

УДК 579.23+579.22+579.083.13+575.224

**ЭТИОЛОГИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ
И ПЛАЗМИДОЗАВИСИМЫЕ ПРИЗНАКИ ПАТОГЕННОСТИ
CAMPYLOBACTER FETUS SUBSPECIES FETUS В СТРУКТУРЕ
АКУШЕРСКО-ГИНЕКОЛОГИЧЕСКИХ ИНФЕКЦИОННЫХ
ОСЛОЖНЕНИЙ БЕРЕМЕННЫХ**

Я.А. Шихама, Г.Н. Лапина, О.Н. Ильинская, О.К. Поздеев

Аннотация

В работе установлено, что выделенные при акушерско-гинекологических исследованиях изоляты *Campylobacter fetus subsp. fetus* способны к адгезии, вирулентности, обладают лизоцимной активностью и не способны синтезировать гемолизин. Широкое внедрение методов, представленных в работе, позволит своевременно проводить санитарно-гигиенические и профилактические мероприятия, особенно при внутрибольничных инфекциях.

Ключевые слова: *Campylobacter fetus subspecies fetus*, гинекологические инфекции, патогенность, вирулентность.

Введение

В настоящее время меняется представление о природе некоторых заболеваний, ранее считавшихся неинфекционными в медицине и биологии, так как микроорганизмы способны реагировать на изменяющиеся условия экологической ниши. Существуют литературные данные о способности *Campylobacter fetus subsp. fetus* изменять свои свойства в ответ на различные факторы среды. Как и вся живая природа, бактерии и вирусы эволюционируют, но только более стремительными темпами [1, 3–5]. Под действием техногенных факторов меняется характер взаимодействия микроорганизмов с организмом человека или хозяина, что выражается вовлечением в круг патогенных организмов все новых представителей мира микробов, особенно ранее считавшихся условно или оппортунистически патогенными [2, 5]. Чаще встречается длительная персистенция патогенов, обуславливающая стертые, малосимптомные формы микробных воспалительных заболеваний (МВЗ), уровень которых значительно превышает острые формы заболевания [5, 6–8].

Кампилобактеры (*C. fetus*, *C. jejuni*, *C. coli*, *C. rectus*), вызывающие патологию, обладают различными антигенными особенностями и вирулентностью. *Campylobacter* – это один из микроорганизмов, способных к инвазивности, продуцирующий цитотоксические токсины, и до настоящего времени антигенная структура и роль *Campylobacter* недостаточно изучена.

Возбудители МВЗ претерпевают генетическую трансформацию, влияющую на изменение патогенности, резистентности к защитным силам макроорганизма

и лекарственным препаратам. Свидетельством этой изменчивости является смена антигенной структуры микроорганизмов, оказывающая влияние на характер, органотропность и особенности течения инфекционно-воспалительного процесса. Характерная особенность *Campylobacter fetus* как одного из условных патогенов заключается в том, что они способны проявлять плазмидозависимые признаки патогенности, такие, как адгезия, резистентность к следствиям защит макроорганизма, лизоцимной активности, клеточному и гуморальному иммунитету [9–11]. Данных о повышении вирулентности штаммов *Campylobacter fetus*, которые содержат плазмиды, кодирующие одновременно токсигенность и лекарственную резистентность, пока нет. Однако наличие таких штаммов может иметь большое значение, поскольку лекарственная резистентность будет способствовать распространению энтеротоксигенных штаммов *Campylobacter fetus* в среде, в которой используются антибиотики в качестве кормовых добавок или лекарственных препаратов [5, 12–14].

Перечисленные литературные данные несомненно демонстрируют, что этиологическая роль *Campylobacter fetus* в ряде инфекций – плазмидозависимая, и это указывает на то, что нехромосомные генетические материалы определяют способность *Campylobacter fetus* синтезировать адгезивные антигены, энтеротоксины, ферменты агрессии, и другие факторы патогенности.

Цель данного исследования – выявление и изучение свойств патогенности *Campylobacter fetus subsp. fetus* в акушерско-гинекологической практике. В работе была поставлена задача исследовать плазмидозависимые признаки патогенности (вирулентность, адгезивность, кампилобактериоциногенность, лизоцимная активность и чувствительность) штаммов *Campylobacter fetus*, выделенных при различных акушерско-гинекологических заболеваниях.

1. Материалы и методы исследования

Для изучения гемолитических свойств штаммов *Campylobacter fetus* применяли метод выявления гемолитической активности *Campylobacter fetus* на специфической среде, стимулирующей продукцию гемолизина. На чашки с приготовленным 10%-ным кровяным агаром засеивали исследуемую культуру бляшками (6 бляшек на чашку) и инкубировали 18–20 ч при 37 °С. В положительном случае вокруг бляшек образовывались зоны гемолиза, которые обычно свидетельствуют о синтезе гемолизина у исследуемой культуры. Зоны гемолиза измеряли от края бляшки до наружного края зоны. Положительным результатом считали зону размером более 1 мм. В протоколе отмечали ширину зоны гемолиза и характер (полный, неполный гемолиз).

Для изучения адгезивных свойств выделенных штаммов *Campylobacter fetus* применяли реакцию прямой гемагглютинации на стекле в присутствии D-маннозы по методу, предложенному Б.Г. Каральником с соавт. [15].

Для изучения лизоцимной активности выделенных штаммов *Campylobacter fetus* применяли метод посева бляшками, предложенный О.П. Бухариным с соавт. [1] для определения лизоцима и его роли в биологии и медицине.

Для изучения лизоцимного действия применяли метод О.П. Бухарина с соавт. [1]. Готовили 5%-ный и 15%-ный растворы лизоцима. Использовали свежие культуры полученных нами штаммов кампилобактеров от женщин с раз-

личными гинекологическими заболеваниями (эрозия шейки матки, гестоз, мертворождения и др.), которые суспендировали в пробирке с лизоцимом. Пробирки инкубировали в термостате при 37 °С в течение 30, 60 и 120 мин.

Вирулентность выделенных штаммов определяли по способности воспринимать краситель Романовского – Гимзы по методике, предложенной Л.В. Григорьевой с соавт. [16].

Для выращивания кампиобактеров использовали 2 среды: кровяной агар (КА) и шоколадный агар (ША). Кровяной агар готовили с использованием крови барана, так как человеческая кровь часто может содержать антитела к *Campylobacter fetus subsp. fetus*. Посев культур проводили внесением 2 капель (0.1 мл) эмульсии на чашки со средами (КА и ША). Посевы культивировали в течение 2–3 сут, инкубация посевов проводилась при температуре 37 °С, влажности 98% и в микроаэрофильных условиях. Для подтверждения роста кампиобактеров были проведены тесты для идентификации выросших колоний и показано, что это *Campylobacter fetus subsp. fetus*. Этот тест указывает на то, что лизоцим как следствие неспецифической иммунной защиты не оказывает бактерицидного или бактериостатического эффекта на *Campylobacter fetus subsp. fetus*.

2. Результаты и их обсуждение

После исследования 52 выделенных штаммов *Campylobacter fetus* было установлено, что они не обладали гемолитическими активностями в 100% случаев.

Патогенное значение оценивалось не только наличием гемолизина у *Campylobacter fetus*, выделенных из систем или органов, поскольку этого недостаточно, чтобы сделать заключение об этиологической значимости *Campylobacter fetus* при данных гинекологических заболеваниях во время беременности. Поэтому определяли другие признаки патогенности: адгезивность, фермент агрессивности (лизоцимная активность), вирулентность.

Способность к адгезии – признак бактерий, имеющий важное значение в процессе специфического прикрепления патогенных агентов на поверхности клетки хозяина и в осуществлении первых этапов инфекционных осложнений. Адгезивность способствует механическим и физиологическим повреждениям клеточной мембраны, что ведет к повышению степени инфицирования организма в целом. Важно, что при преодолении мембраны и проникновении вовнутрь клетки *Campylobacter fetus* может содействовать попаданию других высокопатогенных микроорганизмов в кровоток и осуществлению внутриклеточных инфекций.

Результаты определения адгезивных свойств выделенных штаммов *Campylobacter fetus* указывают на высокую агглютинативную активность в присутствии D-маннозы в 90% случаев (табл. 1).

Исследование действия лизоцима на *Campylobacter fetus fetus* показывает, что после обработки лизоцимом на 3-и сутки появляется рост типичных колоний кампиобактеров почти на всех чашках $10^4 - 10^6$ КОЕ (табл. 2).

Для подтверждения роста кампиобактеров были проведены тесты для идентификации полученных штаммов и было показано, что это *Campylobacter fetus subsp. fetus*. Эти тесты указывали на то, что лизоцим как следствие неспецифической иммунной защиты не оказывал бактерицидный или статистический эффект на *Campylobacter fetus subsp. fetus*.

Табл. 1

Адгезивность штаммов *Campylobacter fetus fetus* в зависимости от нозологии

Нозология	Общее количество штаммов	Количество адгезивных штаммов	% адгезивных штаммов
ХФПН (хроническая фетоплацентарная недостаточность)	16	15	94
Гестоз	5	5	100
ВУИ (внутриутробные инфекции)	6	6	100
Бесплодие	0	0	0
Мертворожденные	3	3	100
Выкидыш	2	2	100
Роды	20	16	80

Табл. 2

Действие лизоцима на выживаемость выделенных штаммов *C. fetus subsp. fetus in vitro*

Время обработки	30 мин		60 мин		120 мин	
	5%-ный раствор	15%-ный раствор	5%-ный раствор	15%-ный раствор	5%-ный раствор	15%-ный раствор
Количество штаммов, выросших после обработки лизоцимом, из 30 обработанных	30	30	30	28	30	28

Наши результаты показывают, что *Campylobacter fetus subsp. fetus* оказался устойчив к лизоциму в тестах *in vitro*, из чего мы можем предположить, что *Campylobacter fetus subsp. fetus* проявляет такое же свойство *in vivo*. Это дает возможность *Campylobacter fetus subsp. fetus* колонизироваться, размножаться и преодолевать слизи и слизистые поверхности тропных тканей или органов, где затем осуществлять внутриклеточное инфицирование и размножение. В слизи и слизистой оболочке *Campylobacter fetus subsp. fetus* может выделять свойственные ему ферменты (протеазы и липазы), которые негативно и разрушительно действуют на структуру слизистой оболочкой. Разрушение нормальной структуры слизистой оболочкой способствует адгезии и колонизации других патогенных микроорганизмов, таким образом, *Campylobacter fetus subsp. fetus* поддерживает хроническое течение инфекции.

В ходе определения лизоцимной активности выделенных штаммов *Campylobacter fetus subsp. fetus* было показано, что 29 из 30 выделенных штаммов вызывали зоны угнетения роста тестерных штаммов *Micrococcus lysodecticus*.

Полученные данные говорят о том, что нечувствительный к лизоциму макроорганизм *Campylobacter fetus subsp. fetus* способен синтезировать лизоцим, который облегчает передвижение *Campylobacter fetus subsp. fetus* в межклеточном пространстве и проникновение во внутриклеточное пространство.

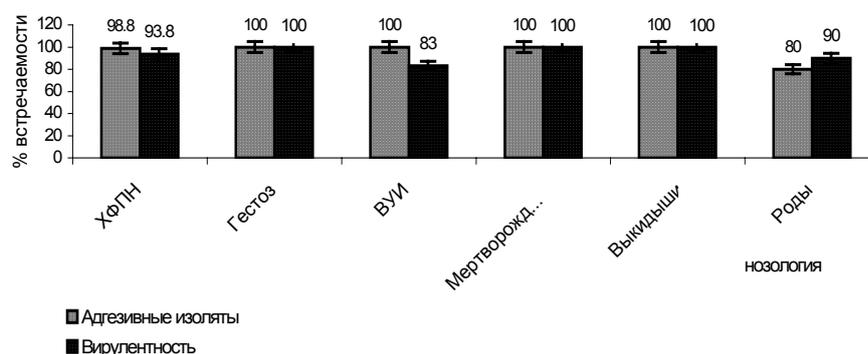


Рис. 1. Частота встречаемости адгезивных изолятов среди выделенных *Campylobacter fetus* и их вирулентность в зависимости от нозологии (среднее \pm стандартная ошибка, $n = 5$)

В целом вирулентность бактерий – это степень патогенности, а патогенность микроорганизмов – это генетически детерминированная способность микроба вызывать инфекционный процесс. Вирулентные штаммы *Campylobacter fetus* могут отличаться от невирулентных высокой скоростью размножения, отчего в их популяции много молодых клеток и большое содержание рибонуклеотидов, что обуславливает высокую базофилию клеток, а потому вирулентные штаммы в живом состоянии более интенсивно адсорбируют анилиновые красители, чем невирулентные. Ранее учеными [16] была установлена связь между активностью дыхательных ферментов (цитохромоксидаза, пероксидаза, каталаза) вирулентных штаммов *Campylobacter fetus* и их способностью энергично окислять анилиновые красители. Это очень хороший метод оценки уровня вирулентности, который заключается в простом определении ферментативной активности патогенных бактерий. На рис. 1 представлены данные по вирулентности, полученные с помощью метода определения ферментативной активности, и оценена степень ее корреляции с адгезивностью выделенных изолятов Кампилобактеров.

Результаты наших исследований указывают на высокий уровень вирулентности выделенных при акушерско-гинекологических заболеваниях штаммов *Campylobacter fetus subsp. fetus*. Из всех выделенных штаммов *Campylobacter fetus subsp. fetus* не чувствительны к лизоциму. Установлена прямая корреляция между исследованными свойствами *Campylobacter fetus subsp. fetus*: штаммы с высокой адгезивностью обладают также высокой лизоцимной активностью и вирулентностью. Все эти свойства позволяют *Campylobacter fetus subsp. fetus* инфицировать и персистировать в репродуктивных органах, особенно во время беременности при сниженном иммунном статусе. Описанные выше плазмидозависимые свойства патогенности *Campylobacter fetus subsp. fetus* обосновывают наше внимательное отношение к кампилобактерам и применение недавно разработанных методов выделения, диагностики и идентификации *Campylobacter fetus subsp. fetus* при различных заболеваниях.

Таким образом, можно сделать вывод, что выделенные штаммы *Campylobacter fetus subsp. fetus* обладают высоким патогенным действием, позволяющим им вызывать инфекции и осложнение у макроорганизма-хозяина.

Campylobacter fetus subsp. fetus показали положительные результаты по способности к адгезии, вирулентности, лизоцимной активности и толерантности к лизоциму и дали отрицательные результаты по способности синтезировать гемолизин. Широкое внедрение вышеуказанных методов позволит своевременно проводить санитарно-гигиенические и профилактические мероприятия, особенно при внутрибольничных инфекциях.

Summary

J. Sheehama, G.N. Lapshina, O.N. Ilinskaya, O.K. Pozdeev. Etiological Role and Plasmids Depending Pathogenicity Factors of *Campylobacter fetus subspecies fetus* in Obstetric-Gynecologic Infectious Complications of Pregnant Women.

The work states that the investigated *Campylobacter fetus subsp. fetus* were capable of adhesiveness, showed virulence, lyzocyme activity and were not capable of synthesizing hemolysin. Wide introduction of the presented methods will allow carrying out timely sanitary-and-hygienic and preventive actions especially at intrahospital infections.

Key words: *Campylobacter fetus subspecies fetus*, Gynecology infections, Pathogenic and virulence.

Литература

1. Бухарин О.В., Васильев Н.В., Усвяцов Б.Я. Лизоцим микроорганизмов. – Томск: Изд-во Том. ун-та, 1985. – 213 с.
2. Бухарин О.В., Усвяцов Б.Я. Бактерионосительство (медико-экологический аспект). – Екатеринбург: УрО РАН, 1996. – 203 с.
3. Бухарин О.В., Гинцбург А.Л., Романова Ю.М., Эль-Регистан Г.И. Механизмы выживания бактерий. – М.: Медицина, 2005. – 366 с.
4. Розенгарт В.И., Шерстобитов О.Е. Избирательная токсичность фосфорорганических инсектоакарицидов. Сравнительно-биохимические аспекты / Под ред. А.П. Бересткина. – Л.: Наука, Ленингр. отд., 1978. – 173 с.
5. Радчука Н.А. Ветеринарная микробиология и иммунология. – М.: Агропромиздат, 1991. – 382 с.
6. Ковалев И.Е., Шипулина Н.В. Иммунохимические механизмы адаптации организма к окружающей среде // Изв. АН СССР. Сер. биол. – 1992. – Т. 400, № 1. – С. 31–41.
7. Гудмундссон С. Значение доплерометрии при ведении беременных с подозрением на внутриутробную задержку развития плода // Ультраз. диаг. в акуш., гинекол. и педиатр. – 1994. – № 1. – С. 15–25.
8. Медведев М.В. Клиническое значение доплерометрического исследования кровотока в маточных артериях при физиологическом и осложненном течении беременности // Акуш. и гин. – 1991. – Т. 111, № 10. – С. 3–6.
9. Blaser M.J., Perez G.P., Smith P.F., Patton C.M., Tenover F.C., Lastovica A.J., Wang W.L. Extra intestinal *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* infections: host factors and strain characteristics // J. Infect. Dis. – 1986. – V. 153, No 21. – P. 552–559.
10. Brooks B.W., Robertson R.H., Lutze-Wallace C.L., Pfahler W. Identification, Characterization, and Variation in Expression of Two Serologically Distinct O-Antigen Epitopes in Lipopolysaccharides of *Campylobacter fetus* Serotype A Strains // Infect. Immun. – 2001. – V. 69, No 8. – P. 7596–7602.
11. Fricker C.R., Park R.W.A. A two year study of the distribution of thermophilic campylobacters in human, environmental and food samples from the Reading area with particular

- reference to toxin production and heat-stable serotype // J. Appl. Bacteriol. – 1989. – V. 66, No 5. – P. 477–490.
12. *Стрижаков А.Н.* Информативность доплерометрии в прогнозировании возникновения гестозов и синдрома задержки развития плода // Акуш. и гин. – 1990. – № 7. – С. 12–15.
 13. *Black R.E., Levine M.M., Clements M.L., Hughes T.P., Blaser M.J.* Experimental *Campylobacter jejuni* infection in humans // J. Infect. Dis. – 1988. – V. 157, No 5. – P. 472–479.
 14. *Оханкин М.Б.* Прогноз позднего гестоза и задержки роста плода по данным доплерометрии // Ультраз. диаг. в акуш., гинекол. и педиатр. – 1993. – № 1. – С. 42–45.
 15. *Каральник Б.Г., Сарбасова Ш.И., Укбаева Т.Д.* Стандартизация определения фимбрий (адгезинов) *Citrobacter* // Лаб. дело. – 1990. – № 2. – С. 46–49.
 16. *Григорьева Л.В., Корчак Г.И., Малахова Л.А.* Использование красок для выявления факторов патогенности эшерихий и сальмонелл // Лаб. дело. – 1992. – № 2. – С. 57–59.

Поступила в редакцию
15.01.08

Шихама Якобс Ангара – аспирант кафедры микробиологии Казанского государственного университета.

E-mail: sheehamajacob@yahoo.com

Лапшина Галина Николаевна – старший преподаватель кафедры микробиологии Казанской государственной медицинской академии.

Ильинская Ольга Николаевна – доктор биологических наук, профессор, заведующий кафедрой микробиологии Казанского государственного университета.

E-mail: Olga.Ilinskaya@ksu.ru

Поздеев Оскар Кимович – доктор биологических наук, профессор, заведующий кафедрой микробиологии Казанского государственного медицинского университета и Казанской государственной медицинской академии.

E-mail: pozdeev@mi.ru