенденцию к увеличению имели систолический объем сердца (СО), и расход энергии на продвижение 1 л крови в течение 1мин. Это свидетельствовало о том, что вакцинация предъявляла повышенные требования к миокарду, к его механической функции, что выражалось в увеличении МО и усилении сократительной функции сердца.

В качестве компенсаторной реакции, позволяющей сохранять среднее динамическое давление на нормальном физиологическом уровне, отмечалось достоверное ($P \leq 0,05$) снижение периферического сопротивления. Вследствие этого обеспечивалось сохранение оптимального кровенаполнения капиллярной сети и создавалась возможность поддерживания тканевого обмена на необходимом функциональном уровне. Аналогичные изменения показателей гемодинамики отмечались при средних и сильных реакциях. Наряду с изменениями МО, СИ, ОСВ, ЛДСК, УПС при этих реакциях имело место достоверное ($P \leq 0,05$) повышение пульсового и бокового АД, что свидетельствовало об увеличении нагрузки на сердце. Так, у привитых со средними и сильными температурными реакциями статистически достоверно возрастала мощность сокращений левого желудочка ($P \leq 0,05$). Все вышесказанное создавало невыгодные, неэкономичные условия работы сердца, поэтому у этих вакцинированных отмечалось более значимое снижение периферического сопротивления. Полная нормализация гемодинамических показателей наступала через 48 ч после вакцинации.

Таким образом, ПВР приводили к компенсаторным изменениям функции сердечно-сосудистой системы, которые носили кратковременный и полностью обратимый характер.

4.2.3. Функция внешнего дыхания и газообмена у привитых в поствакцинальном периоде

Дыхательная система является одной из важнейших в организме. Нарушения ее функции незамедлительно сказываются на состоянии и жизнедеятельности большинства органов и тканей и могут явиться причиной развития гипоксического состояния [29]. С другой стороны, причиной возникновения, развития и формирования

гипоксических состояний могут явиться различные патологические нарушения в организме и болезнетворные воздействия извне.

Функцию внешнего дыхания в поствакцинальном периоде оценивали по показателям спирографии, которую проводили через 1 и 7 сут.

Функция внешнего дыхания обеспечивает газообмен на этапе «наружный воздух – кровь легочных капилляров» и условно разделена на два процесса – вентиляцию, то есть газообмен между наружным и альвеолярным воздухом, и диффузию, то есть газообмен между альвеолярным воздухом и кровью легочных капилляров.

В наших исследованиях при анализе спирограмм были использованы общепринятые показатели легочной вентиляции и газообмена.

Проведенные исследования показали, что до прививки у всех обследованных показатели функции внешнего дыхания находились в пределах нормальных величин. Они в основном соответствовали «должным» величинам и оказались весьма близки к литературным данным, характеризующим молодых людей в возрасте 20–23 лет [30, 31].

В поствакцинальном периоде большинство легочных показателей изменялись несущественно. Однако минутный объем дыхания (МОД) через 1 сут после иммунизации статистически достоверно ($P \leq 0{,}05$) возрастал у привитых с температурными реакциями, независимо от вида изученного ВК (рис. 4.28).

МОД, являясь весьма переменной величиной, обеспечивает адекватный газообмен и изменяется, как правило, за счет частоты и глубины дыхания или дыхательного объема (ДО). В наших исследованиях глубина дыхания в поствакцинальном периоде имела тенденцию к незначительному уменьшению. В то же время у всех привитых, которые отреагировали на прививку повышением температуры тела, возрастала частота дыхания, что и обеспечивало изменение МОД. К 7 сут показатели функции внешнего дыхания полностью нормализовались.

Остальные изученные показатели внешнего дыхания, а также газообмена после прививки практически не изменялись.

Таким образом, исследование легочной системы свидетельствовало об отсутствии у привитых изученными ВК патологических изменений и стеноза дыхательных путей легких. Не было

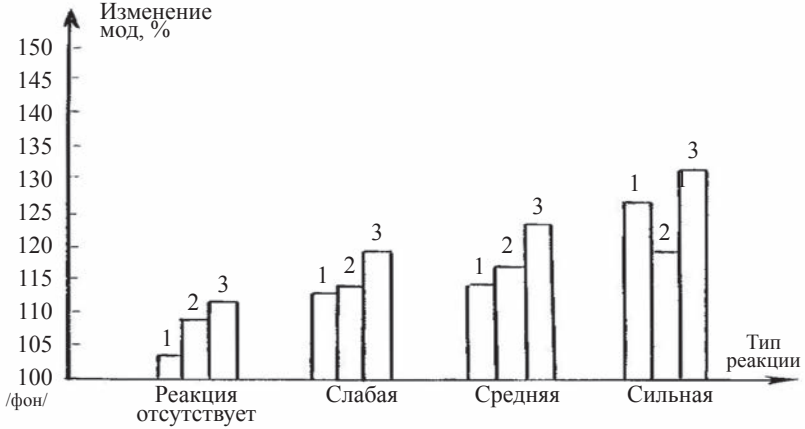

Рис. 4.28. Изменение МОД у привитых изученными вакцинными комплексами в зависимости от степени выраженности поствакцинальной реакции (через 1 сут после иммунизации): 1 – ВК № 1; 2 – ВК № 2; 3 – ВК №5

отмечено также статистически достоверных изменений показателей газообмена – $ПО_2$ и $КИО_2$.

4.2.4. Характеристика функции ЦНС у привитых вакцинными комплексами по психофизиологическим и психологическим показателям

Необходимость и важность проведения исследований по оценке функционального состояния центральной нервной системы (ЦНС) у привитых в поствакцинальном периоде обусловлены тем, что вакцинация может в определенной степени оказывать влияние на функцию корковых систем полушарий головного мозга, изменения которой, в свою очередь, могут отразиться на деятельности других органов и систем.

Можно предположить, что иммунизация, являясь кратковременным стресс-фактором или острым психогенным раздражителем, предъявляет повышенные требования и к психофизиологическим, и психологическим функциям организма [32]. К сожалению, данные литературы по этому вопросу практически отсутствуют. Поэтому нами было проведено изучение влияния комплексных и ассоциированных прививок на такие психофизиологические функции,

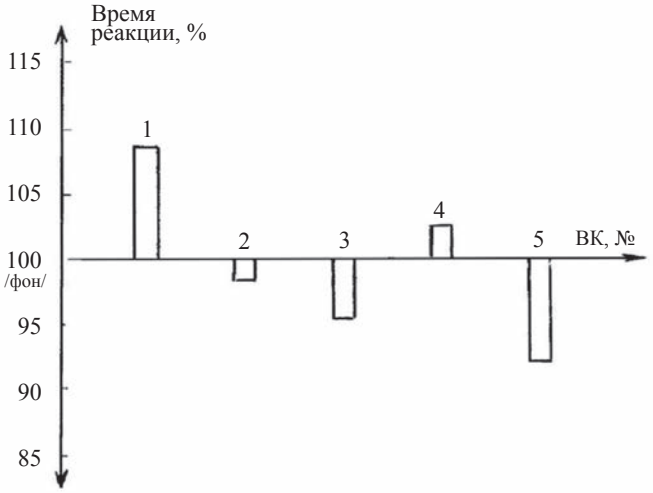

Рис. 4.29. Изменение латентного периода простой сенсомоторной реакции у привитых изученными вакцинными комплексами через 1 сут после иммунизации

как внимание, зрительно-моторная координация, пространственно-временная ориентация и другие.

Определение времени простой сенсомоторной реакции на световой и звуковой раздражители, позволяющие судить о силе процессов возбуждения и внутреннего торможения, а также подвижности основных процессов в коре головного мозга, показало, что изучаемые ВК вызывали разнонаправленные изменения изученного показателя (рис. 4.29). Если ВК №1 и №4 обусловливали увеличение латентного периода простой сенсомоторной реакции, то ВК №2, №3 и №5, напротив, – уменьшение. При этом различия были статистически недостоверны. В то же время анализ изменений этого показателя у привитых с выраженными ПВР свидетельствовал о том, что время простой сенсомоторной реакции на световой и звуковой раздражители увеличивалось в прямой зависимости от степени выраженности лихорадки (рис. 4.30). При этом средние и сильные температурные реакции обусловливали статистически достоверные ($P \leq 0,05$) изменения этих показателей.

Восстановление временного показателя простой сенсомоторной реакции у привитых изученными ВК до исходного значения наблюдалось к 5 сут после иммунизации.

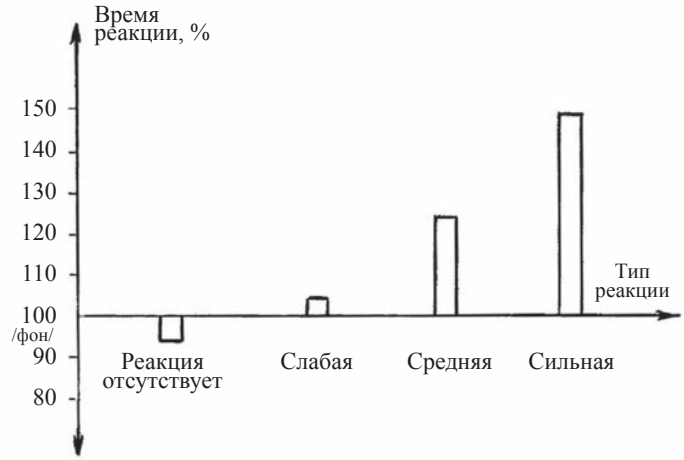

Рис. 4.30. Изменение латентного периода простой реакции у привитых изученным вакцинным комплексом №3 через 24 ч после иммунизации

Аналогичные результаты были получены и при определении показателей реакции на движущийся объект (РДО), позволяющие судить об уравновешенности процессов возбуждения и торможения в коре головного мозга.

Иммунизация ВК №2, №3 и №4 приводила к увеличению количества запаздывающих реакций при выполнении РДО в поствакцинальном периоде. В то же время ВК №1 и №5 способствовали их статистически недостоверному снижению (рис. 4.31). Время реакции достоверно ($P \leq 0{,}001$) увеличивалось у иммунизированных со средними и сильными ПВР (рис. 4.32).

Показатели РДО восстанавливались до фоновых значений у обследуемых через 5 сут после иммунизации.

Выполнение методики теппинг-теста в поствакцинальном периоде показало, что ВК оказывали разнонаправленное действие на изученный показатель. При этом слабые ПВР обусловливали статистически достоверное ($P \leq 0{,}05$) увеличение количества движений при выполнении упражнения, средние – не оказывали влияния, а при сильных реакциях отмечалось утомление двигательного анализатора, что проявлялось в уменьшении количества проставленных знаков (рис. 4.33).

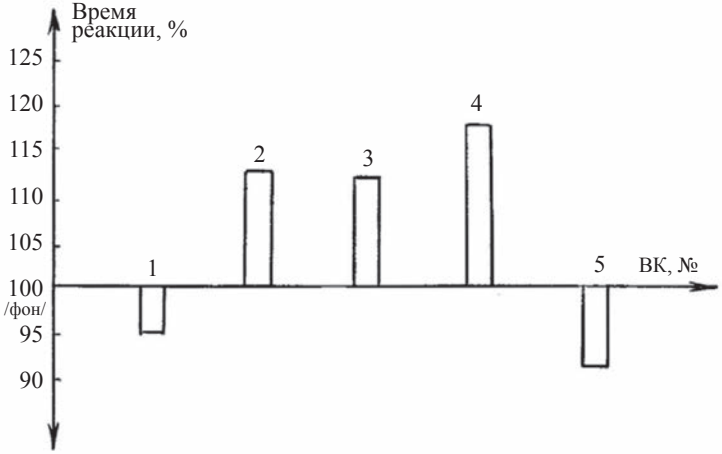

Рис. 4.31. Изменение РДО у привитых изученными вакцинными комплексами через 1 сут после иммунизации

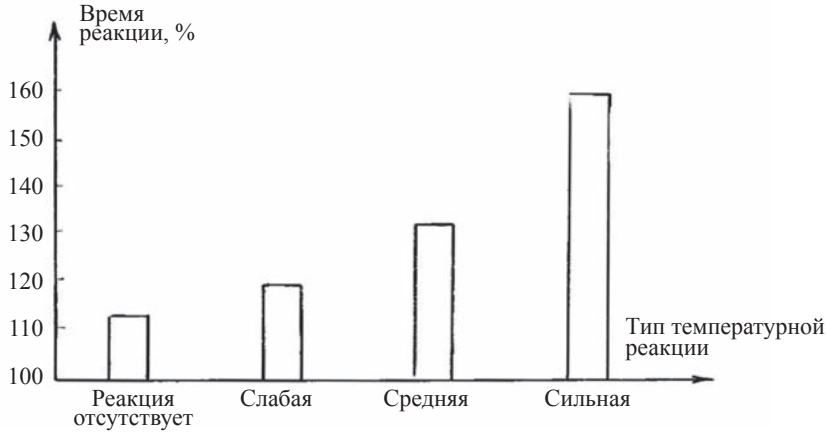

Рис. 4.32. Изменение РДО у привитых изученным вакцинным комплексом №3 через 1 сут после иммунизации

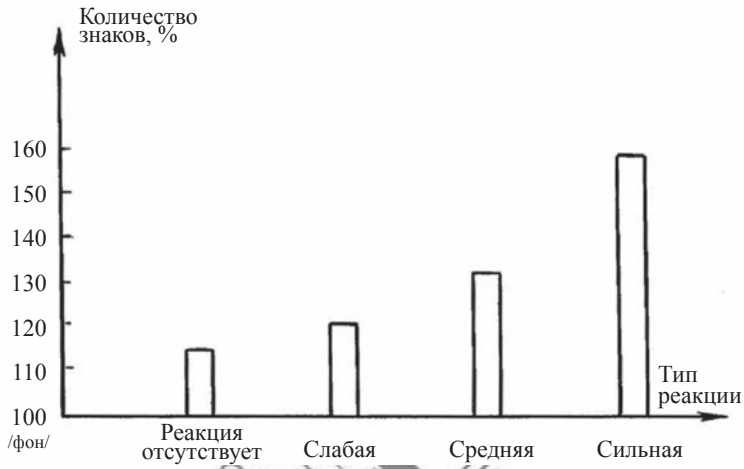

Рис. 4.33. Изменение показателей теппинг-теста у привитых вакцинным комплексом № 2 в зависимости от тяжести поствакцинальных реакций (через 1 сут после иммунизации)

Восстановление психофизиологических показателей до исходного значения наступало практически одновременно с нормализацией температуры тела у привитых, что свидетельствовало о восстановлении баланса между процессами возбуждения и торможения в коре головного мозга.

Учитывая, что одним из важнейших факторов, определяющих работоспособность человека, является психическое состояние, мы провели оценку функционального состояния ЦНС в поствакцинальном периоде по психологическим показателям.

Известно, что психическое состояние выступает в качестве важнейшего субъективного фактора, определяющего успешность и продуктивность деятельности человека, оказывает существенное влияние на эффективность и качество различных видов профессиональной деятельности [33, 34]. Нельзя не отметить, что иерархическая структура психического состояния человека довольно сложна и определяется характеристикой четырех уровней состояния организма: физиологического, психофизиологического, психологического и социально-психологического.

Физиологический уровень включает нейрофизиологические характеристики, сдвиги физиологических функций, морфологические и биохимические изменения.

Психофизиологический уровень – вегетативные реакции, изменения психомоторики, сенсорики. Психологический уровень – изменения психических функций и настроения человека. Характеристики поведения, деятельности и отношения человека в том или ином состоянии объединены на социально-психологическом уровне.

Еще одной задачей нашего исследования являлось изучение психических функций у привитых изученными ВК и установление зависимости между степенью выраженности ПВР у привитых и их психическим состоянием.

Результаты исследований психологического состояния у иммунизированных ВК (№ 2, 3, 4) представлены на рис. 4.34.

Достоверных различий между фоновыми значениями и результатами обследования вакцинированных при выполнении корректурной пробы (таблицы с кольцами Ландольта) и методики «удержания членов ряда» выявлено не было.

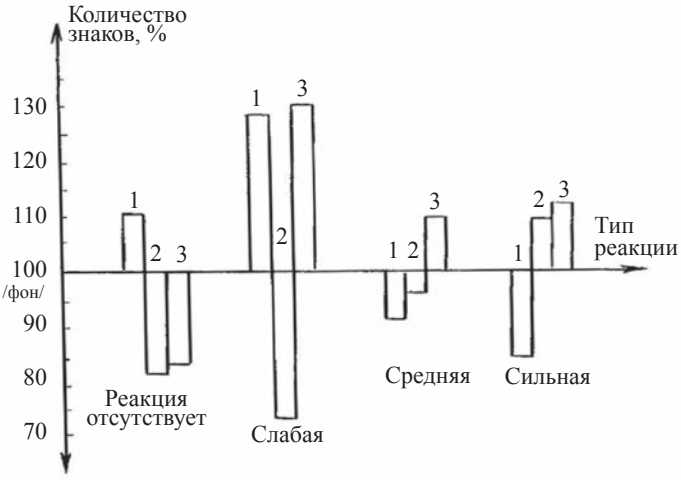

Рис. 4.34. Изменение скорости переработки информации при выполнении корректурной пробы привитыми вакцинными комплексами № 2, 3, 4 в зависимости от степени выраженности лихорадки через 24 ч после иммунизации: 1 – ВК №2; 2 – ВК №3; 3 – ВК №4

Анализируемые показатели во всех группах в первые сутки после вакцинации практически не отличались от результатов исследований, проведенных в контрольной группе в эти же сроки от фоновых значений.

Анализ результатов, полученных при выполнении этих методик у привитых, отреагировавших в поствакцинальном периоде повышением температуры тела, показал, что изменялись они разнонаправленно, без статистически достоверных различий (рис. 4.35–4.37). В то же время были отмечены существенные сдвиги в субъективных показателях психического состояния. Их выраженность и направленность были максимальны и практически одинаковы через 8 и 24 ч после иммунизации.

Достоверные ($P \leq 0,05$) изменения субъективных показателей (по анкете САН) психического состояния – ухудшение оценки состояния, увеличение количества жалоб, повышение уровня реактивной тревожности регистрировались не только у привитых с ПВР, но и у лиц без лихорадочных состояний (рис. 4.38–4.40).

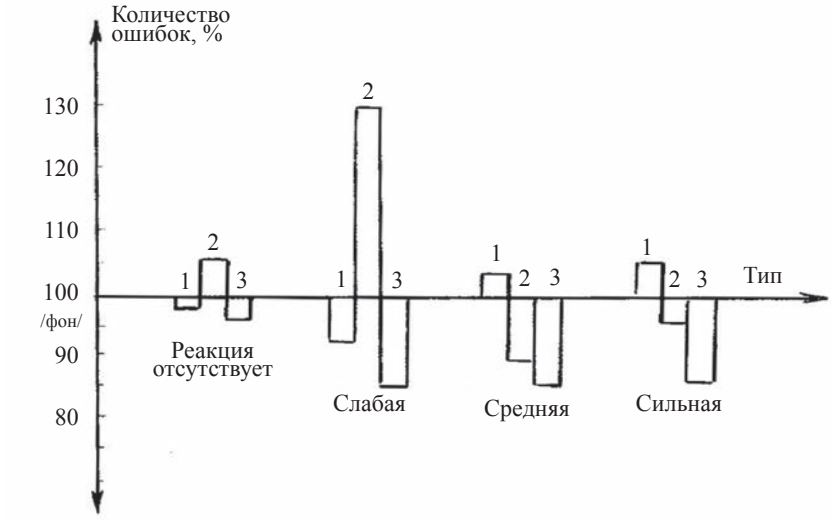

Рис. 4.35. Изменение корректурной пробы у привитых вакцинными комплексами в зависимости от выраженности ПВР через 24 ч после иммунизации: 1 – ВК № 2; 2 – ВК № 3; 3 – ВК № 4

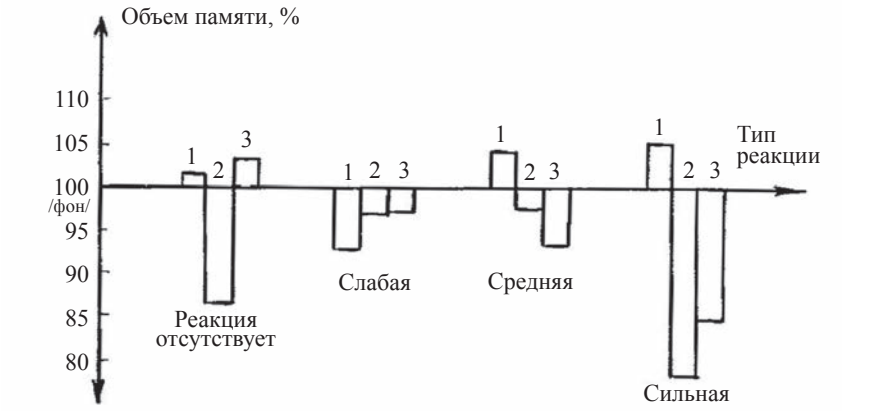

Рис. 4.36. Изменение объема кратковременной памяти при выполнении методики «удержания членов ряда» привитыми вакцинными комплексами в зависимости от выраженности ПВР через 24 ч после иммунизации: 1 – ВК №2; 2 – ВК №3; 3 – ВК №4

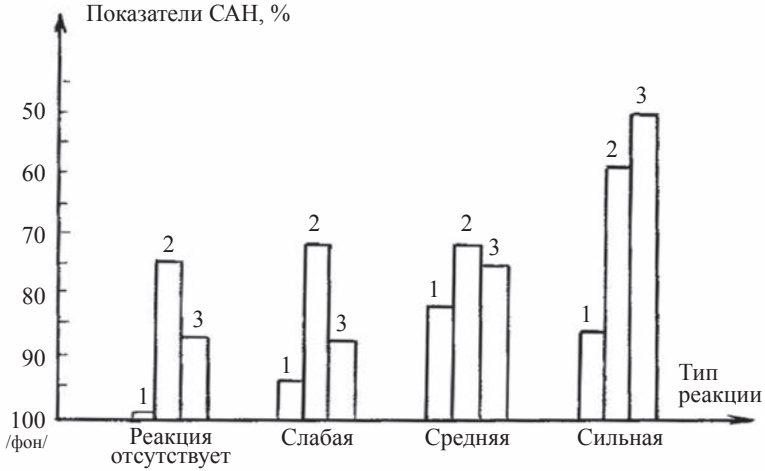

Рис. 4.37. Изменения показателей самооценки состояния у привитых вакцинными комплексами в зависимости от выраженности ПВР через 24 ч после иммунизации (по данным анкеты САН): 1 – ВК №2; 2 – ВК №3; 3 – ВК №4

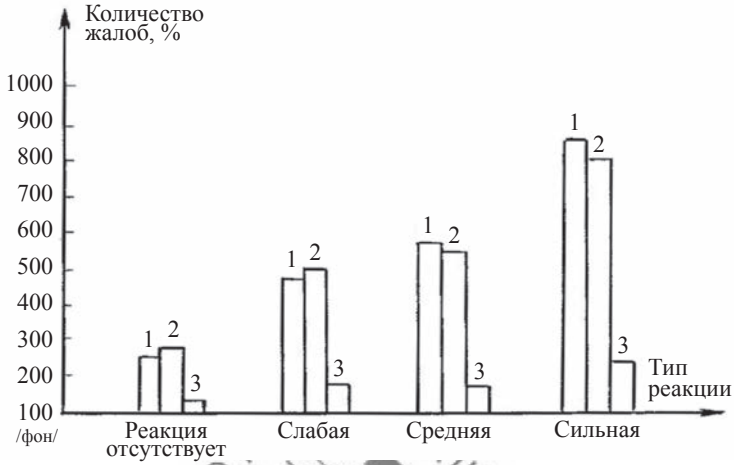

Рис. 4.38. Изменения количества жалоб у привитых вакцинными комплексами в зависимости от выраженности ПВР через 24 ч после иммунизации (по данным анкеты САН): 1 – ВК №2; 2 – ВК №3; 3 – ВК №4

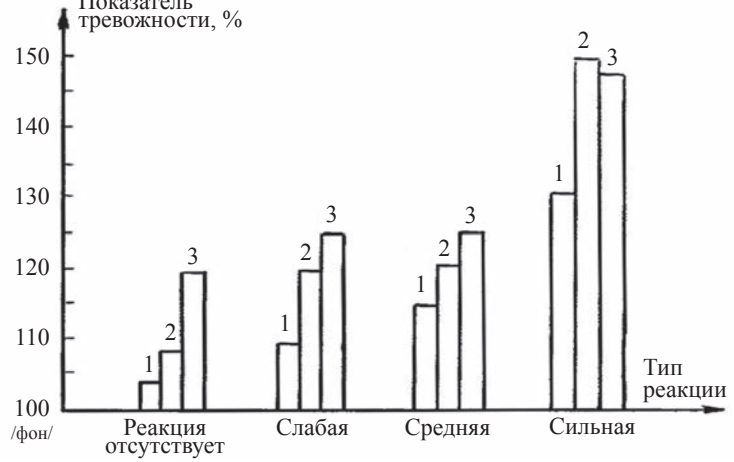

Рис. 4.39. Изменение уровня реактивной тревожности у привитых вакцинными комплексами в зависимости от выраженности ПВР через 24 ч после иммунизации (по данным шкалы реактивной тревожности РХ-1 Ч. Спилберга): 1 – ВК №2; 2 – ВК №3; 3 – ВК №4

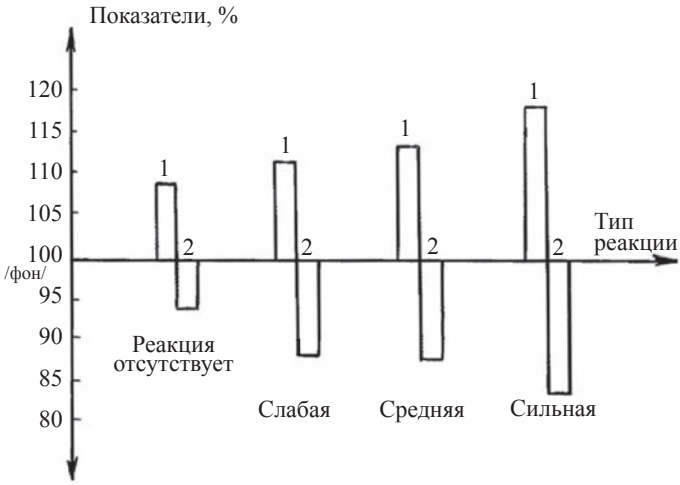

Рис. 4.40. Изменение косвенных показателей работоспособности привитых вакцинным комплексом № 3 при выполнении велоэргометрической пробы через 24 ч после иммунизации: 1 – ВК №2; 2 – ВК №3; 3 – ВК №4

У вакцинированных со средними и сильными температурными реакциями изменения психологических показателей носили более выраженный и затяжной характер.

Таким образом, исследованиями установлено, что параллельно и пропорционально повышению температуры тела в поствакцинальном периоде изменялось психическое состояние иммунизированных. В большинстве случаев прослеживалась прямая зависимость между ухудшением субъективных характеристик психического состояния (ухудшение самочувствия, увеличение уровня тревожности) и степенью выраженности температурной реакции. Изменения объективных показателей психического состояния носили более сложный и опосредованный характер. Однако можно заключить, что функция памяти в поствакцинальном периоде оставалась более стабильной, чем внимание.

Проведенный анализ изменений функционального состояния организма привитых изученными ВК по гематологическим, биохимическим показателям крови, результатам инструментальных исследований сердечно-сосудистой, дыхательной и центральной нервной систем свидетельствовал о том, что комплексная и ассоциированная

иммунизация не приводила к развитию патологических состояний в деятельности изученных систем. Выявленные отклонения от параметров физиологической нормы были стереотипными, кратковременными и полностью обратимыми.

В частности, комплексные прививки обусловливали развитие стереотипных гематологических изменений, выражавшихся в ускорении СОЭ, лейкоцитозе с нейтрофильным сдвигом и лимфопенией. Причем диапазон отклонений изученных показателей был более выражен у привитых, отреагировавших на иммунизацию развитием общих ПВР. При этом через 5 сут после комплексных прививок полного восстановления гемограммы не наступало.

В наших исследованиях гематологические показатели в поствакцинальном периоде существенно не отличались от таковых, представленных в литературе [27, 35].

В отличие от гематологических биохимические показатели крови после вакцинации изменялись в пределах физиологической нормы разнонаправленно, без каких-либо закономерностей.

Была установлена корреляционная связь некоторых показателей от степени повышения температуры тела у привитых в поствакцинальном периоде. Так, при сильных ПВР наблюдалось статистически достоверное снижение в крови активности аспартатаминотрансферазы и резкое увеличение содержания билирубина, креатинина и сахара. У вакцинированных со слабыми и средними ПВР отмечалось снижение активности аланинаминотрансферазы и содержания остаточного азота, но возрастал уровень билирубина.

Биохимическое исследование крови через 5 сут после иммунизации свидетельствовало о том, что подавляющее большинство изученных показателей восстанавливалось до исходных значений.

При оценке деятельности сердца у привитых в поствакцинальном периоде по показателям электрокардиограммы патологических изменений выявлено не было. В то же время было установлено учащение ритма сердечных сокращений, которое особенно сильно было выражено у привитых с сильными температурными реакциями.

ПВР сопровождались кратковременным изменением гемодинамических показателей, что проявлялось в увеличении МОД, ОСВ крови левым желудочком, возрастанием ЛСД крови и снижением периферического сопротивления, что являлось компенсаторной

реакцией сердечно-сосудистой системы и позволяло обеспечивать необходимое кровоснабжение тканей и поддерживать определенный уровень обменных процессов в организме.

Исследование легочной системы с помощью спирографии свидетельствовало об отсутствии у привитых ВК патологических изменений в легких и стеноза дыхательных путей.

ПВР на высоте своего развития сопровождались определенными изменениями в деятельности ЦНС. В частности, преобладание процессов возбуждения приводило к достоверному изменению ряда психофизиологических характеристик (увеличение времени сенсомоторной реакции на световой и звуковой раздражители, увеличение количества реакций при выполнении методики РДО, к снижению показателей теппинг-теста).

Параллельно и пропорционально повышению температуры тела в поствакцинальном периоде изменялось психическое состояние привитых. В большинстве случаев прослеживалась прямая зависимость между ухудшением субъективных характеристик психического состояния (ухудшение показателей анкеты САН, увеличение уровня реактивной тревожности) и степенью выраженности поствакцинальной лихорадки. Изменения объективных показателей психического состояния носили более сложный и опосредованный характер. При этом важно еще раз подчеркнуть, что функция памяти в поствакцинальном периоде оставалась более стабильной, чем внимание.

Резюмируя вышесказанное, можно заключить, что ПВР, которые развивались после введения в организм изученных ВК, по своей сути являлись физиологическими, стереотипными, носили компенсаторный характер и протекали по типу «адекватной мобилизации» организма.

4.3. Иммунологическая эффективность ассоциированной и комплексной иммунизации по серологическим данным

В главе 3 на этапе доклинических исследований оптимизированного секстаанатоксина было показано, что по результатам изучения напряженности иммунитета в острых опытах и серологическим сдвигам вакцина характеризовалась высокой иммунологической эффективностью.

В то же время для всесторонней оценки функции иммунной системы у привитых людей по критериям эффективности и иммунологической безопасности необходимо изучение специфических реакций на клеточном уровне в соответствии с требованиями нормативно-правовых документов [36, 37, 38, 39]. При этом нужно учитывать, что иммунная система представляет собой сложное объединение комплементарных и антикомплементарных клеток, которые в ответ на воздействие антигенов могут развивать характерный иммунный ответ [40]. Реализацию специфических реакций иммунитета обеспечивают два основных типа клеток – лимфоциты и макрофаги. Наше внимание привлекли лимфоидные клетки, способные оказывать цитотоксическое действие без предварительной сенсибилизации. Такие естественные (нормальные – НК) клетки-киллеры обеспечивают первичный клеточный ответ при некоторых вирусных и бактериальных инфекциях, участвуют в аутоиммунных процессах и т.д. [41, 42]. Они представляют «первичную линию обороны» организма от чужеродных агентов, осуществляют иммунорегуляторные функции, вырабатывают интерферон, усиливая цитолиз измененных вирусом клеток [43, 44, 45].

Активное участие в иммунитете и в реализации иммунного ответа принимают также мононуклеарная и полинуклеарная фагоцитарные системы. Фагоциты обладают мощным антитоксическим действием, которое реализуется через цитотоксические факторы:

– нейтральные протеазы, неферментные катионные белки, лизоцим, лактоферин, кислые гидролазы;

– перекись водорода, комплекс свободных радикалов (супероксидный анион, гидроксильный радикал, синглетный кислород).

В нашей работе функциональное состояние этой системы оценивалось по хемотаксической, метаболической и секреторной активности фагоцитирующих клеток крови, а также по функциональной активности лимфоцитов и прежде всего их способности секретировать специфические антитела.

С целью изучения хемотаксической функции фагоцитирующих клеток при комплексно-ассоциированных прививках была поставлена реакция торможения миграции лейкоцитов (РТМЛ) с фитогемагглютинином (ФГА). Результаты исследований представлены в табл. 4.2.

Таблица 4.2

Характеристика миграционной активности лейкоцитов в РТМЛ с ФГА у привитых вакцинным комплексом № 1

Выраженность поствакцинальной реакции	Количество обследованных	Время обследования после прививки, сут	Индекс миграции (X±m)
Реакция отсутствует	12	0	78±3,3
		3	72±5,3
		15	67±5,7
		30	74±3,9
Слабая (37,1–37,5 °С)	6	0	86±3,7
		3	75±5,6
		15	66±3,4
		30	73±5,9
Средняя (37,6–38,5 °С)	24	0	70±2,6
		3	58±3,4*
		15	48±2,0*
		30	57±2,2*
Сильная (≥38,6 °С)	7	0	56±4,8
		3	35±4,8
		15	38±3,1
		30	34±3,1
Контроль (непривитые)	9	0	68±5,2
		3	71±3,7
		15	67±4,1
		30	70±4,6

* Различия статистически достоверны при P≤0,05.

Как видно из табл. 4.2, введение ВК № 1 вызывало статистически достоверное (P≤0,05) усиление торможения миграции лейкоцитов в ответ на ФГА у привитых со слабыми прививочными реакциями через 15 сут, а со средними и сильными – через 15 и 30 сут после вакцинации.

Полученные результаты указывают на то, что в поствакцинальном периоде миграционная способность клеток снижается, а это, в свою очередь, свидетельствует о повышении их адгезивности и, как следствие, увеличении фагоцитарной активности.

Анализ результатов исследований, представленных в табл. 4.3 и 4.4, показал, что динамика показателей хемилюминесценции фагоцитов крови в ответ на чумной антиген (специфическая активность)

Таблица 4.3

Пиковая величина хемилюминесценции (mB) цельной крови при активности ФГА, X±m

Сроки обследования, сут	Группы обследуемых (шифр препаратов)			
	ВЧЖС	С	ВОЖС	ВК №1
0	66,2±9,1	38,6±6,2	41,9±4,2	63,1±13,7
3	91,8±21,3	82,9±15,4*	67,1±6,8*	112,2±21,7
7	67,9±11,1	70,4±9,1*	64,3±7,4*	66,2±7,3
14	131,7±23,4*	139,8±9,5*	136,8±13,3*	141,0±17,4*
25	51,1± 6,4	44,3±5,2	33,1 ± 4,8	32,1±4,5

* Различия статистически достоверны при P≤0,05.

Таблица 4.4

Пиковая величина хемилюминесценции (mB) цельной крови при активности взвесью чумных бактерий, X±m

Сроки обследования, сут	Группы обследуемых (шифр препаратов)		
	ВЧЖС	С	ВК № 1
0	31,8±5,6	33,2±9,7	58,6±27,3
3	89,0±17,4*	81,1±25,3	101,9±43,8
7	73,3±10,6*	69,7±9,4*	67,7±12,0
14	74,3±11,7*	91,5±12,6*	87,1±13,7
25	29,3±4,7	31,1±4,8	15,3±17,2

* Различия статистически достоверны при P≤0,05.

не всегда соответствовала изменениям этих же показателей, происходящим в ответ на неспецифический активатор – ФГА, что подтверждает независимость этих двух показателей.

На 3 сут после иммунизации хемилюминесценция фагоцитов крови в ответ на ФГА достоверно повышалась по сравнению с фоном в группах, вакцинированных С и ВОЖС, а у привитых ВЧЖС и ВК № 1 указанный показатель достоверно превышал фоновые значения только на 14 сут после иммунизации (P≤0,05).

К 25 сут после прививки показатели неспецифического кислородзависимого метаболизма фагоцитов крови возвращались к исходному уровню во всех группах.

Присутствие в составе ВК ВОЖС в дозе, равной 1,0 ч.д., подавляло специфическую активность фагоцитов в отношении чумных бактерий, но сохраняло и даже усиливало неспецифическую эффективность вакцинации.

Таблица 4.5

Динамика ферментативной активности фагоцитирующих клеток крови в поствакцинальном периоде у привитых вакцинным комплексом № 1, X± m

Показатель	Срок исследования, сут			
	фон	3	7	25
Миелопероксидаза, усл. ед.	1,98±0,08	1,99±0,04	1,92±0,08	2,27±0,05
Неспецифические эстеразы, усл.ед.	0,69±0,06	1,01±0,11	1,26±0,06	1,10±0,10
Концентрация сывороточного лизоцима, мкг/мл	8,39±0,48	43,91±1,76*	43,28±4,43*	28,41±3,05*

* Различия статистически достоверны при P≤ 0,05.

После введения С наблюдали как специфический ответ на чумные бактерии, так и неспецифический эффект вакцинации.

Оценка активности миелопероксидазы и неспецифических эстераз в лейкоцитах периферической крови у вакцинированных ВК №1 была проведена в следующие сроки: фон, 3, 7 и 25 сут после иммунизации. В эти же сроки изучали уровень сывороточного лизоцима. Результаты исследований представлены в табл. 4.5.

Проведенные исследования показали, что у вакцинированных ВК №1 активность исследуемых ферментов, участвующих в метаболизме фагоцитов, к концу срока наблюдения статистически недостоверно увеличивалась по сравнению с их фоновыми значениями. В то же время у привитых ВК №1 наблюдалось существенное по сравнению с исходными значениями, увеличение концентрации сывороточного лизоцима (P≤0,05), начиная с 3 сут после вакцинации, что свидетельствует о существенной активации секреторной функции фагоцитирующих клеток в ответ на иммунизацию.

Анализируя полученные результаты, можно заключить, что в процессе вакцинации как монопрепаратами, так и вакцинным комплексом происходит существенная активация неспецифических факторов, участвующих в иммунном ответе. Вместе с тем, как известно, иммуногенез представляет собой процесс взаимодействия различных типов иммунокомпетентных клеток друг с другом, который осуществляется посредством медиаторных сигналов,

вырабатываемых ими под влиянием антигенного раздражителя [46]. Следствием такого воздействия в конечном итоге является развитие специфического клеточного иммунитета и образование специфических антител, а уровень выраженности этих процессов в основном зависит от функционального состояния лимфоидных клеток, участвующих в иммунном ответе, чему и был посвящен следующий этап исследований.

Неспецифическую функциональную активность лимфоцитов крови определяли по их способности реагировать усиленной пролиферацией in vitro на добавление в культуру растительных лектинов-митогенов. С этой целью проводили постановку реакции бласттрансформации (РБТЛ) с Т-клеточными митогенами – конканавалином А (Кон А) и фитогемагглютинином (ФГА).

В табл. 4.6 представлены результаты исследований спонтанной пролиферации и митоген-активированной пролиферации лимфоцитов крови у вакцинированных ВК №1.

Как оказалось, уровень спонтанной пролиферации (контроль) во всех группах на 3 сут после вакцинации возрастал по сравнению с фоновыми показателями и, претерпевая незначительные колебания, к 25 сут снижался до фоновых величин. Исключение составила группа, получившая прививку ВК № 1, где показатель спонтанной пролиферации оставался повышенным.

Незначительное повышение ФГА-активированной пролиферации лимфоцитов, уровень которой снижался на 7 сут, затем на 14 и 25 сут, приближаясь к исходным значениям.

Исследование пролиферативной активности лимфоцитов, индуцированной Кон А, на 3 сут не проводилось. На 7 сут после иммунизации наблюдались незначительные колебания уровня Кон А-активированной пролиферации лимфоцитов по сравнению с фоном. В последующие сроки наблюдения ее уровень был сравним с фоновыми показателями. Важно подчеркнуть, что анализ абсолютных величин пролиферации лимфоцитов в данном случае не в полной мере отражает картину функциональной активности лимфоцитов в поствакцинальном периоде.

В связи с этим для более детального изучения функциональной активности лимфоцитов был высчитан коэффициент стимуляции (КС), представляющий собой частное от деления абсолютных величин пролиферации лимфоцитов в опыте и контроле.

Таблица 4.6

Показатели спонтанной и митоген-активированной пролиферации лимфоцитов крови у вакцинированных вакцинным комплексом №1 (количество К-распадов в 1 мин на 2 мл культуры клеток), X±m

Вакцина (шифр)	Применяемый митоген	Срок исследования после прививки, сут				
		фон	3	7	14	25
ВЧЖС	Без митогена	1750±111	5357±1013*	3739±871*	21491±226	13961±112
	Кон А	79885±4019	–	51530±7756	69672±7085	68812±6697
	ФГА	139113± 7041	171430± 30771	114023± 12154	1351821± 10622	92851± 11092
ТА	Без митогена	1750±111	6471±1497*	886±63*	1912±132	1196±77*
	Кон А	79885± 4019	–	70772± 7409	76008± 5852	700101± 5012
	ФГА	139113+ 7041	162045± 15520	134616± 9103	161676± 12343	108926 ±3877
ВОЖС	Без митогена	1750±111	2193±363	1044±76*	2162±166	927±77*
	Кон А	79885±4019	–	66677±7901	70666±4205	65033±3426
	ФГА	139113+ 7041	135206± 16944	85109± 7517*	145665± 7979	103608± 5480*
ВК № 1	Без митогена	1750±111	4933±941*	1392±85	2154±188	2650±390
	Кон А	79885±4019	–	78914±5551	60398±4892	61427±3887
	ФГА	139113± 7041	168366± 1874	115099± 8402	144542± 7106	92878± 7603*

* Различия по отношению к фону достоверны при P<0,05.

В табл. 4.7 представлен уровень функциональной активности лимфоцитов, выраженный в виде КС. Полученные данные свидетельствуют об угнетении бласттрансформации лимфоцитов крови на ФГА на 3 сут после вакцинации по сравнению с фоном во всех обследуемых группах (P≤ 0,05). На 7 сут после иммунизации ВЧЖС и ТА отмечено значительное повышение отвечаемости лимфоцитов на ФГА по сравнению с фоном (P≤ 0,05), а также с аналогичными показателями на 3 сут после прививки. Уровень активности лимфоцитов на ФГА в других группах вакцинированных возрастал

Таблица 4.7

Влияние вакцинации на бластогенный ответ лимфоцитов крови (коэффициент стимуляции)

Вакцинный препарат (шифр)	Митоген	Срок исследования после прививки, сут				
		фон	3	7	14	25
ВЧЖС	Кон А	53,1±4,2	–	116,2±12,2	33,7±2,9	54,4±9,6
	ФГА	86,3±4,3	32,3±8,8*	290,9±35,6*	66,7±6,1*	89,8±11,1
ТА	Кон А	53,1±4,2	–	76,9±8,5	44,9±3,8	62,3±5,6
	ФГА	86,3±4,3	35,9±3,6*	147,0±10,5	95,9±7,9	96,6±5,7
ВОЖС	Кон А	53,1±4,2	–	66,7±8,6	34,2±2,1	76,2±5,5
	ФГА	86,3±4,3	62,0±7,9	91,3±10,5	72,0±5,5	121,3±8,9*
ВК № 1	Кон А	53,1±4,2	–	59,3±4,6	30,9±3,1	37,3±5,8
	ФГА	86,3±4,3	35,2±4,4*	87,4±8,4	77,0±7,8	52,7±8,1*

* Различия по отношению к фону достоверны при $P<0,05$.

по сравнению с показателем на 3 сут, но не имел статистически достоверных отличий от фоновых данных.

На 14 сут после вакцинации во всех группах наблюдалось снижение уровня функциональной активности лимфоцитов крови, выявленное по ответам на ФГА. В группах иммунизированных ВЧЖС и ТА этот показатель достигал фоновых значений к 25 сут после прививки ($P\leq 0,05$). На 25 сут в группе вакцинированных ВОЖС ответ лимфоцитов на ФГА вторично повышался, а у получивших прививку ВК № 1 – снижался ($P \leq 0,05$).

Аналогичная картина наблюдалась при анализе функциональной активности лимфоцитов, выявленная по их реакции на другой Т-клеточный митоген – Кон-А.

В результате проведенных исследований установлено, что в процессе иммунологической перестройки организма в ответ на введение ВК или монопрепаратов наблюдалось увеличение уровня функциональной активности лимфоцитов, которому предшествовало кратковременное (на 3 сут) ее подавление. К 25 сут после иммунизации уровень бласттрансформации лимфоцитов в ответ на митоген восстанавливался до фоновых величин у привитых ВЧЖС и ТА. Повышение функциональной активности лимфоцитов на 25 сут после иммунизации ВОЖС и ВК №1 может быть объяснена повышенной антигенной нагрузкой. Восстановление уровня функциональной

Таблица 4.8

Показатели специфической сенсибилизации лимфоцитов крови у иммунизированных вакцинным комплексом № 1 (коэффициент стимуляции), X±m

Вакцинный препарат (шифр)	Применяемый в РБТЛ антиген (шифр)	Сроки исследования, сут				
		фон	14		25	
ВЧЖС	ВЧЖС ВОЖС С	1,46±0,07 1,22±0,08 1,41±0,07	4,40±0,57 4,27±0,81 4,49±0,66	90% 70% 100%	4,78±1,24 5,80±0,93 4,20±1,07	100% 62% 75%
С	ВЧЖС ВОЖС С	1,64±0,07 1,22±0,08 1,41±0,07	2,17±0,20 2,54±0,31 2,07+0,17	18% 53% 18%	3,07±0,36 3,03±0,45 2,70±0,50	55% 65% 30%
ВОЖС	ВЧЖС ВОЖС С	1,46±0,07 1,22±0,08 1,41±0,07	2,45±0,26 4,66±0,93 3,31±0,46	45% 95% 55%	2,43±0,19 4,59±0,91 3,02±0,42	35% 65% 40%
(ВЧЖС+ВОЖС) + +С (ВК№ I)	ВЧЖС ВОЖС С	1,46±0,07 1,22±0,08 1,41±0,07	4,23±0,76 2,19±0,18 2,32±0,27	55% 78% 22%	5,61±0,76 3,95±0,38 3,43±0,66	90% 100% 35%

Примечание. ВЧЖС – антиген, приготовленный из штамма ЕВ; ВОЖС – антиген, приготовленный из осповакцины; С – антиген, приготовленный из компонентов секстаанатоксина; в скобках показан процент положительных проб крови.

активности лимфоцитов в этих группах происходило, вероятно, в более поздние сроки.

Уровень специфической сенсибилизации лимфоцитов в изученных группах на вышеназванные антигены представлен в табл. 4.8.

Из приведенных показателей КС видно, что специфическая сенсибилизация лимфоцитов выявлялась на 14-е сут после вакцинации во всех обследуемых группах. Появление положительных ответов на специфические антигены, использованные в РБТЛ, в группах привитых, не получавших данный антиген при иммунизации, можно объяснить, по-видимому, неспецифической стимуляцией определенных пулов лимфоцитов, способных отвечать на многие антигены бактериальной и вирусной природы.

Во всех исследованных группах уровни специфической сенсибилизации на 14 и 25 сут после вакцинации достоверно не изменялись ($P \leq 0,05$).

В зависимости от использованной моновакцины или изученного комплекса количество проб, ответивших положительно на специфический антиген, в группах заметно различалось. Наибольшее количество привитых, у которых на 14 сут после иммунизации была выявлена специфическая сенсибилизация лимфоцитов, определялось: на антиген из штамма ЕВ – в группе привитых ВЧЖС; на антиген из осповакцины – в группе привитых ВОЖС.

На 25 сут после прививки наибольшее количество проб, ответивших положительно на антиген из штамма ЕВ, отмечалось в группе привитых ВЧЖС, а на антиген из ВОЖС – в группе иммунизированных ВК

В группе привитых ВЧЖС уровень специфической сенсибилизации к чумному антигену не отличался от соответствующих результатов исследований у иммунизированных ВК №1.

Низкие показатели, как по специфической сенсибилизации лимфоцитов, так и по количеству проб, положительно ответивших в специфической РБТЛ, были зафиксированы в группе привитых С.

Суммируя результаты, полученные при исследовании специфической сенсибилизации лимфоцитов, можно констатировать, что она выявлялась во всех группах обследуемых на 14 сут после вакцинации.

Активность К- и НК-клеток была изучена в динамике вакцинального процесса. Фоновыми показателями служили средние величины, полученные при обследовании 256 человек.

Как видно из табл. 4.9 и 4.10, активность как К-, так и НК-клеток после вакцинации существенно изменялась. Так, активность К-клеток на 3 сут достоверно увеличивалась во всех группах обследованных (табл. 4.9). Однако максимальное увеличение наблюдалось в группе лиц, вакцинированных 1,0 ч.д. ВОЖС. В остальных группах величина активности К-клеток достигала примерно одинаковых значений.

К 7 сут активность этих клеток значительно повышалась в группах, привитых ВЧЖС и ВК № 1. У иммунизированных С она существенно снижалась.

Таблица 4.9

Активность К-клеток крови у привитых вакцинным комплексом №1 (единицы цитотоксической активности на 1 мл цельной крови), X+m

Вакцинный препарат (шифр)	Срок исследования, сут				
	фон	3	7	14	25
ВЧЖС	63,5±4,1	106,9±17,4*	179,9±40,8*	58,2±15,0	87,5±18,2
ВОЖС	63,5±4,1	87,8±10,1*	106,4±14,2*	39,8±3,3*	186,5±27,2*
С	63,5±4,1	135,5±19,8*	87,6±11,7*	52,5±11,4	77,6±6,0
(ВЧЖС+ВОЖС)+С	63,5±4,1	121,0±15,1*	167,0±23,5*	73,4±12,9	76,5±5,7

* Различия по отношению к фону достоверны при P <0,05.

К 14 и 25 сут у привитых ВЧЖС, С и ВК №1 активность К-клеток снижалась и заметно стабилизировалась. Иммунизация ВОЖС приводили к значительному снижению активности К-клеток, однако в последующем она возрастала до величин, превышающих максимальные показатели во всех остальных группах.

Активность НК-клеток после иммунизации на 3 сут достоверно увеличивалась во всех обследованных группах (табл. 4.10), снижаясь к 25 сут примерно до одинаковых значений. Однако следует отметить, что в интервале между 3 и 25 сут активность НК-клеток во всех обследованных группах изменялась разнонаправленно. Так, у привитых ВЧЖС на 7 и 14 сут выявлено повышение активности НК-клеток, а у иммунизированных С и ВК №1 активность НК-клеток снижалась уже к 7 сут и оставалась на этом уровне до 25 сут (срок наблюдения).

Анализируя полученные данные, можно сделать предположение о возможности угнетающего влияния С на НК-клетки. Провести такой анализ по отношению к группе привитых ВК №1 практически невозможно из-за отсутствия стимулирующего эффекта ВОЖС. Стимулирующее влияние ВЧЖС в этой комбинации вакцин, по-видимому, тормозится как С, так и ВОЖС.

Полученные при исследовании активности К- и НК-клеток данные свидетельствуют о том, что вакцинация вызывала циклические изменения этих показателей, что соответствует литературным данным. Практически все изученные вакцины и ВК №1 приводили

Таблица 4.10

Активность НК – клеток крови у привитых вакцинным комплексом №1 (единицы цитотоксической активности на 1 мл цельной крови), X ± m

Вакцинный препарат (шифр)	Срок исследования, сут				
	фон	3	7	14	25
ВЧЖС	93,3±4,26	121,2±10,71*	112,0±42,17	152,6±16,23*	43,9±6,90*
ВОЖС	93,3±4,26	141,1±17,54*	65,5±15,52	95,8±15,67	55,8±6,04*
С	93,3±4,26	139,6±12,74*	65,5±15,61	76,9±29,61	55,5±6,50*
(ВЧЖС+ВОЖС)+ +С	93,3±4,26	167,0± 17,28*	63,0±11,58*	60,8±8,28*	39,0±2,98*

* Различия по отношению к фону достоверны при $P<0,05$.

к достоверному снижению активности НК-клеток и повышению К-клеток ($P \leq 0,05$).

Анализируя амплитуду отклонений величины активности изученных клеток, можно заключить, что наиболее выраженные изменения указанных показателей вызывала иммунизация ВОЖС.

Таким образом, представленные в настоящем разделе исследований данные свидетельствуют о том, что в процессе иммунизации людей ВК у них в поствакцинальном периоде наблюдается достаточно выраженная активация неспецифического и специфического клеточного звеньев иммуногенеза. В частности, показано существенное по сравнению с исходными (до прививки) значениями увеличение активности метаболических и секреторных процессов в фагоцитирующих клетках крови, что указывает на достаточно эффективное их взаимодействие с антигенным раздражителем на ранних этапах иммуногенеза. В пользу этого положения, по-видимому, свидетельствует и достаточно выраженная функциональная активность лимфоцитов и естественных киллеров, т.е. клеток, принимающих непосредственное участие в формировании специфического клеточного иммунитета.

Можно предположить, что установленное повышение активности специфического клеточного иммунитета является следствием стимулирующего влияния изученного ВК на неспецифическое

звено иммуногенеза, поскольку, как следует из данных литературы, существует тесная взаимосвязь между компонентами, составляющими неспецифический и специфический этапы иммунного ответа.

При этом следует подчеркнуть, что реакция иммунокомпетентных клеток на комплексно-ассоциированную иммунизацию практически не отличалась от таковой при введении в организм препаратов, входящих в состав этих комплексов, т.е. существенных конкурентных взаимоотношений между вводимыми в одной смеси или комплексе антигенами выявлено не было.

Убедительным подтверждением этого служат результаты, полученные при оценке уровня специфических антител в поствакцинальном периоде. Учитывая, что они достаточно подробно изложены в наших предыдущих работах [15, 17, 18, 38, 45], мы ограничились в данной главе кратким изложением этих итогов. В большинстве случаев защитные титры антител, полученные при комплексно-ассоциированном введении в организм, соответствовали показателям монопрепаратов, входящих в изученные вакцинные комплексы. В то же время необходимо отметить, что относительно слабый иммунитет формировали использованные в комплексах холерная и брюшнотифозная вакцины. Указанное обстоятельство подчеркивает необходимость в существенном совершенствовании существующей системы ВП прежде всего за счет улучшения качества используемых и разработки новых эффективных ИЛП против наиболее актуальных инфекционных заболеваний.

Литература

1. *Кассиль, Г.И.* Внутренняя среда организма. – М.: Наука, 1983. – 227 с.

2. *Росин, Я.А.* Регуляция функций. – М.: Наука, 1984. – 172 с.

3. *Медведев, В.И.* Введение // Физиологические основы повышения эффективности труда. – Л.: Наука, 1978. – С. 3–7.

4. *Виру, А.А.* Функциональная устойчивость и физиологические резервы организма // Характеристика функциональных резервов спортсмена. – Л., 1982. – С. 8–11.

5. *Моисеева, И.И.* Гомеостаз и оценка функциональных резервов организма / И.И. Моисеева, А.М. Ситникова // Современные проблемы клинической физиологии ЦНС. – Л.: Медицина, 1981. – С.5–18.

6. *Хочачка, П.* Стратегия биохимической адаптации / П. Хочачка, Ж. Сомеро; пер. с англ. – М.: Мир, 1977. – 316 с.

7. *Баевский, Р.М.* Проблемы прогнозирования состояния здоровья организма в процессе его адаптации к различным воздействиям // Нервные и эндокринные механизмы стресса. – Кишинев: Штиинца, 1988. – Т.94. – С. 30–61.

8. *Казначеев, В.П.* Очерки теории и практики экологии человека. – М.: Наука, 1983. – 260 с.

9. Компоненты адаптационного процесса // под ред. В.И. Медведева. – Л.: Медицина, 1984. – 111 с.

10. *Шепилов, А.А.* Выносливость борцов / А.А. Шепилов, В.П. Климин. – М.: Физкультура и спорт, 1979. – 128 с.

11. *Бехтерева, Н.П.* Нейрофизиологические аспекты психической деятельности человека. – Л.: Медицина, 1971. – 127с.

12. *Адо, А.Д.* Общая аллергология. – М.:Медицина, 1978. – 463 с.

13. *Ковалев, И.Е.* Поток чужеродных веществ, влияние на человечество / И.Е. Ковалев, А.Г. Максимов // Природа. – 1980. – № 9. – С. 90–91.

14. *Бехтерева, Н.П.* Физиологические корреляты состояний и деятельности в центральной нервной системе / Н.П. Бехтерева, П.В. Бундзен, Ю.Л. Гоголицын и др. // Физиология человека. – 1980. – № 5. – С. 877–892.

15. *Агафонов, В.И.* Комплексная и ассоциированная иммунизация массовыми методами / В.И. Агафонов, Т.И. Булатова, Х.П. Гамлешко и др. – Алма-Ата: Наука, 1983. – 164 с.

16. *Агафонов, В.И.* Массовая комплексная иммунизация и ее влияние на трудоспособность / В.И. Агафонов, К.Г. Гапочко, Х.П. Гамлешко и др. – Алма-Ата: Наука, 1979. – 168 с.

17. *Агафонов, В.И.* Массовая комплексная (ассоциированная) иммунизация против брюшного тифа, холеры и чумы / В.И. Агафонов, К.Г. Гапочко, Х.П. Гамлешко и др. // Воен.-мед. журн. – 1983. – № 8. – С. 45–48.

18. *Гапочко, К.Г.* Вакцины, поствакцинальные реакции и функциональное состояние организма привитых / К.Г. Гапочко, Р.Ш. Магазов, В.С. Матковский и др. – Уфа: Башк.кн. изд-во, 1986. – 200 с.

19. *Агафонов, В.И.* Комплексная вакцинация против туберкулеза и других инфекций / В.И. Агафонов, В.Д. Беляков, Д.Т. Хохлов и др. // Воен.-мед. журн. – 1976. – № 3. – С. 42–45.

20. *Виноградов, М.И.* Физиология трудовых процессов. 2-е изд., перераб. и доп. – М.: Медицина, 1966. – 366 с.

21. *Загрядский, В.П.* Методы исследования в физиологии труда. – Л.:Наука, 1976. – 96 с.

22. *Леонова, А.В.* Функциональное состояние человека в трудовой деятельности / А.В. Леонова, В.И. Медведев. – М.: Изд-во МГУ, 1981. –112 с.

23. *Гапочко, К.Г.* Поствакцинальные реакции: механизм развития и профилактика / К.Г. Гапочко, Р.Ш. Магазов, А.П. Савельев и соавт. – Уфа: Башк. кн. изд-во, 1991. – 232 с.

24. *Савельев, А.П.* Ассоциированная и комплексная иммунизация: состояние и перспективы / А.П. Савельев, Р.Ш. Магазов, О.П. Мисников и др. – Уфа: Гилем, Башк. энцикл., 2014. – 424 с.

25. *Гольдберг, Д.И.* Справочник по гематологии / Д.И. Гольдберг, Е.Д. Гольдберг. –Томск: Изд-во ТГУ, 1980. – 265 с.

26. *Имангулов, Р.Г.* Критерии оценки боеспособности войск (обзор литературы) // Воен.-мед. журн. – 1982. – № 10. – С. 35–37.

27. *Бунин, К.В.* Прививочные реакции при иммунизации живыми вакцинами / К.В. Бунин, К.Г. Гапочко. – М.: Медицина, 1970. – 296 с.

28. *Лутфуллин, М.Х.* Гиперчувствительность замедленного типа и иммунитет против бруцеллеза у морских свинок реиммунизированных живой вакциной из штамма 82 // Тез. докл. 4-й Всес. конф. (Москва, 23–25 апр. 1991). – М., 1991. – С. 100–101.

29. *Ван Лир, Э.* Гипоксия /Э. Ван Лир, К.Стикней; пер. с англ. – М.: Мир, 1967. – 212 с.

30. *Спектрова, С.Я.* К методике анализа спирографии. – Минск: Здравоохр. Белорус., 1983. – 200 с.

31. *Хасис, Г.Л.* Нормативы основных показателей внешнего дыхания. – Кемерово, 1970. – 78 с.

32. *Ващук, О.В.* Влияние дозированной физической нагрузки на результаты тестирования сенсомоторной реакции у привитых / О.В. Ващук, В.Н. Голубев, А.П. Савельев и др. // Научные основы физического воспитания и спорта. – Л., 1982. – С. 37–39.

33. *Короленко, И.П.* Психофизиология человека в экстремальных условиях. –Л.: Медицина, 1978. – 272 с.

34. *Сосникова, Ю.Е.* Психические состояния человека, их классификация и диагностика. – Горький, 1983. – 200 с.

35. *Марченко, А.М.* Изучение некоторых показателей реактогенности при иммунизации кроликов аттенуированными штаммами вируса венесуэльского энцефаломиелита лошадей / А.М. Марченко, З.П. Бекетова, В.Д. Подоплекин // Конструирование и применение биологических препаратов. – Томск: Изд-во ТГУ, 1976. – С. 243–249.

36. Федеральный закон «Об обращении лекарственных средств» № 61-ФЗ от 12 апреля 2010 г. с изменениями от 27.07.2010 № 192-ФЗ, от 11.10.2010 № 313- ФЗ и от 06.12.2011 № 409-ФЗ.

37. Приказ МЗ и СР РФ от 19.06.2003 г. № 266 «Об утверждении правил клинической практики в РФ».

38. Национальный стандарт РФ. ГОСТ 52379 – 2005 «Надлежащая клиническая практика». – М.: Стандартинформ, 2006. – 33 с.

39. СП 3.3.2.561-96 «Государственные испытания и регистрация новых медицинских иммунобиологических препаратов».

40. *Василенко, А.Ж.* Ассоциированная и комплексная иммунизация (особенности формирования иммунного ответа организма) / А.Ж. Василенко, Р.Ш. Магазов, О.П. Мисников и др. – Уфа: РИО ГУП «Иммунопрепарат», 2000. – 241 с.

41. *Engler, H.* Naturliche Killer – Zellen /H. Engler, H.Kerchner //Med. Monatschr. Pharm. – 1983. –Vol.6. – №1. – P. 3–10.

42. *Kay, N.E.* Natural Killer Cells //CRC Crit. Rev. Clin. Lab. Sci. – 1986. – Vol. 22. – № 4. – P.343–359.

43. *Ломакин, М.С.* К-клетки как фактор иммунологического надзора / М.С. Ломакин, И.Н. Майский // Успехи совр. биол. – 1985. – Вып. 99. – № 2. – С. 249–263.

44. *Малыгин, А.М.* Натуральные киллеры и их физиологическое значение // Цитология. – 1985. – Вып. 27. – №10. – С. 1091–1100.

45. *Herberman, R.B.* Immunoregulation and natural killer cells // Mol. Immunol. – 1982. – Vol. 19. – №10. – P. 1313–1321.

46. *Петров, Р.В.* Иммунология. – М.: Медицина, 1987. – 415 с.

ГЛАВА 5

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ ПОЛИАНАТОКСИНА «ТЕТРА-ГА» ПРОТИВ РАНЕВОЙ АНАЭРОБНОЙ ИНФЕКЦИИ*

Несмотря на очевидные положительные стороны сухого сорбированного секстаанатоксина в отношении раневой анаэробной инфекции (РАИ) он не был лишен недостатков, основными из которых являлись недостаточная иммунологическая эффективность анатоксина перфрингенс (формирование напряженного антитоксического иммунитета не более чем к одной смертельной дозе соответствующего токсина), а также узость спектра формируемого антитоксического иммунитета (только к трем токсинам – перфрингенс, эдематиенс, столбнячный – имеющим отношение к РАИ). Секстаанатоксин не обеспечивал формирование антитоксического иммунитета к другим возбудителям РАИ, которыми являются Cl. hystolyticum и Cl. septicum.

Поэтому актуальной задачей представлялась разработка полианатоксинсодержащего препарата «Тетра-ГА» против раневых клостридиозов, являющегося смесью сорбированных на гидроокиси алюминия анатоксинов: анатоксина перфрингенс, анатоксина эдематиенс, анатоксина септикум и анатоксина гистолитикум. Поэтому основной целью наших дальнейших исследований явилось экспериментальное изучение специфической активности и иммунобиологической безопасности полианатоксина «Тетра-ГА», как средства специфической профилактики раневых клостридиозов.

Известно, что для объективной оценки специфической активности любого лекарственного средства в экспериментальных условиях большое значение имеет выбор адекватной модели того или иного патологического процесса [1, 2, 3].

* Исследования выполнены совместно с О.Д. Семеновым, И.А. Добрыниной и О.В. Хлопуновой.

Не является исключением и оценка средств иммунопрофилактики РАИ, моделирование которой в экспериментальных условиях возможно различными способами, однако большинство исследователей склоняется к использованию методологии, включающей введение возбудителя или суспензии, содержащей несколько возбудителей РАИ, в мышцу животного одновременно с жидкой казеиновой средой, содержащей 0,1% агара и 0,4% желатина. При моделировании РАИ с использованием Cl. perfringens в качестве травмирующего агента применяется хлорид кальция в виде 5–10% раствора [3, 4].

В качестве биологической модели используются мыши, морские свинки, кролики и собаки, однако предпочтение отдают белым беспородным мышам и морским свинкам, поскольку инфекционный процесс у них по развитию и клиническим проявлениям аналогичен, протекающему у человека [3, 5]. После заражения животные теряют подвижность, плохо ориентируются в пространстве, слабо реагируют на внешние раздражители. В месте введения наблюдаются дегенеративно-дистрофические и некротические изменения, а также клеточная инфильтрация с преобладанием полиморфно-ядерных лейкоцитов. В крови повышено количество лейкоцитов, во внутренних органах нарушается кровообращение и, как следствие этого, развиваются дистрофические изменения различной степени выраженности. Гибель животных, как правило, наступает через 12–36 ч от момента заражения [2, 6, 7]. Поэтому для реализации цели и задач настоящего исследования прежде, чем приступить к оценке протективных свойств средств иммунопрофилактики раневой анаэробной инфекции (РАИ), предстояло провести серию исследований, посвященных отработке экспериментальных моделей инфекции, вызванной Cl. oedematiens, Cl. septicum, Cl. histolyticum.

5.1. Моделирование экспериментальной раневой анаэробной инфекции с использованием Cl. oedematiens, Cl. septicum, Cl. histolyticum*

В наших исследованиях для воспроизведения РАИ применяли Cl. perfringens типа А (вирулентный штамм № 28 и вирулентный

* Исследования выполнены совместно с О.Д. Семеновым, О.В. Хлопуновой, И.А. Добрыниной и А.К. Федотовым.

штамм № 233), Cl. oedematiens (вирулентный штамм № 79), Cl. septicum (вирулентный штамм № 59), Cl. hystolyticum (вирулентный штамм № 5). Для культивирования возбудителей использовали питательные среды Китт-Тарощци, полужидкую обогащенную среду для контроля стерильности (СКС), анаэробный агар с добавлением 5% крови.

Для моделирования интоксикаций использовали токсины перфрингенс, эдематиенс, септикум и гистолитикум.

Исследования проводили на рандомбредных белых мышах-самцах и морских свинках, а также кроликах породы «Шиншилла». Было использовано 1000 мышей массой 16–18 г, 650 морских свинок массой 200–250 г и 100 кроликов массой 2,0–2,5 кг.

Моделирование раневой анаэробной инфекции проводили с использованием односуточных культур Cl. perfringens, Cl. oedematiens, Cl. septicum, Cl. hystolyticum, либо ассоциации возбудителей Cl. perfringens и Cl. oedematiens. Суспензию конкретного возбудителя вводили животным внутримышечно в верхнюю треть бедра задней лапы в объеме 0,1 мл (белым мышам) или 0,2 мл (морским свинкам) в дозах от 1 до 16 $ЛД_{50}$. Одновременно в эту же область вводили 0,1 мл 5% (белым мышам) или 10% (морским свинкам) раствора хлорида кальция. Наблюдение за инфицированными животными осуществляли в течение 21 сут от момента заражения, ежедневно отмечая количество живых и погибших животных. При моделировании РАИ, вызванной ассоциацией возбудителей Cl. perfringens и Cl. oedematiens, их монокультуры предварительно суспендировали, после чего полученные суспензии смешивали в равных объемах, проводили определение $ЛД_{50}$ полученной суспензии и затем осуществляли заражение животных таким же образом, как и при моделировании РАИ, вызванной монокультурами упомянутых возбудителей.

Моделирование интоксикаций клостридиальными токсинами осуществляли с использованием токсинов перфрингенс, эдематиенс, гистолитикум и септикум, каждый из которых вводили подопытным животным внутривенно (в хвостовую вену) или внутрибрюшинно в объеме 0,5 мл. В исследовании использовали дозы биотоксинов от 2 до 20 $ЛД_{50}$. Наблюдение за животными осуществляли в течение 4 сут от момента введения того или иного токсина, ежедневно отмечая количество живых и погибших

животных. Процесс моделирования экспериментальной РАИ с использованием Cl. oedematiens, Cl. septicum, Cl. histolyticum включал несколько последовательных этапов, первый из которых был посвящен культивированию упомянутых возбудителей с целью их последующего использования в качестве заражающих агентов.

Культивирование микроорганизмов проводили на питательных средах: полужидкой обогащенной СКС и плотной питательной среде (анаэробный агар с добавлением 5% крови). Полученные результаты представлены в табл. 5.1.

Полученные результаты свидетельствуют, что культивированные штаммы возбудителей РАИ по своим культуральным и морфологическим свойствам соответствуют Cl. oedematiens, Cl. septicum, Cl. histolyticum.

По окончании микробиологических исследований и накопления чистых культур возбудителей РАИ были проведены исследования по определению величины $ЛД_{50}$ каждого возбудителя. Исследования выполнены на 120 беспородных белых мышах-самцах массой 18–20 г. В результате проведенных исследований оказалось, что для Cl. oedematiens величина исследованного показателя составила 105 КОЕ/мл, для Cl. septicum и Cl. histolyticum – 104 КОЕ/мл.

В дальнейшем были спланированы точечные эксперименты, в которых осуществляли моделирование РАИ с использованием каждого из возбудителей в фиксированной заражающей дозе. Результаты исследований приведены на рис. 5.1–5.3.

Таблица 5.1

Культуральные и морфологические свойства исследованных штаммов возбудителей раневой анаэробной инфекции

Возбудитель, № штамма	Характер роста возбудителя в питательной среде	Морфологические свойства возбудителя
Cl. oedematiens, 79	Равномерное помутнение по всему объему среды	Грамположительные палочки с закругленными концами, образуют субтерминальные споры
Cl. septicum, 59	Легкое помутнение в верхней трети среды в виде комка ваты	Единичные грамположительные мелкие палочки
Cl. histolyticum, 5	Легкое помутнение по всему объему среды	Грамположительные мелкие палочки

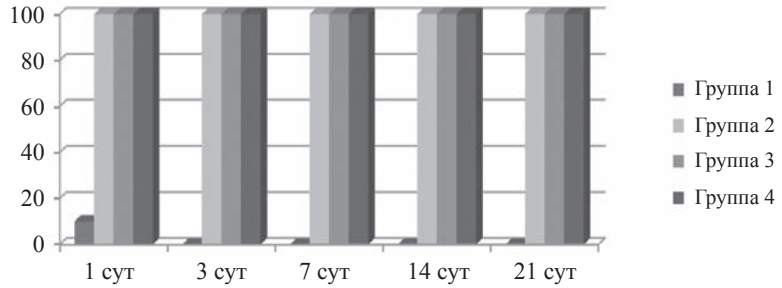

Рис. 5.1. Динамика выживаемости белых беспородных мышей, инфицированных Cl. oedematiens (штамм № 79): группа 1 (20 гол.) – животные, инфицированные культурой возбудителя в дозе 10 $ЛД_{50}$, и получавшие одновременно 5% раствор хлорида кальция внутримышечно в объеме 0,2 мл; группа 2 (20 гол.) – животные, инфицированные культурой возбудителя в дозе 10 $ЛД_{50}$, но не получавшие хлорид кальция; группа 3 (20 гол.) – животные, получавшие только 5% раствор хлорида кальция внутримышечно в объеме 0,2 мл., группа 4 (20 гол.) – животные, которым не вводили хлорид кальция и культуру возбудителя

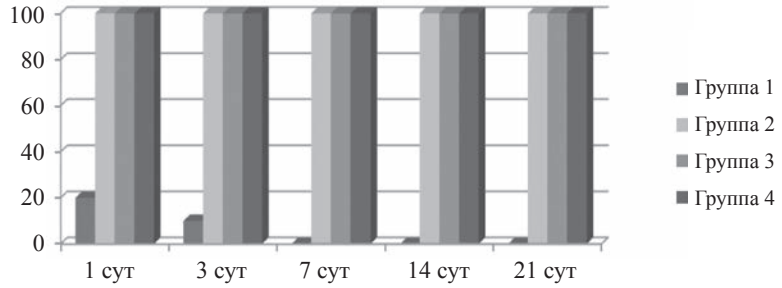

Рис. 5.2. Динамика выживаемости белых беспородных мышей, инфицированных Cl. septicum (штамм № 59): группа 1 (20 гол.) – животные, инфицированные культурой возбудителя в дозе 10 $ЛД_{50}$, и получавшие одновременно 5% раствор хлорида кальция внутримышечно в объеме 0,2 мл; группа 2 (20 гол.) – животные, инфицированные культурой возбудителя в дозе 10 $ЛД_{50}$, но не получавшие хлорид кальция; группа 3 (20 гол.) – животные, получавшие только 5% раствор хлорида кальция внутримышечно в объеме 0,2 мл; группа 4 (20 гол.) – животные, которым не вводили хлорид кальция и культуру возбудителя

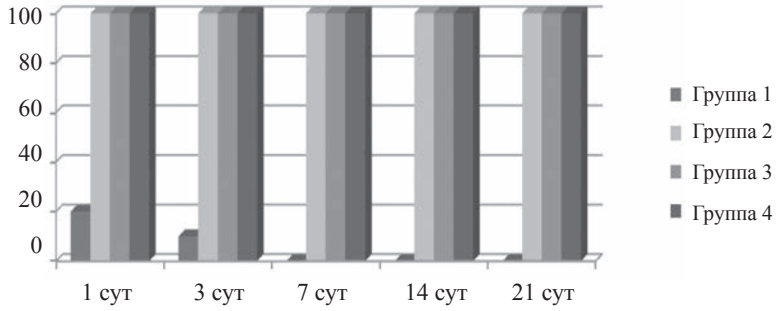

Рис. 5.3. Динамика выживаемости белых беспородных мышей, инфицированных Cl. histolyticum (штамм № 5): группа 1 (20 гол.) – животные, инфицированные культурой возбудителя в дозе 10 $ЛД_{50}$ и получавшие одновременно 5% раствор хлорида кальция внутримышечно в объеме 0,2 мл; группа 2 (20 гол.) – животные, инфицированные культурой возбудителя в дозе 10 $ЛД_{50}$, но не получавшие хлорид кальция; группа 3 (20 гол.) – животные, получавшие только 5% раствор хлорида кальция внутримышечно в объеме 0,2 мл; группа 4 (20 гол.) – животные, которым не вводили хлорид кальция и культуру возбудителя

Данные, приведенные на рис. 5.1–5.3, свидетельствуют, что при раздельном применении культур возбудителей и хлорида кальция у животных не происходило развития инфекционного процесса. Если же культуру возбудителя и хлорид кальция вводили одновременно в одно и то же место, то у белых беспородных мышей развивался инфекционный процесс, характеризовавшийся цианозом кожи и отеком пораженной конечности, снижением двигательной и пищевой активности инфицированных животных, выраженным гангренозным распадом тканей в месте введения возбудителя. В результате этих изменений через 24 ч от момента заражения погибало 80–90% инфицированных животных, а через 48 ч после заражения регистрировали 100% гибель инфицированных животных, независимо от вида использованного возбудителя.

5.2. Моделирование интоксикаций гангренозными токсинами в экспериментальных условиях*

Как известно, при РАИ патологический процесс обусловлен комплексным действием возбудителя, продуцируемых им токсинов и метаболитов, а также биологически активными продуктами распада поврежденных тканей макроорганизма [4, 8]. Каждый из возбудителей РАИ обладает способностью продуцировать несколько токсинов. По мнению большинства исследователей, с самим возбудителем и его метаболитами связаны местные проявления РАИ, а токсины оказывают как общее, так и местное патологические действия [10]. Поэтому логичной представляется следующая последовательность развития РАИ: возбудитель(ли) → продукция гангренозных токсинов → продукция неспецифических токсических веществ → РАИ.

В связи с этим представляется, что оценка эффективности средств иммунопрофилактики РАИ в экспериментальных условиях должна проводиться не только на моделях заражения возбудителями инфекции, но и на моделях интоксикаций гангренозными токсинами.

Моделирование интоксикаций токсинами перфрингенс, эдематиенс, гистолитикум и септикум проводили на белых беспородных мышах-самцах.

Токсины вводили животным подкожно или внутривенно. Критерием, характеризующим специфическую активность каждого из использованных токсинов, являлась величина $ЛД_{50}$. После введения соответствующего токсина, за животными наблюдали в течение 7 сут, ежедневно регистрируя количество живых и павших. Результаты проведенных исследований приведены в табл. 5.2.

Каждый из клостридиальных токсинов при введении экспериментальным животным обладал достаточно выраженным поражающим действием, что характеризовалось снижением двигательной и пищеварительной активности животных, которые регистрировали уже спустя 18–20 ч.

Выраженность поражающего действия токсинов, особенно перфрингенс, эдематиенс и гистолитикум, зависела от способа их введения

* Исследования выполнены совместно с О.Д. Семеновым, В.А. Харитоновой.

Таблица 5.2

Поражающая активность гангренозных токсинов в опытах на белых беспородных мышах-самцах массой 18–20 г

Наименование токсина	Способ введения токсина	Отравляющая доза токсина, мл	Количество павших животных, гол	Величина $ЛД_{50}$, мл
Перфрингенс	внутривенно	0,011	8	0,0067
		0,005	4	
		0,020	3	
		0,010	0	
	подкожно	0,045	10	0,028
		0,022	5	
		0,011	3	
		0,005	0	
Септикум	внутривенно	0,010	10	0,0048
		0,005	5	
		0,0025	3	
		0,0012	0	
	подкожно	0,080	8	0,042
		0,040	5	
		0,020	1	
		0,010	0	
Эдематиенс	внутривенно	0,0125	10	0,0026
		0,006	8	
		0,003	5	
		0,0015	0	
	подкожно	0,025	10	0,0054
		0,012	10	
		0,006	5	
		0,003	0	
Гистолитикум	внутривенно	0,010	10	0,0021
		0,005	8	
		0,002	5	
		0,008	0	
	подкожно	0,020	10	0,0070
		0,010	6	
		0,005	3	
		0,0025	0	

БАШКОРТ ЭНЦИКЛОПЕДИЯҺЫ БАШКИРСКАЯ ЭНЦИКЛОПЕДИЯ

животным, о чем свидетельствовали определенные различия в величинах $ЛД_{50}$ токсинов. При внутривенном способе введения токсинов величина показателя была меньше, чем при их подкожном применении. Полученные результаты согласуются с данными литературы и свидетельствуют, что моделирование интоксикаций клостридиальными токсинами может осуществляться как при подкожном, так и внутривенном способах введения их экспериментальным животным.

5.3. Защитная эффективность полианатоксина «Тетра-ГА» в сравнении с секстаанатоксином в отношении экспериментальной РАИ, вызванной Cl. perfringens типа А и Cl. oedematiens

При оценке защитной эффективности разработанного полианатоксина «Тетра-ГА» в отношении экспериментальной РАИ первоначально была проведена серия исследований на моделях инфекции, вызванной Cl. perfringens типа А и Cl. oedematiens. При этом в качестве препарата сравнения использовали С.

Моделирование инфекции осуществляли с использованием вирулентных штаммов Cl. perfringens типа А (штамм 233А) и Cl. oedematiens (штамм 65). Иммунизацию оцениваемыми ИЛП осуществляли однократно, либо двукратно с интервалом 30 сут. Оба препарата вводили подкожно в объеме 0,5 мл. Исследования выполняли на белых беспородных мышах и морских свинках. Спустя 21 сут после окончания иммунизации производили заражение животных культурами соответствующих возбудителей. Результаты проведенных исследований по сравнительной оценке защитной эффективности полианатоксинов в условиях их однократного применения приведены в табл. 5.3.

Данные в отношении РАИ, вызванной Cl. perfringens типа А, были получены при применении для иммунизации С. Независимо от биологической модели выживаемость иммунизированных животных находилась на уровне 20% на фоне 100% летальности в контроле. При сравнении защитных свойств полианатоксинов в отношении РАИ, вызванной Cl. oedematiens при их однократном применении, оказалось, что САТ обеспечивал более выраженный уровень защиты, чем полианатоксин «Тетра-ГА».

Таблица 5.3

Влияние однократной иммунизации секстаанатоксином на устойчивость экспериментальных животных к заражению Cl. perfringens типа А и Cl. oedematiens

Биопатоген для заражения	Вид животных	Количество животных в группе	Выживаемость, X; (X-tm÷X+tm), %
Cl. perfringens типа А	Белые беспородные мыши	20	20±9
Cl. perfringens типа А	Морские свинки	12	20±11
Cl. oedematiens	Белые беспородные мыши	20	60±11*
Cl. oedematiens	Морские свинки	12	66±15*
Cl. perfringens типа А (контроль заражения)	Белые беспородные мыши	20	0±11
Cl. perfringens типа А (контроль заражения)	Морские свинки	12	0±18
Cl. oedematiens (контроль заражения)	Белые беспородные мыши	20	0±11
Cl. oedematiens (контроль заражения)	Морские свинки	12	0±18

* Различия с показателями в контрольных группах достоверны при $P \leq 0,05$; заражающая доза возбудителей – 10 $ЛД_{50}$.

Как следует из представленных в табл. 5.4 данных, однократное применение полианатоксина «Тетра-ГА» оказалось недостаточно эффективным в плане формирования невосприимчивости организма к заражению Cl. perfringens типа А или Cl. oedematiens.

Защитная эффективность препарата вне зависимости от моделируемой инфекции оказалась одинаковой и составила 15%, что примерно в 2 раза ниже, чем показатели выживаемости в соответствующих контрольных группах, хотя достоверных различий не выявлено ($P>0,05$).

Таким образом, можно заключить, что по уровню формируемой защиты в отношении РАИ, вызванной Cl. perfringens типа А, оба оцененных полианатоксина при их однократном применении оказались равно низкоэффективными, обеспечивая выживаемость от 15 до 20% иммунизированных животных. В то же время в отношении РАИ, вызванной Cl. oedematiens, С оказался

Таблица 5.4

Выживаемость морских свинок, иммунизированных однократно полианатоксином «Тетра-ГА» в условиях инфицирования монокультурами Cl. perfringens типа А и Cl. Oedematiens

Возбудитель	Группа	Количество животных в группе, гол.	Абс. количество выживших животных, гол.	Выживаемость*, X; (X-tm÷X+tm), %
Cl. perfringens типа А	Опытная	13	2	15,0 (2÷45)
	Контрольная	3	1	33,0 (1÷91)
Cl. oedematiens	Опытная	13	2	15,0 (2÷45)
	Контрольная	3	1	33,0 (1÷91)

* Заражающая доза возбудителя, количество $ЛД_{50}$.

более эффективным, чем полианатоксин «Тетра-ГА», они оба применялись однократно: если последний обеспечивал выживаемость только 15% инфицированных животных, то под влиянием С этот показатель, в зависимости от биологической модели, находился на уровне 60–66%, что было достоверно выше, чем среди животных, иммунизированных «Тетра-ГА» (P≤05).

В следующей серии экспериментов, спланированных аналогичным образом, защитный эффект полианатоксинов в отношении РАИ оценивали в условиях их двукратного с интервалом 30 сут введения. Дозы ИЛП были аналогичны использованным при их однократном применении, а заражение животных осуществляли спустя 21 сут после окончания схемы иммунизации. Полученные результаты приведены в табл. 5.5 и 5.6.

Оказалось, что повторное введение полианатоксинов способствовало формированию более выраженной защиты организма от заражения соответствующими возбудителями РАИ. Так, в отношении РАИ, вызванной Cl. oedematiens, оба препарата оказались равно эффективными и обеспечивали практически 100% выживаемость инфицированных особей на фоне 100% летальности в контроле (P≤0,05).

Таблица 5.5

Влияние секстаанатоксина при двукратном с интервалом 30 сут применении на устойчивость экспериментальных животных к заражению Cl. perfringens типа А и Cl. Oedematiens

Биопатоген для заражения	Вид животных, гол.	Количество животных в группе, гол	Выживаемость, X; (X-tm÷X+tm), %
Cl. perfringens типа А	Белые беспородные мыши	20	60 (36–81)*
Cl. perfringens типа А	Морские свинки	12	50 (21–79)*
Cl. oedematiens	Белые беспородные мыши	20	95 (75–100)*
Cl. oedematiens	Морские свинки	12	90 (68–99)*
Cl. perfringens типа А (контроль заражения)	Белые беспородные мыши	20	0 (0–17)
Cl. perfringens типа А (контроль заражения)	Морские свинки	12	0 (0–26)
Cl. oedematiens (контроль заражения)	Белые беспородные мыши	20	0 (0–17)
Cl. oedematiens (контроль заражения)	Морские свинки	12	0 (0–26)

* Различия с показателями в контрольных группах достоверны при P≤ 0,05; заражающая доза возбудителей – 10 $ЛД_{50}$.

Таблица 5.6

Влияние полианатоксина «Тетра-ГА» при двукратном с интервалом 30 сут применении на устойчивость экспериментальных животных к заражению Cl. perfringens типа А и Cl. Oedematiens

Иммунобиологический препарат	Вводимая доза ИЛП для повторной иммунизации, мл	Возбудитель	Выживаемость, X; (X-tm÷X+tm), %
Тетра-ГА	0,25	Cl. perfringens типа А	100 (69–100)*
	0,5		100 (69–100)*
Тетра-ГА	0,25	Cl. oedematiens	100 (69–100)*
	0,5		100 (69–100)*
Не вводили		Cl. perfringens типа А	0 (0–31)
Не вводили		Cl. oedematiens	0 (0–31)

* Различия с показателями в контрольных группах достоверны при P≤0,05; заражающая доза возбудителей – 10 $ЛД_{50}$

В то же время в отношении РАИ, вызванной Cl. perfringens типа А, иммунизация С обеспечивала менее выраженный (на 40–50% ниже) уровень защиты, чем иммунизации полианатоксином «Тетра-ГА» (100% защита на фоне 100% летальности в контроле).

Таким образом, проведенные исследования свидетельствуют, что двукратная иммунизация полианатоксинами в сравнении с однократной обеспечивала более выраженный уровень защиты организма к заражению возбудителями РАИ Cl. perfringens типа А и Cl. oedematiens.

Однако вновь разработанный полианатоксин оказался более эффективным при формировании напряженного иммунитета к Cl. perfringens типа А, чем САТ (рис. 5.4 и 5.5). Совокупность полученных результатов позволяет заключить, что вновь разработанный полианатоксин «Тетра-ГА» в плане формирования невосприимчивости организма к заражению Cl. perfringens типа А

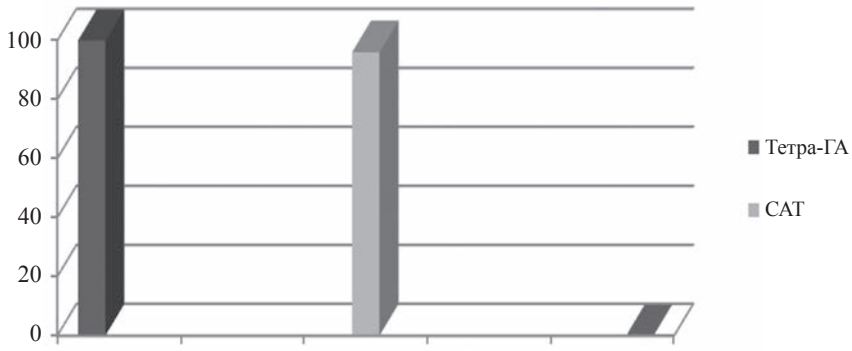

Рис. 5.4. Уровень выживаемости (%) морских свинок, иммунизированных двукратно с интервалом 30 сут полианатоксинами С и «Тетра-ГА», инфицированных монокультурой Cl. Oedematiens (по оси ординат – уровень выживаемости (%) инфицированных животных)

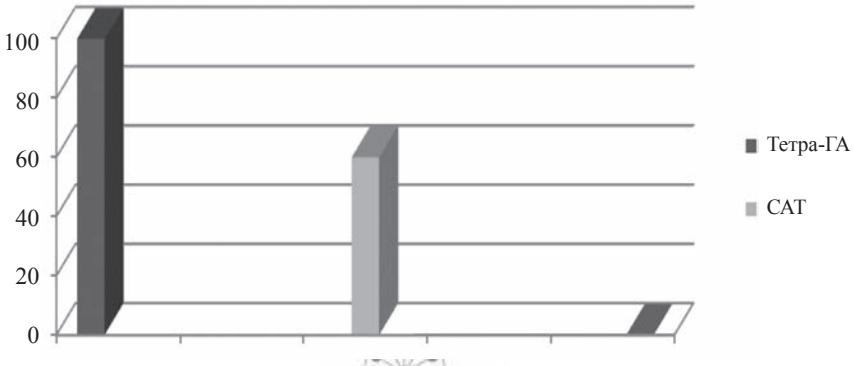

Рис. 5.5. Уровень выживаемости (%) морских свинок, иммунизированных двукратно с интервалом 30 сут полианатоксинами С и «Тетра-ГА», инфицированных монокультурой Cl. perfringens типа А (по оси ординат – величина выживаемости инфицированных животных)

и Cl. oedematiens, особенно при его двукратном с интервалом 30 сут применении, следует рассматривать как более эффективный ИЛП, чем ранее применявшийся С.

Полианатоксин «Тетра-ГА» целесообразно использовать в качестве средства иммунопрофилактики раневых клостридиозов, вызываемых Cl. perfringens типа А и Cl. oedematiens.

5.4. Защитная эффективность полианатоксина «Тетра-ГА» в сравнении с моноанатоксинами в отношении экспериментальной РАИ, вызванной Cl. histolyticum и Cl. septicum

Помимо анатоксинов перфрингенс и эдематиенс, в состав полианатоксина «Тетра-ГА» входят анатоксины гистолитикум и септикум. Поскольку в ранее используемых ИЛП для иммунопрофилактики РАИ упомянутые анатоксины не входили, при проверке эффективности «Тетра-ГА» в отношении этих инфекций было проведено ее сравнение с эффективностью соответствующих моноанатоксинов.

Было спланировано несколько серий экспериментов, первая из которых была посвящена оценке эффективности моноанатоксинов гистолитикум и септикум в отношении соответствующих экспериментальных инфекций. Исследования выполнены на белых беспородных мышах-самцах массой 18–20 г. Животных иммунизировали каждым из анатоксинов однократно подкожно в объеме 0,5 мл. Заражение иммунизированных животных вирулентными культурами соответствующих возбудителей проводили на 21 сут после окончания иммунизации. После заражения за животными устанавливали наблюдение в течение 21 сут, ежедневно отмечая количество живых и павших мышей. Результаты проведенных исследований приведены в табл. 5.7.

Оказалось, что использованные ИЛП обладали определенным защитным действием в отношении РАИ, вызванной Cl. septicum или Cl. histolyticum. Однократное применение анатоксина септикум способствовало повышению выживаемости животных от более высоких заражающих доз, минимальная инфицирующая доза соответствующего возбудителя, вызывала 50% гибель иммунизированных животных в 10 раз, а анатоксина гистолитикум – в 100 раз по сравнению с аналогичными показателями в контрольных группах.

Следующая серия экспериментов была посвящена оценке протективных свойств полианатоксина «Тетра-ГА» в отношении экспериментальной РАИ, вызванной монокультурами Cl. septicum или Cl. histolyticum. Полианатоксины изучали при нескольких схемах их применения, отличавшихся друг от друга количеством инъекций ИБП. Первоначально схема иммунизации экспериментальных животных включала однократное введение полианатоксина. Эксперименты выполнены на морских свинках массой 250–300 г. Препарат вводили внутримышечно в объеме 0,5 мл. Спустя 14 сут после иммунизации, животных заражали внутримышечно вирулентными культурами Cl. septicum или Cl. histolyticum, в дозах 2 $ЛД_{50}$. Культуры возбудителей вводили в заднюю лапу животного в объеме 0,5 мл одновременно с 0,2 мл 5% раствора хлорида кальция. Результаты исследований приведены в табл. 5.8.

Установлено, что более эффективной однократная иммунизация полианатоксином «Тетра-ГА» оказалась в отношении РАИ, вызванной Cl. septicum. Выживаемость иммунизированных животных составила 54 % на фоне 100 % летальности в контрольной

Таблица 5.7

Выживаемость мышей, иммунизированных моноанатоксинами септикум и гистолитикум, при заражении монокультурами Cl.septicum и Cl.histolyticum

Группа животных*	Возбудитель	Заражающая доза возбудителя, КОЕ/мл**	Выживаемость, X; (X-tm÷X+tm), %
Иммунизированные анатоксином септикум	Cl. septicum	108	0 (0,37)
		107	0 (0,37)
		106	25 (3,65)
		105	50 (16,84)
Интактные	Cl. septicum	107	0 (0,37)
		106	0 (0,37)
		105	0 (0,37)
		104	50 (16,84)
Иммунизированные анатоксином гистолитикум	Cl. histolyticum	108	0 (0,37)
		107	0 (0,37)
		106	50 (16,84)
		105	75 (35,97)
Интактные	Cl. histolyticum	107	0 (0,37)
		106	0 (0,37)
		105	0 (0,37)
		104	50 (16,84)

* Группа состояла из 32 белых рандомбредных мышей.
** Каждой дозой возбудителей заражали по 8 животных из группы.

Таблица 5.8

Выживаемость морских свинок, иммунизированных однократно полианатоксином «Тетра-ГА» в условиях инфицирования монокультурами Cl. septicum или Cl. histolyticum

Возбудитель*	Группа	Количество животных в группе, гол.	Количество выживших животных, гол.	Выживаемость, X; (X-tm÷X+tm), %
Cl. histolyticum	Опытная	13	2	15,0 (2÷45)
	Контрольная	3	1	33,0 (1÷91)
Cl. septicum	Опытная	13	7	54,0 (25÷81)
	Контрольная	3	0	0,0 (29÷100)

* Заражающая доза возбудителя, количество 2 $ЛД_{50}$.

группе, однако достоверных различий в исследованном показателе между подгруппами животных выявить не удалось (P>0,05). В то же время иммунологическая эффективность анатоксина гистолитикум в составе полианатоксина «Тетра-ГА» при однократном применении последнего оказалась достаточно низкой. Выживаемость в экспериментальной группе находилась на уровне 15% против 33% в контроле, хотя различия были статистически недостоверны (p>0,05).

В связи с полученными результатами можно заключить, что однократное применение полианатоксина «Тетра-ГА» в определенной степени можно рассматривать оправданным только в исключительных случаях при проведении иммунопрофилактики РАИ, вызванной Cl. septicum. Установленный протективный эффект прежде всего оказался недостоверным в сравнении с контролем, а также получен в условиях заражения экспериментальных животных достаточно низкими заражающими дозами соответствующего возбудителя – 2 $ЛД_{50}$. В целом следует отметить, что компоненты полианатоксина «Тетра-ГА» при его однократном применении проявляют весьма низкую иммуногенность и, как следствие, не обеспечивают формирование напряженного иммунитета к заражению Cl. septicum или Cl. histolyticum.

Заключительная часть исследований была посвящена оценке протективных свойств полианатоксина «Тетра-ГА» в отношении РАИ, вызванной Cl. septicum или Cl. histolyticum при двукратном с интервалом 30 сут применении ИЛП. Исследования выполнены на морских свинках массой 250–300 г. Полианатоксин вводили внутримышечно в объеме 0,25 мл. Спустя 21 сут после окончания курса иммунизации, животных заражали монокультурами Cl. septicum или Cl. histolyticum в дозе – 3 DCL. Результаты проведенных исследований приведены в табл. 5.9.

Как свидетельствуют представленные данные, полианатоксин «Тетра-ГА» при двукратной иммунизации способствовал формированию достаточно выраженного иммунитета у экспериментальных животных к заражению Cl.septicum. При этом на фоне 100% летальности в контроле выживаемость иммунизированных животных составила 100% (P≤0,05). В то же время в отношении РАИ, вызванной Cl. histolyticum, даже двукратная иммунизация полианатоксином оказалась недостаточно эффективной. На фоне 100%

Таблица 5.9

Выживаемость иммунизированных двукратно препаратом «Тетра-ГА» морских свинок, инфицированных монокультурами Cl. septicum или Cl. Histolyticum

Иммунобиологический препарат	Вводимая доза ИБП при первичной и повторной иммунизации, мл	Возбудитель	Выживаемость, X; (X-tm÷X+tm), %
Тетра-ГА	0,25	Cl. septicum	100 (69÷100)
Тетра-ГА	0,25	Cl. histolyticum	40 (12÷74)
Не вводили		Cl. histolyticum	0 (0÷31)
Не вводили		Cl. septicum	0 (0÷31)

летальности в контроле выживаемость среди иммунизированных морских свинок находилась на уровне 40%, что достоверно не отличалось от контрольных значений и не соответствовало нормативам действующих ОТТ.

Суммируя результаты проведенных исследований, можно заключить, что полианатоксин «Тетра-ГА» в качестве средства иммунопрофилактики следует рассматривать при РАИ, вызванной Cl. perfringens типа А, Cl. oedematiens и Cl. septicum. В этих условиях препарат при двукратном применении обеспечивал 100% выживаемость инфицированных экспериментальных животных, что достоверно превышало контрольные значения ($P \leq 0,05$). В то же время применительно к РАИ, вызванной Cl. histolyticum, даже двукратная иммунизация ИЛП не обеспечивала надежного уровня защиты. Только у 40% иммунизированных животных при их инфицировании упомянутым возбудителем не развивался инфекционный процесс, что достоверно не отличалось от контроля ($P > 0,05$). Полученный результат в определенной степени может говорить о недостаточной иммуногенности компонента гистолитикум в разработанном препарате.

Литература

1. *Ашмарин, И.П.* Статистические методы в микробиологических исследования / И.П. Ашмарин, А.А. Воробьев. – Л.: Медицина, 1962. – 180 с.

2. *Гублер, Е.В.* Вычислительные методы анализа и распознавания патологических процессов / Е.В. Гублер. – Л.: Медицина, 1978. – 296 с.

3. *Казиев, В.М.* Введение в анализ, синтез и моделирование систем. Метод Кербера / В.М. Казиев. – М.: Медицина, 2006. – 248 с.

4. *Сергеева, Т.И.* Методологические основы системы активной иммунопрофилактики газовой гангрены / Т.И. Сергеева, Г.И. Кремлев и др. // Материалы VII съезда ОЭМиП. – М., 1997. – Том 2. – С. 40–41.

5. *Мертвецов, Н.П.* Современные подходы к конструированию молекулярных вакцин / В.П. Мертвецов, И.Б. Беклемишев, И.М. Савич. – Новосибирск: Наука, 1987. – 210 с.

6. *Ахундова, К.А.* Метод воспроизведения газовой гангрены // Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 1975. – № 4. – С. 43–47.

7. *Генес, В.С.* Некоторые простые методы кибернетической обработки данных диагностических и физиологических исследований / В.С. Генес. – М.: Наука, 1967. – 208 с.

8. *Горшков, С.З.* Анаэробная клостридиальная раневая газовая инфекция / С.З. Горшков. – М.: Медицина, 2007. – 128 с.

9. *Мисников, О.П.* Состояние и перспективы развития массовых методов иммунизации / О.П. Мисников, А.П. Савельев, О.Д. Семенов и др. // Отечественная эпидемиология в XXI веке: приоритетные направления развития и новые технологии в диагностике и профилактике болезней человека: труды юбилейной всероссийской научной конференции, посвященной 75-летию кафедры общей и военной эпидемиологии Военно-медицинской академии им. С.М. Кирова и 90-летию со дня рождения академика В.Д. Белякова /под ред. П.И. Огаркова (Санкт-Петербург, 19–20 апреля 2012 г.). – СПб., 2012. – С. 211.

10. *Разоренов, Г.И.* Математические методы анализа чувствительности организма к комбинированному действию комплекса факторов / Г.И. Разоренов // Тр. Ленингр. НИИ эпидемиологии, микробиологии и гигиены. – Л., 1979. – С. 12–32.

ГЛАВА 6

ВЫРАЖЕННОСТЬ АНТИТОКСИЧЕСКОГО ИММУНИТЕТА У ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ЖИВОТНЫХ, ИММУНИЗИРОВАННЫХ ПОЛИАНАТОКСИНОМ «ТЕТРА-ГА»*

6.1. Оценка антитоксического иммунитета, вызываемого моноанатоксинами

Результаты исследований на моделях РАИ показали, что иммунопрофилактика полианатоксином «Тетра-ГА» наиболее эффективна при заражении экспериментальных животных Cl. perfringens типа А, Cl. oedematiens, Cl. septicum и несколько менее эффективна при заражении экспериментальных животных Cl. histolyticum. Положительного результата от применения полианатоксина, как правило, удавалось достигнуть при его применении как минимум двукратно. Однократная иммунизация ИЛП не способствовала формированию у иммунизированных животных напряженного иммунитета к инфекции.

Анализ имеющихся информационных материалов свидетельствует, что основными факторами вирулентности возбудителей раневых анаэробных инфекций (РАИ) являются продуцируемые ими экзотоксины и продукты их жизнедеятельности, оказывающие негативное влияние на функциональное состояние макроорганизма [1, 2, 3]. Поскольку ИЛП на основе анатоксинов должны прежде всего формировать напряженный антитоксический иммунитет, то в ходе выполнения следующего этапа настоящего исследования полианатоксин «Тетра-ГА» был оценен с позиции его способности формировать напряженный иммунитет к токсинам перфрингенс, эдематиенс, гистолитикум и септикум.

* Исследования выполнены совместно с О.Д. Семеновым, И.А. Добрыниной и О.В. Хлопуновой.

Первоначально была проведена оценка способности отдельных компонентов полианатоксина «Тетра-ГА» формировать антитоксический иммунитет у иммунизированных животных. Исследования выполнены на беспородных белых мышах-самцах массой 16–18 г. Моноанатоксины вводили однократно подкожно шприцевым методом в объеме 0,5 мл. Иммунизирующая доза каждого препарата составляла 6 ЕС/мл. Для моделирования интоксикаций соответствующие токсины вводили животным спустя 14 сут после окончания иммунизации внутривенно (в хвостовую вену) или подкожно в объеме 0,5 мл. Наблюдение за животными осуществляли в течение 5 сут от момента введения того или иного токсина, ежедневно отмечая количество живых и павших животных. Результаты проведенных исследований приведены в табл. 6.1.

Установлено, что однократная иммунизация моноанатоксинами (табл. 6.1), обеспечивала формирование у экеспериментальных животных состояния невосприимчивости к соответствующим токсинам. В зависимости от отравляющей дозы иммунизация анатоксином перфрингенс обеспечивала выживаемость 20–83%, анатоксином эдематиенс – 40–90%, анатоксином септикум – 60–80%, анатоксином гистолитикум – 60–80% иммунизированных животных на фоне 100% гибели интактных животных, которым вводили каждый из токсинов в дозе 2 $ЛД_{50}$ (максимальная доза).

Наиболее выраженный протективный эффект в условиях однократной иммунизации моноанатоксинами был получен при введении иммунизированным животным соответствующих токсинов в минимальных из испытанных доз. Из всех испытанных моноанатоксинов наименее эффективным оказался анатоксин перфрингенс, иммунизация которым обеспечивала защиту только 20% иммунизированных животных, при введении одноименного токсина в дозе 5 $ЛД_{50}$. В то же время иммунизация остальными анатоксинами обеспечивала невосприимчивость животных к одноименным токсинам (эдематиенс – 20 $ЛД_{50}$, септикум – 5 $ЛД_{50}$, гистолитикум – 5 $ЛД_{50}$) на уровне 40–60 %. В связи с этим можно высказать предположение относительно перспективности использования моноанатоксинов эдематиенс, гистолитикум и септикум в качестве средств экстренной иммунопрофилактики интоксикаций, обусловленных одноименными токсинами.

Таблица 6.1

Антитоксическая эффективность моноанатоксинов перфрингенс, эдематиенс, гистолитикум, септикум при однократном применении в условиях отравления белых беспородных мышей гангренозными токсинами

Наименование токсина	Группы животных	Кол-во животных в группе	Отравляющая доза токсина, кол-во $ЛД_{50}$	Кол-во погибших животных после введения токсина, гол.					Выживаемость, X (X-tm÷X+tm), %
				5					
				на 1-е сут	на 2-е сут	на 3-и сут	на 4-е сут	на 5-е сут	
1	2	3	4						6
Перфрингенс	Иммунизированные моноанатоксином перфрингенс	6	1,5	0	1	0	0	0	83 (40÷100)
		6	2,5	2	0	0	0	0	67 (22÷96)
		5	5,0	2	1	1	0	0	20 (0÷72)
	Интактные	4	0,5	0	1	0	0	0	75 (19÷100)
		4	1,0	1	2	0	0	0	25 (1÷81)
		4	2,0	3		0	0	0	0 (0÷60)
Эдематиенс	Иммунизированные моноанатоксином эдематиенс	10	10	1	0	0	0	0	90 (56÷100)*
		10	20	1	3	1	1	0	40 (12÷56)
	Интактные	4	0,5	0	1	0	0	0	75 (19÷100)
		4	1,0	0	0	1	0	0	75 (19÷100)
		4	2,0	1	2	1	0	0	0 (0÷60)

ЭНЦИКЛОПЕДИЯ БАШКИРСКАЯ

Окончание табл. 6.1

1	2	3	4	5					6
Септикум	Иммунизированные моноанатоксином септикум	10 10	2,5 5,0	1 3	1 0	0 1	0 0	0 0	80 (44÷98) 60 (26÷83)
	Интактные	4 4 4	0,5 1,0 2,0	1 1 4	0 2 0	0 0 0	0 0 0	0 0 0	75 (19÷100) 25 (1÷81) 0 (0÷69)
Гистолитикум	Иммунизированные моноанатоксином гистолитикум	10 10	2,5 5,0	0 2	2 2	0 0	0 0	0 -	80 (44÷98) 60 (26÷83)
	Интактные	4 4 4	0,5 1,0 2,0	0 2 3	0 1 1	0 0 0	0 0 0	0 0 0	100 (40÷100) 25 (1÷81) 0 (0÷69)

* Различия с показателем выживаемости в группе интактных (неиммунизированных) животных достоверны при $P \leq 0,05$.

ЭНЦИКЛОПЕДИЯ ВЕТЕРИНАРСКАЯ

6.2. Изучение антитоксического иммунитета, развивающегося после применения полианатоксина «Тетра-ГА»

Практически аналогичные результаты были получены при однократной иммунизации животных (белые беспородные мыши) полианатоксином «Тетра-ГА» (табл. 6.2), в результате которой формировался антитоксический иммунитет к основным раневым клостридиальным токсинам. Иммунологическая эффективность полианатоксина в отношении токсинов эдематиенс, септикум и гистолитикум оказалась практически на том же уровне, что и в случае однократного применения соответствующих моноанатоксинов.

В отношении интоксикации токсином перфрингенс эффект полианатоксина оказался на более высоком уровне, чем при применении анатоксина перфрингенс в моноварианте. В зависимости от дозы использованных токсинов выживаемость животных, которым однократно вводили полианатоксин «Тетра-ГА», составила: по отношению к интоксикации токсином перфрингенс – от 70 до 90%; эдематиенс – от 44 до 70%, септикум – от 56 до 78%, гистолитикум – от 50 до 80%. Как и в случае иммунизации моноанатоксинами, наиболее выраженный протективный эффект при иммунизации полианатоксином «Тетра-ГА» регистрировали в случае применения токсинов в минимальных их использованных дозах. При интоксикациях, вызванных более высокими дозами токсинов, эффективность иммунизации полианатоксином «Тетра-ГА» снижалась на 30–50%. Сравнивая полученные результаты с представленными в табл. 6.1, можно заключить, что выживаемость иммунизированных животных в том и другом случае была примерно одинаковой, что позволяет высказать предположение об отсутствии между компонентами полианатоксина каких-либо конкурентных взаимоотношений в плане их иммунотропных эффектов. Применительно к анатоксину перфрингенс его иммуногенность в полианатоксине оказалась более выраженной, чем при использовании в моноварианте.

С целью подтверждения наличия у полианатоксина «Тетра-ГА» иммунотропных эффектов, направленных на формирование специфического антитоксического иммунитета к гангренозным токсинам перфрингенс, эдематиенс, гистолитикум, септикум подобный спектр исследований был выполнен еще на двух видах экспериментальных животных: морские свинки и кролики породы «Шиншилла».

Таблица 6.2

Антитоксическая эффективность полианатоксина «Тетра-ГА» при однократном применении в условиях отравления мышей гангренозными токсинами

Наименование токсина	Группы животных	Кол-во животных в группе, гол.	Доза токсина, количество ≤ $ЛД_{50}$	Кол-во погибших животных после введения токсина, гол.					Выживаемость, X; (X-tm÷X+tm), %
				5					
				на 1-е сут	на 2-е сут	на 3-и сут	на 4-е сут	на 5-е сут	
1	2	3	4						6
Перфрингенс	Иммунизированные полианатоксином «Тетра-ГА»	10 10	2,5 5,0	0 1	1 2	0 0	0 0	0 0	90 (56÷100)* 70 (35÷93)
	Интактные	4 4 4	0,5 1,0 2,0	0 1 3	1 2 1	0 0 0	0 0 0	0 0 0	75 (19÷100) 25 (1÷81) 0 (0÷69)
Эдематиенс	Иммунизированные полианатоксином «Тетра-ГА»	10 9	10 20	– 2	2 1	1 2	– –	– –	70 (35÷93) 44 (14÷79)
	Интактные	4 4 4	0,5 1,0 2,0	– – 1	1 – 2	- 1 1	– – –	– – –	75 (19÷100) 75 (19÷100) 0 (0÷69)

Окончание табл. 6.2

1	2	3	4	5					6
Септикум	Иммунизированные поли-анатоксином «Тетра-ГА»	9 9	2,5 5,0	1 3	1 1	– –	– –	– –	78 (40÷97) 56 (21÷86)
	Интактные	4 4 4	0,5 1,0 2,0	1 1 4	– 2 –	– – –	– – –	– – –	75 (19÷100) 25 (1÷81) 0 (0÷69)
Гистолитикум	Иммунизированные поли-анатоксином «Тетра-ГА»	10 10	2,5 5,0	2 4	– 1	– –	– –	– –	80 (44÷98) 50 (19÷81)
	Интактные	4 4 4	0,5 1,0 2,0	– 2 3	– 1 1	– – –	– – –	– – –	100 (40÷100) 25 (1÷81) 0 (0÷69)

* Различия с показателем выживаемости в группе интактных (неиммунизированных) животных достоверны при $P \leq 0,05$

ЭНЦИКЛОПЕДИЯ ВЕТЕРИНАРСКАЯ

Первоначально определяли величину $ЛД_{50}$ каждого токсина в отношении морских свинок и кроликов. Для этого готовили различные разведения токсинов, после чего по 0,5 мл каждого разведения соответствующего токсина вводили внутрибрюшинно (морским свинкам) или внутривенно в краевую вену уха (кроликам). За экспериментальными животными устанавливали наблюдение в течение 7 сут, регистрируя их состояние и гибель. Результаты приведены в табл. 6.3 (для морских свинок) и 6.4 (для кроликов).

Как видно из приведенных в табл. 6.3 данных, морские свинки оказались чувствительными к интоксикации, вызванной каждым из четырех клостридиальных токсинов. В течение первых 3 сут отмечена гибель большей части животных, подвергшихся воздействию каждым из токсинов. Клиническая картина интоксикации характеризовалась снижением аппетита и двигательной активности животных. Величина $ЛД_{50}$ для токсина перфрингенс составила 0,0145 мл, септикум – 0,037 мл, эдематиенс – 0,022 мл, гистолитикум – 0,027 мл.

Представленные в табл. 6.4 результаты свидетельствуют, что кролики в сравнении с морскими свинками оказались менее восприимчивы к отравлению гангренозными токсинами. Для токсина перфрингенс этот показатель составил 0,072 мл, для токсина

Таблица 6.3

Величины $ЛД_{50}$ гангренозных токсинов в опытах на морских свинках

Наименование токсина	Доза токсина в разведении, мл	Количество животных		Величина $ЛД_{50}$, мл
		в группе	павших	
Перфрингенс	0,04	4	4	0,0145
	0,02	4	3	
	0,01	3	1	
Эдематиенс	0,08	4	4	0,037
	0,04	4	2	
	0,02	3	2	
Септикум	0,06	4	4	0,022
	0,03	4	2	
	0,015	3	2	
Гистолитикум	0,06	4	3	0,027
	0,03	4	3	
	0,015	3	0	

Таблица 6.4

Величины $ЛД_{50}$ гангренозных токсинов в опытах на кроликах*

Наименование токсина	Доза токсина в разведении, мл	Количество павших животных	Величина $ЛД_{50}$, мл
Перфрингенс	0,2 0,1 0,05	4 3 1	0,072
Эдематиенс	0,2 0,1 0,05	4 2 2	0,07
Септикум	0,2 0,1 0,05	4 1 0	0,12
Гистолитикум	0,2 0,1 0,05	3 3 0	0,075

* Количество животных в каждой группе – 4 гол.

эдематиенс – 0,07 мл, для токсина септикум – 0,12 мл, а для токсина гистолитикум – 0,075 мл.

Определенные величины $ЛД_{50}$ гангренозных токсинов позволили перейти к исследованиям по оценке антитоксической эффективности полианатоксина «Тетра-ГА» на кроликах и морских свинках. Полианатоксин применяли однократно, двукратно или трехкратно в объеме 0,5 мл. В последнем случае интервал между первой и второй инъекциями ИЛП составил 30 сут, а между второй и третьей – 4 мес. Спустя 30 сут после последней иммунизации, животным вводили клостридиальные токсины (перфрингенс, эдематиенс, гистолитикум, септикум) в дозе 2 $ЛД_{50}$ в объеме 0,5 мл. После введения токсинов за животными устанавливали наблюдение в течение 7 сут, ежедневно регистрируя количество живых и павших. Результаты проведенных исследований приведены в табл. 6.5 и 6.6. Оказалось, что полианатоксин «Тетра-ГА» при двукратном применении обеспечивал формирование антитоксического иммунитета у морских свинок и кроликов, которым вводили клостридиальные токсины перфрингенс, эдематиенс, септикум и гистолитикум. В большей степени этот эффект проявлялся в отношении токсинов перфрингенс и эдематиенс. Выживаемость животных в опытных группах по сравнению с контрольными увеличивалась на 50–83%.

В отношении интоксикаций, обусловленных токсинами гистолитикум и септикум, двукратное применение полианатоксина «Тетра-ГА» оказалось недостаточно эффективным. Выживаемость животных в условиях интоксикации токсином гистолитикум находилась на уровне контроля, то есть отсутствовала (наблюдали 100% летальность животных как в опытной, так и в контрольной группах).

Выживаемость животных в условиях интоксикации токсином септикум по сравнению со 100% летальностью в контрольных группах увеличивалась только на 20–25%. Следовательно, полианатоксин «Тетра-ГА» при двукратном с интервалом 30 сут применении способствует формированию напряженного антитоксического иммунитета в отношении токсинов перфрингенс, эдематиенс и характеризуется недостаточной эффективностью в отношении интоксикаций септикум и гистолитикум.

Сопоставляя эти данные с результатами оценки защитной эффективности данного ИЛП в отношении РАИ, вызванной, например, Cl. septicum (табл. 5.9), можно отметить расхождения в полученных эффектах. А именно в условиях двукратной иммунизации «Тетра-ГА» устойчивость морских свинок к заражению возбудителем Cl. septicum достигала максимального уровня – 100% на фоне 100% летальности в контроле при заражающей дозе возбудителя, равной 3 DCL. В то же время протективный эффект, формируемый у животных под влиянием полианатоксина «Тетра-ГА» к интоксикации соответствующим токсином, в условиях однократной иммунизации не превышал 16,7%, а двукратной – 20%.

Поскольку однократная или двукратная иммунизация полианатоксинами, как известно, не является оптимальной [4, 5, 6], а существующие схемы их применения, как правило, включают не менее трех инъекций ИЛП, то заключительная часть настоящего этапа исследований была выполнена именно в условиях трехкратной иммунизации полианатоксином «Тетра-ГА». В качестве биологической модели использовали кроликов. Схема иммунизации полианатоксином состояла из трех инъекций, при этом интервал между первой и второй инъекциями составлял 30 сут, а между второй и третьей – 4 мес. Результаты проведенных исследований приведены в табл. 6.7.

Установлено, что после трехкратного применения полианатоксина «Тетра-ГА» устойчивость кроликов к интоксикации гангренозными токсинами повышалась по сравнению с аналогичными

Таблица 6.5

Уровень выживаемости морских свинок в результате изучения антитоксического эффекта полианатоксина «Тетра-ГА» при двукратном с интервалом 30 сут введении внутрибрюшинно гангренозных токсинов перфрингенс, эдематиенс, гистолитикум, септикум

Наименование токсина	После однократной иммунизации				После двукратной иммунизации			
	Группа животных	Кол-во животных в группе, гол.	Выживаемость		Группа животных	Кол-во животных в группе, гол.	Выживаемость	
			абс.	%			абс.	%
Перфрингенс	Опытная	6	2	33,3	Опытная	5	4	80,0
	Контрольная	4	0	0	Контрольная	4	0	0
Эдематиенс	Опытная	6	1	16,7	Опытная	6	5	83,3
	Контрольная	4	1	25,0	Контрольная	4	1	25,0
Септикум	Опытная	6	1	16,7	Опытная	5	1	20,0
	Контрольная	4	0	0	Контрольная	3	0	0
Гистолитикум	Опытная	6	0	0	Опытная	5	0	0
	Контрольная	4	0	0	Контрольная	3	0	0

ЭНЦИКЛОПЕДИЯ

Таблица 6.6

Уровень выживаемости кроликов в результате изучения антитоксического эффекта полианатоксина «Тетра-ГА» при двукратном с интервалом 30 сут введении внутривенно гангренозных токсинов перфрингенс, эдематиенс, гистолитикум, септикум

Наименование токсина	После однократной иммунизации				После двукратной иммунизации			
	Группа животных	Кол-во животных в группе, гол.	Выживаемость		Группа животных	Кол-во животных в группе, гол.	Выживаемость	
			абс.	%			абс.	%
Перфрингенс	Опытная	4	2	50,0	Опытная	4	3	75,0
	Контрольная	2	0	0	Контрольная	2	0	0
Эдематиенс	Опытная	4	1	25,0	Опытная	4	2	50,0
	Контрольная	2	0	0	Контрольная	2	0	0
Септикум	Опытная	4	1	25,0	Опытная	4	1	25,0
	Контрольная	2	0	0	Контрольная	2	0	0
Гистолитикум	Опытная	4	0	0	Опытная	4	0	0
	Контрольная	2	0	0	Контрольная	2	0	0

ЭНЦИКЛОПЕДИЯ БАШКИРСКАЯ

результатами, полученными после двукратного применения препарата. Антитоксический эффект каждого из компонентов полианатоксина возрастал на 25% в сравнении с таковым, зарегистрированным после его двукратного применения. Особо следует подчеркнуть, что трехкратная иммунизация способствовала повышению иммуногенности анатоксина гистолитикум, однако и в этом случае она оставалась на более низком уровне, чем иммуногенность остальных компонентов полианатоксина «Тетра-ГА». Выживаемость иммунизированных кроликов при введении им токсина гистолитикум составила 25%.

Таким образом, проведенные исследования показали, что иммуногенность полианатоксина «Тетра-ГА», характеризуется выработкой в организме соответствующих антитоксинов. При этом выраженность этого процесса прямо коррелирует с формированием невосприимчивости организма к РАИ, вызванной Cl. perfringens и Cl.oedematiens.

При сопоставлении результатов выживаемости экспериментальных животных, инфицированных упомянутыми возбудителями и соответствующими токсинами, выявлены прямые корреляционные зависимости ($r = 65$; $P \leq 0{,}01$ – для перфрингенса и $r = 0{,}85$; $P \leq 0{,}001$ – эдематиенс) высокой степени достоверности. Однако следует отметить, что вклад антитоксического иммунитета в формирование невосприимчивости организма к РАИ, вызванной Cl. perfringens типа А, судя по полученным результатам корреляционного анализа, менее значим, чем к аналогичной инфекции, вызванной Cl. oedematiens. Достаточно выраженная продукция антитоксинов при иммунизации полианатоксином «Тетра-ГА», особенно в условиях трехкратного применения ИЛП, зарегистрирована в отношении токсина септикум. При этом корреляционные зависимости между уровнями защиты от инфекции и интоксикации также носили прямой характер ($r = 0{,}78$; $P \leq 0{,}001$). В то же время при двукратной иммунизации полианатоксином в отношении РАИ, вызванной Cl. septicum, регистрировали выраженный протективный эффект (на уровне 100%) на фоне достаточно слабого (на уровне 25%) антитоксического иммунитета. Эти различия можно связать либо с особенностями формирования специфического иммунного ответа организма к данному возбудителю и его токсину, либо с особенностями механизмов защиты организма от воздействия данных биопатогенов.

Наименее выраженный антитоксический иммунитет формировался к токсину гистолитикум при иммунизации полианатоксином

Таблица 6.7

Уровень выживаемости кроликов в результате изучения антитоксического эффекта полианатоксина «Тетра-ГА» при трехкратном внутривенном введении клостридиальных токсинов перфрингенс, эдематиенс, гистолитикум, септикум

Наименование токсина	После двукратной иммунизации				После трехкратной иммунизации			
	Группа животных	Кол-во животных в группе, гол.	Выживаемость		Группа животных	Кол-во животных в группе, гол.	Выживаемость	
			абс.	%			абс.	%
Перфрингенс	Опытная	4	3	75,0	Опытная	4	4	100,0
	Контрольная	2	0	0	Контрольная	2	0	0
Эдематиенс	Опытная	4	2	50,0	Опытная	4	3	75,0
	Контрольная	2	0	0	Контрольная	2	0	0
Септикум	Опытная	4	1	25,0	Опытная	4	2	50,0
	Контрольная	2	0	0	Контрольная	2	0	0
Гистолитикум	Опытная	4	0	0	Опытная	4	1	25,0
	Контрольная	2	0	0	Контрольная	2	0	0

ЭНЦИКЛОПЕДИЯ ВАКЦИНОПРОФИЛАКТИКИ

«Тетра-ГА»: уровень защиты даже при трехкратном применении ИЛП не превышал 25%. Практически аналогичный протективный эффект регистрировали и при инфицировании иммунизированных животных соответствующим возбудителем. При проведении сопоставительного анализа оказалось, что между уровнем защиты от инфекции и интоксикации токсином гистолитикум в условиях иммунизации животных полианатоксином «Тетра-ГА», существовала прямая коррелятивная зависимость ($r = 0,67$; $P \leq 0,01$). В связи с этим можно заключить, что антитоксический иммунитет, формируемый в результате иммунизации полианатоксином «Тетра-ГА», играет заметную роль в защите организма от Cl. histolyticum. Достаточно низкий уровень этого иммунитета в сравнении с аналогичным в отношении остальных гангренозных токсинов можно объяснить недостаточной иммуногенностью компонента гистолитикум в составе полианатоксина. Нельзя также не отметить, что иные механизмы формирования невосприимчивости организма к инфицированию Cl. histolyticum, по-видимому, не так значимы, как это имеет место в отношении Cl. perfringens типа А или Cl. septicum.

Литература

1. *Выгодчиков, Г.В.* Ассоциированная иммунизация против анаэробных инфекций октаанатоксином / Г.В. Выгодчиков, А.А. Воробьев, И.А. Ларина и др. // Вопросы противоэпидемической защиты населения. – М., 1964. – Вып.7. – С. 153–163.

2. *Горшков, С.З.* Анаэробная клостридиальная раневая газовая инфекция. – М.: Медицина, 2007. – 128 с.

3. *Hitchock, C.* Gangrene infection: new approaches to an old disease / C. Hitchock, F. Demello, J Haglin // Surg. Clin. N. AteG. – 1975. – V. 55. – P. 1403–1410.

4. *Савельев, А.П.* Ассоциированная и комплексная иммунизация: состояние и перспективы /А.П. Савельев, Р.Ш. Магазов, О.П. Мисников и др. – Уфа: Гилем, Башк. энцикл., 2014. – 424 с.

5. *Магазов, Р.Ш.* Разработка сорбированного оптимально сбалансированного секстаанатоксина для профилактики анаэробных инфекций: дисс. … д-ра мед. наук. – Уфа, 1986. – 250 с.

6. *Мельников, В.Н.* Анаэробные инфекции / В.Н. Мельников, Н.И. Мельников. – М.: Медицина, 1973. – 288 с.

ГЛАВА 7

ВЛИЯНИЕ ИММУНИЗАЦИИ ПОЛИАНАТОКСИНОМ «ТЕТРА-ГА» НА СОСТОЯНИЕ КЛЕТОЧНЫХ И ГУМОРАЛЬНЫХ ФАКТОРОВ НЕСПЕЦИФИЧЕСКОЙ ИММУНОЛОГИЧЕСКОЙ РЕЗИСТЕНТНОСТИ*

7.1. Изучение клеточных факторов неспецифической иммунологической резистентности при иммунизации полианатоксином «Тетра-ГА»

Общеизвестно, что в защите организма от инфекции принимают участие не только факторы специфического иммунитета, но и неспецифической резистентности. Более того, от уровня их активности во многом зависит иммуногенность ИЛП, равно как и выраженность инфекционного процесса. Учитывая данное обстоятельство, при оценке эффективности средств иммунопрофилактики инфекционных заболеваний важное значение придается их влиянию на естественный (неспецифический) иммунитет, в том числе с позиции иммунологической безопасности такого рода препаратов. В настоящее время не вызывает сомнения, что введение ИЛП в организм оказывает влияние на систему неспецифической иммунологической резистентности, что во многом, например при применении С, обеспечивает формирование эффективной защиты от инфицирования возбудителями раневых клостридиозов, в частности, вызванных Cl. perfringens типа А [1,2]. Препарат вызывал активацию многих компонентов иммунореактивности: макрофагов, нейтрофилов, NK-клеток, а через продукцию цитокинов (ИЛ-1, -6, -8) – Т- и В-лимфоцитов. Учитывая существенную роль вышеперечисленных компонентов в противомикробной

* Исследования выполнены совместно с О.Д. Семеновым и К.К. Федоровым.

защите, очевидно, что подобным эффектом может обладать и полианатоксин «Тетра-ГА», вследствие чего, по-видимому, и обеспечивать защиту организма от отдельных возбудителей РАИ (Cl. perfringens типа А, Cl. septicum) помимо создаваемого в результате его применения антитоксического иммунитета. В ранее проведенных исследованиях [1, 3, 4] подобный эффект был зарегистрирован у С, который оказывал в основном стимулирующее действие на клеточные и гуморальные компоненты неспецифической иммунологической резистентности.

При этом установлено, что у животных, привитых С, в поствакцинальном периоде повышались активность клеток фагоцитарной системы крови, концентрация в сыворотке крови лизоцима, нафтол-AS-ацетатэстеразы (NASA) и МПО. Максимальное повышение функционального состояния клеток фагоцитарной системы происходило в период с 7 по 14 сут после иммунизации, а активация процессов синтеза и секреции гуморальных факторов – с 14 по 28 сут поствакцинального периода [2, 5].

Таблица 7.1

Функциональное состояние гранулярных лейкоцитов периферической крови кроликов, иммунизированных полианатоксином «Тетра-ГА»

Прививочный препарат	Срок исследования после иммунизации, сут	Величины исследованных показателей, X±m		
		Фагоцитарный индекс, %	Фагоцитарное число, м.кл./фаг.	Индекс переваривания, усл. ед.
Полианатоксин «Тетра-ГА»	«Фон»	45,0±5,51	4±1,05	1,15±0,05
	1	60,8±6,05	7±1,75*	1,27±0,03
	7	69,2±10,4*	7±1,63*	1,58±0,14*
	14	69,7±7,39*	8±1,63	1,69±0,06*
	21	56,8±4,31	6±1,63	1,32±0,12*
	28	45,2±3,82	3±1,05	1,22±0,07
Физиологический раствор (контроль)	«Фон»	39,3±1,70	3±1,41	1,10±0,02
	1	41,3±3,77	3±0,82	1,11±0,01
	7	43,5±3,12	4±1,30	1,12±0,02
	14	43,3±2,18	5±1,30	1,10±0,03
	21	41,9±3,19	4±0,82	1,10±0,03
	28	42,2±2,14	3±0,63	1,11±0,01

* Различия с показателями до вакцинации («фон») и в контрольной группе достоверны при $P \leq 0,05$; количество животных в каждой группе – 10 гол.

Учитывая вышеизложенное, состояние неспецифической иммунологической резистентности было оценено и в условиях иммунизации подопытных животных полианатоксином «Тетра-ГА». Исследования выполнены на морских свинках и кроликах. Первоначально проведена оценка функционального состояния клеток фагоцитарной системы крови у животных, иммунизированных полианатоксином «Тетра-ГА».

Были оценены следующие показатели: фагоцитарный индекс, фагоцитарное число и индекс переваривания. Иммунизацию осуществляли однократно подкожно, прививочная доза ИБП составляла 0,5 мл. Полученные результаты приведены в табл. 7.1.

В результате однократного применения полианатоксин «Тетра-ГА» оказывал стимулирующее действие на гранулярные лейкоциты периферической крови иммунизированных кроликов. У привитых животных фагоцитарный индекс возрастал в первые две недели поствакцинального периода, фагоцитарное число – с 7 по 14 сут, а индекс переваривания достаточно значимо превышал фоновые и контрольные параметры на протяжении всего срока наблюдения ($P<0,05$).

7.2. Оценка гуморальных факторов неспецифической иммунологической резистентности при иммунизации полианатоксином «Тетра-ГА»

Влияние полианатоксина «Тетра-ГА» на гуморальную составляющую неспецифической иммунологической резистентности оценивали на морских свинках путем определения в сыворотке крови животных концентраций МПО, NASA, лизоцима и бета-лизинов. Прививки проводили шприцевым методом, ИЛП вводили однократно подкожно в дозе 0,5 мл. Контрольным животным аналогичным образом вводили 0,5 мл физиологического раствора. Полученные в ходе исследования результаты представлены в виде диаграмм на рис. 7.1–7.4.

Установлено, что полианатоксин «Тетра-ГА» оказывает стимулирующее действие и на гуморальные компоненты неспецифической иммунологической резистентности, которое наиболее отчетливо проявляется в отношении процессов синтеза и секреции в кровь лизоцима, МПО и NASA. При динамическом наблюдении

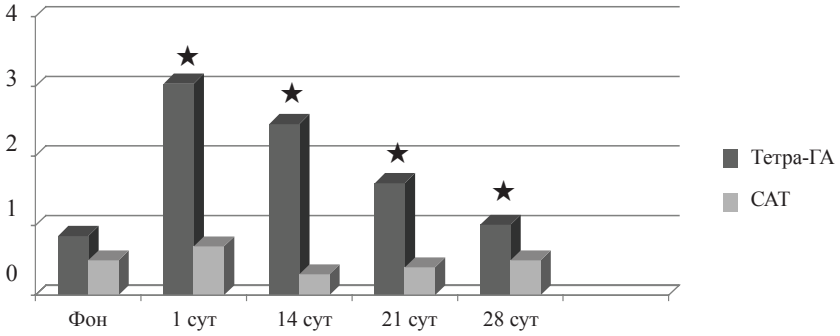

Рис. 7.1. Динамика изменений уровня миелопероксидазы в сыворотке крови морских свинок, иммунизированных однократно подкожно полианатоксином «Тетра-ГА» (По оси абсцисс – срок исследования по отношению к вакцинации, по оси ординат – концентрация миелопероксидазы в сыворотке крови (усл. ед.). В каждой группе было по 10 морских свинок. Звездочкой отмечены достоверные повышения исследованного показателя в сравнении с его фоновыми и контрольными значениями при $P<0,05$)

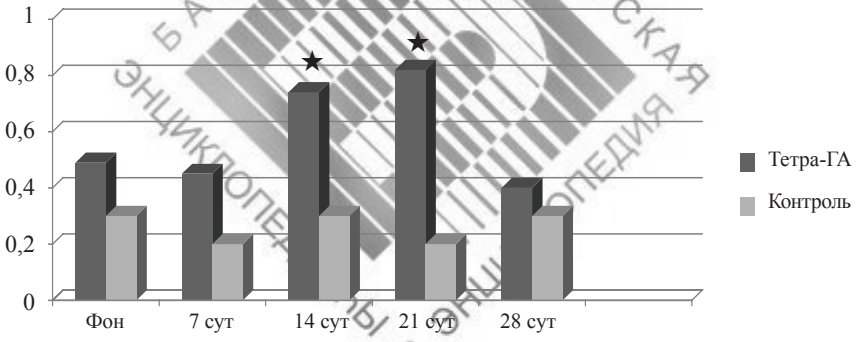

Рис. 7.2. Динамика изменений уровня нафтол-AS-ацетатэстеразы в сыворотке крови морских свинок, иммунизированных однократно подкожно полианатоксином «Тетра-ГА» (По оси абсцисс – срок исследования по отношению к вакцинации, по оси ординат – концентрация нафтол-AS-ацетатэстеразы в сыворотке крови (усл. ед.). В каждой группе было по 10 морских свинок. Звездочкой отмечены достоверные повышения исследованного показателя в сравнении с его фоновыми и контрольными значениями при $P<0,05$)

зарегистрированы достоверно более высокие значения их концентраций в сыворотке крови животных, иммунизированных полианатоксином «Тетра-ГА», чем в контрольных группах, особенно в период с 7 по 21 сут после иммунизации ($P<0,05$).

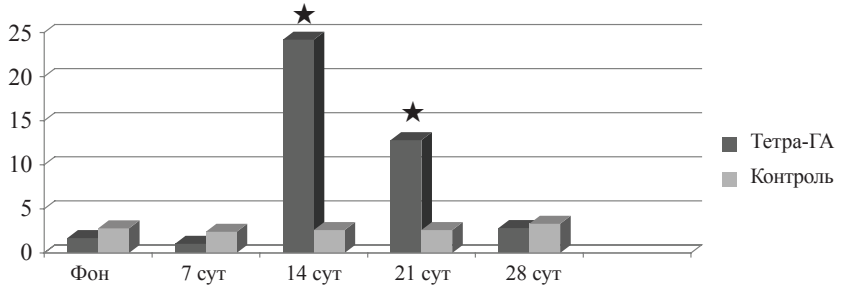

Рис. 7.3. Динамика изменений уровня лизоцима в сыворотке крови морских свинок, иммунизированных однократно подкожно полианатоксином «Тетра-ГА» (По оси абсцисс – срок исследования по отношению к вакцинации, по оси ординат – концентрация лизоцима в сыворотке крови (мкг/мл). В каждой группе было по 10 морских свинок. Звездочкой отмечены достоверные повышения исследованного показателя в сравнении с его фоновыми и контрольными значениями при $P<0,05$)

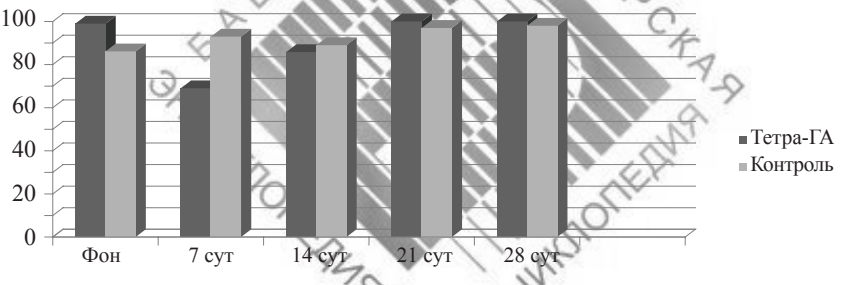

Рис. 7.4. Динамика изменений уровня бета-лизинов в сыворотке крови морских свинок, иммунизированных однократно подкожно полианатоксином «Тетра-ГА» (По оси абсцисс – срок исследования по отношению к вакцинации, по оси ординат – концентрация бета-лизинов в сыворотке крови (%). В каждой группе было по 10 морских свинок)

Стимулирующий эффект полианатоксина «Тетра-ГА» более выражен в отношении гуморальных факторов неспецифической иммунологической резистентности, чем клеток фагоцитарной системы. Исключение составили изменения в поствакцинальном периоде со стороны концентрации в сыворотке крови бета-лизинов, которые практически не менялись на всем протяжении исследования по сравнению как с контролем, так и с фоновыми значениями ($P>0,05$).

Таким образом, проведенные исследования показали, что полианатоксин «Тетра-ГА» обладает достаточно выраженным стимулирующим влиянием на клеточные и гуморальные факторы неспецифической иммунологической резистентности, наиболее отчетливо проявляющимся в течение первых 30 сут после его введения в организм. Подобный эффект препарата следует рассматривать как один из основных, помимо специфической активности, в плане формирования невосприимчивости организма к возбудителям РАИ. Возможно, именно с этим эффектом полианатоксина связан установленный в результате его применения защитный эффект в отношении РАИ, вызванной Cl. perfringens типа А и в большей степени Cl. septicum.

Вместе с тем нельзя не отметить, что ни влияние полианатоксина на неспецифическую иммунологическую резистентность, ни его иммуногенные свойства не способствовали формированию напряженного иммунитета к РАИ, вызванной Cl. histolyticum, что позволило высказать положение о низкой иммуногенности анатоксина гистолитикум – компонента полианатоксина. Устранить данный недостаток возможно, судя по имеющимся доступным информационным материалам, несколькими путями, например:

– повышением иммунизирующей дозы анатоксина в препарате «Тетра-ГА»;

– оптимизацией дозового состава входящих в полианатоксин других компонентов с целью устранения конкурентных взаимоотношений, хотя по полученным в ходе исследования данным подобных взаимоотношений не наблюдалось;

– повышением иммуногенных свойств анатоксина путем использования иммунологических адъювантов [6, 7, 8].

7.3. Оценка рекомбинантного интерлейкина-2 человека в качестве иммунологического адъюванта анатоксина гистолитикум в составе полианатоксина «Тетра-ГА»

В связи с этим был предпринят следующий этап исследований, в рамках которого предполагалось оценить возможность использования иммунологических адъювантов для повышения иммуногенности компонента гистолитикум в составе полианатоксина

«Тетра-ГА». При этом основное внимание было уделено использованию в таком качестве рекомбинантного ИЛ-2 человека.

В настоящее время при поиске эффективных иммунологических адъювантов все большее внимание уделяется соединениям, оказывающим избирательное действие на компоненты иммунной системы, способным стимулировать межклеточные взаимодействия и тем самым активизирующим специфический антителогенез. В частности, этим характеристикам в большей степени соответствуют препараты цитокинов и их рекомбинантные аналоги. В качестве адъювантов наиболее подробно исследованы ИЛ-1, -2, -3, -12, -15, а также ИФН-γ [6, 7]. Препараты на основе ИЛ-1 оказались эффективными при вакцинации против гепатита, инфекций, вызываемых стрептококками и пневмококками, гриппа [9]. Применение препаратов на основе ИЛ-12 способствовало повышению иммуногенности ИБП в отношении токсоплазмоза и лейшманиоза, а также туберкулеза, герпеса, ВИЧ-инфекции [6, 10]. Препараты на основе ИЛ-15 способствовали повышению иммуногенности ДНК-вакцины против ВИЧ-инфекции, а также столбнячного анатоксина [10]. Адъювантный эффект IFN-γ продемонстрирован при его сочетанном применении с ИЛП против малярии, туберкулеза, энтероколита иерсиниозной природы [6, 7]. Вместе с тем, согласно имеющимся данным доступных информационных материалов, большинство исследователей предпочтение в этом плане отдают препаратам на основе ИЛ-2, поскольку упомянутый цитокин занимает ключевое место в реакциях иммунной системы, осуществляя взаимосвязь между иммунокомпетентными клетками при антителогенезе [7]. В пользу данного положения получены положительные подтверждения. Так, показана адъювантная активность ИЛ-2 в отношении противоопухолевых вакцин, вакцины БЦЖ, ИЛП против бешенства, гриппа, ящура, бронхопневмоний, вирусных диарей крупного рогатого скота, ВИЧ-инфекции, Hemophilus pleuropneumonia, гепатита В, ортопоксвирусных инфекций. Рекомбинантные препараты ИЛ-2 (рИЛ-2) обеспечивали повышение иммунологической эффективности ДНК-вакцины гепатита В, поксвирусной рекомбинантной вакцины, герпетической вакцины [6].

Исследования выполнены на морских свинках. Полианатоксин применяли подкожно однократно или двукратно с интервалом 30 сут в объеме 0,5 мл. В ходе иммунизации морским свинкам вводили

рИЛ-2 в дозе 400 МЕ/особь, в одном шприце с полианатоксином. Спустя 30 сут после последней иммунизации животным внутрибрюшинно вводили клостридиальные токсины (перфрингенс, эдематиенс, гистолитикум, септикум) по 2 $ЛД_{50}$ каждого в объеме 0,5 мл.

Результаты изучения антитоксической эффективности полианатоксина «Тетра-ГА» в комбинации с рекомбинантным ИЛ-2 человека при однократном и двукратном с интервалом 30 сут применении у морских свинок, получавших внутрибрюшинно гангренозные токсины перфрингенс, эдематиенс, гистолитикум, септикум, приведены в табл. 7.2 и 7.3.

После введения токсинов за животными устанавливали наблюдение в течение 7 сут, ежедневно регистрируя количество живых и павших.

Таблица 7.2

Результаты изучения антитоксической эффективности полианатоксина «Тетра-ГА» в комбинации с рекомбинантным ИЛ-2 человека при однократном применении у морских свинок, получавших внутрибрюшинно гангренозные токсины перфрингенс, эдематиенс, гистолитикум, септикум

Наименование токсина	Однократное применение Тетра-ГА			
	Прививочный препарат	Количество животных в группе, гол.	Количество выживших	
			абсолютное число, гол.	%
Перфрингенс	Тетра- ГА+рИЛ-2	6	4	16,7
	Тетра-ГА	6	2	33,3
	Контрольная	4	0	0
Эдематиенс	Тетра-ГА+рИЛ-2	6	3	50,0
	Тетра-ГА	6	1	16,7
	Контрольная	4	1	25,0
Септикум	Тетра-ГА+рИЛ-2	6	3	50,0
	Тетра-ГА	6	1	16,7
	Контрольная	4	0	0
Гистолитикум	Тетра-ГА+рИЛ-2	6	3	50,0
	Тетра-ГА	6	0	0
	Контрольная	4	0	0

Таблица 7.3

Результаты изучения антитоксической эффективности полианатоксина «Тетра-ГА» в комбинации с рекомбинантным ИЛ-2 человека при двукратном применении у морских свинок, получавших внутрибрюшинно гангренозные токсины перфрингенс, эдематиенс, гистолитикум, септикум

Наименование токсина	Двукратное применение Тетра-ГА			
	Прививочный препарат	Количество животных в группе, гол.	Количество выживших	
			абсолютное число, гол.	%
Перфрингенс	Тетра-ГА+рИЛ-2	6	6	100,0
	Тетра-ГА	5	4	80,0
	Контрольная	4	0	0
Эдематиенс	Тетра-ГА+рИЛ-2	6	6	100,0
	Тетра-ГА	6	5	83,3
	Контрольная	4	1	25,0
Септикум	Тетра-ГА+рИЛ-2	6	5	83,3
	Тетра-ГА	5	1	20,0
	Контрольная	3	0	0
Гистолитикум	Тетра-ГА+рИЛ-2	6	4	66,7
	Тетра-ГА	5	0	0
	Контрольная	3	0	0

Как свидетельствуют представленные данные, полианатоксин «Тетра-ГА» при двукратном с интервалом 30 сут применении совместно с рИЛ-2 характеризовался более выраженной иммунологической эффективностью, обеспечивая формирование более напряженного антитоксического иммунитета к слабоиммуногенным компонентам – анатоксинам септикум и гистолитикум, чем при его самостоятельном применении. Аналогичный эффект зарегистрирован и в отношении высокоиммуногенных анатоксинов пефрингенс и эдематиенс. Так, после однократного совместного введения полианатоксина и рИЛ-2 человека выживаемость животных, которым вводили соответствующие токсины, составила 66,7% (перфрингенс), 50,0% (эдематиенс), 50,0% (септикум) и 50,0% (гистолитикум) против 33,3%, 16,7%, 16,7%, 0% соответственно в группах животных, иммунизированных только полианатоксином (иммуногенность компонентов полианатоксина возрастала на 30–50%).

Следовательно, применение рИЛ-2 уже в ходе однократной иммунизации обеспечивает существенное повышение иммуногенности компонентов полианатоксина. Дальнейшее повышение иммуногенности полианатоксина было зарегистрировано после повторной иммунизации ИБП и рИЛ-2. Однако в отличие от однократной иммунизации прирост активности был не столь выраженным (не более 20%). Оценивая полученные результаты, особо следует отметить, что под влиянием рИЛ-2 заметно повышалась иммуногенность слабоиммуногенных компонентов полианатоксина «Тетра-ГА» – септикум и гистолитикум, что свидетельствует о перспективности использования упомянутого иммунологического адъюванта в комплексе с полианатоксином «Тетра-ГА» для иммунопрофилактики раневых клостридиозов.

Литература

1. *Василенко, А.Ж.* Совместимость вакцин при комплексной и ассоциированной иммунизации / А.Ж. Василенко, М.А. Мисникова, А.П. Савельев и др. // под ред. К.Г. Гапочко и Р.Ш. Магазова. – Уфа: Гилем, 1996. – 405 с.

2. *Василенко, А.Ж.* Ассоциированная и комплексная иммунизация (особенности формирования иммунного ответа организма) / А.Ж. Василенко, Р.Ш. Магазов, О.П. Мисников и др. –Уфа: РИО ГУП «Иммунопрепарат», 2000. – 241 с.

3. *Савельев, А.П.* Изучение неспецифической пролиферативной активности лимфоцитов после ассоциированной иммунизации / А.П. Савельев, О.П. Мисников, Н.В. Пак и др. // Микробиология: от микроскопа до нанотехнологий: мат-лы юбил. науч.-практ. конференции. – СПб.: ВМедА, 2013. – С. 101.

4. *Пак, Н.В.* Оценка влияния ассоциации иммунобиологических лекарственных препаратов на показатели неспецифического иммунитета в эксперименте / Н.В. Пак, Н.А. Рязанцева, А.В. Степанов и др. // Там же. – С. 120–121.

5. *Семенов, О.Д.* Экспериментальная оценка эффективности и разработка схемы применения нового полианатоксина «Тетра-ГА» для профилактики раневых клостридиозов / О.Д. Семенов, А.В. Степанов, А.П. Савельев // Достижения науки и практики в обеспечении санитарно-эпидемиологического благополучия Вооруженных Сил Рос-

сийской Федерации: сборник материалов третьего съезда военных врачей медико-профилактического профиля Вооруженных Сил Российской Федерации. – СПб., 2010. – С. 141–142.

6. *Семенов, О.Д.* Экспериментальное обоснование оптимальной схемы применения полианатоксина против раневых клостридиозов / О.Д. Семенов, А.В. Степанов, В.А. Харитонова и др. // Там же. – С. 147.

7. *Степанов, А.В.* Сравнительное изучение противовирусной активности иммуномодулирующих препаратов «Ронколейкин» и «Интерферональфа 16» на модели ЛДР у белых мышей» / А.В. Степанов, Е.В. Левшина, С.В. Попов и др. // Там же. – С. 154–155.

8. *Shoepe, H.* Naturally occurring Cl. perfringens nontoxic alpha-toxin variant as a potential vaccine candidate against alpha-toxin associated diseases / H. Shoepe, C. Pache, A. Neubauer(et al.) // Infect. Immun. – 2001. – Vol. 69. – № 11. – P. 7194–7196.

9. *Gursel, M.* Interleukin-15 acts as an immunological co-adjuvant for liposomal antigen in vivo / M. Gursel, G. Gregoriadis // Immunol. Lett. – 1997. – Vol.55. – № 3. – P.161–165.

10. *Letscher-Bru, V.* Protective effect of vaccination with a combination of recombinant surface antigen 1 and interleukin-12 against toxoplasmosis in mice / V. Letscher-Bru, O. Villard, B. Risse (et al.) // Infect. Immun. – 1998. – Vol.66. – № 9. – P. 4503–4506.

РЕСПУБЛИКА БАШКОРТОСТАН ЭНЦИКЛОПЕДИЯҺЫ · БАШКИРСКАЯ ЭНЦИКЛОПЕДИЯ

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Клостридиальные инфекции считаются одним из самых тяжело протекающих, зачастую со смертельным исходом, заболеваний, которые приводят к развитию выраженной эндогенной интоксикации с поражением жизненно важных органов и систем. Клостридии – возбудители ботулизма, газовой гангрены и столбняка, широко распространены в природе и представляют опасность для человека, поскольку естественный иммунитет к их токсинам у него отсутствует. Известны также такие клостридиозы, как некротический энтерит, геморрагический энтероколит, брадзот, энтеротоксин и другие клостридиальные болезни, поражающие преимущественно животных. Отличительной особенностью анаэробных инфекций является то, что в патогенезе этих состояний нет инфекционного процесса, а присутствует лишь его составная часть – процесс интоксикации, тяжесть которого определяется видом и количеством токсинов, являющихся самыми сильными природными ядами.

Возбудители клостридиальных инфекций обнаруживаются в почве, воде, траве, на листьях и плодах овощей, фруктов, в кишечнике человека и животных. В неблагоприятных условиях, во внешней среде вегетативные формы возбудителей анаэробных инфекций образуют споры, чрезвычайно устойчивые к различным физическим и химическим факторам.

В испражнениях, почве и на различных заражённых предметах споры сохраняются десятки лет, поэтому почва является неиссякаемым резервуаром клостридиозов.

Клиническая тяжесть заболеваний, высокая летальность и инвалидизация, эпидемиологические особенности возбудителей клостридиальных инфекций побудили ученых всего мира в XX в. сосредоточить свои усилия на разработку средств специфической профилактики этой грозной инфекции.

Согласно современным представлениям, наиболее действенными средствами иммунопрофилактики РАИ являются анатоксины, поскольку наряду с формированием антитоксического иммунитета, они оказывают стимулирующее влияние на иммунокомпетентные

клетки, повышая тем самым неспецифическую иммунологическую резистентность организма [1, 2].

Установление инфекционной природы столбняка, открытие столбнячного антитоксина положили начало серопрофилактике, которая, несмотря на недостатки, до 1923 г. занимала доминирующее положение [3]. Создание метода активной иммунизации стало возможным после получения G. Ramon нового препарата, названного анатоксином [4]. Под этим подразумевается получение вакцинного препарата, сохранившего антигенные и иммуногенные свойства, но полностью лишенного токсичности.

Почти столетний период интенсивных исследований в области изготовления, усовершенствования и практического применения бактерийных анатоксинов увенчался значительными успехами. Разработан целый ряд анаэробных и аэробных анатоксинов, в основном удовлетворяющих современным требованиям иммунопрофилактики.

Успехи в разработке очищенных, концентрированных, сорбированных анатоксинов обеспечили возможность получения ассоциированных полианатоксинсодержащих препаратов.

В нашей стране обстоятельно и серьезно проблема конструирования ассоциированных вакцинных препаратов для профилактики анаэробных инфекций разрабатывалась в 1954–1985 гг. лабораториями, руководимыми Г.В. Выгодчиковым, К.И. Матвеевым, А.Т. Кравченко, В.Н. Мельниковым, Р.Ш. Магазовым, Г.П. Черкас, А.И. Углевой и др.

После всестороннего изучения микробиологических, биохимических и иммунологических свойств возбудителя были разработаны подходы к конструированию анатоксинов, включающие методы изготовления и оценки качества готовой продукции.

Для этого были решены ряд актуальных проблем. Прежде всего это касается поиска и внедрения в практику сорбированных очищенных концентрированных анатоксинов. При этом технологическая схема получения таких анатоксинов была основана на выборе доступной и качественной питательной среды, наработке нативных токсинов, очистке и концентрированию их, обезвреживанию и сорбции очищенного и концентрированного анатоксина.

Почти полвека потребовалось ученым всего мира, чтобы в ходе интенсивных исследований в области разработки, изготовления,

усовершенствования и практического применения добиться значительных успехов в создании средств превентивной профилактики клостридиальных инфекций.

В нашей стране принятие в противоэпидемическую практику химической брюшнотифозной вакцины с очищенным сорбированным секстаанатоксином (БТС) положило начало развитию направления ассоциированной и комплексной иммунизации против клостридиозов, являющегося единственно надежным средством в борьбе с анаэробными пищевыми интоксикациями и раневыми инфекциями. Серийный выпуск ее был начат в 1969 г. в Уфимском НИИВС им. И.И. Мечникова Министерства здравоохранения СССР. Препарат состоял из 7 компонентов для профилактики брюшного тифа, ботулизма (А, В, Е), столбняка и газовой гангрены (перфрингенс и эдематиенс). Действующим началом вакцины являлись комплексный О- и Ви-антигены брюшнотифозных бактерий и очищенные концентрированные анатоксины клостридий ботулизма типов А, В, Е, столбняка и газовой гангрены (перфрингенс и эдематиенс), сорбированные на гидроокиси алюминия и консервированные мертиолятом . Это был первый ассоциированный препарат против анаэробных инфекций, сочетающийся с брюшнотифозным компонентом.

Высокая реактогенность прививок БТС, в том числе и при комплексной (ассоциированной) иммунизации, а также неудовлетворительная иммунологическая эффективность брюшнотифозного и перфрингенс компонентов послужили основанием для проведения последующей модернизации вакцины.

В Уфимском НИИВС им. И.И. Мечникова под руководством В.Н. Мельникова и Р.Ш. Магазова был создан качественно новый, сухой полианатоксинсодержащий препарат – сухой сорбированный секстаанатоксин (С), не содержащий брюшнотифозного компонента. Остальной набор анатоксинов был таким же, как и в коммерческой БТП-вакцине, и предназначался для профилактики ботулизма (типов А, В, Е), столбняка и газовой гангрены (перфрингенс, эдематиенс).

Новая сухая форма ИЛП обеспечивала длительный срок годности (≥ 5 лет), способность сохранять свои свойства при экстремальных температурах окружающего воздуха, не требовала включения в состав препарата консерванта. Эти качества существенно

расширяли возможности его хранения и использования в различных климатических условиях, а отсутствие консерванта позволяло применять его в смеси с живыми вакцинами. Кроме того, исключение из состава препарата реактогенного брюшнотифозного компонента должно было значительно снизить реактогенность прививок, уменьшить сенсибилизацию прививаемых контингентов.

В результате экспериментальных исследований с привлечением методов математической теории эксперимента было обосновано оптимальное сочетание анатоксинов в новом сбалансированном секстаанатоксине, повлекшее снижение содержания ботулинического анатоксина типа А в 3 раза, а анатоксина эдематиенс – в 2 раза.

Наряду с оптимизацией прививочных доз компонентов секстаанатоксина были проведены исследования, направленные на обеспечение стабильности его производства путем замены дефицитного сырья, являющегося основой питательной среды для культивирования клостридий ботулинум. В результате проведенной работы для культивирования клостридий ботулинум типа А и В разработан и внедрен в промышленную практику новый способ изготовления питательной среды, содержащей в качестве белковой основы гидролизат эприна. Получаемые на этой среде токсины подлежат очистке сорбционно-элюционным методом с применением каолина или хроматографическим методом на колонках с отечественной волокнистой ДЭАЭ-целлюлозой.

Новая технология позволила получать анатоксины, отвечающие требованиям научно-технической документации, и исключала зависимость их производства от наличия дефицитного и дорогостоящего сырья – китовой или рыбной муки. Она послужила основанием для составления изменений к регламенту производства ботулинического трианатоксина.

Доклинические исследования оптимизированного секстаанатоксина показали удовлетворительную переносимость, умеренную реактогенность, выраженную иммунологическую эффективность и иммунологическую безопасность ИЛП, что позволило приступить к очередному этапу исследований – клиническим испытаниям на людях.

С получением нового, более совершенного полианатоксинсодержащего ИЛП появилась возможность его включения в разработанную ранее схему комплексно-ассоциированной иммунизации

(комплекс иммунобиологических лекарственных препаратов – КИЛП) вместо БТС. Встраивание в схему иммунизации менее реактогенного ИЛП позволяло надеяться на снижение реактогенности комплексных прививок [5].

С этой целью был использован КИЛП, предназначенный для одновременного введения в организм секстаанатоксина (в одно место) и ассоциации живых оспенной и чумной вакцин (в другое место). При изложении результатов клинических исследований на людях указанного КИЛП в настоящей работе мы провели сравнительную оценку его с другими комплексами, разработанными в другие сроки.

В целях ознакомления читателей с конкретными вакцинными комплексами дана сравнительная характеристика их реактогенности, рассмотрены вопросы влияния комплексных и ассоциированных прививок на функциональное состояние организма и работоспособность привитых.

При установлении особенностей функционирования иммунной системы организма привитых изучаемым КИЛП была обнаружена достаточно выраженная активация неспецифического и специфического клеточного звена иммуногенеза. При этом важно подчеркнуть, что реакция иммунокомпетентных клеток на комплексную и ассоциированную иммунизацию существенно не отличалась от таковой при введении в организм монопрепаратов, входящих в состав этих комплексов. В результате клинико-иммунологического изучения КИЛП не установлено в них конкурентных взаимоотношений между антигенами.

Не рассматривая в данной работе все обстоятельства прекращения выпуска сухого сорбированного секстаанатоксина, хотелось бы обратить внимание читателей на тот факт, что с 1995 г. в стране отсутствует возможность вакцинопрофилактики раневых анаэробных инфекций.

Исключением является столбняк, иммунопрофилактика которого с использованием соответствующих ИЛП – АКДС, АДС, АДС-М, БУБО-М осуществляется как среди детского, так и взрослого населения страны.

Согласно доступным информационным материалам, этиологическая природа РАИ не ограничивается только Cl. tetani, она включает и другие виды высокотоксичных клостридий, а с учетом того

факта, что экзотоксины, продуцируемые отдельными возбудителями РАИ, рассматриваются в качестве потенциального биологического поражающего агента токсинной природы необходимость в разработке эффективных средств иммунопрофилактики РАИ не теряет своей актуальности [6, 7, 8]. По мнению отечественных и зарубежных специалистов в данной области, приоритетными должны стать исследования по созданию полианатоксинов, включающих анатоксины перфрингенс, эдематиенс, септикум и гистолитикум [13, 14].

Основываясь на вышеизложенном, специалистами РАМН и МО РФ были проведены исследования, в результате которых был разработан полианатоксин «Тетра-ГА» против раневых клостридиозов, компонентами которого являются сорбированные на гидрате окиси алюминия анатоксины перфрингенс, эдематиенс, септикум и гистолитикум.

В нашей работе в эксперименте на животных были изучены специфическая активность и иммунобиологическая безопасность полианатоксина «Тетра-ГА» как средства специфической профилактики раневых клостридиозов.

С этой целью были разработаны экспериментальные модели РАИ, вызываемые Cl. oedematiens, Cl. histolyticum, Cl. septicum, их ассоциациями, а также смоделированы интоксикации соответствующих экзотоксинов.

Была проведена сравнительная оценка эффективности вакцинации полианатоксином «Тетра-ГА» и С (препарат сравнения) у экспериментальных животных при заражении их возбудителями Cl. perfringens и Cl. oedematiens, Cl. histolyticum, Cl. septicum.

Кроме того, изучено влияние кратности введения полианатоксина «Тетра-ГА» на выраженность формирования антитоксического иммунитета у экспериментальных животных.

На заключительном этапе экспериментальных исследований проведена оценка иммунологической безопасности полианатоксина «Тетра-ГА» по состоянию компонентов неспецифической иммунологической резистентности у иммунизированных животных.

Первоначально были проведены исследования по моделированию экспериментальной РАИ с использованием Cl. oedematiens, Cl. septicum, Cl. histolyticum. При этом в основном необходимо было оценить пригодность моделирования РАИ с применением хлорида кальция (5–10 %) в отношении возбудителей Cl. oedematiens,

Cl. septicum и Cl. histolyticum, поскольку в отношении инфекции, вызванной Cl. perfringens типа А, такой подход себя полностью оправдал [15]. Полученные результаты оказались весьма обнадеживающими. В частности, показано, что для воспроизведения РАИ, вызванной Cl. oedematiens, Cl. septicum или Cl. histolyticum предпочтительно введение культуры возбудителя одновременно с хлоридом кальция в одно и то же место. При этом отмечено, что у белых беспородных мышей развивается инфекционный процесс, характеризующийся цианозом кожи и отеком пораженной конечности, снижением двигательной и пищевой активности инфицированных животных, выраженным гангренозным распадом тканей в месте введения возбудителя. Причем, спустя 24 ч от момента заражения, погибало 80–90% инфицированных животных. В результате этих изменений к 48 ч после заражения регистрировали 100% гибель инфицированных животных вне зависимости от использованного для моделирования РАИ возбудителя.

В ходе проведенных исследований установлено, что моделирование интоксикаций токсинами перфрингенс, эдематиенс, гистолитикум и септикум можно осуществлять путем их подкожного или внутривенного введения лабораторным животным. Критерием, характеризующим специфическую активность каждого из использованных токсинов, являлась величина $ЛД_{50}$. Каждый из клостридиальных токсинов при введении экспериментальным животным обладал достаточно выраженным поражающим действием. Клиническая картина интоксикаций характеризовалась снижением двигательной и пищеварительной активности животных, первые проявления которой регистрировали уже спустя 18–20 ч после введения токсинов. Выраженность специфического действия токсинов, особенно перфрингенс, эдематиенс и гистолитикум, зависела от способа их введения в организм. При внутривенном введении токсины проявляли менее выраженную биологическую активность, чем при подкожном, о чем свидетельствовали меньшие значения величин $ЛД_{50}$ токсинов в последнем случае.

При оценке защитной эффективности разработанного полианатоксина «Тетра-ГА» в отношении экспериментальной РАИ первоначально была проведена серия исследований на моделях инфекции, вызванной Cl. perfringens типа А и Cl. oedematiens. В качестве препарата сравнения использовали С, поскольку в его состав

входили анатоксины перфрингенс и эдематиенс. Проведенные исследования показали, что по уровню формируемой защиты в отношении РАИ, вызванной Cl. perfringens типа А, полианатоксин «Тетра-ГА» и С в условиях однократного применения оказались равно низкоэффективными и обеспечивали выживаемость от 15 до 20% иммунизированных животных. В то же время в отношении РАИ, вызванной Cl. oedematiens, С при однократном применении оказался более эффективным, чем полианатоксин «Тетра-ГА». Если последний обеспечивал выживаемость только 15% инфицированных животных, то под влиянием однократной иммунизации С этот показатель в зависимости от биологической модели находился на уровне 60–66%, что было достоверно выше, чем среди животных, иммунизированных «Тетра-ГА» ($P<0,05$). Более эффективным оказалось двукратное с интервалом 30 сут применение обоих ИЛП. При этом в отношении РАИ, вызванной Cl. oedematiens, оба препарата оказались равноэффективными и обеспечивали практически 100% выживаемость инфицированных особей на фоне 100% летальности в контроле ($P<0,05$). В то же время в отношении РАИ, вызванной Cl. perfringens типа А, иммунизация С обеспечивала менее выраженный (на 40–50% ниже) уровень защиты, чем иммунизация полианатоксином «Тетра-ГА» (100% защита на фоне 100% летальности в контроле). Следовательно, полианатоксин «Тетра-ГА» в плане формирования невосприимчивости организма к заражению Cl. perfringens типа А и Cl. oedematiens, особенно при двукратном с интервалом 30 сут применении, следует рассматривать как более эффективный ИЛП, чем секстаанатоксин.

Помимо анатоксинов перфрингене и эдематиенс в состав полианатоксина «Тетра-ГА» входят анатоксины гистолитикум и септикум. Поскольку ранее использованные ИЛП для иммунопрофилактики РАИ не содержали упомянутые анатоксины, то при проверке эффективности «Тетра-ГА» в отношении этих инфекций было проведено сравнение с эффективностью соответствующих моноанатоксинов. Оказалось, что при однократном применении анатоксина септикум, минимальная инфицирующая доза соответствующего возбудителя, вызывающая 50% гибель иммунизированных животных, увеличивалась в 10 раз, а анатоксина гистолитикум – в 100 раз по сравнению с аналогичными показателями в контрольных группах. Так, по уровню формируемой у иммунизированных животных

защиты более эффективной оказалась однократная иммунизация полианатоксином «Тетра-ГА» в отношении РАИ, вызванной Cl. septicum. Выживаемость иммунизированных животных составила 54% на фоне 100% летальности в контрольной группе, хотя достоверных различий в исследованном показателе между подгруппами животных выявить не удалось (P>0,05).

Напротив, иммунологическая эффективность анатоксина гистолитикум в составе полианатоксина «Тетра-ГА» при однократном применении по уровню формируемой защиты оказалась низкой. Выживаемость в опытной группе находилась на уровне 15% против 33% в контроле.

Совокупность полученных результатов позволила заключить, что однократное применение полианатоксина «Тетра-ГА» можно рассматривать оправданным только при проведении иммунопрофилактики РАИ, вызванной Cl. septicum, и то в исключительных случаях, поскольку установленный протективный эффект прежде всего оказался недостоверным в сравнении с контролем, а также был получен в условиях заражения экспериментальных животных довольно низкими заражающими дозами соответствующего возбудителя – 2 $ЛД_{50}$.

Более эффективным оказалось двукратное применение полианатоксина с интервалом 30 сут. В этом случае обеспечивалось формирование напряженного иммунитета к заражению Cl. septicum. На фоне 100% летальности в контроле выживаемость иммунизированных животных составила 100% (P<0,05). Однако, как и при однократном применении, двукратная иммунизация полианатоксином «Тетра-ГА» не обеспечивала надежной защиты от заражения Cl. histolyticum. На фоне 100% летальности в контроле выживаемость иммунизированных морских свинок находилась на уровне 40%, что достоверно не отличалось от контрольных значений.

Следовательно, полианатоксин «Тетра-ГА» можно рассматривать в качестве перспективного средства иммунопрофилактики РАИ, вызванной Cl. perfringens типа А, Cl. oedematiens, Cl. septicum. Применительно к РАИ, этиологическим фактором которой является Cl. histolyticum, использование полианатоксина не достаточно эффективно. Даже двукратная иммунизация ИЛП не вызывала формирования у иммунизированных животных надежного уровня защиты, что в определенной степени может говорить о недостаточной

иммуногенности компонента гистолитикум в исследованном полианатоксине.

Поскольку ИЛП на основе анатоксинов должны прежде всего формировать напряженный антитоксический иммунитет, то в ходе выполнения настоящего исследования, полианатоксин «Тетра-ГА» был оценен с позиции его способности формировать напряженный иммунитет к гангренозным токсинам перфрингенс, эдематиенс, гистолитикум и септикум. Проведенные исследования показали, что иммунизация полианатоксином «Тетра-ГА» способствует выработке в организме подопытных животных соответствующих анатоксинов. Важно подчеркнуть, что выраженность этого процесса находится в прямой корреляционной зависимости с уровнем защиты иммунизированных животных в отношении РАИ, вызванной Cl. perfringens и Cl. oedematiens. При сопоставлении результатов выживаемости экспериментальных животных, инфицированных упомянутыми возбудителями и соответствующими токсинами, выявлены достоверные прямые корреляционные зависимости ($r=65$; $P<0,01$ – для перфрингенса и $r = 0,85$; $P<0,001$ – эдематиенс). Вместе с тем нельзя не отметить, что вклад антитоксического иммунитета в формирование невосприимчивости организма к РАИ, вызванной Cl. perfringens типа А, судя по полученным результатам корреляционного анализа, менее значим, чем к аналогичной инфекции, вызванной Cl. oedematiens.

Достаточно выраженная продукция антитоксинов при иммунизации полианатоксином «Тетра-ГА», особенно в условиях трехкратного применения, зарегистрирована в отношении токсина септикум. При этом корреляционные зависимости между уровнями защиты от инфекции и интоксикации также носили достоверный прямой характер ($r=0,78$; $P<0,001$). При двукратной иммунизации полианатоксином в отношении РАИ, вызванной Cl. septicum, регистрировали выраженный протективный эффект (на уровне 100%) на фоне достаточно слабого (около 25%) антитоксического иммунитета. Возможно, эти различия можно связать с особенностями формирования специфического иммунного ответа организма к данному возбудителю и его токсину или с особенностями механизмов защиты организма от воздействия данного биопатогена.

Наименее выраженный антитоксический иммунитет формировался при иммунизации полианатоксином «Тетра-ГА» к токсину

гистолитикум. Уровень защиты, даже при трехкратном применении ИЛП, не превышал 25%. Практически аналогичный протективный эффект был зарегистрирован и при инфицировании иммунизированных животных соответствующим возбудителем. При проведении сопоставительного анализа оказалось, что между уровнем защиты от инфекции и интоксикации токсином гистолитикум в условиях иммунизации животных полианатоксином «Тетра-ГА», существовала достоверная прямая коррелятивная зависимость ($r=0,67$; $P<0,01$). В связи с этим можно заключить, что антитоксический иммунитет, формируемый в результате иммунизации полианатоксином «Тетра-ГА» играет заметную роль в защите организма от РАИ, вызванной Cl. histolyticum. Достаточно низкий уровень этого иммунитета в сравнении с аналогичным в отношении остальных гангренозных токсинов можно объяснить недостаточной иммуногенностью компонента гистолитикум в составе полианатоксина. Нельзя также не отметить, что иные механизмы формирования невосприимчивости организма к инфицированию Cl. histolyticum, по-видимому, не так значимы, как это имеет место при РАИ, вызванной, например, Cl. perfringens типа А или Cl. septicum.

Учитывая, что развитие РАИ после любого травматического повреждения сопровождается существенными, преимущественно иммуносупрессивными изменениями [16, 17, 18], очевидно, что использование иммунобиологических лекарственных препаратов с целью профилактики целесообразно, дабы не усиливать выраженность упомянутых нарушений.

Поэтому нами была проведена серия исследований по оценке иммунобиологической безопасности разработанного полианатоксина. Наибольшее внимание было уделено оценке состояния неспецифических механизмов иммунной защиты, поскольку эти изменения приоритетны при развитии РАИ, так же оценивали состояние клеток фагоцитарной системы и гуморальных факторов неспецифической иммунологической резистентности у иммунизированных полианатоксином «Тетра-ГА» животных. В результате проведенных исследований установлено, что полианатоксин оказывал стимулирующее действие на гранулярные лейкоциты периферической крови, наиболее отчетливо регистрируемое в течение 30 сут после иммунизации. Аналогичная направленность эффекта полианатоксина была отмечена и в отношении гуморальных факторов

неспецифической иммунологической резистентности, а именно процессов синтеза и секреции в кровь лизоцима, МПО и NASA. Подобное действие полианатоксина на фагоцитирующие клетки и гуморальные факторы неспецифической иммунологической резистентности следует рассматривать как один из основных, помимо специфической активности, в плане формирования невосприимчивости организма к основным возбудителям РАИ. Возможно, именно с этим эффектом введения полианатоксина связан установленный в результате его применения защитный эффект в отношении РАИ, вызванной Cl. perfringens типа А и в большей степени Cl. septicum. Более того, выявленная направленность эффектов полианатоксина «Тетра-ГА» на клетки иммунной системы позволяет его характеризовать как иммунологически безвредный препарат, использование которого с профилактической целью не будет вызывать у привитых развития иммунной депрессии на уровне неспецифической иммунологической резистентности.

Нельзя не отметить, что в составе ИЛП имеется слабоиммуногенный компонент – анатоксин гистолитикум, поскольку он не обеспечивал формирование напряженного иммунитета как к инфекции, так и интоксикации соответствующим токсином. В связи с этим оправдан поиск эффективных путей повышения иммуногенности данного компонента полианатоксина. Подобный подход возможно осуществить по одному из следующих направлений:

– повышением иммунизирующей дозы анатоксина в препарате «Тетра-ГА»;

– оптимизацией дозового состава входящих в полианатоксин других компонентов с целью устранения конкурентных взаимоотношений, хотя по полученным в ходе исследования данным подобных взаимоотношений не выявлено;

– повышением иммуногенных свойств анатоксина путем использования иммунологических адъювантов [19].

Рассматривая каждое из этих направлений в отдельности, необходимо отметить, что увеличение прививочной дозы какого-либо компонента в многокомпонентной системе, которой, в частности, является полианатоксин «Тетра-ГА», может вызвать дисбаланс в развитии иммунного ответа на другие его компоненты, то есть привести к формированию конкурентных взаимоотношений между входящими в препарат моноанатоксинами. В то же время в испытанных

пропорциях каждого анатоксина использование ИЛП не приводило к развитию подобной нежелательной ситуации. Каждый из компонентов препарата «Тетра-ГА» характеризовался определенным уровнем иммунологической активности, способствующей в конечном итоге необходимому уровню защиты в соответствии с требованиями действующих ОТТ 8.1.112-2011, за исключением компонента гистолитикум. Поэтому, как нам представляется, нивелировать этот отрицательный эффект можно путем использования в схеме иммунизации полианатоксина «Тетра-ГА» иммунологического адъюванта. Поскольку в разработанном препарате уже присутствует один адъювант – гидрат окиси алюминия, то в качестве второго адъюванта необходимо использовать такое средство, которое обладало бы способностью оказывать избирательное действие на компоненты иммунной системы. При этом оно, стимулируя межклеточные взаимодействия и тем самым специфический антителогенез, не оказывало бы отрицательного влияния на адъювантные свойства гидрата окиси алюминия. По нашему мнению, этим характеристикам более всего соответствуют препараты цитокинов и их рекомбинантные аналоги [18].

Анализ доступных информационных материалов свидетельствует о том, что должного положительного эффекта можно достигнуть при использовании препаратов на основе ИЛ-2. Упомянутый цитокин занимает ключевое место в реакциях иммунной системы, осуществляя взаимосвязь между иммунокомпетентными клетками при антителогенезе [19, 20]. Так, показана адъювантная активность ИЛ-2 в отношении противоопухолевых вакцин, вакцины БЦЖ, вакцин против бешенства, гриппа, ящура, бронхопневмоний, вирусных диарей крупного рогатого скота, ВИЧ-инфекции, Hemophilus pleuropneumonia, гепатита В, ортопоксвирусных инфекций. Рекомбинантные препараты ИЛ-2 (рИЛ-2) обеспечивали повышение иммунологической эффективности ДНК-вакцины против гепатита В, поксвирусной рекомбинантной вакцины, герпетической вакцины [19].

Полученные нами результаты свидетельствуют, что полианатоксин «Тетра-ГА» при двукратном с интервалом 30 сут применении совместно с рИЛ-2 характеризуется более выраженной иммунологической эффективностью, обеспечивая формирование более напряженного антитоксического иммунитета к слабоиммуногенным компонентам – анатоксинам септикум и гистолитикум,

чем при его применении без адъюванта. Аналогичный эффект зарегистрирован и в отношении высокоиммуногенных анатоксинов пефрингенс и эдематиенс. Так, после однократного совместного введения полианатоксина и рИЛ-2 человека выживаемость животных, которым вводили соответствующие токсины, составила 66,7% (перфрингенс), 50,0% (эдематиенс), 50,0% (септикум) и 50,0% (гистолитикум) против 33,3%, 16,7%, 16,7%, 0% соответственно в группах животных, иммунизированных только полианатоксином (иммуногенность компонентов полианатоксина возрастала на 30–50%).

Следовательно, применение рИЛ-2 уже в ходе однократной иммунизации обеспечивает существенное повышение иммуногенности компонентов полианатоксина. Дальнейшее повышение иммуногенности полианатоксина было зарегистрировано после повторной иммунизации ИЛП и рИЛ-2. Однако в отличие от однократной иммунизации прирост активности был не столь выраженным (до 20%). Применение рИЛ-2 в сочетании с полианатоксином представляется более перспективным в плане иммунопрофилактики раневых клостридиозов, чем только полианатоксина, поскольку способствует повышению иммуногенности всех входящих в него компонентов.

Таким образом, в представленной работе дан анализ и обобщение теоретических, экспериментальных и клинико-иммунологических исследований, полученных в результате многолетнего доклинического изучения и полевых испытаний эффективных средств и методов вакцинопрофилактики клостридиальных инфекций.

Показано, что полианатоксин «Тетра-ГА» следует рассматривать как перспективное средство иммунопрофилактики раневых клостридиозов и интоксикаций клостридиальными токсинами.

Литература

1. *Воробьев, А.А.* Анатоксины / А.А. Воробьев, Н.Н. Васильев, А.Т. Кравченко. – М.: Медгиз, 1965 – С. 488.

2. *McDonel, L.L.* Clostridium perfringens toxins / L.L McDonel // Pharmacol. Ther. – 1980. – Vol.10, №3. – P.617–655.

3. Руководство по вакцинному и сывороточному делу / под ред. П.Н. Бургасова. – М.: Медицина, 1978. – 440 с.

4. *Рамон, Г.* Сорок лет исследовательской работы / пер. с франц. – М.: Медгиз, 1962. – 459 с.

5. *Агафонов, В.И.* Испытание на людях массовой ассоциированной иммунизации с помощью модернизированных брюшнотифозной вакцины с секстаанатоксином и секстаанатоксина / В.И. Агафонов, Т.И. Булатова, К.Г. Гапочко и др. // Вопросы противоэпидемической защиты населения. – М., 1981. – Вып. 3. – С. 383–392.

6. *Савельев, А.П.* Ассоциированная и комплексная иммунизация: состояние и перспективы / А.П. Савельев, Р.Ш. Магазов, О.П. Мисников и др. – Уфа: Гилем, Башк. энцикл., 2014. – 424 с.

7. *Гапочко, К.Г.* Вакцины, поствакцинальные реакции и функциональное состояние организма привитых / К.Г. Гапочко, Р.Ш. Магазов, В.С. Матковский и др. – Уфа: Башк. кн. изд-во, 1986. – 200 с.

8. *Великанов, И.М.* Ботулизм // Журн. микробиол. – 1934. – Т.12, вып. 2 – С. 211–231.

9. *Иванова, Л.Г.* Сухая среда для диагностики пищевых отравлений, вызванных клостридиями ботулинум и клостридиями перфрингенс / Л.Г. Иванова, Т.И. Сергеева, Н.В. Плоскирев и др. // Лабораторное дело. – 1962. – № 4. – С. 33–36.

10. *Duff, J.T.* Studies on immunity to toxine of Clostridium botulinum. I. A simplified procedure for isolation of type A toxin / J.T. Duff, G.G. Wright, J. lerer et al. // J. Bacteriol. – 1957. – V.73. – № 1. – P. 42–47.

11. *Горфункель, Д.М.* Получение очищенного и концентрированного ботулинового анатоксина типа В и изучение его антигенных и иммуногенных свойств / Д.М. Горфункель, Н.Я. Денисова, Ф.М. Кац и др. // Анаэробные инфекции: труды межинститутской конференции. – М., 1960. – Т.9. – С. 132–140.

12. *Arnon, S.* Human tetanus and human botulism / In: The clostridia: molecular biology and pathogenesis. – San Diego: Academic Press, 1997. – P. 95–115.

13. *Roux, E.* Contribution a l'etude de la diphtherie // Ann Inst Pasteur. – 1888. – P. 629–631.

14. *Бадиков, В.Д.* Микробиология боевой хирургической травмы / В.Д. Бадиков: автореф. дисс. ... д-ра мед.наук. – СПб., 2000. – 40 с.

15. *Цып, В.Н.* Активная иммунизация против столбняка и газовой гангрены / В.Н Цып, Д.Н. Захарина, Л.А. Черная // Труды четвертого анаэробного совещания. – М.: Биомедгиз, 1936. – С. 31.

16. *Горшков, С.З.* Анаэробная клостридиальная раневая газовая инфекция / С.З. Горшков. –М.: Медицина, 2007. – 128 с.

17. *Lottenberg, R.* Capturing host plasmin (ogen): a common mechanism for invasive pathogens? / R. Lottenberg, D. Minning – Wenz, M.D. Boyle // Trends Microbiol. – 1994. – № 2.

18. *Oswald, E.* Cytotoxic necrotizing factor type 2 produced by virulent Escherichia coli modifies the small GTP-binding proteins Rho involved in assembly of actinstress fibers / E. Oswald, M. Sugai, A. Labigne et al. // ProcNatiAcadSci USA. – 1994. – № 91. – P. 3814–3818.

19. *Степанов, А.В.* Применение цитокинов для профилактики и лечения раневой анаэробной инфекции / А.В. Степанов, О.В. Хлопунова, В.М. Добрынин (и др.) // Актуальные проблемы и перспективы развития военной медицины. Том 3. – СПб.: ВмедА, 2002. – С. 275–284.

20. *Семенов, О.Д.* Экспериментальная оценка протективных свойств нового полианатоксина против раневых клостридиозов / О.Д. Семенов, А.В. Степанов, В.М. Добрынин // Сборник материалов научно-практической конференции, посвященной 40-летию Научно-исследовательского испытательного центра (медико-биологической защиты) ФГУ «ГосНИИИ ВМ Минобороны России». – СПб., 2010. – С. 89–97.

БАШКИРСКАЯ ЭНЦИКЛОПЕДИЯ

Оглавление

Перечень сокращений, условных обозначений, символов, единиц и терминов 5

Введение 7

Глава 1. **Эпидемиология клостридиальных инфекций** 10

1.1. Общие сведения о клостридиальных инфекциях 12

1.2. Эпидемиология, патогенез и основные клинические признаки ботулизма 19

1.3. Эпидемиология, патогенез и основные клинические признаки столбнячной инфекции 43

1.4. Эпидемиология, патогенез и основные клинические признаки раневых клостридиозов (газовые гангрены Cl. perfringens, Cl. oedematiens, Cl. histoliticum, Cl.septicum) 56

Литература 66

Глава 2. **Этапы развития и создания средств вакцинопрофилактики клостридиальных инфекций**

2.1. Историческая справка о развитии средств вакцинопрофилактики клостридиальных инфекций 74

2.2. Разработка и создание иммунобиологических лекарственных препаратов против ботулизма 90

2.3. Разработка и создание иммунобиологических лекарственных препаратов против столбняка 100

2.4. Разработка и создание иммунобиологических лекарственных препаратов против раневых инфекций 102

Литература 104

Глава 3. **Экспериментальное изучение эффективности клостридиальных анатоксинов**

3.1. Доклиническое изучение полианатоксинсодержащих иммунобиологических лекарственных препаратов.....118

3.1.1. Экспериментальная оценка иммунологической эффективности брюшнотифозной вакцины с секстаанатоксином 118

3.1.2. Экспериментальная оценка иммунологической эффективности сухого сорбированного секстаанатоксина 122

3.1.2.1. Теоретическое обоснование оптимизации компонентов сорбированного секстаанатоксина методом математической теории эксперимента 122

3.1.2.2. Оптимизация (балансировка) секстаанатоксина 129

3.1.2.3. Разработка технологии получения ботулинических анатоксинов с использованием гидролизата эприна в качестве основы питательной среды..... 131

3.1.2.4. Разработка методов концентрации, обезвреживания и очистки ботулинических токсинов..... 138

3.1.2.5. Авторские испытания нового оптимизированного секстаанатоксина 149

3.2. Экспериментальное обоснование включения оптимизированного секстаанатоксина в состав вакцинных комплексов..... 155

Литература..... 158

Глава 4. **Клинико-иммунологическое изучение ассоциированно-комплексных прививок**..... 161

4.1. Переносимость и реактогенность комплексных и ассоциированных прививок..... 163

4.2. Функциональное состояние систем организма привитых изучаемыми вакцинными комплексами по данным инструментально-лабораторных исследований 184

4.2.1. Гематологические показатели и биохимический состав крови у лиц, привитых вакцинными комплексами 184

4.2.2. Характеристика сердечно-сосудистой системы у привитых вакцинными комплексами 191

4.2.3. Функция внешнего дыхания и газообмена у привитых в поствакцинальном периоде 194

4.2.4. Характеристика функции ЦНС у привитых вакцинными комплексами по психофизиологическим и психологическим показателям 196

4.3. Иммунологическая эффективность ассоциированной и комплексной иммунизации по серологическим данным 207

Литература 219

Глава 5. **Экспериментальное изучение эффективности полианатоксина «Тетра-ГА» против раневой анаэробной инфекции** 223

5.1. Моделирование экспериментальной раневой анаэробной инфекции с использованием Cl. oedematiens, Cl. septicum, Cl. histolyticum 224

5.2. Моделирование интоксикаций гангренозными токсинами в экспериментальных условиях 229

5.3. Защитная эффективность полианатоксина «Тетра-ГА» в сравнении с секстаанатоксином в отношении экспериментальной РАИ, вызванной Cl. perfringens типа А и Cl. oedematiens 231

5.4. Защитная эффективность полианатоксина «Тетра-ГА» в сравнении с моноанатоксинами в отношении экспериментальной РАИ, вызванной Cl. histolyticum и Cl. septicum 236

Литература 240

Глава 6. **Выраженность антитоксического иммунитета у экспериментальных животных, иммунизированных полианатоксином «Тетра-ГА»**

6.1. Оценка антитоксического иммунитета, вызываемого моноанатоксинами 242

6.2. Изучение антитоксического иммунитета, развивающегося после применения полианатоксина «Тетра-ГА» 246

Литература 256

Глава 7. **Влияние иммунизации полианатоксином «Тетра-ГА» на состояние клеточных и гуморальных факторов неспецифической иммунологической резистентности**

7.1. Изучение клеточных факторов неспецифической иммунологической резистентности при иммунизации полианатоксином «Тетра-ГА» 257

7.2. Оценка гуморальных факторов неспецифической иммунологической резистентности при иммунизации полианатоксином «Тетра-ГА» 259

7.3. Оценка рекомбинантного интерлейкина-2 человека в качестве иммунологического адъюванта анатоксина гистолитикум в составе полианатоксина «Тетра-ГА» 262

Литература 266

Заключение 268

Литература 281

Научное издание

**Магазов Риза Шаихъянович, Савельев Александр Павлович,
Мисников Олег Павлович, Чепур Сергей Викторович,
Быков Владимир Николаевич, Степанов Александр Викторович**

ВАКЦИНОПРОФИЛАКТИКА КЛОСТРИДИАЛЬНЫХ ИНФЕКЦИЙ

Редактор: *Л.Д. Петрова*
Технический редактор: *Ф.Д. Емалетдинов*
Компьютерная верстка: *Е.Т. Хомякова*

Подписано в печать 11.03.2016 г. Формат 60×84 $^{1}/_{16}$. Бумага офисная «Снегурочка».
Гарнитура «Таймс». Печать на ризографе. Усл. печ. л. 17. Уч.-изд. л. 15.57.
Тираж 200 экз. Заказ № 12.

Издательство «Гилем» НИК «Башкирская энциклопедия».
450006, г. Уфа, ул. Революционная, 55. Тел.: (347) 250-06-72.
gilem@bashenc.ru

Отпечатано в типографии НИК «Башкирская энциклопедия».
450006, г. Уфа, ул. Революционная, 55. Тел.: (347) 251-02-27.

Переплетные работы изготовлены в ЗАО «Магнитогорский Дом печати».
455023, Челябинская область, г. Магнитогорск, пр. К. Маркса, д. 69.
Тел.: (3519) 26-15-11.