

Н.М.Семенко
Д.О.Степанський
Н.Г.Смотрова
І.Ю.Стеценко
А.М.Іванова

ДЗ «Дніпропетровська медична академія МОЗ України»

Ключові слова: адгезія, вірулентність, патогенність, фотоколориметрія, діагностика інфекційних захворювань.

Надійшла: 27.09.2016

Прийнята: 12.11.2016

УДК 579.22: 576.52. 001

МЕТОДИ ВИВЧЕННЯ АДГЕЗІЇ МІКРООРГАНІЗМІВ

Реферат. Метою роботи є узагальнення основних методів вивчення адгезивності мікроорганізмів та можливості їх використання у рутинній лабораторній діагностиці. Було проведено порівняння декількох основних методів дослідження адгезії, зокрема, з використанням еритроцитів крові групи 1(O) Rh+ (методика Бріліса); метод, заснований на застосуванні еритроцитів ссавців; специфічні методики вивчення адгезії *Staphylococcus spp.* відносно гемопротейнів, фібриногену та фібронектину; методика фотоколориметрії та ін.. Дані літературних джерел, які були використані при виконанні роботи, свідчать, що найбільш перспективним та точним методом дослідження адгезії на даний момент є фотоколориметрія, оскільки цей метод є швидким та простим у виконанні, має хороший потенціал для використання у рутинній лабораторній діагностиці.

Morphologia. – 2016. – Т. 10, № 4. – С. 7-11.

© Н.М.Семенко, Д.О.Степанський, Н.Г.Смотрова, І.Ю.Стеценко, А.М.Іванова, 2016

✉ natalies2512@yandex.ua

Semenko N.M., Stepankiy D.O., Smotrova N.G., Stetsenko I.Yu., Ivanova A.M. Investigation methods of adhesion of microorganisms.

ABSTRACT. Background. Adhesion is the main property of microorganisms that determines its pathogenicity. Laboratory examination of adhesion is important to determine the virulence of the bacteria and its effect on the development of pathology. **Objective.** Compilation of the main research methods of microbial adhesion and their possible use in common laboratory diagnostics. **Results.** Microbial adhesion is explored in vivo and in vitro. Research in vivo requires the native biological models. For example, studies of adhesion of *S. aureus* relatively a rats' blood vessels when fluorochrome labeled bacteria enter the body of biological models and watch the number of microorganisms adherent to the arterial walls of the peritoneum, previously performed surgical access. The scientists used fluorescent microscopy for this. Research methods of microbial adhesion in vitro include the study of the adhesive properties of red blood cells using Group 1 (O) Rh +; research using adhesive properties of mammals' red blood cells; study the microbial adhesion to hemoprotein, fibronectin and fibrinogen; evaluation of adhesive properties by Photocolorimetry; measuring forces acting between *S. aureus* and human skin. **Conclusion.** The most accurate and easy-to-carrying is a research method of adhesion as Photocolorimetry. It's very important to use the definition of microorganism adhesive properties not only for scientific purpose, but also in usual diagnostics of infectious diseases.

Key words: adhesion, virulence, photocolorimetry, diagnostics of infectious diseases.

Citation:

Semenko NM, Stepankiy DO, Smotrova NG, Stetsenko IYu, Ivanova AM. [Investigation methods of adhesion of microorganisms]. *Morphologia*. 2016;10(4):7-11. Ukrainian.

Ключовим фактором, який визначає патогенність мікроорганізмів, є адгезивність. В момент здійснення мікроорганізмом адгезії запускається каскад імунологічно-опосередкованих реакцій, які визначають специфіку інфекційного процесу. Адгезія – явище специфічне, і обов'язковою умовою для успішного завершення цього процесу є комплементарність факторів колонізації мікроорганізму (адгезини, ЛПС, спеціалізовані білки і т.д.) та специфічних рецепторів клітин-мішеней макроорганізму [1]. Адгезивність – це величина, яка кількісно вимірює здат-

ність бактерій спричиняти інфекційний процес, а значить, є одним з параметрів, що визначає вірулентність. Лабораторне дослідження рівня адгезії – ключовий метод, який створює чітке уявлення про патогенний потенціал конкретного виду чи штаму мікроорганізмів.

Отже, узагальнення основних методів вивчення адгезивності мікроорганізмів та можливості їх використання у рутинній лабораторній діагностиці є досить актуальним.

Вивчення адгезії здійснюється в експериментах *in vivo* та *in vitro* [2]. Дослідження *in vivo*

потребують наявності живих біологічних моделей. Яскравим прикладом є дослідження адгезивності *S. aureus* відносно стінок судин щура, коли мічені флуорохромом мікроорганізми вводять в організм біологічної моделі та спостерігають за кількістю мікроорганізмів, які прикріпилися до стінок артерій очеревини з допомогою флуоресцентної мікроскопії, попередньо здійснивши оперативний доступ [3]. Такий метод є складним у виконанні та неточним. Тому частіше в умовах лабораторії відтворюють експерименти *in vitro*[4].

Методи дослідження адгезивності *in vitro*

1. *Оцінка адгезивних властивостей з використанням еритроцитів крові групи 1(O) Rh+*. Виконання дослідження здійснюється згідно методики Бріліса. Суміш суспензії мікроорганізмів та еритроцитів, оброблених формаліном, інкубують при 37°C, регулярно струшуючи суміш. У подальшому готують фіксований препарат, пофарбований методом Романовського-Гімза і досліджують його методом світлової мікроскопії з урахуванням не менш, ніж 50 еритроцитів. В рамках методики Бріліса виділяють експрес-метод для визначення якісної характеристики адгезії та розгорнутий для кількісної характеристики [5].

Основною перевагою використання еритроцитів крові людини при дослідженні адгезивних властивостей м/о є наявність на поверхні клітин крові глікофору – специфічного рецептора для факторів адгезії, який за властивостями ідентичний глікокаліксу епітеліоцитів. Таким чином, цей спосіб дає можливість максимально точно визначити рівень вірулентності конкретного мікроорганізму. Недоліком цього методу є його ефективність переважно для Гр- мікроорганізмів [6].

2. *Оцінка адгезивних властивостей з використанням еритроцитів ссавців*. Найчастіше з цією метою використовують еритроцити барана. Даний метод виключає використання рідких фіксаторів та гістологічних барвників, що дозволяє зберегти природну архітектоніку утворених адгезивних зв'язків та робить метод максимально об'єктивним. Окрім того, метод з використанням тваринних клітин дозволяє більш глибоко вивчати процеси адгезії, в тому числі з урахуванням дії абіотичних (температура, РН середовища, ультрафіолетове опромінення тощо) та антропогенних (антибіотики, дезінфектанти) факторів.

Суміш бактеріальної суспензії та еритроцитів готують аналогічно методиці Бріліса. Після завершення процесу приготування матеріалу роблять мазки на предметних (для світлової мікроскопії) або покритих (для електронної мікроскопії) скельцях. Після цього скельця поміщають в чашки Петрі та фіксують протягом 30-40 хв парами 25% глутарового альдегіду. Для додаткового контрастування фіксований мазок обробляють

парами 1-2% чотирьохокису осмію протягом 3-5 хв. Готовий препарат досліджують методом світлової мікроскопії, або ж методом електронно-скануючої мікроскопії, попередньо здійснивши напilenня золотом чи платиною. [7]

3. *Оцінка рівня адгезії м/о до гемопротейнів*. Специфічний метод для якісного дослідження адгезивності *S. aureus*, найточніше характеризує рівень патогенності та вірулентності виділеного штаму. Особливістю метаболізму золотистого стафілокока є здатність диференціювати джерела екзогенного заліза, в першу чергу надаючи перевагу складовим гемопротейнів (гемоглобін та міоглобін). Даний процес забезпечується наявністю на поверхні стафілокока Isd-системи, яка регулюється іонами заліза (Iron-regulated surface determinants). Ця система грає роль специфічного рецептора до гемопротейнів у найбільш вірулентних штамів *S. aureus*. [8]

При виконанні даного дослідження суспензію *S. aureus* в концентрації 1 млн м.т./мл інкубують в лунках полістиролового планшета з іммобілізованими гемопротейнами в поживному середовищі 199 протягом 60 хв. Далі неадгезовані стафілококи видаляють шляхом триразового промивання середовищем 199 з твін-20. Кількість адгезованих *S. aureus* визначають наступними способами:

- Врахування кількості бактерій, що вирости в середовищі шляхом вимірювання його оптичної щільності;
- підрахунок клітин, які вирости на щільному поживному середовищі з серії десятикратних розведень;
- визначення активності бактеріальних ферментів у адгезованих штамів [9].

Приклад здійснення способу визначення рівня адгезії S. aureus до гемопротейнів

Було здійснено дослідження адгезивності *Staphylococcus spp.*, які були виділені зі шкіри та слизових оболонок декількох груп пацієнтів. Перша група – пацієнти з сезонним алергічним ринітом (САР). Друга група – пацієнти з атопічним дерматитом. Третя група – носії (слизова оболонка носа). Досліджувану культуру, розведену в середовищі 199 до концентрації 1 млн м. т. на 1 мл вносили в лунки полістиролового планшета з іммобілізованим гемоглобіном, інкубували в термостаті при 37°C протягом 60 хв. Наступним кроком було видалення вмісту лунок шляхом трьохразового промивання середовищем 199 з вмістом 0,05% твін-20 і фізіологічним розчином. Після проведення даного етапу маніпуляції лунки осушували, вносили по 150 мкл субстратного розчину (0,03% розтвор H_2O_2). Через 10 хвилин вносили 50 мкл 4% розчину молібдату аммонію і проводили фотометрію при довжині хвилі 414 нм. Таким чином визначалася оптична щільність досліджуваного зразка ($O_{\text{Щ}}^{\text{досл}}$). Для дослідження також була необхідна фонова оптична щіль-

ність (ОЩ_{фон}). Її визначали шляхом внесення 150 мкл Н₂О₂ у концентрації 0,03% та 50 мкл 4% розчину молібдату аммонію. При цьому бактеріальна суспензія не вносила. Отриманий мате-

ріал досліджували фотометром з налаштованою довжиною хвилі 414 нм. Показник адгезії (ПА) визначали за наступною формулою: $ПА = \frac{ОЩ_{фон}}{ОЩ_{досл}}$ (табл. 1) [10].

Таблиця 1

Показники адгезії мікроорганізмів. За результатами [10].

Вид мікроорганізму	ПА, М±м
<i>S. aureus</i> (зі слизової носа носіїв)	0,71±0,07
<i>S. aureus</i> (шкіра пацієнтів з atopічним дерматитом)	0,6±0,06
<i>S. aureus</i> (слизова пацієнтів з САР)	0,63±0,05
<i>S. aureus</i> (шкіра здорових пацієнтів)	0,54±0,09
<i>S. aureus</i> (ATCC N 25923 – музейний штаб)	0,48±0,07
<i>S. epidermidis</i> (слизова носа здорових пацієнтів)	0,38±0,07
<i>S. epidermidis</i> (шкіра здорових пацієнтів)	0,32±0,05

Отримані результати підтверджують кореляцію ПА із рівнем патогенності мікроорганізму.

4. *Визначення адгезивності staphylococcus spp. до фібрoneктину та фібриногену* є ще одним відомим запатентованим способом визначення рівня патогенності даного роду мікроорганізмів. Базується на патенті № 2393229 (Тюрин Ю.А., Мустафін І.Г., Фассахов Р.С. Способ определения адгезии Staphylococcus spp. к гемопротейнам). Суть даного дослідження полягає у визначенні рівня адгезії відносно фібрoneктину (Fn) і фібриногену (Fb), яка у патогенних штамів визначається високою ефективністю та специфічністю у порівнянні з контрольним зразком, де субстратом адгезії виступає полістирол, у відношенні до якого Staphylococcus spp. не володіють специфічністю. Цей феномен пояснюється тим, що патогенні штами експресують на поверхні бактерії адгезини, які виступають специфічними рецепторами адгезії до вище згаданих білків. [11]

Перелік дій, що здійснюється при виконанні даного дослідження, дуже схожий на алгоритм дій при дослідженні рівня адгезії відносно гемопротейнів. В 96-луноковий полістироловий планшет (в частині лунок у стінках міститься Fb та Fn, частина з них вільні) вноситься суспензія Staphylococcus spp. в концентрації 1 млн м.т./мл. Матеріал інкубують в середовищі 199 при температурі 37°C протягом 60±15 хв. Далі лунки 3-кратно промивають середовищем 199 з твін-20 і визначають результати трьома наступними способами:

- Врахування кількості бактерій, що вирости в середовищі шляхом вимірювання його оптичної щільності;
- підрахунок клітин, які вирости на щільному поживному середовищі з серії десятикратних розведень;
- визначення активності бактеріальних ферментів у адгезованих штамів.

Приклад застосування способу визначення адгезивності Staphylococcus spp. до фібрoneкти-

ну та фібриногену. Дослідження адгезивних властивостей виділених бактерій Staphylococcus spp. зі слизових оболонок, шкіри і мокроти при наявності запальних процесів. З цією метою досліджували культуру в розведенні 1 млн м.т./мл вносили в лунки полістиролового планшета. Частина лунок – «чисті» (К-контроль), частина містять в стінці іммобілізовані Fn і Fb. Після 1-годинної інкубації в термостаті при температурі 37°C лунки тричі промивають середовищем 199 з 0,05% твін-20 та фізіологічним розчином. Після цього лунки осушували, вносили по 150 мкл субстратного розчину (0,03% розв'язок Н₂О₂). Через 10 хвилин вносили 50 мкл 4% розчину молібдату аммонію і проводили фотометрію при довжині хвилі 414 нм з допомогою малогабаритного фотометра для імуно-ферментного аналізу (ІФА) АІФР-01 «Уніплан». Аналогічно дослідженню рівня адгезії до гемопротейнів, визначали ОЩ_{фон}, оптичну щільність відносно фібриногену (ОЩ_{fb}) та оптичну щільність відносно фібрoneктину (ОЩ_{fn}). Додатково визначали контроль (ОЩ_к) (табл. 2) [11].

Розрахунок ПА здійснювали за формулами:

$ПА_{fb} = \frac{ОЩ_{fb} - ОЩ_{к}}{ОЩ_{фон}}$ - показник специфічної адгезії до фібриногену;

$ПА_{fn} = \frac{ОЩ_{fn} - ОЩ_{к}}{ОЩ_{фон}}$ - показник специфічної адгезії до фібрoneктину.

На відміну від результатів дослідження адгезивності Staphylococcus spp. відносно гемопротейнів, дане дослідження не має такої однозначної кореляції рівня адгезії та вірулентності.

5. *Оцінка рівня адгезії з використанням культури тканин.* Здійснюється шляхом прямого контакту зрізів тканин із суспензією бактерій. Яскравий приклад – дослідження адгезії S. pneumoniae з використанням зрізів легень мишей (RU (21) 96100972, МПК С12Q 1/14, 1/20 (22) 1996.01.16 (54). Способ определения адгезии S. pneumoniae и ее блокирования). Недоліком даного способу є його висока собівартість, деяка складність виконання та потреба у високотехнологічному обладнанні [8].

Показники специфічної адгезії мікроорганізмів до фібрoneктину та фібриногену. За результатами [11].

Вид мікроорганізму	ПА(Fn), М±m	ПА(Fb), М±m
<i>S. aureus</i> (сі слизової оболонки носа носіїв)	0,81±0,07	0,52±0,06
<i>S. aureus</i> (шкіра хворих з atopічним дерматитом)	0,9±0,06	0,76±0,05
<i>S. aureus</i> (слизова оболонка хворих на CAP)	0,73±0,05	0,63±0,05
<i>S. aureus</i> I-78	0,87±0,09	0,71±0,07
<i>S. aureus</i> ATCC N 25923	0,48±0,07	0,5±0,02
<i>S. epidermidis</i> (слизова носа здорових пацієнтів)	0,28±0,07	0,42±0,3
<i>S. epidermidis</i> (шкіра здорових пацієнтів)	0,82±0,05	0,91±0,05

6. Оцінка адгезивних властивостей методом фотоколориметрії.

Метод дослідження адгезивності шляхом фотоколориметрії є одним із останніх досягнень сучасної науки. Він характеризується простотою виконання, високою чутливістю та інформативністю. Головною перевагою даного методу дослідження є його універсальність як для Gr+, так і для Gr- мікроорганізмів.

У якості субстрату адгезії для мікроорганізмів можуть виступати або еритроцити крові I(O) Rh+, або еритроцити щура, кролика, морської свинки. Клітини крові перед застосуванням тричі відмивають у 0,9% розчину NaCl шляхом центрифугування 1000 об/хв, потім ресуспендують у тому ж розчині. Підготовані еритроцити змішують з суспензією бактерій, інкубують 30 хв при температурі 37°C. Наступним кроком є центрифугування суміші зі швидкістю 1000 об/хв протягом 1,5 хв., відбір 2 мл надосадової рідини та визначення з допомогою фотоколориметра її оптичної щільності (ОЩ). Маючи цю величину, можемо порахувати показник адгезії (ПА) мікроорганізмів [2].

Параметри кількісної оцінки адгезії (табл. 3) [2].

Таблиця 3
Показники адгезії мікроорганізмів

Адгезивність	СПА
Нульова	0-1,0
Низька	1,01-2,0
Середня	2,01-4,0
Висока	Більше 4

Середній показник адгезії (СПА) – середня кількість м/о, які знаходяться на поверхні еритроциту. Враховується не менше 25 еритроцитів, не більше 5 в полі зору.

Коефіцієнт участі еритроцитів у адгезії (К) – відсоток еритроцитів, які взяли участь в адгезії.

Індекс адгезивності м/о (ІАМ) – середня кількість м/о на одному еритроциті, що взяв участь у адгезії
$$ІАМ = \frac{СПА \times 100}{К}$$

7. Методика дослідження сили адгезії *S. aureus* до рогового шару епітеліоцитів шкіри. [5] Відомий спосіб дослідження сили адгезії, який застосовує атомо-силову мікроскопію. З допомогою мікроскопічної голки досліджуються різні ділянки поверхні клітин *S. aureus* та епітеліоцитів. Головною метою даної маніпуляції є визначення ділянок поверхні, які є найбільш та найменш схильними до адгезії.

Модифікований метод має наступний механізм виконання: бактерія *S. aureus* закріплена на поверхні мікроскопічної голки. Далі з допомогою вищезгаданої атомо-силової мікроскопії вимірюють, з якою силою закріплений на голці мікроорганізм адгезується до різних ділянок клітини епідермісу шкіри, «відтягуючи» бактерію від клітини після повного завершення процесу утворення адгезивних зв'язків. Створюється карта адгезивності мікроорганізму та епідермальної клітини. В результаті проведеного дослідження було встановлено, що середня сила зв'язку між *S. aureus* та клітинами шкіри становить 500 пН. При порівнянні отриманої величини з вагою *S. aureus*, яка становить в середньому 0,01 пН, стає зрозуміло, що сила адгезивних зв'язків між бактерією та клітиною шкірою в 50 000 разів перевищує вагу самої бактерії.

Таким чином, дослідження адгезивності мікроорганізмів має вирішальне значення при встановленні ступеня їх патогенності. Для цього використовують декілька основних методик, описаних вище. На даний момент найбільш точним та простим у виконанні є методика дослідження адгезивних властивостей з допомогою фотоколориметрії. На наш погляд потрібно більш інтенсивно використовувати визначення адгезивних властивостей мікроорганізмів не тільки в наукових цілях, а й в рутинній діагностиці інфекційних захворювань.

Визначення рівня адгезії відіграє значну роль в оцінці рівня патогенності мікроорганізмів. Дослідження адгезії, особливо, з допомогою фотоколориметра, в клінічних лабораторіях дає можливість значно підвищити точність визначення домінуючого організму, який спричинив інфекційний процес у пацієнта. Особливо це стосується ранової інфекції, за якої можлива

наявність одразу декількох потенційно патогенних збудників без вираженого кількісного чи

якісного переважання одного з них.

Літературні джерела References

1. Shyrobokov VP, editor. Medychna mikrobiologiya, virusologiya i imunologiya: pidruchnik dlya studentiv vyshchih navchalnih zakladiv [Medical Microbiology, Virology and Immunology: textbook for students in higher medical education]. Vinnitsa: Nova knyha; 2010. 952 p. Ukrainian.

2. Pimenov EV, Oborin VA, Ivonin AG. [Evaluation of adhesion properties of Bacillus anthracis in the red blood cells of mammals using photocolometry]. Problemy osobo opasnyh infektsiy. 2011;4:41-43. Russian.

3. Claes J, Liesenborghs L, Lox M, Verhamme P, Vanassche T, Peetermans M. In vitro and in vivo model to study bacterial adhesion to the vessel wall under flow conditions. J Vis Exp. 2015 Jun 11;(100):e52862. doi: 10.3791/52862.

4. Pavlova IB, Lenchenko EM, Shtukareva MYu, Belousov VI. [Methodic recommendations for the preparation the preparations for the study of the degree of microbial adhesion to animal cells in a light and scanning electron microscope]. Ministry of Agriculture of Russian Federation. 1999;13(7):2-4. Russian.

5. Formosa-Dague C, Fu ZH, Feuillie C, Derclaye S, Foster TJ, Geoghegan JA, Dufrene YF. Forces between Staphylococcus aureus and human skin]. Nanoscale Horizons. 2016;1:298-303. DOI: 10.1039/C6NH00057F.

6. Romanov VE, Ivonin AG, Bondarenko AL, Oborin VA, Nehoroshkina EL, inventors; Federal State Institution of Higher Education "Vyatka State Agricultural Academy", assignee. [The method for determining the activity of erythrocyte fixing bacteria]. Russian patent. RU 2360969. 2009 Jul 10. Int CL C12Q1/02. Russian.

7. Naumenko ZS, Shpicina IV. [Comparative evaluation of adhesion activity of bacteria isolated from patients with osteomyelitis hearth and of the open fracture wounds]. Heniy ortopedii. 2011;4:31-34. Russian.

8. Potaturkina-Nesterova NI, Falova OE, Volgina TI, inventors; Federal State Educational Institution of Higher Professional Education "Ulyanovsk State Technical University", assignee. [The method for determining the adhesion of Staphylococcus aureus]. Russian patent. RU 2510024. 2012 Apr 4. Int CL C12Q1/14. Russian.

9. Seregina NV, Salomatina TV. [Study of adhesive ability listeria monocytogenes to human erythrocytes and sheep]. In: [Contemporary medicine: current issues; 2013 Nov 28; Novosibirsk, Russia]. SibAK; 2013. p. 108-115. Russian.

10. Tyurin YuA, Mustafin IG, Fassahov RS, inventors; Federal State Institution of Science "Kazan Research Institute of Epidemiology and Microbiology" of Rospotrebnadzor, State Educational Institution of Higher Professional Education "Kazan State Medical University, Federal Agency for Healthcare and Social Development", assignee. [A method for determining the adhesion of Staphylococcus spp. to hemoprotein]. Russian patent. RU 2393229. 2010 Jun 27. Int CL C12Q1/14. Russian.

11. Tyurin YuA, Fassahov RS, inventors; Federal State Institution of Science "Kazan Research Institute of Epidemiology and Microbiology" of Rospotrebnadzor, assignee. [A method for determining the adhesion of Staphylococcus spp. to fibronectin and fibrinogen]. Russian patent. RU 2490329. 2013 Aug 20. Int CL C12Q1/14. Russian.

Семенко Н.Н., Степанский Д.А., Смотрова Н.Г., Стеценко И.Ю., Иванова А.М. Методы изучения адгезии микроорганизмов.

Реферат. Целью работы является обобщение основных методов изучения адгезивности микроорганизмов и возможности их использования в рутинной лабораторной диагностике. Было проведено сравнение нескольких основных методов исследования адгезии, в частности, с использованием эритроцитов крови группы 1 (O) Rh + (методика Брилиса); метод, основанный на применении эритроцитов млекопитающих; специфические методики изучения адгезии Staphylococcus spp. относительно гемопротеинов, фибриногена и фибронектина; методика фотоколориметрии и др. Данные литературных источников, которые были использованы при выполнении работы, свидетельствуют, что наиболее перспективным и точным методом исследования адгезии на данный момент является фотоколориметрия, поскольку этот метод является быстрым и простым в исполнении, имеет хороший потенциал для использования в рутинной лабораторной диагностике.

Ключевые слова: адгезия, вирулентность, патогенность, фотоколориметрия, диагностика инфекционных заболеваний.