სერგო რიგვავა, მერაბ ნათიძე, ლია გუბელაძე, ნათია ქარუმიძე, დალი გოგიაშვილი, თამარ ტურიაშვილი, ლალი ქავთარაძე

სტაფილოკოკური იმუნოგენების შერჩევა ჰიპერიმუნური პოლიკლონური შრატის მისაღებად

გ. ელიავას სახელობის ბაქტერიოფაგიის, მიკრობიოლოგიისა და ვირუსოლოგიის ინსტიტუტი

Doi: https://doi.org/10.52340/jecm.2022.08.06

SERGO RIGVAVA, MERAB NATIDZE, LIA GUBELADZE, NATIA KARUMIDZE, DALI GOGIASHVILI, TAMAR TURIASHVILI, LALI KAVTARADZE

SELECTION OF STAPHYLOCOCCAL IMMUNOGENES TO OBTAIN HYPERIMMUNE POLYCLONAL SERUM

G. Eliava Institute of Bacteriophages, Microbiology and Virology

SUMMARY

Complicated staphylococcal infections: sepsis, meningitis, endocarditis and other requires the development of new generation biological agent with high medicinal property, devoid of adverse events. In this direction, development of microbial cell antigen, anti-hemolytic, anti-leukocidin and anti-hyaluronidase immunoglobulin is promising, which needs staphylococcal immunogene for immunization of producers. Selection of staphylococcal strains was based on the study of morphological, cultural and enzymatic activity, determination of sensitivity to novobiocin and staphylococcal bacteriophage. Among 102 laboratory and clinical staphylococcal strains, following were selected: a) high plasmocoagulating, with hemolytic property, mannitol decomposition and proteolytic property, also St. aureus 24 sensitive to novobiocin and staphylophage and St. epidermidis 6 strains devoid of the mentioned property; b) Thermally inactivated staphylococcal strains, due to their stable characteristics; c) Staphylococcal: alfa-anatoxin, PV-leukocidin and hyaluronidase. Mentioned immunogens were used for priming and immunization of producer-animals (goats). First cycle of immunization has been administered. In the immune serum, the activity of antibodies against the used immunogens is determined by immunoenzymatic analysis, based on „Sandwich-ELISA“ and in passive hemagglutination reaction, using diagnostic test-systems.

This work was supported by Shota Rustaveli National Science Foundation of Georgia (SRNSFG), Grant # AR - 18-306.

Keywords: staphylococcus, anatoxin, PV-leukocidin, anti-staphylococcal serum.

შესავალი. სტაფილოკოკების ანტიბიოტიკორეზისტენტული შტამებით გამოწვეული ინფექციები გლობალური საფრთხეა სიკვდილიანობის დონის გათვალისწინებით, რომელსაც ზრდის ტენდენცია ახასიათებს [4]. სტაფილოკოკური ანტიგენების ფართო სპექტრის მიმართ გამომუშავებული ანტისხეულები (IgG) Staphylococcus aureus-ს პათოგენების მრავალფეროვნებაზე მიუთითებს [3]. სტაფილოკოკური ინფექციების შესწავლამ მეცნიერები მიიყვანა დასკვნამდე, რომ გადაუდებელი ამოცანაა დაავადების პრევენციისათვის დამცავი ანტიგენური ვაქცინების შექმნა. მრავალი მეცნიერი მუშაობს ეფექტური ვაქცინების შემუშავებაზე [8,1,2].

დღეისთვის მიღებულია მულტივალენტური მრავალკომპონენტიანი ვაქცინები, რომლებიც პასუხობენ შემდეგ კრიტერიუმებს: 1. ბაქტერიული სპეციფიკური ანტიგენების შემცველობა კლინიკური მასალებიდან გამოყოფილ ბაქტერიებში. 2. ყველა ანტიგენი ასრულებს მნიშვნელოვან როლს *Staph. Aureu*-ით გამოწვეულ პათოგენეზში [4].

მოხსენიებული ავტორების მიერ დადგენილია, რომ ვაქცინები ინდუცირებენ T-უჯრედულ იმუნიტეტს, იწვევენ ციტოკინების სეკრეციას, რომლებიც ახდენენ იმუნიტეტის სტიმულირებას და განაპირობებენ პაციენტის გამოჯანმრთელებას.

გართულებული სტაფილოკოკური ინფექციები საჭიროებს უსაფრთხო, მაღალეფექტური სამკურნალო პრეპარატების შემუშავებას, ვინაიდან მრავალმხრივი გვერდითი მოვლენებიდან გამომდინარე, ანტიბიოტიკი რიგ შემთხვევაში ვერ იძლევა სასურველ შედეგს [7,6]. ამასთან, გასათვალისწინებელია სტაფილოკოკური ინფექციების პათოგენეზში ტოქსინებისა (ჰემოლიზინი-

ალფა-ტოქსინი, ლეიკოციდინი, სხვა ტოქსინების) და ფერმენტების (ჰიალურონიდაზა, კოაგულაზა) მონაწილეობა, რომლებიც უკიდურესად ამძიმებენ ინფექციური პროცესის მიმდინარეობას.

პათოგენური სტაფილოკოკებით გამოწვეული გართულებული ინფექციების შემთხვევაში ტოქსიკური ფაქტორების როლიდან გამომდინარე, სამკურნალოდ უპირატესობა მაღალი აქტივობის მქონე იმუნურ პრეპარატებს ენიჭება. მათი უნიკალური თვისებაა უჯრედებსა და ქსოვილებზე არსებული პათოგენისა და ტოქსინების განეიტრალება [5].

პროექტის მიზანი. კვლევის მიზანია კლინიკური სტაფილოკოკების (Staphylococcus aureus, Staphylococcus epidermidis) სტაბილური ნიშან-თვისებების მქონე ვირულენტური და პირობით პათოგენური შტამების შერჩევა მათი შემდგომი იმუნოგენებად გამოსაყენებლად, მაღალი სპეციფიკური აქტივობის მქონე ჰიპერიმუნური შრატის მისაღებად.

კვლევის შინაარსი. ცდებში გამოკვლევებს დავუქვემდებარეთ სტაფილოკოკების 102 შტამი. სტაფილოკოკების შესწავლა მოიცავდა მორფოლოგიური (ფორმა, განლაგება, საღებავების მიმართ დამოკიდებულება, კაფსულის გამომუშავება), კულტურალური (საკვებ არეებზე ზრდა, კოლონიების ფორმა), ბიოქიმიური (NH_3 გამომუშავება, კატალაზური აქტივობა, ციტრირებული სისხლის პლაზმის კოაგულაცია, მანიტის ფერმენტაცია, ჰემოლიზური თვისება) ნიშან-თვისებების შესწავლას, ნოვობიოცინისა და სტაფილოფაგის მიმართ მგრძნობელობის დადგენას.

კვლევითი სამუშაოების ჩატარება ხორციელდებოდა მიკრობებზე მუშაობის სტანდარტული პირობების შექმნით და ლაბორატორიულ პრაქტიკაში არსებული მეთოდების გამოყენებით.

გამოკვლევათა პროცესში შესწავლილი 102 შტამიდან ძირითადი ნიშან-თვისებების გათვალისწინებით შერჩეულ იქნა 30 ტიპური, მათ შორის St. aureus 24, ხოლო St. epidermidis 6 შტამი.

სტაფილოკოკების კულტურებისათვის დამახასიათებელია მსგავსი მორფოლოგიური ნიშნები (ცხრილი 1), კერძოდ, ნაცხებში მტევნისებური განლაგება, ლურჯ-იისფერში შეღებვა (გრამდადებითი), აგარზე S ფორმის კოლონიების წარმოქმნა; თუმცა აღინიშნება მნიშვნელოვანი განსხვავება, რაც St. aureus მიერ მიკროკაფსულის წარმოქმნით განისაზღვრება, რასაც St. epidermidis შტამები მოკლებულია.

ცხრილი 1. სტაფილოკოკების მორფოლოგიური მახასიათებლები

#	მიკრობის დასახელება	კულტურათა რაოდენობა	გრამით შეღებვა	განლაგება	კოლონიის ფორმა	მიკროკაფსულის გამომუშავება
1.	St. aureus	24	+	მტევნისებური	S	+
2.	St. epidermidis	6	+	მტევნისებური	S	-

მნიშვნელოვანი განსხვავება აღინიშნება შესწავლილ შტამებში ფერმენტული აქტივობის მაჩვენებლებში (ცხრილი 2), რაც St. aureus მიერ ერითროციტების ლიზისში, ბოცვრის ციტრირებული სისხლის პლაზმის შედედებაში, მანიტის ფერმენტაციასა და პროტეოლიზურ თვისებებში აისახა. აღნიშნული თავისებურება St. epidermidis შტამებისადმი არ არის დამახასიათებელი, რაც მათი სახეობრივი კუთვნილების მიმანიშნებელია.

ცხრილი 2. სტაფილოკოკების შტამების ფერმენტული მახასიათებლები

#	მიკრობის დასახელება	კულტურათა რაოდენობა	პლაზმო-კოაგულაცია	მანიტის ფერმენტაცია	ჰემოლიზი	პროტეოლიზი
1.	St. aureus	24	+	+	+	+
2.	St. epidermidis	6	-	-	-	-

ნოვობიოცინისა და სტაფილოფაგების მიმართ სტაფილოკოკების მგრძნობელობის შესწავლამ გამოავლინა რეზისტენტული შტამების არსებობა (ცხრილი 3). ასე მაგალითად, St. aureus 24 შტამიდან ნოვობიოცინისადმი მგრძნობიარე აღმოჩნდა 19, რეზისტენტული 5. St. epidermidis 6 შტამიდან მგრძნობიარე 4, რეზისტენტული 2; სტაფილოფაგის მიმართ St. aureus 24 შტამიდან მგრძნობიარე აღმოჩნდა 13, არამგრძნობიარე 11, ხოლო St. epidermidis 6 შტამიდან მგრძნობიარე – 1, არამგრძნობიარე – 5.

ცხრილი 3. სტაფილოკოკების ანტიბიოტიკო და ფაგომგრძნობელობა

#	მიკრობის დასახელება	კულტურათა რაოდენობა	ნოვობიოცინი		სტაფილოფაგი	
			მგრძნობიარე	არამგრძნობიარე	მგრძნობიარე	არამგრძნობიარე
1.	St. aureus	24	19	5	13	11
2.	St. epidermidis	6	4	2	1	5

იმუნური შრატის მისაღებად პროდუცენტ-ცხოველებს (თხა) ჩაუტარდა აცრები იმუნოგენების მზარდი დოზებით. იმუნოგენებად გამოყენებიულ იქნა შემდეგი პათოგენები: თერმო-ინაქტივირებული ბაქტერიული კულტურა, ალფა-ანატოქსინი, PV-ლეიკოციდინი ჰიალურონიდაზა. იმუნოგენები შეყვანილ იქნა შემდეგი დოზებით - სტაფილოკოკების თერმოინაქტივირებული კულტურა (5 მლრდ/მლ) - 0,5 მლ, მეორე აცრა - 1 მლ; მესამე აცრა - 2 მლ, მეოთხე აცრა - 4 მლ; ადსორბირებული სტაფილოკოკური ანატოქსინი - პირველი აცრა -1 მლ, მეორე აცრა - 2 მლ, მესამე აცრა - 3,5 მლ, მეოთხე აცრა - 4,5 მლ. PV-ლეიკოციდინი - პირველი ინიექცია - 0,1 მგ, მეორე ინიექცია - 0,2 მგ, მესამე ინიექცია - 0,4 მგ. ეს ინიექციები დროში ემთხვევა ანატოქსინის მეორე, მესამე და მეოთხე ინიექციებს. ჰიალურონიდაზა - 0,2 მგ პირველი ინიექცია, 0,4 მგ მეორე ინიექცია. იმუნოგენებს ემატებოდა იმუნოსტიმულატორი (0,5%-ანი ალუმინ კალიუმის შაბი). სპეციფიკური ანტისხეულები ბაქტერიის, ტოქსინების (ალფა-ტოქსინი, PV-ლეიკოციდინი) და ფერმენტის (ჰიალურონიდაზა) მიმართ შესწავლილ იქნა ნორმალურ შრატში, იმუნურ შრატში და იმუნოგლობულინში.

განსაზღვრულ იქნა ანტიტოქსიკური ანტისხეულების ტიტრი ლიმეს-ჰემოლიზის რეაქციაში, რომელმაც შეადგინა 150 სე/მლ. სხვა იმუნოგენების მიმართ ანტისხეულების დონის შესაფასებლად შემუშავებულ იქნა ლიოფილიზირებული სადიაგნოსტიკო ტესტ-სისტემა, რომელიც გამოვიყენეთ პასიური ჰემაგლუტინაციის რეაქციაში. გამოკვლევებმა აჩვენა, რომ ანტისხეულების ტიტრი სტაფილოკოკური ბაქტერიების მიმართ არის - 1:6400 – 1:12800, ანტილეიკოციდინური ანტისხეულების ტიტრი იყო 1:640 – 1:1280; ანტისხეულების ტიტრმა ჰიალურონიდაზის მიმართ პასიური ჰემაგლუტინაციის რეაქციაში შეადგინა - 1:160 – 1:320. ანტისტაფილოკოკური ანტისხეულები თხის ნორმალურ შრატში განსაზღვრულ იქნა იმუნოფერმენტული მეთოდით (immunoenzyme method). შედეგები დარეგისტრირებულ იქნა იმუნოფერმენტულ რიდერზე Sunostik SPR-960. იმუნოფერმენტული ანალიზის ჩასატარებლად გამოვიყენეთ რეაგენტი: Anti-Goat IgG (H&L) in rabbit Affinity Purified, Polysciences, Inc.exp.10.2022. ნორმალური მაჩვენებლების მიხედვით 50-390 ნგ/მლ ჩატარებულია იმუნოფერმენტული ანალიზი, ძირითად „Sandwich-ELISA“-ს საფუძველზე, ტესტ-სისტემებთან თანდართული გაიდლაინების შესაბამისად. თხის ნორმალური (საკონტროლო) შრატების საშუალო მონაცემები სტაფილოკოკური ალფა-ტოქსინის მიმართ იყო 0,081; ხოლო იმუნურ შრატში იმავე ტოქსინის მიმართ დადებითობის ინდექსმა შეადგინა 10,08. იმუნურ შრატში ანტიბაქტერიული ანტისხეულების დადებითობის ინდექსმა შეადგინა 9,2517 (მონიშნული IgG განზავება - 1:1000). დაგეგმილია შემდგომი კვლევითი სამუშაოები, რომელიც ითვალისწინებს ჰიპერიმუნური შრატიდან ანტისტაფილოკოკური იმუნოგლობულინის მიღებას სპირტოვანი ფრაქციონირების მეთოდით. პროექტის ბოლო ეტაპია ანტისხეულების F(ab')2 - ფრაგმენტების მიღება და შესწავლა სპეციფიკურ აქტივობაზე, ტოქსიკურობაზე, უვნებლობაზე (არეაქტოგენობაზე), პიროგენობაზე, სამკურნალო და პროფილაქტიკურ თვისებებზე ევროპული ფარმაკოპეის მოთხოვნათა შესაბამისად.

გამოყენებული ლიტერატურა:

1. Bröker BM, Mrochen D, Péton V. The T Cell Response to Staphylococcus aureus. Pathogens. 2016 Mar 17;5(1):31. doi: 10.3390/pathogens5010031. PMID: 26999219; PMCID: PMC4810152.

2. Cohen TS, Hilliard JJ, Jones-Nelson O, Keller AE, et al. Staphylococcus aureus α toxin potentiates opportunistic bacterial lung infections. Sci Transl Med. 2016 Mar 9;8(329):329ra31. doi: 10.1126/scitranslmed.aad9922. PMID: 26962155.
3. Colque-Navarro P, Jacobsson G, Andersson R, Flock JI, Möllby R. Levels of antibody against 11 Staphylococcus aureus antigens in a healthy population. Clin Vaccine Immunol. 2010 Jul;17(7):1117-23. doi: 10.1128/CVI.00506-09. PMID: 20445005; PMCID: PMC2897265.
4. Deng J, Wang X, et al. Broad and Effective Protection against Staphylococcus aureus Is Elicited by a Multivalent Vaccine Formulated with Novel Antigens. mSphere. 2019 Sep 4;4(5):e00362-19. doi: 10.1128/mSphere.00362-19. PMID: 31484738; PMCID: PMC6731528.
5. Larkin EA, Stiles BG, Ulrich RG. Inhibition of toxic shock by human monoclonal antibodies against staphylococcal enterotoxin B. PLoS One. 2010 Oct 11; 5(10):e13253. doi: 10.1371/journal.pone.0013253. PMID: 20949003; PMCID: PMC2952590.
6. Liu C, Bayer A, Cosgrove SE, Daum RS, et al. Infectious Diseases Society of America. Clinical practice guidelines by the infectious diseases society of america for the treatment of methicillin-resistant Staphylococcus aureus infections in adults and children. Clin Infect Dis. 2011 Feb 1;52(3):e18-55. doi: 10.1093/cid/ciq146. PMID: 21208910.
7. Ohlsen K, Lorenz U. Immunotherapeutic strategies to combat staphylococcal infections. Int J Med Microbiol. 2010 Aug;300(6):402-10. doi: 10.1016/j.ijmm.2010.04.015. PMID: 20547101.
8. Thomer L, Emolo C, et al. Antibodies against a secreted product of Staphylococcus aureus trigger phagocytic killing. J Exp Med. 2016 Mar 7;213(3):293-301. doi: 10.1084/jem.20150074. PMID: 26880578; PMCID: PMC4813671.

სერგო რიგვავა, მერაბ ნათიძე, ლია გუბელაძე, ნათია ქარუმიძე, დალი გოგიაშვილი, თამარ ტურიაშვილი, ლალი ქავთარაძე

სტაფილოკოკური იმუნოგენების შერჩევა ჰიპერიმუნური პოლიკლონური შრატის მისაღებად

გ. ელიავას სახელობის ბაქტერიოფაგიის, მიკრობიოლოგიისა და ვირუსოლოგიის ინსტიტუტი

რეზიუმე

გართულებული სტაფილოკოკური ინფექციები: სეფსისი, მენინგიტი, ენდოკარდიტი და სხვა მოითხოვს ახალი თაობის, გვერდით მოვლენებს მოკლებული, მაღალი სამკურნალო თვისების ბიოლოგიური პრეპარატის შემუშავებას. აღნიშნულის მიმართულებით პერსპექტიულია მიკრობის უჯრედული ანტიგენის, ანტიჰემოლიზური, ანტილეიკოციდური და ჰიალურონიდაზის საწინააღმდეგო იმუნოგლობულინის შემუშავება, რაც პროდუცენტების იმუნიზაციისათვის სტაფილოკოკურ იმუნოგენს საჭიროებს. სტაფილოკოკის შტამების სელექციას საფუძვლად დავუდეთ მორფოლოგიური, კულტურალური და ფერმენტული აქტივობის შესწავლა, ნოვობიოცინისადმი და სტაფილოკოკური ბაქტერიოფაგის მიმართ მგრძნობელობის დადგენა. სტაფილოკოკის ლაბორატორიული და კლინიკური 102 შტამიდან შერჩეულ იქნა: ა) მაღალი პლაზმოკოაგულაციური, ჰემოლიზური თვისების, მანიტის დაშლის და პროტეოლიზური თვისების, აგრეთვე ნოვობიოცინისა და სტაფილოფაგის მიმართ მგრძნობიარე St. aureus 24 და აღნიშნულ თვისებას მოკლებული St. epidermidis 6 შტამი; ბ) სტაფილოკოკების თერმოინაქტივირებული შტამები, მათი სტაბილური ნიშან-თვისებებიდან გამომდინარე; გ) სტაფილოკოკური: ალფა-ანატოქსინი, PV-ლეიკოციდინი და ჰიალურონიდაზა. აღნიშნული იმუნოგენები გამოყენებულ იქნა პროდუცენტ-ცხოველების (თხები) გრუნდირებისა და იმუნიზაციისათვის. ჩატარებულია იმუნიზაციის პირველი ციკლი. იმუნურ შრატში განსაზღვრულია გამოყენებული იმუნოგენების საწინააღმდეგო ანტისხეულების აქტივობა იმუნოფერმენტული ანალიზით ,,Sandwich-ELISA''-ს საფუძველზე და პასიური ჰემაგლუტინაციის რეაქციაში სადიაგნოსტიკო ტესტ-სისტემების გამოყენებით.