

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АНТИКОМПЛЕМЕНТАРНОЙ АКТИВНОСТИ БАКТЕРИЙ ПО КИНЕТИКЕ ИММУННОГО ГЕМОЛИЗА

В работе описывается методика определения антикомplementарной активности бактерий, основанная на измерении кинетических параметров иммунного гемолиза в жидкой фазе. Показана сопоставимость уровней антикомplementарной активности *S. aureus* и *E. coli*, измеренных предлагаемым и ранее описанным методом, основанным на детекции степени гемолиза в геле. Обсуждаются преимущества и недостатки этих методов.

Введение

Обладание бактериальными патогенами фенотипически проявленной резистентностью к бактерицидным механизмам хозяина есть универсальное средство увеличить шансы возбудителя на выживание, персистенцию и реализацию вирулентного потенциала [9]. С этих позиций сам феномен выживания бактерий в макроорганизме рассматривается как одно из важных звеньев в патогенезе инфекционного процесса, а их способность к инактивации комплемента, ключевого гуморального эффектора иммунитета, – существенной составляющей персистентного потенциала патогенов [4].

Разработанные нами ранее методы определения антикомplementарной активности бактерий (АКА) позволили показать значение данного признака в персистенции бактерий – возбудителей ряда инфекций человека [1, 2, 4]. Эти методы основаны на определении параметров иммунного гемолиза в агарозном геле и, как большинство методов, основанных на использовании геля в качестве носителя, обладают рядом существенных преимуществ, главными из которых являются высокая производительность и экономичность. Однако проведение реакции комплементзависимого иммунного гемолиза в геле имеет и ряд недостатков, оборачивающихся ограниченной возможностью его применения [5, 6].

Целью настоящего исследования явилась разработка методических приемов определения антикомplementарной активности бактерий по кинетике иммунного гемолиза в жидкой фазе. Такой подход, по нашему мнению, должен при потере в производительности обеспечивать более высокую точность определения и возможность сокращения затрат времени.

Материалы и методы

В работе использовано 56 штаммов *Escherichia coli*, среди них 19 штаммов выделены из кишечника здоровых людей, 20 – из мочи больных пиелонефритом, 17 – из воды откры-

тых водоемов; 37 штаммов *Staphylococcus aureus*, выделенных от бактерионосителей. Бактериальные культуры были идентифицированы с помощью наборов «Enterotest I», «Enterotest II» и «Staphytest» («LaChema», Чехия).

Бактериальную массу исследуемых чистых культур стандартной бактериологической петлей засеивали в 3,5 мл мясоептонного бульона и культивировали при температуре 37°C в течение 18-24 часов. Измеряли оптическую плотность культуры против среды культивирования ($\lambda=541$ нм). Супернатант отделяли от бактериальных клеток центрифугированием в течение 30 мин при 3000 g. До момента контакта с комплементом супернатанты хранили в при температуре 4°C.

Источником комплемента служила лиофилизированная сыворотка морской свинки (НПО «Биомед», г.Пермь). Веронал-мединаловый буфер (pH=7,45), содержащий ионы кальция и магния (ВМБ) готовили, как описано в работе [6]. В качестве источника эритроцитов использовали кровь барана, взятую стерильно пункцией яремной вены. Кровь сохраняли в равном объеме стерильного раствора Олсвера [6] при температуре 4°C. Перед употреблением кровь выдерживали в таких условиях в течение недели, после чего использовали на протяжении 8-10 недель. Сенсibilизацию эритроцитов барана проводили по стандартной методике [5]. Концентрация рабочей суспензии сенсibilизированных эритроцитов барана (СЭБ) составляла 3×10^8 СЭБ/мл, расчетная концентрация непосредственно в кювете – 1×10^7 СЭБ/мл, что обеспечивало оптическую плотность суспензии в пределах линейного участка зависимости от концентрации СЭБ (см. ниже).

В качестве прототипа использован один из наиболее приемлемых, на наш взгляд, вариантов оценки кинетических параметров иммунного гемолиза, предложенный ранее в работе [8]. В качестве метода сравнения применяли методику парциального гемолиза в геле [1].

Результаты и их обсуждение

Предварительное исследование зависимости оптической плотности (OD_{800}) суспензии СЭБ от их концентрации (С) выявили ее линейный характер в диапазоне концентраций СЭБ от 0 до $1,4 \times 10^7$ СЭБ/мл, что согласуется с данными, полученными в работе [8]. При этом параметры взаимосвязи концентрации эритроцитов с их оптической плотностью, охарактеризованные методом наименьших квадратов [7], описывались уравнениями:

$$C = 21,459 \times OD_{800}, \text{ или } OD_{800} = 0,0466 \times C,$$

где С – концентрация СЭБ, выраженная в 10^6 СЭБ/мл.

Использование первого из приведенных уравнений возможно и при отсутствии в лаборатории спектрофотометра (фотоэлектроколориметра) с вычислительным блоком, позволяющим автоматически трансформировать получаемые оптические плотности в значения концентрации СЭБ. В этом случае измерение активности комплемента в опытных и контрольных кюветах следует производить по конечной точке во временном диапазоне, соответствующем линейному падению оптической плотности суспензии при лизисе эритроцитов (в большинстве случаев между 30 и 180-240 секундами от момента внесения эритроцитов в кювету с пробой, содержащей комплемент).

В условиях нашей лаборатории с учетом особенностей вычислений микропроцессорного блока спектрофотометра СФ-46 в режиме измерения динамики концентрации (режим «А(3)» по инструкции к прибору) в память процессора прибора вводились коэффициенты «С»=0 и «Б»=2,798. Это позволило каждые 10 с в режиме измерения динамики концентраций получать значения скорости лизиса СЭБ, наблюдаемой за последние 10 секунд и выраженные в $10^7 \times \text{СЭБ/с}$ ($10^6 \times \text{СЭБ/с}$ при учете цифр после десятичного знака), что соответствует 10^7 литических единиц комплемента (ЛЕК, где 1 единице соответствует лизис 1 эритроцита в секунду), как предлагалось в уже упоминавшейся выше работе [8].

Процедура определения антикомплементарной активности внеклеточных продуктов бактерий осуществлялась следующим образом. Супернатанты бульонных культур в объеме 50 мкл смешивали с равным количеством сыворотки (источник комплемента) и инкубировали в

течение 30 минут при температуре $+4^\circ\text{C}$ (вариант А) и $+37^\circ\text{C}$ (вариант Б). При этом в первом случае воспроизводился холододовой контакт внеклеточных продуктов бактерий с сывороткой, как это делалось в ранее разработанных вариантах определения степени гемолиза в геле (парциальный и радиальный гемолиз). Во втором случае определяли способность бактерий к инактивации комплемента в условиях, не исключающих активацию последнего бактериальными продуктами. В качестве контроля использовали мясопептонный бульон. После инкубации смесь охлаждали до 4°C (вариант Б), разводили с помощью ВМБ (2,7 мл) и оставляли на холоду вплоть до измерения. Непосредственно перед измерением пробу, содержащую все компоненты тест-системы, кроме эритроцитов прогревали на водяной бане в течение 3 мин при температуре 37°C , после чего в пробирку добавляли 200 мкл рабочей взвеси СЭБ, осторожно перемешивали, переносили в кювету (объем 3 мл, толщина 1 см) спектрофотометра и немедленно начинали измерение кинетики гемолиза в режиме «А(3)» при длине волны 800 нм. В ходе исследования учитывали максимальные значения скорости лизиса эритроцитов, которые достигались, как правило на третьей–пятой минуте от момента внесения СЭБ. В течение последующего промежутка времени после определения максимальной скорости лизиса СЭБ реакция прогрессивно замедлялась и останавливалась.

Антикомплементарную активность культур бактерий вычисляли по разнице между значениями скорости лизиса эритроцитов в контрольной и опытной пробах, которую в свою очередь перерасчитывали на 1 мл супернатанта и выражали в анти-ЛЕК $\times 10^6/\text{с}$.

Инкубация внеклеточных продуктов бактерий с комплементом вела, как правило, к снижению функциональной активности последнего. При этом сравнение двух использованных вариантов определения АКА указывает на выраженную и достоверную корреляционную связь между ними (рисунки 1 и 2), зарегистрированную как для *E.coli*, так и для *S.aureus*.

Обращает на себя внимание тот факт, что данные корреляционные связи в большей степени были выражены, если проводилась предварительная инкубация супернатантов бактериальных культур и комплемента при 4°C (рисунки 1А и 2А, $R^2=0,758$ и $R^2=0,713$ соответственно; $P<0,05$), что в сравнении с альтернативным

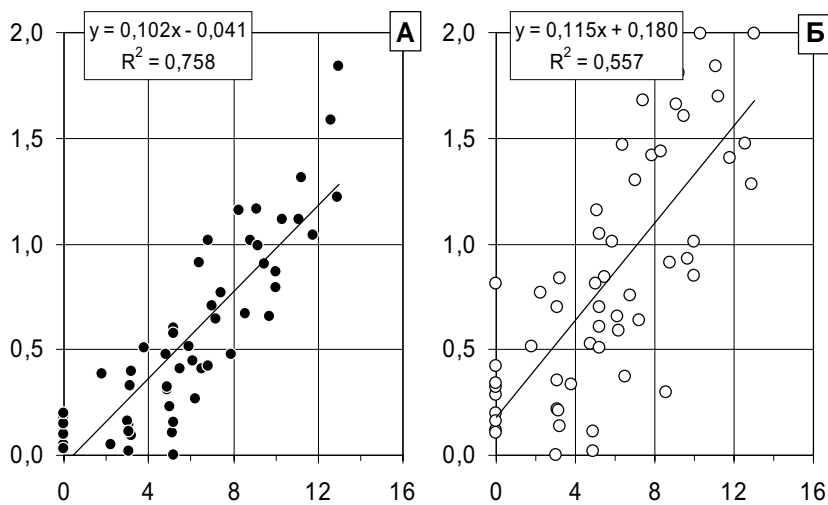
режимом (рисунки 1Б и 2Б, $R^2=0,557$ и $R^2=0,593$ соответственно; $P<0,05$) указывает на заметный вклад процессов активации системы комплемента в конечный результат определения АКА. Такая инактивация комплемента за счет его активации за пределами досягаемости мембранмишенной рассматривается нами и рядом исследователей в качестве существенного фактора выживания бактерий в макроорганизме, действие которого связано с разобщением сайтов активации системы и сайтов-мишеней [10].

В целом, существенных отличий в величинах АКА, связанных с видовыми особенностями использованных бактерий, нами не обнаружено, что

позволяет рекомендовать предлагаемую методику как альтернативную имеющимся.

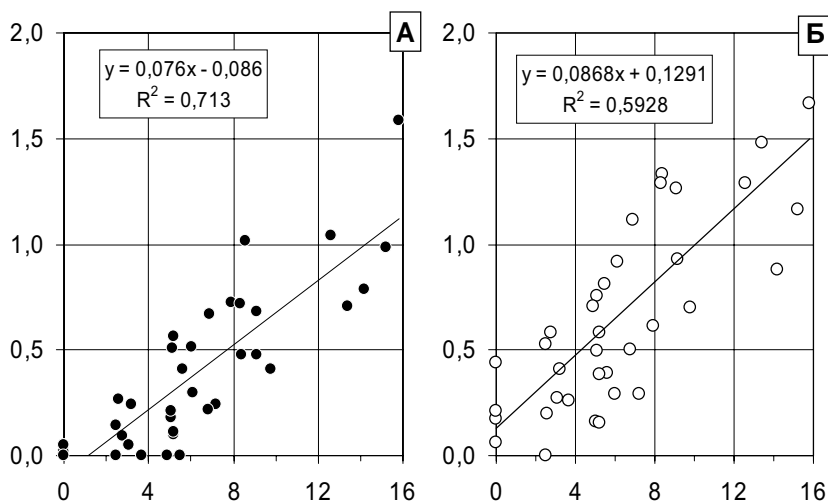
Сравнительный анализ гемолитических методов определения АКА позволяет выделить ряд существенных преимуществ предлагаемого варианта. Предложенные ранее методы, основанные на определении параметров иммунного гемолиза в геле, различаются способом их регистрации. При оценке парциального гемолиза, также как и в стандартной процедуре реакции связывания комплемента, учитывается степень гемолиза по конечной точке. При проведении радиального гемолиза в геле измеряются диаметры зон гемолиза, квадраты которых пропорциональны активности внесенного в лунку комплемента.

Указанные процедуры, как и большинство иммунологических методов, основанных на использовании геля в качестве носителя, обладают рядом достоинств, главными из которых являются высокая производительность и экономичность за счет возможности одновременной постановки десятков (сотен) проб. Однако проведение реакций, подобных комплементзависимому гемолизу сенсibilизированных эритроцитов, в геле имеет и ряд недостатков, оборачивающиеся порой ограниченной возможностью его применения. К числу последних следует отнести невысокую прецизионность, объясняемую низкой чувствительностью и воспроизводимостью, трудоемкость процесса, вызванную необходимостью тщательного приготовления геля, длительность проведения реакции, связанную с относительно продолжительной диффузией компонентов реакции в геле. Высокие требования при этом предъявляются и к гелеобразующим



А – инкубация при 4°C, Б – инкубация при 37°C.

Рисунок 1. Сопоставимость результатов определения антикомплементарной активности методами парциального гемолиза в геле и по кинетике гемолиза. *Escherichia coli*.



А – инкубация при 4°C, Б – инкубация при 37°C.

Рисунок 2. Сопоставимость результатов определения антикомплементарной активности методами парциального гемолиза в геле и по кинетике гемолиза. *Staphylococcus aureus*.

субстанциям (обычно это агароза с низким показателем электроэндоосмоса). Те же причины ограничивают использование С1-С5-дефицитных сывороток для тестирования функциональной активности инициальных компонентов комплемента.

Оптимальным вариантом преодоления этих недостатков является, на наш взгляд, проведение реакции в жидкой фазе с регистрацией максимальной скорости лизиса эритроцитов, которая линейно связана с дозой (концентрацией) комплемента в пробе.

Список использованной литературы:

1. Брудастов Ю.А., Дерябин Д.Г. Биологическое значение антикомплемментарной активности бактерий//Журн. микробиол.-1994 (Приложение).- С. 28-32.
2. Брудастов Ю.А., Вальшев А.В., Брудастов А.Н. Антикомплемментарная активность производственного штамма *Bacillus cereus* IP5832 («Бактисубтил») и энтеробактерий при их совместном культивировании// Журн. микробиол. - 1996. - №3. - С.91-93.
3. Бухарин О.В. Персистенция патогенных бактерий./ М.: Медицина; Екатеринбург: УрО РАН. - 1999. - 365 с.
4. Бухарин О.В., Брудастов Ю.А., Дерябин Д.Г.// Клин. лаб. диагностика.- 1992. - № 11-12. - С.68-71.
5. Зейфарт М. Титрование комплемента//Иммунологические методы/под ред. Г. Фримеля, пер. с нем.- М.: Медицина, 1987.- 472 с.
6. Кэбот Е., М.Мейер Экспериментальная иммунохимия.- М.: Мир, 1968.- С.140-246.
7. Лакин Г.Ф. Биометрия// М.: Высш. шк., 1990.- 352с.
8. Халяпин Б. Д., Прокофьев А. А. Кинетический метод количественного определения комплемента //Иммунология.- 1986.- N 3.С. 60-66.
9. Smith H. The revival of interest in mechanisms of bacterial pathogenicity // Biol.Rev.Camb.Philos.Soc. - 1995. - V.70. - N2. - P.277-316
10. Taylor P.W. Bacterial resistance to complement//In J.A.Roth(ed.) Virulence mechanisms of bacterial pathogens. - ASM, Washington, 1988.-P.107-120.