

В.А.Оборин, Е.В.Пименов, А.Г.Ивонин

ИЗУЧЕНИЕ АДГЕЗИИ БАКТЕРИЙ ВАКЦИННОГО ШТАММА *YERSINIA PESTIS* EV НИИЭГ К ЭРИТРОЦИТАМ ЖИВОТНЫХ ФОТОКОЛОРИМЕТРИЧЕСКИМ МЕТОДОМ

ГОУ ВПО «Вятский государственный университет», Киров

С помощью фотоколориметрического метода изучены адгезивные свойства клеток вакцинного штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ в отношении эритроцитов лабораторных, домашних и сельскохозяйственных животных. Установлено, что уровень адгезии бактерии зависит как от видовой принадлежности эритроцитов, так и от условий инкубации микробных и эукариотических клеток. Полученные данные позволяют предположить, что взаимодействие эритроцитов с *Y. pestis* имеет определенное значение в развитии инфекционного процесса, обусловленного возбудителем чумы.

Ключевые слова: адгезия, бактерии, вакцинный штамм *Y. pestis* EV НИИЭГ, эритроциты.

Развитие любого инфекционного процесса начинается с прикрепления возбудителя к клеткам-мишеням макроорганизма, за которым следует его проникновение в органы и ткани с последующим проявлением патогенных свойств. Поэтому исследованию адгезивных свойств микроорганизмов, являющихся возбудителями инфекционных заболеваний, придается большое значение.

В настоящее время выявлены и изучены поверхностные структуры *Y. pestis*, ответственные за процесс прикрепления к клеткам хозяина [1, 10, 11]. Однако определение адгезивных свойств чумных бактерий проводилось с помощью реакции геммагглютинации (РГА) или по методике В.И.Брилис и соавт. [3]. Вместе с тем известно, что в РГА определяется только один вид адгезинов – геммагглютинины [2], а метод В.И.Брилис достаточно субъективен и трудоемок, что значительно снижает информативность получаемых результатов.

Для оценки адгезивной способности бактерий в отношении эритроцитов нами предложен фотоколориметрический метод [7]. Ранее с его помощью был изучен процесс прикрепления клеток *Y. pestis* EV НИИЭГ к эритроцитам человека [8]. В настоящей работе приведены результаты оценки адгезии данного микробного штамма к эритроцитам разных видов животных. Учитывая различную чувствительность животных к инфицированию *Y. pestis* и принимая во внимание трансмиссивный путь передачи возбудителя при чуме, выбранное направление исследований представлялось весьма актуальным.

Материалы и методы

В исследованиях использовали вакцинный штамм *Y. pestis* EV линии НИИЭГ, полученный из ФГУ «48 ЦНИИ Минобороны РФ». Микробную культуру, выращенную на плотной питательной среде на основе гидролизата рыбной муки с добавлением генцианвиолета, суспендировали в 0,9 % растворе хло-

рида натрия. Оптическую плотность (ОП) суспензии доводили до 1,0 усл. ед. при длине волны 540 нм. Для измерения ОП применяли фотоэлектроколориметр КФК-2 и кюветы длиной оптического пути 5 мм.

Пробы венозной крови людей получали из ФГЛУ «Кировская областная станция переливания крови», пробы крови от животных – из питомника ФГУ «48 ЦНИИ Минобороны РФ», ФГУП учхоз Вятской ГСХА «Чистые пруды», ФГУ «Кировская областная станция по борьбе с болезнями животных». В качестве антикоагулянтов при взятии крови применяли 3,8 % раствор лимонно-кислого натрия (1:10) или гепарин (3 ЕД на 1 мл). В день взятия крови эритроциты трижды отмывали десятикратным объемом 0,9 % раствора хлорида натрия путем центрифугирования при 1000 об/мин в течение 5 мин и ресуспендировали в этом же растворе. Конечную концентрацию эритроцитов доводили до $1,0 \cdot 10^{12}/л$.

В пробирках смешивали по 1,0 мл суспензии эритроцитов и по 2,5 мл суспензии бактерий. В качестве контроля использовали пробы, содержащие: 2,5 мл суспензии микробных клеток и 1,0 мл 0,9 % раствора хлорида натрия; 1,0 мл суспензии эритроцитов и 2,5 мл 0,9 % раствора хлорида натрия. Пробы выдерживали в статических и динамических условиях (вращающаяся платформа) при $(20 \pm 1) ^\circ C$ и $(37 \pm 1) ^\circ C$ в течение 5, 10, 20, 30, 40 и 50 мин, после центрифугировали при 1000 об/мин в течение 3,0 мин для осаждения эритроцитов. Затем из проб отбирали надосадочную жидкость в объеме 2,0 мл и на КФК-2 определяли значение ее ОП.

Адгезивную способность бактерий оценивали по введенному нами показателю адгезии (ПА), который рассчитывали по формуле:

$$ПА = \frac{D_{к1} + D_{к2} - D_{cn}}{D_{к1}} \times 100 \%,$$

где ПА – показатель адгезии, $D_{к1}$ – ОП надосадочной жидкости в контрольной пробе 1, $D_{к2}$ – ОП

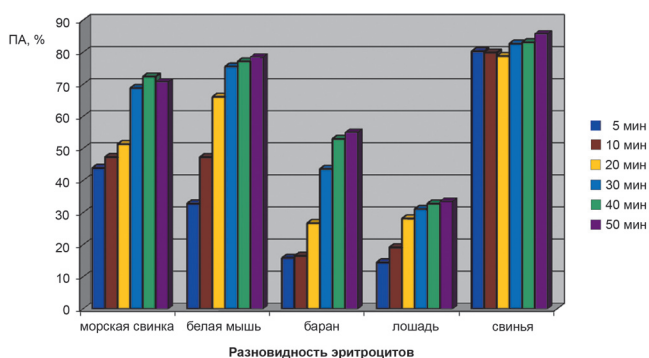


Рис. 1. Динамика изменения ПА *Y. pestis* EV НИИЭГ к эритроцитам животных при различной продолжительности инкубации проб

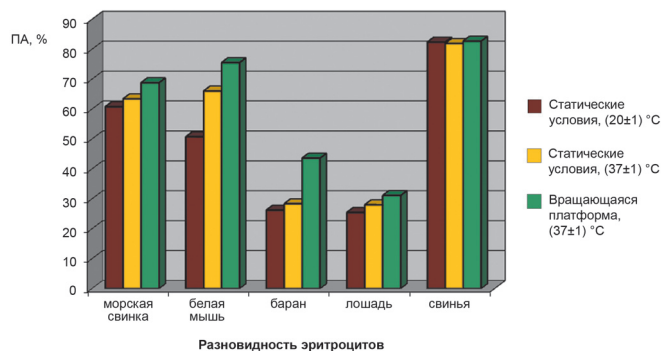


Рис. 2. Динамика изменения ПА *Y. pestis* EV НИИЭГ к эритроцитам животных при различных условиях инкубации проб

надосадочной жидкости в контрольной пробе 2, D_{on} – ОП надосадочной жидкости в опытной пробе.

В каждой серии опытов выполняли по три независимых определения; статистическую обработку полученных данных проводили с помощью компьютерной программы для обработки медицинской информации «Biostat 4.03».

Результаты и обсуждение

Известно, что при изучении адгезивных свойств бактерий важным является определение оптимальных условий их взаимодействия с клетками-мишенями [2, 3, 5]. Поэтому на первом этапе исследований изучено влияние продолжительности инкубации проб на уровень адгезии клеток *Y. pestis* EV НИИЭГ к эритроцитам различных видов животных. Для этого эритроциты морской свинки, белой мыши, барана, лошади и свиньи инкубировали на вращающейся платформе при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течение различного времени, после чего определяли значения ПА (рис. 1).

Как видно из рис. 1, степень адгезии бактерий зависела как от видовой принадлежности эритроцитов, так и от продолжительности совместной инкубации микробных клеток с эритроцитами. В проведенном эксперименте высокие значения ПА отмечались в отношении эритроцитов домашней свиньи, белой мыши, морской свинки. В меньшей степени адгезия бактерий проявлялась к эритроцитам барана, и незначительно – к эритроцитам лошади. ПА *Y. pestis* EV НИИЭГ к эритроцитам свиньи достигал максимального значения уже после 5 мин инкубации. Увеличение продолжительности инкубации микроорганизмов с эритроцитами других животных до 30 мин приводило к существенному повышению уровня адгезии. При дальнейшем увеличении срока инкубации роста ПА не регистрировали. Поэтому в последующих исследованиях учет результатов адгезии предложили проводить после 30-минутной инкубации проб.

Далее изучили влияние условий совместной инкубации бактерий с эритроцитами на ПА (рис. 2). При этом пробы выдерживали в статических и ди-

намических условиях при различных температурных режимах.

Адгезия клеток *Y. pestis* EV НИИЭГ к эритроцитам домашней свиньи не зависела от температуры и условий инкубации. В то же время, прикрепление бактерий к эритроцитам других видов животных (морской свинки, белой мыши, барана и лошади) наиболее интенсивно происходило при $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ на вращающейся платформе. Следовательно, данные условия инкубации являются наиболее подходящими для оценки адгезии клеток *Y. pestis* EV НИИЭГ к эритроцитам животных.

Выбрав оптимальные режимы инкубации (выдерживание проб в динамических условиях при $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течение 30 мин), определили значения ПА в отношении эритроцитов, более широкой видовой принадлежности. Результаты этих исследований приведены в таблице.

Анализируя данные таблицы, эритроциты различной видовой принадлежности можно разделить на 3 группы в зависимости от степени адгезии к ним клеток *Y. pestis* EV НИИЭГ. К первой группе относятся эритроциты белых крыс, домашних свиней, белых мышей, морских свинок, а также людей, для которых ПА составляет свыше 60 %. Вторая группа эритроцитов (золотистые хомячки, собаки, козы, овцы и коровы) имеет ПА в пределах 40–60 %, третья (лошади, кошки) – ниже 30 %. При сопоставлении результатов определения ПА *Y. pestis* EV НИИЭГ к эритроцитам людей и различных видов животных, с данными литературы по их восприимчивости и чувствительности к инфицированию *Y. pestis* выявляется следующая закономерность: чем выше ПА, тем восприимчивее и чувствительнее к заражению возбудителем чумы является вид. Так, у людей и животных, обладающих высокой восприимчивостью и чувствительностью к инфицированию *Y. pestis*, ПА превышает 60 %, а животные с высокой восприимчивостью, но низкой и средней чувствительностью ПА находится на уровне 40–60 %. В то же время, у животных, имеющих ПА ниже 30 % отмечается низкая восприимчивость или чувствительность к инфицированию возбудителем чумы. Исключение составляют собаки, которые за-

Уровень адгезии бактерий *Y. pestis* EV НИИЭГ к эритроцитам людей и животных и данные литературы по восприимчивости и чувствительности к инфицированию возбудителем чумы

| Группа | Вид млекопитающих | Количество обследованных | ПА, % | Восприимчивость / чувствительность к инфицированию [4, 6, 9, 12] |
|--------|--------------------|--------------------------|---------------------------|--|
| 1 | Белые крысы | 8 | 83,97±5,01 | Высокая / Высокая |
| | Домашние свиньи | 6 | 76,94±4,01 | Средняя / Средняя |
| | Люди | 12 | 76,37±7,15 | Высокая / Высокая |
| | Белые мыши | 12 | 70,70±3,61 | Высокая / Высокая |
| | Морские свинки | 12 | 61,12±2,82 | Высокая / Высокая |
| 2 | Собаки | 6 | 57,08±3,88 | Высокая / Низкая |
| | Золотистые хомячки | 10 | 47,09±4,36 ¹ | Высокая / Низкая |
| | Козы | 8 | 51,28±7,36 ¹ | Высокая / Средняя |
| | Коровы | 8 | 45,31±3,12 ¹ | Высокая / Средняя |
| | Овцы | 5 | 43,38±3,74 ¹ | Высокая / Средняя |
| 3 | Лошади | 6 | 30,59±1,88 ^{1,2} | Низкая / Низкая |
| | Кошки | 6 | 22,11±5,53 ^{1,2} | Высокая / Низкая |

Примечание: ¹ – различия с группой 1; ^{1,2} – различия с группами 1 и 2 достоверны (p<0,05) по критерию Стьюдента.

нимают промежуточное положение между первой и второй группой, так как у них ПА ниже 60 %, но они, являясь восприимчивыми к заражению, обладают низкой чувствительностью.

Таким образом, проведенные исследования показали, что клетки *Y. pestis* EV НИИЭГ обладают способностью прикрепляться к эритроцитам людей и животных. При этом установлено, что уровень адгезии бактерий зависит от видовой принадлежности эритроцитов и от условий их взаимодействия. Выявлено, что эритроциты ряда животных проявляют свою способность фиксировать бактерии в определенных условиях, что может быть обусловлено как морфологическими, так и функциональными различиями рецепторного аппарата эритроцитов различных видов млекопитающих. Экспериментальным путем выбраны оптимальные условия, позволяющие выявлять потенциальную способность эритроцитов фиксировать на своей поверхности бактерии исследуемого штамма.

Сравнение полученных результатов с данными литературы по восприимчивости и чувствительности к заражению возбудителем чумы человека и разных видов животных позволяет сделать предположение о том, что эритроциты играют определенную роль в восприимчивости к инфицированию *Y. pestis* и реализации инфекционного процесса при чуме.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бахтеева И.В. Исследование функциональной активности рН 6 антигена *Yersinia pestis* с помощью наборов изогенных мутантов [автореф. дис. ... канд. мед. наук]. М.: 2008. 24 с.
2. Бондаренко В.М., Баркус М.М., Брилис В.И., Ленцнер А.А. Гемагглютинирующая и адгезивная способность штаммов клебсиелл и энтеробактерий Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 1987; 7:3–6.
3. Брилис В.И., Брилене Т.А., Ленцнер Х.П., Ленцнер А.А. Методика изучения адгезивного процесса микроорганизмов Лаб. дело. 1986; 4:210–2.
4. Домарадский И.В. Чума. М.: Медицина; 1998. 176 с.
5. Езепчук Ю.В. Патогенность как функция биомолекул. М.: Медицина; 1985. 240 с.
6. Логвиненко О.В., Тимченко Л.Д., Шапошникова Л.И. Динамика цитоэнзимхимических и патоморфологических изме-

нений у золотистых хомячков при использовании больших доз возбудителя чумы. В кн.: Акт. вопр. эпидемиологии инф. болезней. М.: ЗАО «МП Гигиена», 2006; 8:704–8.

7. Оборин В.А., Бондаренко А.Л., Романов В.Е., Ивонин А.Г., Нехорошикина Е.Л. Фотометрический метод определения бактериофиксирующей активности эритроцитов в отношении возбудителей бактериальных инфекций. В кн.: Научно-практическая конференция и школа по инфекционной патологии (с международным участием). М.: 2007. С. 76.

8. Оборин В.А., Ивонин А.Г., Пименов Е.В., Романов В.Е., Абашева Ф.И., Вылегжанина О.В. Изучение адгезии клеток вакцинного штамма *EV Yersinia pestis* к эритроцитам человека фотокolorиметрическим методом. Вестник НГУ. Серия: Биология, клиническая медицина. 2009; 7(3):25–9.

9. Туманский В.М. Микробиология чумы (микробиологические основы диагностики чумы. М.: Медгиз; 1958. 268 с.

10. Ценева Г.Я., Солодовникова Н.Ю., Воскресенская Е.А. Молекулярные аспекты вирулентности иерсиний. Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2002; 4(3): 248–66.

11. Straley S.C., Skrzypek E., Piano G.V., Bliska V.J. Yop of *Yersinia* spp. pathogenic for humans. Infect. Immun. 1993; 61(3):3105–10.

12. Watson R.P., Blanchard T.W., Mense M.G., Gasper P.W. Histopathology of experimental plague in cats. Vet. Pathol. 2001; 38(2):165–72.

V.A.Oborin, E.V.Pimenov, A.G.Ivonin

Analysis of Adhesion of *Yersinia pestis* Vaccine Strain EV to Erythrocytes of the Animals Using Photocolorimetric Method

Vyatka State University, Kirov

The adhesive properties of *Y. pestis* vaccine strain EV as regards the erythrocytes of laboratory, domestic and agricultural animals were studied using photocolorimetric method. The level of bacteria adhesion was shown to depend upon erythrocytes species as well as upon incubation conditions of bacterial and eukaryotic cells. The received data suggested interaction of erythrocytes and *Y. pestis* to be significant in the development of infectious process caused by plague agent.

Key words: adhesion, bacteria, *Y. pestis* vaccine strain EV, erythrocytes.

Об авторах:

Оборин В.А., Пименов Е.В., Ивонин А.Г. Вятский государственный университет. 610000, Киров, ул. Московская, 36. E-mail: vaoborin50@mail.ru

Authors:

Oborin V.A., Pimenov E.V., Ivonin A.G. Vyatka State University. 610000, Kirov, Moskovskaya St., 36. E-mail: vaoborin50@mail.ru

Поступила 02.10.09.