

Сравнительный анализ информативности методов определения бактериофиксирующей активности эритроцитов

© 2011. В. А. Оборин¹, к.м.н., доцент,
 Е. В. Пименов², чл.-корр. РАН, д.м.н, профессор, А. Г. Ивонин¹, к.б.н., инженер,
¹Вятский государственный университет,
²Лаборатория сравнительной кардиологии Коми НЦ УрО РАН, г. Сыктывкар
 e-mail: vaoborin50@mail.ru

Исследована фиксирующая активность эритроцитов человека в отношении микроорганизмов бактериальной природы. Показано, что фотокolorиметрический метод является более информативным по сравнению с методами световой микроскопии. Предлагается использовать данный метод для изучения адгезии бактерий на эритроцитах.

Fixing activity of human erythrocytes concerning microorganisms of the bacterial nature is investigated by means of a number of methods. It is shown that the photocolormetric method is more informative in comparison with the methods of light microscopy. It is offered to use the given method for studying adhesion of bacteria on erythrocytes.

Ключевые слова: методы, бактерии, адгезия, эритроциты

Key words: methods, bacteria, adhesion, erythrocytes

В настоящее время доказано, что воздействие неблагоприятных экологических факторов на людей и животных приводит к изменению состава микрофлоры слизистых оболочек и покровных тканей. Это обусловлено изменением фиксирующей способности эпителиальных клеток и клинически проявляется в виде дисбиотических состояний. Поэтому изучение взаимодействия эукариотических клеток с различными микроорганизмами является актуальным направлением исследований.

По современным представлениям адгезия бактерий к слизистым оболочкам и покровным тканям представляет собой сложный и многофакторный процесс взаимодействия между про- и эукариотическими клетками [1 – 3]. При этом способность бактерий прикрепляться к поверхности организма хозяина рассматривается как их адгезивные свойства [4, 5]. Способность эритроцитов фиксировать на своей поверхности микробные клетки обозначается как бактериофиксирующая активность эритроцитов (БФАЭ) [6].

На сегодняшний день в основном изучаются адгезивные свойства микробных клеток, а фиксирующая способность клеток организма-хозяина в отношении микроорганизмов бактериальной природы остаётся малоисследованной. При изучении адгезивных свойств бактерий применяется большое количество методов как *in vitro*, так и *in vivo*. Методы *in vivo* с использованием различных лабораторных животных (кролики, белые мыши),

несмотря на информативность, трудоёмки, дорогостоящи, длительны и малоприспособны для исследования большого числа культур [7].

При определении адгезивных свойств бактерий *in vitro* в качестве клеток организма-хозяина применяют эпителиоциты, эритроциты, реже – тканевые и органы культуры клеток [8]. Их применение решает этические проблемы использования лабораторных животных, ускоряет процесс получения информации.

Методики получения эпителиальных клеток являются трудоёмкими, в то время как эритроциты легко можно получать в необходимых количествах. Кроме того, эритроциты имеют на своей поверхности гликофорин – вещество, идентичное гликокаликсу эпителиоцитов, на котором расположены рецепторы для адгезивных микробов [7, 8]. Поэтому при изучении процессов адгезии бактерий на эукариотических клетках чаще применяются эритроциты людей и различных видов животных [9 – 11].

Для оценки уровня адгезии микроорганизмов к эритроцитам широко применяется световая микроскопия [8, 12, 13]. На этом методическом подходе основан ряд методик [12, 14].

Метод, разработанный В. И. Брилис с соавторами [12], заключается в совместной инкубации бактерий с эритроцитами и последующей оценке результатов взаимодействия между клетками под световым микроскопом. Эффективность данного метода была показана многими авторами в сравнительных исследова-

дованиях с использованием тканевых культур и изолированных эпителиальных клеток [7, 8, 11, 15].

С. С. Гизатулина с соавторами [14] предлагают определять адгезивные свойства бактерий по способности их колоний связывать на своей поверхности эритроциты с образованием своеобразного «ободка».

Авторами статьи разработан фотоколориметрический метод определения БФАЭ, на который получен патент РФ на изобретение [16]. Метод основан на определении оптической плотности надосадочной жидкости пробы, содержащей суспензию эритроцитов и бактерий, после предварительного её инкубирования на вращающейся платформе при температуре 37°C и последующего осаждения эритроцитов путём центрифугирования. Фотоколориметрический метод хорошо зарекомендовал себя при изучении БФАЭ млекопитающих в отношении вакцинных штаммов возбудителей чумы, сибирской язвы, туляремии и бруцеллёза [17].

Целью настоящей работы являлось сравнительное изучение информативности разработанного авторами фотоколориметрического метода определения БФАЭ с методами, которые используются при оценке адгезивных свойств микроорганизмов бактериальной природы [12, 14].

Материалы и методы исследований

В работе использовали вакцинные штаммы *Yersinia pestis* EV НИИЭГ и *Bacillus anthracis* 55 ВНИИВВиМ, полученные из ФГУ «48 ЦНИИ Минобороны РФ» (г. Киров), пробиотические штаммы *Escherichia coli* M-17, *Bifidobacterium bifidum* № 1, *Lactobacillus plantarum* P4, *Lactobacillus buhneri* P0, *Lactobacillus casei* DN-114001, *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 53103, *Lactobacillus acidophilus* и *Lactobacillus bulgaricus*, предоставленные ОАО «Агровет» (г. Киров), клинические штаммы *Escherichia coli* серогрупп O86, O112, O124, O142, O144 и O152, полученные из бактериологической лаборатории госпиталя в/ч 1407 ФГУ «48 ЦНИИ Минобороны РФ», и музейные штаммы *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus vulgaris*, *Proteus mirabilis*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Serratia marcescens* и *Klebsiella pneumoniae* из коллекции кафедры морфологии и микробиологии ФГОУ ВПО «Вятская ГСХА».

Культивирование штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ осуществляли на ГРМ-агаре (рН 7,2) при

температуре (28±1)°С в течение 24 часов. Клинические и музейные штаммы выращивали на ГРМ-агаре (рН 7,2) при температуре (37±1)°С в течение 24 часов. Для выделения лактобацилл использовали питательную среду Мозера-Рогоза-Шарпа (MRS), выращивание осуществляли в анаэробных условиях. Культуры вакцинного штамма *B. anthracis* 55 ВНИИВВиМ получали путём выращивания на мясо-пептонном агаре (МПА) при температуре (37±1)°С в течение 24 часов. Споры *B. anthracis* 55 ВНИИВВиМ использовали в работе без предварительного культивирования. Выраженные на питательных средах и лиофильно-высушенные культуры суспензировали в стерильном 0,9%-ном растворе хлорида натрия (рН 7,2).

Для получения суспензии эритроцитов использовали венозную кровь донора 0(I) Rh+ группы крови. В качестве антикоагулянта применяли 3,8% раствор цитрата натрия (1:10). Не позднее 24 ч. после взятия крови эритроциты трижды отмывали десятикратным объёмом 0,9% раствора хлорида натрия путём центрифугирования при 1000 об/мин в течение 5 мин. и ресуспензировали в этом же растворе.

Оценку БФАЭ человека осуществляли, определяя индекс адгезии микроорганизмов (ИАМ) по методу [12], процента адгезивно-активных колоний (АКК) по методу [14] и показателю БФАЭ, определяемому фотоколориметрическим методом [16]. Статистическую обработку результатов исследований осуществляли при помощи компьютерной программы «Biostat» версии 4.03 с вычислением значений средней арифметической (M), ошибки средней арифметической (m) и коэффициента достоверности (p). Достоверность различий между группами оценивали с использованием t-критерия Стьюдента.

Результаты и их обсуждение

Данные сравнительного изучения фиксирующей активности эритроцитов человека 0(I) Rh+ группы крови в отношении клеток *Y. pestis* EV НИИЭГ, спор и вегетативных клеток *B. anthracis* 55 ВНИИВВиМ, а также ряда других микроорганизмов бактериальной природы представлены в таблице.

Из анализа данных таблицы следует, что фиксирующая способность эритроцитов человека в отношении изученных микробных культур значительно варьирует. Высокую степень фиксации эритроциты человека прояви-

Таблица

Результаты определения фиксирующей способности эритроцитов человека в отношении различных микробных штаммов (M±m; n=5)

Бактерии	ИАМ	ААР, %	ПБФАЭ, %
Вакцинные штаммы			
<i>B. anthracis</i> 55 ВНИИВВиМ	4,91±0,67	10,91±1,58	46,69±2,77
<i>Y. pestis</i> EV НИИЭГ	7,02±0,95	0	77,41±5,29
Пробиотические штаммы			
<i>E. coli</i> M-17	2,67±0,28	0	6,11±0,91
<i>L. plantarum</i> P4	2,07±0,41	0	7,34±2,19
<i>L. buchneri</i> P0	2,21±0,17	0	32,13±3,11
<i>L. casei</i> DN-114001	4,23±0,62	14,34±2,37	55,25±4,17
<i>L. rhamnosus</i> ATCC 53103	1,12±0,07	0	14,72±1,25
<i>L. acidophilus</i>	0,12±0,02	0	0,25±0,04
<i>L. bulgaricus</i>	2,64±0,12	0	гемолиз
<i>B. bifidum</i> №1	1,93±0,51	0	0,66±2,54
Клинические штаммы			
<i>E. coli</i> O151	3,53±0,44	9,33±4,49	20,74±2,19
<i>E. coli</i> O124	3,15±0,18	0	17,94±1,68
<i>E. coli</i> O142	2,14±0,41	8,33±2,41	2,49±1,75
<i>E. coli</i> O144	3,09±0,20	21,33±6,39	2,72± 2,15
<i>E. coli</i> O186	2,99±0,36	0	28,26±2,23
<i>E. coli</i> O112	1,85±0,16	10,01±1,53	3,11±5,34
Музейные штаммы			
<i>P. aeruginosa</i>	2,22±0,19	0	12,05±1,64
<i>K. pneumoniae</i>	1,65±0,24	0	2,42±2,02
<i>E. coli</i>	2,11±0,32	7,33±1,86	9,47±1,53
<i>P. vulgaris</i>	1,87±0,18	0	0,81±2,69
<i>P. mirabilis</i>	1,68±0,25	0	2,56±3,68
<i>S. epidermidis</i>	1,73±0,24	0	1,46±3,61
<i>S. saprophyticus</i>	1,84±0,18	0	0,34±2,69
<i>S. marcescens</i>	1,72±0,19	0	3,83±9,29
<i>M. luteus</i>	1,46±0,20	0	0,28±1,81

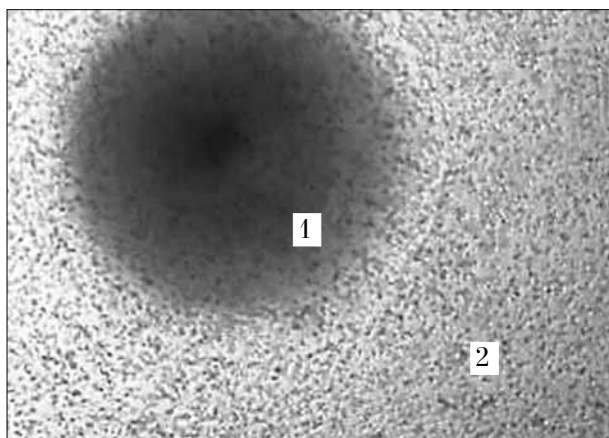


Рис. 1. Адгезивно-неактивная колония штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ. Микрофотосъемка в падающем свете. Увел. ×80.
1 – микробная колония;
2 – эритроциты вокруг колонии

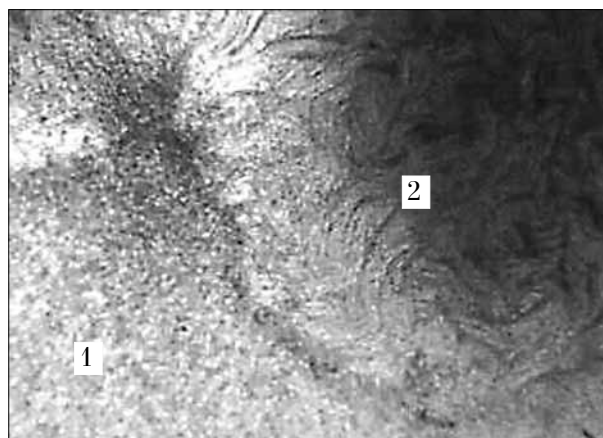


Рис. 2. Адгезивно-активная колония вакцинного штамма *B. anthracis* №55 ВНИИВВиМ. Микрофотосъемка в падающем свете. Увел. ×80.
1 – «ореол» из эритроцитов по краю колонии;
2 – микробная колония

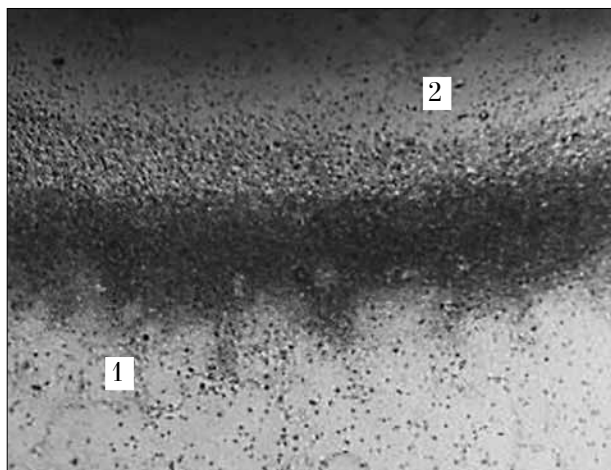


Рис. 3. Адгезивно-активная колония *E. coli* O144. Микрофотосъёмка в падающем свете. Увел. $\times 80$.
1 – скопление эритроцитов по краю колонии;
2 – микробная колония

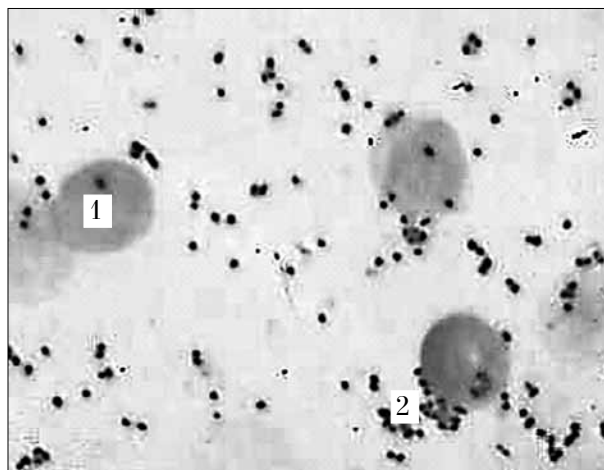


Рис. 4. Микроскопическая картина адгезии бактерий *Y. pestis* EV НИИЭГ к эритроцитам человека. Окраска по Граму. Увел. $\times 1000$.
1 – эритроциты; 2 – микробные клетки

ли в отношении клеток *Y. pestis* EV НИИЭГ и спор *B. anthracis* № 55 ВНИИВВиМ, а также микробных клеток пробиотических штаммов *L. casei* DN-114001 и *L. buchneri* РО. Фиксирующая способность эритроцитов человека в отношении штаммов, выделенных из кишечника человека, и музейных культур была выражена значительно слабее. Между значениями ПБФАЭ и ИАМ микробных культур установили сильную положительную корреляционную связь ($r=0,9$). В то же время между показателем ИАМ и количеством ААК корреляционная связь отсутствовала.

Установлено, что методом С. С. Гизатулиной [14] адгезивно-активные колонии выделялись в небольшом количестве – лишь у 7 из 25 исследуемых микробных культур, чаще у представителей кишечной группы бактерий. Вакцинный штамм *Y. pestis* EV НИИЭГ адгезивно-активных колоний не образовывал, хотя являлся высоко адгезивным (рис. 1). Вакцинный штамм *B. anthracis* 55 ВНИИВВиМ формировал колонии, вокруг которых в 10% случаев образовывался незначительно выраженный ободок из эритроцитов (рис. 2). Вокруг колоний штамма *E. coli* 144, выделенного из кишечника человека, находящегося на лечении в госпитале в/ч 1407 по поводу энтероколита, в 21% случаев формировался выраженный ореол из эритроцитов (рис. 3).

Учитывая полученные результаты и принимая во внимание, что методом С. С. Гизатулиной [14] оценивается взаимодействие эритроцитов не с отдельными микробными клетками, а с колониями бактерий, пришли к выводу, что

данный метод для определения БФАЭ использовать нецелесообразно.

Метод В. И. Брилис [12] давал возможность оценивать микроскопическую картину адгезии микробов к эритроцитам (рис. 4). Однако при его использовании возникли следующие затруднения. Во-первых, с помощью данного метода практически невозможно установить сам факт фиксации бактерий на эритроцитах: бактерии могут находиться рядом с эритроцитом или на его фоне, не прикрепившись к нему. Во-вторых, методом [12] исследуется взаимодействие бактерий с ограниченным количеством эритроцитов (50–100). В-третьих, метод обладает существенной трудоёмкостью.

Применение фотоколориметрического метода [16] за счёт использования приёмов седиментации эритроцитов с прикрепившимися к ним бактериями и фотоколориметрического определения последних в надосадочной жидкости позволяет установить процент микробных клеток, фиксированных на эритроцитах.

При этом одновременно оценивается фиксирующая способность миллионов эритроцитов. Определение БФАЭ с помощью прибора значительно повышает информативность и снижает трудоёмкость проводимых исследований.

Заключение

Таким образом, установлено, что метод С. С. Гизатулиной [14] не способен в полной мере охарактеризовать фиксирующую активность эритроцитов человека в отношении изу-

чаемых микробных культур. Метод В. И. Брилис [12], наряду с трудоёмкостью и ограниченным количеством исследуемых эритроцитов, не позволяет установить сам факт фиксации бактерий на эритроцитах.

Показано, что фотоколориметрический метод определения БФАЭ является более информативным по сравнению с методами световой микроскопии, так как позволяет устанавливать количество фиксированных на эритроцитах бактерий и даёт возможность одновременно изучать взаимодействие миллионов эритроцитов с микробными клетками. Регистрация результатов исследований осуществляется с помощью прибора, что не только повышает информативность, но и снижает трудоёмкость проведения исследований. Поэтому при изучении механизмов адгезии бактерий на эритроцитах целесообразно применять фотоколориметрический метод. Метод прост в исполнении, не требует дорогостоящего оборудования и может использоваться в любой бактериологической лаборатории как при изучении адгезивных свойств микробных клеток, так и при исследовании БФАЭ млекопитающих в отношении микроорганизмов бактериальной природы.

Литература

1. Дмитриева Н.Ф., Тимофеев Ю.М., Брико Н.И. Персистенция *Streptococcus pyogenes* // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. 2009. № 3. С. 104–109.
2. Симонова Е.В. Пономарева О.А. Роль нормальной микрофлоры в поддержании здоровья человека // Сибирский медицинский журнал. 2008. № 8. С. 20–25.
3. Saldana Z., Erdem A.L., Schiller S., Okeke I.N., Lucas M., Sivananthan A., Phillips A.D., Kaper J.B., Puente J.L., Giron J.A. The *Escherichia coli* common pilus and the bundle-forming pilus act in concert during the formation of localized adherence by Enteropathogenic *E. coli* // J. Bact. 2009. V. 191. № 11. P. 3451–3461.
4. Иванова В.В., Корнева Е.А. Закономерности взаимоотношений макроорганизма и возбудителей инфекционных болезней у детей // Вестник РАМН. 2000. № 11. С. 35–40.
5. Dunne W.M. Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately? // Clin. Microbiol. Rev. 2002. V. 15. № 2. P. 155–166.
6. Каплин В.Н., Лейбович Е.З. Материалы к обоснованию ранней иммунологической диагностики дизентерии // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. 1979. № 6. С. 49–54.
7. Телесманич Н.Р., Ломов Ю.М., Бардых И.Х., Винокур Н.И. Адгезивные и некоторые другие свойства *Vibrio cholerae* ТСР⁺ СТХ⁺, изолированных на объектах внешней среды Ростовской области в 2002 году // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. 2004. № 6. С. 3–6.
8. Смолина Т.П., Черных С.В., Горшкова Р.П. Снижение адгезии микроорганизмов на клетках уроэпителия с помощью полисахарида, выделенного из морских протеобактерий *Pseudoalteromonas nigrifaciens* // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. 2006. № 3. С. 58–61.
9. Евтеева Н.И. Биоразнообразие энтеробактерий в природных местообитаниях Нижегородской области: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. Н.Новгород. 2009. 25 с.
10. Колякина А.В. Лектиновые рецепторы холерных вибрионов: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. Ставрополь. 2009. 18 с.
11. Курилова А.А., Проскурина В.А., Майская В.Д. Неоднородность штаммов *Bacillus anthracis* по способности к адгезии // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. 2004. № 3. С. 81–83.
12. Брилис В.И., Брилене Т.А., Ленцнер Х.П., Ленцнер А.А. Методика изучения адгезивного процесса микроорганизмов // Лабораторное дело. 1986. № 4. С. 210–212.
13. Ананьева Н.В., Ганина В.И., Ленченко Е.М., Ванина Н.Н. Оценка методов исследования взаимодействия бактерий с клетками животных // Доклады Российской академии сельскохозяйственных наук. 2007. № 3. С. 53–55.
14. Гизатулина С.С., Биргер М.О., Кулинич Л.И., Фиш Н.Г., Мазитова О.П., Бирюкова Н.В. Способ оценки состояния микрофлоры кишечника человека по количеству адгезивно-активных колоний и типу адгезинов // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. 1991. № 4. С. 21–23.
15. Зайцева Е.А., Сомов Г.П. Влияние температуры на адгезивные свойства листерий // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. 2006. № 3. С. 20–23.
16. Романов В.Е., Ивонин А.Г., Бондаренко А.Л., Оборин В.А., Нехорошкина Е.Л. Способ определения бактериофиксирующей активности эритроцитов. Патент РФ на изобретение № 2360969; опубл. 10.07.2009. Бюл. № 11.
17. Оборин В.А. Бактериофиксирующая активность эритроцитов. Киров: Вятская ГСХА, 2010. 194 с.