

Д. Л. Кирик, Е. А. Шабловская, В. М. Плугатырь,
Н. М. Ралко, В. И. Кикоть, Н. М. Кролевецкая

АДГЕЗИВНО-ИНВАЗИВНЫЕ СВОЙСТВА КАМПИЛОБАКТЕРИЙ РАЗЛИЧНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

Исследования проведены на перевиваемой клеточной культуре Her-2. Все штаммы обладали выраженной способностью к адгезии и инвазии. В начале процесса взаимодействия микробов с монослоем индексы адгезивности были в пределах от $5,5 \pm 0,3$ у штамма из ООС до $10,6 \pm 0,7$ у клинического изолята; через сутки после заражения — $16,8 \pm 1,3$ и $25,2 \pm 0,8$ соответственно. Индекс инвазивности в начале исследования находился в диапазоне от $2,9 \pm 0,1$ у штамма из ООС до $5,1 \pm 1,4$ у клинического изолята, в конце соответственно — $9,4 \pm 0,8$ и $16,0 \pm 1,2$. Сделан вывод о наличии фактора риска заражения при широком распространении вирулентных кампилобактерий среди сельскохозяйственных животных и птиц, а также ООС.

Введение. Клеточные культуры, нашедшие широкое применение в лабораторной диагностике вирусных инфекций, в последние годы стали использоваться в качестве модели для исследования возбудителей бактериальных инфекций. Анализ вирулентных свойств кампилобактерий показал, что в клеточной культуре Int 407 они вызывают выраженный цитопатический и цитотоксический эффект [1].

Клеточная инвазия играет значительную роль в патогенезе кампилобактериоза [2]. Горелов и соавт. [3] разработали модель — изолированные эпителиальные клетки тонкой и толстой кишки крыс, — позволяющую оценивать адгезивные свойства *Campylobacter jejuni*. Установлена корреляция между степенью адгезивной активности *C. jejuni* и тяжестью клинического течения инфекции у детей.

В то же время многие патогенетические механизмы кампилобактериозной инфекции остаются неясными и требуют разработки. В доступной нам литературе мы не нашли сведений по изучению адгезивно-инвазивных свойств штаммов кампилобактерий, выделенных из объектов окружающей среды (ООС). В связи с этим целью настоящей работы явилось изучение адгезивно-инвазивных свойств штаммов кампилобактерий различного происхождения.

Материалы и методы. В работе использованы штаммы *C. jejuni*: 300, выделенный из испражнения ребенка 3 лет; 3В — из воды открытого водоема и 11ЖБ — из кишечника курицы. До исследования бактерии хранили при -70°C в глицериново-пептонной среде. Перед опытом культуры размораживали и делали 1—2 пересева на плотные селективные питательные среды. Использовали 24-ч культуры, выращенные при 42°C в микроаэрофильных условиях на железо-эритрит кровяном агаре. Культуру отмывали от питательной среды фосфатным буферным раствором (ФБР), pH 7,2, и готовили микробную взвесь густотой 10^7 КОЕ/мл.

Для изучения адгезивных свойств кампилобактерий суспензию клеток культуры Her-2 в концентрации 10^5 на 1 мл разливали в пенициллиновые флаконы с плексиглазовыми стеклами по 2 мл и инкубировали при 37°C в течение 48 ч в среде Игла (с добавлением глутамина и 2% сыворотки крупного рогатого скота). Клеточные культуры заражали, помещая плексиглазовые стекла с выросшим монослоем в пробирки

© Д. Л. КИРИК, Е. А. ШАБЛОВСКАЯ, В. М. ПЛУГАТЫРЬ, Н. М. РАЛКО,
В. И. КИКОТЬ, Н. М. КРОЛЕВЦКАЯ, 1994

с концентрацией микроорганизмов 10^7 КОЕ/мл. Стандартность результатов обеспечивали тремя повторностями, при этом каждым штаммом заражали по пять пробирок на один срок. Результаты опытов учитывали после инкубации при 37°C в течение 0,5; 1; 6 и 24 ч. Через указанные промежутки времени инкубации стекла с зараженными монослоями промывали стерильным физиологическим раствором и заливали поддерживающей средой Игла для дальнейшей экспозиции при 37°C . На каждом этапе препараты готовили фиксацией в течение 0,5 ч 96° этиловым спиртом. Фиксированные монослои окрашивали гематоксилином в течение 5 мин, докрашивали 1 %-м водным раствором эозина, далее их промывали дистиллированной водой, просветляли в ксилоле, высушивали и заключали в балзам на предметные стекла. Адгезию и инвазию регистрировали, подсчитывая бактерии на поверхности и внутри клеток Нер-2 (100 клеток — 10 полей зрения). Адгезивные свойства оценивали по индексу адгезивности (среднее количество микробных клеток, прикрепившихся на 1 клетку, из числа участвовавших в адгезии), инвазивные — по индексу инвазивности (число инвазивированных бактерий на 1 клетку Нер-2). Контролем служили клетки незараженных культур тканей, содержащихся в идентичных опытам условиях. Полученные результаты обрабатывали известными методами вариационной статистики.

Результаты и обсуждение. Данные по изучению общепринятых факторов патогенности бактерий (способность к адгезии и инвазии штаммов кампилобактерий различного происхождения) представлены в таблице. Все исследуемые штаммы обладали выраженной способностью к адгезии и инвазии. В начале процесса взаимодействия микробов с монослоем индексы адгезивности находились в пределах от $5,5 \pm 0,3$ у штаммах из ООС до $10,6 \pm 0,7$ у клинического изолята. В течение первого часа этот показатель соответственно возрастал от $7,8 \pm 0,5$ до $11,0 \pm 1,3$. В период между первым и шестым часом продолжалось увеличение количества адгезированных на монослое микробов. При этом индекс адгезивности составлял у клинического изолята $16,1 \pm 1,6$, у «куриного» штамма — $13,4 \pm 1,7$, а у штамма, выделенного из ООС, — $10,2 \pm 1,1$. Через сутки после заражения количество микробов, прикрепленных к одной клетке, было соответственно $25,2 \pm 0,8$; $20,5 \pm 0,9$ и $16,8 \pm 1,3$.

Известно, что внутриклеточное паразитирование свойственно только вирулентным штаммам. У изученных нами кампилобактерий различного происхождения индекс инвазивности в начале исследования находился в пределах от $2,9 \pm 0,1$ у штамма из ООС до $5,1 \pm 1,4$ у клинического изолята. Процесс проникновения кампилобактерий внутрь клеток монослоя развивался достаточно быстро и уже через час индекс инвазивности составлял у клинического изолята $7,0 \pm 2,1$, у «куриного» штамма — $5,8 \pm 1,0$, а у штамма из ООС — $4,0 \pm 0,8$. Через сутки после заражения этот показатель соответственно был — $16,0 \pm 1,2$; $11,2 \pm 0,9$ и $9,1 \pm 0,8$.

Таким образом, кампилобактерии наряду с другими факторами патогенности обладают адгезивными и инвазивными свойствами. Отсут-

Средние показатели поражения культур клеток Нер-2 после заражения различными штаммами S. jejuni ($M \pm m$)*

Время наблюдения, ч	Индекс адгезивности			Индекс инвазивности		
	300	ЗВ	ИЖБ	300	ЗВ	ИЖБ
0,5	$10,6 \pm 0,7$	$5,5 \pm 0,3$	$7,1 \pm 0,4$	$5,1 \pm 1,1$	$2,9 \pm 0,1$	$3,6 \pm 1,1$
1	$11,0 \pm 1,3$	$7,8 \pm 0,5$	$9,0 \pm 1,0$	$7,0 \pm 2,1$	$4,0 \pm 0,8$	$5,8 \pm 1,0$
6	$16,1 \pm 1,6$	$10,2 \pm 1,1$	$13,6 \pm 1,7$	$9,7 \pm 0,5$	$6,1 \pm 1,3$	$8,1 \pm 1,9$
24	$25,2 \pm 0,8$	$16,8 \pm 1,3$	$20,5 \pm 0,9$	$16,0 \pm 1,2$	$9,1 \pm 0,8$	$11,2 \pm 0,9$

* Достоверность различий показателей у исследуемых штаммов оценена с помощью критерия t (Стьюдента).

ствие статистически достоверной разности изученных показателей у штаммов различного происхождения свидетельствует о наличии фактора риска заражения при широком распространении вирулентных штаммов кампилобактерий среди сельскохозяйственных животных и птиц, в ООС и необходимости усиления противоэпидемических мероприятий, направленных на ограничение циркуляции этих возбудителей.

*Д. Л. Кірик, О. А. Шабловська, В. М. Плугатир,
Н. М. Ралко, В. І. Кікоть, Н. М. Кролевецька*

АДГЕЗИВНО-ИНВАЗИВНІ ВЛАСТИВОСТІ КАМПИЛОБАКТЕРІЙ РІЗНОГО ПОХОДЖЕННЯ

Резюме

Дослідження проведено на перевивній клітинній культурі Нер-2. Всім штамам була притаманна виражена здатність до адгезії та інвазії. На початку процесу взаємодії мікробів з моношаром індекси адгезивності були в межах від $5,5 \pm 0,3$ у штама із об'єкта навколишнього середовища (ОНС) до $10,6 \pm 0,7$ у клінічного ізолята; через добу після зараження — $16,8 \pm 1,3$ і $5,2 \pm 0,8$ відповідно. Індекс інвазивності на початку дослідження знаходився в діапазоні від $2,9 \pm 0,1$ у штама із ОНС до $5,1 \pm 1,4$ у клінічного ізолята, наприкінці відповідно — $9,1 \pm 0,8$. Зроблено висновок про наявність фактора ризику зараження за широкого розповсюдження вірулентних кампілобактерій серед сільськогосподарських тварин і птахів, а також ОНС.

*D. L. Kirik, E. A. Shablovskaya, V. M. Plugatir,
N. M. Raiko, V. I. Kichot, N. M. Krolevetskaya*

ADHESIVE-INVASION CAMPYLOBACTERIA PROPERTIES OF DIFFERENT ORIGIN

Summary

Investigations were carried out on interweared cellular culture HEP-2. All investigated strains have owned of expressed ability of both adhesion and invasion. At the first period of microbes interaction with monolayer the adhesive indexes were over from $5,5 \pm 0,3$ in strain of EO to $10,6 \pm 0,7$ in clinical isolate; in twenty-four hours after infection — $16,8 \pm 1,3$ and $5,2 \pm 0,8$ respectively. At the beginning of investigation invasion index was over from $2,9 \pm 0,1$ in strain of EO, to $5,1 \pm 1,4$ in clinical isolate and at the end — $9,1 \pm 0,8$ and $16,0 \pm 1,2$ respectively. It was concluded about the presence of the infection risk factor among agricultural animals, poultry, and in EO.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Mahajan S., Rodgers F. G. Isolation, characterization, and host-cell-binding properties of a cytotoxin from *Campylobacter jejuni* // J. Clin. Microbiol.—1990.—28, N 6.— P. 1314—1320.
2. Field L. H., Underwood J. L., Payne S. M., Berry L. J. Characteristics of an avirulent-*Campylobacter jejuni* strain and its virulence — enhanced // J. Med. Microbiol.—1993.—38, N 2.— P. 293—300.
3. Горелов А. В., Горелая Е. М., Жуховицкий В. Г., Бондаренко В. М. Адгезия клинических изолятов *Campylobacter jejuni* к эпителиальным клеткам кишечника *in vitro* // Журн. микробиол.—1990.— № 7.— С. 3—6.

Ин-т эпидемиологии и инфекц. болезней
им. Л. В. Громашевского МЗ Украины, Киев

Получено 09.02.94