

В.А.Оборин, Е.В.Пименов, А.Г.Ивонин

ВЛИЯНИЕ УСЛОВИЙ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ШТАММА *YERSINIA PESTIS* EV НИИЭГ НА ЕГО АДГЕЗИВНЫЕ СВОЙСТВА

ГОУ ВПО «Вятский государственный университет», Киров

При помощи фотокolorиметрического метода определены адгезивные свойства клеток вакцинного штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ, выращенных в различных условиях. Выявлено, что температура культивирования и состав питательных сред оказывают существенное влияние на формирование поверхностных структур бактерий, отвечающих за их прикрепление к эритроцитам человека. Установлено, что наиболее высокий уровень адгезии проявляют микробные клетки, выращенные при $(28 \pm 1)^\circ\text{C}$ на ГРМ-агаре и агаре Хоттингера. Показано, что лиофилизация бактерий *Y. pestis* EV НИИЭГ, а также отмывание от экстрацеллюлярных метаболитов не влияет на их адгезивную способность. Полученные результаты позволяют рекомендовать фотокolorиметрический метод для изучения адгезивной активности микробных культур, составляющих основу живых вакцин.

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

Адгезия – общебиологическое свойство всех живых клеток, в том числе и микроорганизмов. Для патогенных бактерий адгезия является одним из основных факторов патогенности [9, 10]. Микробные клетки вакцинных штаммов также должны прикрепляться к слизистым оболочкам и покровным тканям, проникать и размножаться в организме хозяина, вызывая иммунный ответ. Поэтому изучение адгезивных свойств бактерий живых вакцин является важным направлением исследований современной микробиологии.

Известно, что лиганд-рецепторное взаимодействие микробных и эукариотических клеток зависит от морфофункционального состояния их поверхностных структур [4, 11]. У чумного микроба выявлены и изучены образования, ответственные за процесс прикрепления к клеткам хозяина [1, 14, 15]. Ранее нами было показано, что микробные клетки вакцинного штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ обладают выраженной адгезивной способностью в отношении эритроцитов человека [6].

В настоящем сообщении представлены данные об адгезивной активности микробных культур *Y. pestis* EV НИИЭГ, полученных в разные сроки культивирования, на различных питательных средах и температурных режимах выращивания.

Материалы и методы

В работе использовали микробную культуру штамма *Y. pestis* EV линии НИИЭГ, выделенную из коммерческой чумной живой сухой вакцины. Для выращивания микробной культуры применяли различные питательные среды на основе гидролизата рыбной муки (ГРМ-агар), рН 7,2, мясо-пептонный агар (МПА) и агар Хоттингера (АХ), рН 7,2, приготовленные в лабораторных условиях. В качестве дополнительных ингредиентов в питательные среды вносили сульфит натрия ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) и генцианвиолет (ГВ). Бактерии выращивали при различных темпе-

ратурных режимах (20 ± 1) , (28 ± 1) и $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течение 24, 48 и 72 ч, после чего микробные клетки суспендировали в 0,9 % растворе хлорида натрия. Исследования проводили с суспензией микробной культуры, соответствующей 1,0 единице оптической плотности (ОП) при длине волны проходящего света 540 нм.

Для получения суспензии эритроцитов использовали венозную кровь донора 0(I) Rh+ группы крови. В качестве антикоагулянта применяли 3,8 % раствор лимонно-кислого натрия (1:10). Не позднее 24 ч после 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 $1,0 \cdot 10^{12}/\text{л}$.

Адгезивную активность микробных культур определяли с помощью разработанного авторами фотокolorиметрического метода [8]. 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 бактерий и 1,0 мл 0,9 % раствора хлорида натрия; 1,0 мл суспензии эритроцитов и 2,5 мл 0,9 % раствора хлорида натрия. Пробы инкубировали на вращающейся платформе при $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течение 30 мин, после чего центрифугировали при 1000 об/мин в течение 1,5 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 показателю адгезии (ПА) который рассчитывали по формуле:

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

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

жидкости в контрольной пробе 2, $D_{оп}$ – оптическая плотность надосадочной жидкости в опытной пробе.

В каждой серии опытов выполняли по пять независимых определений; статистическую обработку полученных данных проводили с помощью компьютерной программы, применяемой при анализе медицинской информации «Biostat 4.03».

Результаты и обсуждение

По литературным данным, адгезивные свойства микробных клеток зависят от многих факторов и в первую очередь от условий их культивирования [4, 9].

Поэтому первоначально были изучены адгезивные свойства микробных клеток вакцинного штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ, выращенных на плотных питательных средах различного состава. Для этого определяли показатель адгезии микробных культур, культивируемых в течение 48 ч при температуре $(28 \pm 1)^\circ\text{C}$ на основе гидролизата рыбной муки (рН 7,2) и агара Хоттингера, которые применяются для выращивания *Y. pestis*, а также мясо-пептонного агара, используемого при культивировании других микроорганизмов. В качестве дополнительных ингредиентов в питательные среды вносили сульфит натрия и генцианвиолет, которые применяют для стимуляции роста чумного микроба и ингибирования посторонней микрофлоры при выращивании *Y. pestis* [1, 5, 14]. Показатель адгезии определяли с помощью фотоколориметрического метода по отношению эритроцитов человека. В предыдущих исследованиях было выявлено, что уровень адгезии бактерий *Y. pestis* EV НИИЭГ зависит от видовой принадлежности эритроцитов и показано, что эритроциты людей обладают способностью фиксировать на своей поверхности микробные клетки вакцинного штамма чумного микроба [7]. Кроме того, живая чумная вакцина используется для иммунизации людей. Следовательно, особый интерес представляют данные об адгезивных свойствах бактерий вакцинного штамма чумного микроба к эритроцитам человека.

Проведенные исследования показали, что уровень адгезии бактерий, выращенных на ГРМ-агаре и АХ, был достоверно выше уровня адгезии бактерий, выращенных на МПА. Очевидно, что МПА являлся менее благоприятной средой для формирования микробными клетками факторов адгезии. При этом добавление в состав МПА дополнительных ингредиентов – Na_2SO_3 и ГВ не влияло на показатели адгезии, в то время как их включение в состав ГРМ-агара и АХ приводило к статистически значимому повышению адгезивности микробных культур. Вероятно, входя в состав питательных сред, благоприятных для синтеза адгезинов бактерий, эти компоненты способствовали еще большей их экспрессии.

Далее исследовали влияние температуры и продолжительности выращивания бактерий на уровень

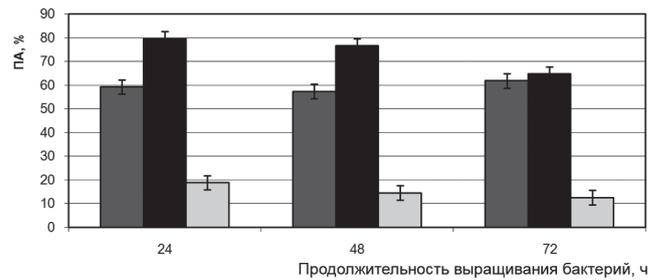


Рис. 1. Показатели адгезии штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ в зависимости от температуры и продолжительности выращивания микробных клеток:

■ – $(20 \pm 1)^\circ\text{C}$, ■ – $(28 \pm 1)^\circ\text{C}$, ■ – $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$

адгезии (рис. 1). Наиболее высокие значения ПА регистрировали в случае выращивания микробных клеток при температуре $(28 \pm 1)^\circ\text{C}$. При этом у 24- и 48-часовых культур величина ПА составляла 76–80 %, а у 72-часовых достоверно ($P < 0,05$) снижалась до уровня 64 %. Значения ПА микробных клеток, культивируемых при $(20 \pm 1)^\circ\text{C}$ находились в пределах 57–62 %, при $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ – 12–19 %.

Из литературы известно [5], что при температуре культивирования $(28 \pm 1)^\circ\text{C}$ у клеток *Y. pestis* EV НИИЭГ выявляется два дополнительных белка, которые не образуются при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$. Можно предположить, что именно эти белки играют определенную роль в прикреплении бактерий к эритроцитам человека. Согласно данным [12], адгезин чумного микроба (белок рН6 антиген) экспрессируется только в диапазоне температур 35–41 °C и кислых условиях среды. Однако полученные нами результаты исследований показали, что высокие адгезивные свойства проявляют микробные клетки *Y. pestis* EV НИИЭГ, выращенные при относительно низкой температуре и нейтральном рН. Это свидетельствует о наличии у чумного микроба, вероятно, и других адгезинов.

В последние годы появились сообщения о наличии у бактерий надоболочечных белковых структур [2, 3, 13]. S-слой выявлен и изучен у чумного микроба, имеются данные о его участии в прикреплении клеток *Y. pestis* к различным поверхностям [3]. Поэтому на следующем этапе исследований было изучено влияния экстрацеллюлярных метаболитов на способность бактерий прикрепляться к эритроцитам человека. Для этой цели определяли степень адгезии микробных клеток, дважды отмытых 0,9 % раствором хлорида натрия путем центрифугирования при 4000 об/мин в течение 10 мин, и клеток, смытых с питательных сред без последующего отмыывания (рис. 2).

Из данных, представленных на рис. 2, видно, что удаление надоболочечных структур бактерий не приводило к статистически значимым изменениям ПА. Следовательно, экстрацеллюлярные субстанции не оказывают влияния на адгезию бактерий *Y. pestis* EV НИИЭГ к эритроцитам человека.

На заключительном этапе работы были проведены исследования по изучению влияния процесса ли-

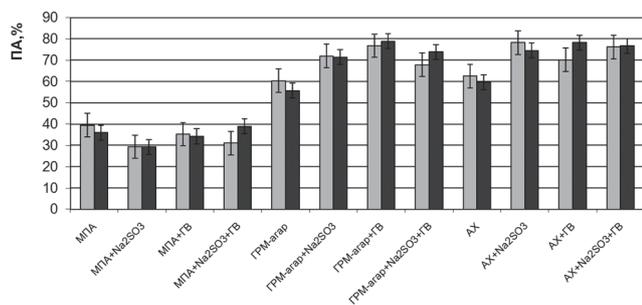


Рис. 2. Влияние отмывания клеток *Y. pestis* EV НИИЭГ от внеклеточных метаболитов на их адгезивную способность в отношении эритроцитов человека:

■ – отмывтые микробные клетки, ■ – микробные клетки без отмывания

офилизации на адгезивные свойства штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ. Для этого определяли ПА микробной культуры, выращенной на ГРМ-агаре с ГВ и суспензированной в 0,9 % растворе натрия хлорида, и культуры, полученной в результате разведения чумной живой сухой вакцины 0,9 % раствором натрия хлорида. В одном варианте эксперимента клетки, приготовленные из лиофилизированного состояния, дважды отмывали от стабилизаторов путем центрифугирования при 4000 об/мин в течение 10 мин, а в другом – применяли без отмывания. Установили, что значения ПА микробных клеток, выращенных на питательной среде и полученных из лиофильно-высушенного состояния, статистически значимо друг от друга не отличались (рис. 3). Полученные данные свидетельствовали о сохранении адгезивной способности клеток штамма при их лиофилизации в процессе производства вакцины.

Таким образом, установили, что на адгезивные свойства бактерий *Y. pestis* EV НИИЭГ в отношении эритроцитов человека оказывают влияние состав среды, температура культивирования и, в незначительной степени, продолжительность выращивания. Лиофилизация микробных клеток не сказывается на их способности взаимодействовать с эритроцитами. Следовательно, условия, применяемые для получения клеток штамма при производстве живой сухой чумной вакцины (выращивание при $(28 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течение 48 ч на АХ, лиофилизация) [12], являются благоприятными для сохранения и проявления у чумного микроба адгезивной активности.

Установлено, что экстрацеллюлярные метаболиты не влияют на адгезивность штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ. Очевидно, что в процессе взаимодействия бактерий с эритроцитами человека участвуют поверхностные структуры их клеточной стенки.

Проведенные исследования показали высокую чувствительность и информативность фотокolorиметрического метода оценки адгезии и возможность его использования для изучения адгезивных свойств бактерий, входящих в состав живых вакцин, а так-

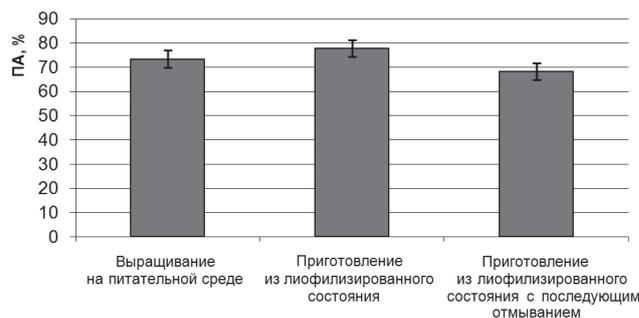


Рис. 3. Показатели адгезии клеток *Y. pestis* EV НИИЭГ, выращенных на питательной среде, а также полученных из лиофилизированного состояния

же для выбора оптимальных условий приготовления препаратов для иммунизации людей и животных.

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. Гончарова А.Ю. Выделение, биохимическая и иммунобиологическая характеристика белков S-слоя сибиреязвенного микроба [автореф. дис. ... канд. мед. наук]. М.; 2007. 22 с.
3. Дятлов И.А. Получение S-слоя чумного микроба и возможности его применения. Биотехнология. 2004; 1:20–5.
4. Езепчук Ю.В. Патогенность как функция биомолекул. М.: Медицина; 1985. 240 с.
5. Зюзина В.П., Демидова Г.В., Соколова Е.П., Беспалова И.А., Бородина Т.Н., Алексеева Л.П. и др. Сравнение спектра белков, присутствующих в препаратах липополисахаридов *Yersinia pestis*, выращенных при 28 и 37 °С. Биотехнология. 2003; 3:20–4.
6. Оборин В.А., Ивонин А.Г., Пименов Е.В., Романов В.Е., Абаишева Ф.И., Вылегжанина О.В. Изучение адгезии клеток вакцинного штамма EV *Yersinia pestis* к эритроцитам человека фотокolorиметрическим методом. Вестник НГУ. Сер.: Биология, клин. мед. 2009; 7(3):25–9.
7. Оборин В.А., Пименов Е.В., Ивонин А.Г. Изучение адгезии бактерий вакцинного штамма *Yersinia pestis* EV НИИЭГ к эритроцитам животных фотокolorиметрическим методом. Probl. osobo opasnykh inf. 2010; 1:48–50.
8. Патент 2360969 Российская Федерация, МПК C12Q1/02, G01N33/483. Способ определения бактериофиксирующей активности эритроцитов. В.Е.Романов, А.Г.Ивонин, А.Л. Бондаренко, В.А.Оборин, Е.Л.Нехорошкина; заявитель и патентообладатель ФГБОУ ВПО Вятская ГСХА. № 2007141246/13; заявл. 06.11.2007; опубл. 10.07.2009. Бюл. № 11.
9. Поспелова С.В., Карпунина Т.И., Зубарева Н.А. Изучение адгезивных свойств микроорганизмов, выделенных от больных с патологией гепатобилиарной системы. Пермский мед. журн. 1998; XV(3):22–5.
10. Телесманич Н.Р., Ломов Ю.М., Бардых И.Х., Винокур Н.И. Адгезивные и некоторые другие свойства VIBRIO CHOLERAЕ TCP⁺ СТХ⁻; изолированных на объектах внешней среды Ростовской области в 2002 году. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 2004; 6:3–6.
11. Усвятцов Б.Я., Ханина Е.А., Бухарин О.В. Взаимодействие бактерий и эритроцитов. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 2005; 4:89–95.
12. Федорова В.А., Голова А.Б., Елисеев Ю.Ю. Влияние условий культивирования бактерий *Yersinia pestis* на индукцию специфического иммунитета при моделировании экспериментальной чумы у мышей. Иммунология. 2007; 6:371–4.
13. Bichowsky-Slommnicki L., Ben-Efraim S. Biological activities in the extracts of *Pasteurella pestis* and their relationship to the "pH 6 antigen". J. Bacteriol. 1963; 86:101–11.
14. Huang X.-Z., Lindler L.E. The pH 6 antigen is an antiphagocytic factor produced by *Yersinia pestis* independent of *Yersinia* outer proteins and capsule antigen. Infect. Immun. 2004; 72:7212–9.
15. Liu F., Chen F., Galván E.M., Lasaro M.A., Schifferli D.M. Effects of Psa and F1 on the Adhesive and Invasive Interactions of *Yersinia pestis* with Human Respiratory Tract Epithelial Cells. Infect. Immun. 2006; 74:5636–44.

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

The Influence of Growth Conditions of *Yersinia pestis* EV NIEG Strain on Its Adhesion Properties

Vyatka State University, Kirov

Adhesion properties of vaccine *Y. pestis* EV NIEG strain cells, cultivated in different conditions, were identified by photocolometric method. It was elucidated that the temperature of cultivation and the composition of nutrient media influence essentially the formation of surface structures of bacteria responsible for attachment to human red blood cells. The highest level of adhesion was demonstrated by the microbial cells cultivated at (28±1) °C on GRM-agar and Hottinger agar. Liophilisation of *Y. pestis* EV NIEG cell as well as washing off extracellular metabolites did not affect the adhesion property of bacteria. The results received enabled to recommend the photo-

colorimetric method for study of adhesion activity of microbial cultures which were the basis of live vaccines.

Key words: adhesion, bacteria, vaccine strain *Y. pestis* 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 12.01.10.