

Е.В.Пименов¹, В.А.Оборин², А.Г.Ивонин¹

ОЦЕНКА АДГЕЗИВНЫХ СВОЙСТВ СПОР ВАКЦИННЫХ ШТАММОВ *BACILLUS ANTHRACIS* НА ЭРИТРОЦИТАХ МЛЕКОПИТАЮЩИХ С ПОМОЩЬЮ ФОТОКОЛОРИМЕТРИИ

¹Лаборатория сравнительной кардиологии Коми НЦ УрО РАН, Сыктывкар;

²ФГБОУ ВПО «Вятский государственный университет», Киров

В статье приведены результаты изучения адгезии спор вакцинных штаммов сибирезвального микроба к эритроцитам человека и животных с помощью фотоколориметрического метода. Установлены различия в адгезивной способности спор *B. anthracis* штаммов № 55 ВНИИВВиМ, СТИ-1 и II вакцины Ценковского. Выявлено, что уровень адгезии спор *B. anthracis* № 55 ВНИИВВиМ к эритроцитам млекопитающих зависит от чувствительности вида к инфицированию возбудителем сибирской язвы.

Ключевые слова: сибирская язва, споры, вакцинные штаммы, адгезия, эритроциты.

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

Evaluation of the Adhesive Properties of Spores of *Bacillus anthracis* Vaccine Strains to the Mammalian Erythrocytes Using Photocolorimetry Technique

Laboratory of comparative cardiology of Komi Scientific Center of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Syktyvkar; Vaytka State University, Kirov

Displayed are the results of studies concerning adhesion of spores of *Bacillus anthracis* vaccine strains to the erythrocytes of humans and other mammals using photocolorimetry technique. Determined are the differences in adhesive capacity of spores of *B. anthracis* vaccine strains № 55 VNIIVVM, STI-I and II Tsenkovsky. Discovered is the fact that the level of adhesive activity of *B. anthracis* № 55 VNIIVVM spores to the mammalian erythrocytes depends upon the sensitivity of the species to the anthrax agent.

Key words: *Bacillus anthracis*, spores, vaccine strains, adhesion, erythrocytes.

Адгезия представляет собой сложный многокомпонентный процесс, обеспечивающий колонизацию микроорганизмами любых плотных субстратов, включая ткани человека и животных [4, 11, 14]. Изучению адгезивной активности микроорганизмов бактериальной природы в последние годы уделяется пристальное внимание, однако об адгезивных свойствах споровых форм бактерий, в том числе возбудителя сибирской язвы, имеются лишь единичные сообщения [7]. Следовательно, изучение адгезивности спор *B. anthracis* является актуальной задачей.

На сегодняшний день для исследования адгезии бактерий на клетках организма хозяина предложены методы *in vitro* и *in vivo* [4]. Однако методы *in vivo* с использованием лабораторных животных являются достаточно трудоемкими, дорогостоящими и непригодными для изучения большого количества штаммов, кроме того, исключают возможность работы с клетками человеческого происхождения [12]. В связи с этим при определении адгезивности бактерий наиболее часто применяются методы *in vitro* с использованием в качестве клеток-мишеней эритроцитов [1, 5]. Считается, что гликофорин мембраны эритроцитов идентичен гликокаликсу эпителиальных клеток, на котором расположены рецепторы для адгезинов микроорганизмов. Данное сходство и простота получения эритроцитов в необходимых количествах делает их универсальной моделью для изучения адгезивных свойств бактерий [12].

Для регистрации адгезии микроорганизмов к

эритроцитам применяется световая микроскопия [8], реакция гемагглютинации (РГА) [13], реже – электронная микроскопия [1]. Однако все эти методы не лишены определенных недостатков: для одних такими являются субъективность и недостаточная информативность, для других – трудоемкость и технические сложности.

Авторами статьи разработан метод изучения адгезии бактерий на эритроцитах *in vitro* при помощи фотоколориметрии, характеризующийся простотой исполнения, высокой чувствительностью и информативностью [10]. В данной статье приводятся результаты оценки адгезивной активности спор вакцинных штаммов сибирезвального микроба фотоколориметрическим методом.

Материалы и методы

В исследованиях использовали штамм *B. anthracis* № 55 ВНИИВВиМ, предоставленный ООО «Агровет» (Москва), а также штаммы *B. anthracis* СТИ-1 и II вакцины Ценковского, полученные в ФГУ «48 ЦНИИ Минобороны РФ» (Киров). Эксперименты проводили с суспензиями бактериальных спор, соответствующими 1,0 ед. оптической плотности (ОП) при длине волны проходящего света 540 нм.

Субстратом адгезии служили эритроциты человека 0 (I) Rh+ группы крови, а также лабораторных и сельскохозяйственных животных (белой крысы, морской свинки, кролика, коровы, свиньи). В каче-

стве антикоагулянтов при взятии крови применяли 3,8 % раствор лимонно-кислого натрия (1:10) или гепарин (3 ЕД/1,0 мл). 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. Конечная концентрация эритроцитов в суспензии составляла $1,0 \cdot 10^{12}/л$.

При проведении эксперимента в пробирках смешивали по 1,0 мл суспензии эритроцитов и по 2,5 мл суспензии спор. В качестве контроля использовали пробы, содержащие: 2,5 мл суспензии спор 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 $(37 \pm 1)^\circ C$ в течение 30 мин, после чего эритроциты осаждали путем центрифугирования при 1000 об./мин в течение 1,5 мин. Затем из проб отбирали надосадочную жидкость в объеме 2,0 мл и на фотоэлектроколориметре КФК-2 определяли величину ее ОП.

Фиксирующую активность эритроцитов в отношении спор вакцинных штаммов сибирезвеного микроба оценивали по формуле:

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

где ПА – показатель адгезии, $D_{к1}$ – ОП надосадочной жидкости в 1-й контрольной пробе, $D_{к2}$ – ОП надосадочной жидкости во 2-й контрольной пробе, $D_{оп}$ – ОП надосадочной жидкости в опытной пробе.

В каждой серии опытов выполняли по пять независимых определений, статистическую обработку полученных данных проводили с помощью компьютерной программы для обработки медицинской информации «Biostat версии 4.03».

Результаты и обсуждение

В настоящее время для специфической профилактики сибирской язвы в нашей стране разработаны живые вакцины на основе спорных форм штаммов *B. anthracis* № 55 ВНИИВВиМ, СТИ-1 и II вакцины Ценковского [6, 9]. Вакцина из штамма № 55 ВНИИВВиМ применяется в ветеринарии, а из СТИ-1 используется для специфической профилактики сибирской язвы у людей. Штамм II вакцины Ценковского не нашел практического применения в профилактике заболевания ввиду достаточно высокой остаточной вирулентности.

Известно, что эффективность живых вакцин, используемых для профилактики бактериальных инфекций, во многом зависит от способности микробных клеток приживаться и размножаться в организме хозяина [3]. В свою очередь, приживание бактерий обусловлено их способностью к адгезии на клетках-мишенях макроорганизма [4]. Исходя из этого, на первом этапе исследований оценивали связывание спор вакцинных штаммов сибирезвеного микроба с эритроцитами человека (табл. 1).

Таблица 1

Уровень адгезии спор вакцинных штаммов *B. anthracis* на эритроцитах человека 0 (I) Rh+ группы крови ($M \pm m$, $n=5$)

Штаммы <i>B. anthracis</i>	ПА, %
№ 55 ВНИИВВиМ	46,31±2,77
СТИ-1	43,29±3,52
II вакцина Ценковского	57,63±3,14*

*Различия с другими штаммами *B. anthracis* достоверны ($P < 0,05$) по критерию Стьюдента.

Анализ данных табл. 1 свидетельствует о том, что споры вакцинных штаммов сибирезвеного микроба проявляли выраженную адгезивную активность в отношении эритроцитов человека. При этом ПА для штамма *B. anthracis* II вакцины Ценковского был достоверно выше ($P < 0,05$), чем для штаммов *B. anthracis* СТИ-1 и *B. anthracis* № 55 ВНИИВВиМ, что свидетельствовало о вариабельности адгезивных свойств у вакцинных штаммов сибирезвеного микроба.

В следующей серии экспериментов нами была проведена сравнительная оценка адгезивной активности спор *B. anthracis* № 55 ВНИИВВиМ в отношении эритроцитов различных видов млекопитающих (табл. 2).

Как показали результаты эксперимента, степень прикрепления спор *B. anthracis* № 55 ВНИИВВиМ к эритроцитам зависела от видовой принадлежности последних. Споры данного штамма проявляли достаточно высокий уровень адгезии на эритроцитах человека, кролика, морской свинки и коровы (ПА в пределах 39–47 %) и очень низкий – на эритроцитах белой крысы и свиньи (ПА около 4 %). Виды млекопитающих, эритроциты которых подвергались исследованию, были условно разделены нами на две группы (табл. 2). Для видов, относящихся ко 2-й группе, значения ПА были достоверно ниже ($P < 0,05$), чем для 1-й группы.

При сопоставлении результатов эксперимента с данными литературы по эпидемиологии сибирской язвы [2, 9] была установлена следующая закономерность: споры *B. anthracis* № 55 ВНИИВВиМ обладали выраженными адгезивными свойствами в отношении

Таблица 2

Уровень адгезии спор *B. anthracis* № 55 ВНИИВВиМ к эритроцитам ряда млекопитающих по чувствительности к инфицированию возбудителем сибирской язвы

Группа	Вид млекопитающих	Количество обследованных	ПА, % ($M \pm m$)	Чувствительность к инфицированию [2, 9]
1-я	Человек	5	46,69±2,77	Высокая
	Кролик	5	46,24±3,18	Высокая
	Морская свинка	6	41,21±2,16	Высокая
	Корова	5	39,18±2,24	Высокая
2-я	Белая крыса	6	4,52±1,08*	Низкая
	Свинья	5	4,23±0,31*	Низкая

*Различия с 1-й группой достоверны ($P < 0,05$) по критерию Стьюдента.

нии эритроцитов млекопитающих, чувствительных к инфицированию возбудителем (человек, корова, морская свинка, кролик), и очень незначительной адгезивной активностью в отношении эритроцитов животных, резистентных к инфицированию сибиреязвенным микробом (белая крыса, свинья). Это позволило предположить, что в чувствительности млекопитающих к инфицированию возбудителем сибирской язвы определенную роль играет способность эритроцитов связывать на своей поверхности бактериальные споры.

Таким образом, проведенные нами исследования показали, что споры штаммов *B. anthracis* № 55 ВНИИВВиМ, СТИ-1 и II вакцины Ценковского обладают способностью к адгезии на эритроцитах человека. Установлено, что степень проявления спорами сибиреязвенных бацилл адгезивной активности зависит как от штаммовых особенностей микроба, так и от видовой принадлежности эритроцитов. Сопоставление результатов оценки адгезии с данными литературы по чувствительности человека и животных к заражению возбудителем сибирской язвы позволило выдвинуть предположение о том, что способность эритроцитов фиксировать на своей поверхности споры *B. anthracis*, возможно, играет определенную роль в чувствительности того или иного вида млекопитающих к инфицированию данным микробом.

Работа выполнена в рамках программы Президиума РАН «Фундаментальные науки – медицине» на 2011 год. Авторы выражают благодарность Президиуму РАН за возможность проведения данных исследований.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Анянзева Н.В., Ганина В.И., Ленченко Е.М., Ванина Н.Н. Оценка методов исследования взаимодействия бактерий с клетками животных. Докл. Российской акад. сельскохоз. наук. 2007; 3:53–5.
2. Бургазов П.Н., редактор. Патоморфогенез сибирской язвы. М.: Медицина; 2002. 240 с.
3. Гинзбург Н.Н., редактор. Сибирская язва. М.: Медицина; 1975. 160 с.
4. Езепчук Ю.В. Патогенность как функция биомолекул. М.: Медицина; 1985. 240 с.
5. Зайцева Е.А., Сомов Г.П. Влияние температуры на адгезивные свойства листерий. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 2006; 3:20–3.
6. Коротич А.С., Погребняк Л.И. Сибирская язва. Киев: Урожай; 1976. 160 с.
7. Курилова А.А., Проскура В.А., Майская В.Д. Неоднородность штаммов *Bacillus anthracis* по способности к адгезии. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 2004; 3:81–3.
8. Макаренкова И.Д., Запорожец Т.С., Беседнова Н.Н., Елякова Л.А., Звягинцева Т.Н., Потанов В.А. и др. Изучение возможности снижения адгезивной активности *Corinebacterium diphtheriae* биополимерами природного происхождения. Антибиотики и химиотерапия 1999; 44:50–3.

9. Онищенко Г.Г., редактор. Сибирская язва: актуальные проблемы разработки и внедрения медицинских средств защиты. М.: Медицина; 2010. 424 с.

10. Романов В.Е., Иволин А.Г., Бондаренко А.Л., Оборин В.А., Нехорошикина Е.Л. Способ определения бактериофиксирующей активности эритроцитов. Патент № 2360969.

11. Сидоренко С.В. Инфекционный процесс как «диалог» между хозяином и паразитом. Клин. микробиол. антимикроб. химиотерапия. 2001; 3(4):301–15.

12. Телесманич Н.Р., Ломов Ю.М., Бардых И.Х., Винокур Н.И. Адгезивные и некоторые другие свойства *Vibrio cholerae* TCP⁺ СТХ⁺, изолированных на объектах внешней среды Ростовской области в 2002 году. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 2004; 6:3–6.

13. Харсеева Г.Г., Москаленко Е.П., Алутина Э.Л., Бревдо А.М. Влияние полиоксидония на адгезивные свойства *Corinebacterium diphtheriae*. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 2009; 2:11–5.

14. Labbate M., Zhu H., Thung L., Bandara R., Larsen M., Willcox M. et al. Quorum-sensing regulation of adhesion in *Serratia marcescens* MG1 is surface dependent. J. Bact. 2007; 189:2702–11.

References (Presented are the Russian sources in the order of citation in the original article)

1. Anan'eva N.V., Ganina V.I., Lenchenko E.M., Vanina N.N. [Evaluation of methods of examination of interactions between bacteria and animal cells]. Report of the Russian Academy of Agricultural Sciences. 2007; 3:53–5.
2. Burgasov P.N., editor. [Pathological morphogenesis of Anthrax]. M.: Meditsina; 2002. 240 p.
3. Ginzburg N.N., editor. [Anthrax]. M.: Meditsina; 1975. 160 p.
4. Ezepechuk Yu.V. [Pathogenicity as a Function of Biomolecules]. M.: Meditsina; 1985. 240 p.
5. Zaitseva E.A., Somov G.P. [Action of temperature on the adhesive properties of Listeria]. Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol. 2006; 3:20–3.
6. Korotich A.S., Pogrebnyak L.I. [Anthrax]. Kiev: Urozhai; 1976. 160 p.
7. Kurilova A.A., Proskurina V.A., Maiskaya V.D. [Inhomogeneity of *Bacillus anthracis* strains as related to their adhesive capacity]. Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol. 2004; 3:81–3.
8. Makarenkova I.D., Zaporozhets T.S., Besednova N.N., Elyakova L.A., Zvyagintseva T.N., Potanov V.A. et al. [Analysis of the possibility to decrease adhesive activity of *Corinebacterium diphtheriae* using naturally occurring biopolymers]. Antibiotiki. Khimioterapiya. 1999; 44:50–3.
9. Onishchenko G.G., editor. [Anthrax: Topical Issues of Development and Implementation of the Medical Protection Means]. M.: Meditsina; 2010. 424 p.
10. Romanov V.E., Ivonin A.G., Bondarenko A.L., Oborin V.A., Nekhoroshkina E.L. [Method of identification of the bacteria-binding activity of erythrocytes]. Patent № 2360969.
11. Sidorenko S.V. [Infection as a “dialogue” between host and parasite]. Klin. Mikrobiol. Antimikrob. Khimioterapiya. 2001; 3(4):301–15.
12. Telesmanich N.R., Lomov Yu.M., Bardykh I.Kh., Vinokur N.I. [Adhesive and some other properties of *Vibrio cholerae* TCP⁺ СТХ⁺, isolated from the environmental objects in the territory of the Rostov region in 2002]. Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol. 2004; 6:3–6.
13. Kharseeva G.G., Moskalenko E.P., Alutina E.L., Brevdo A.M. [Effect of the polyoxidonium on the adhesive properties of *Corinebacterium diphtheriae*]. Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol. 2009; 2:11–5.

Authors:

Pimenov E.V., Ivonin A.G. Laboratory of comparative cardiology of Komi Scientific Centre of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences. Kommunisticheskaya St., 24, Syktyvkar, 167982, Russia. E-mail: alexivonin@mail.ru

Oborin V.A. Vyatka State University. Moskovskaya St., 36, Kirov, 610000, Russia.

Об авторах:

Пименов Е.В., Иволин А.Г. Лаборатория сравнительной кардиологии Коми научного центра Уральского отделения Российской академии наук. 167982, Сыктывкар, ул. Коммунистическая, д. 24. E-mail: alexivonin@mail.ru

Оборин В.А. Вятский государственный университет. 610000, Киров, ул. Московская, 36.

Поступила 11.03.11.