

УСКОРЕННЫЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ «СВОЙ–ЧУЖОЙ» МИКРООРГАНИЗМОВ В РЕАКЦИИ АГГЛЮТИНАЦИИ

О.В. Бухарин, Н.Б. Перунова, И.Н. Чайникова, Е.В. Иванова, С.В. Андриющенко

Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН, ФГБУН Оренбургский федеральный исследовательский центр УрО РАН, г. Оренбург, Россия

Резюме. Предложен простой ускоренный метод определения «свой–чужой» микроорганизмов в реакции агглютинации (РА) лечебно-профилактической сывороткой отечественного производства (КИП, лиофилизат иммуноглобулинов IgG, IgA, IgM, разработанный ЗАО «Иммуно-Гем», Москва), тестируемых патогенных, условно-патогенных и доминантных бифидобактерий пробиотического ряда. Параллельно все изученные культуры, зарегистрированные в базах отечественных и международных коллекций, были протестированы методом межмикробного распознавания «свой–чужой», ранее разработанным нами. Было протестировано 16 коллекционных штаммов различных микроорганизмов в РА с указанной лечебно-профилактической сывороткой. Материалом для исследования послужили коллекционные штаммы бактерий *Bifidobacterium bifidum* 791, *Escherichia coli* ЛЭГМ-18, *Klebsiella pneumoniae* 278, *Lactobacillus fermentum* 90Т-С4, *Bifidobacterium longum* МС-42, *Escherichia coli* М-17, *Shigella sonnei* 1776, *Shigella flexneri* 170, *Escherichia coli* 157, *Staphylococcus aureus* 209, *Candida albicans* 10231 и *Salmonella* серовар Enteritidis ATCC 10708. Также в работе были использованы культуры из музея ИКВС УрО РАН, *Bifidobacterium longum* ICIS-505, *Lactobacillus acidophilus* ICIS-1127, *Bifidobacterium bifidum* ICIS-202, *Bifidobacterium bifidum* ICIS-310. Для оценки чужеродности пептидогликана микроорганизмов был также использован метод межмикробного распознавания «свой–чужой» на основе индукции метаболитов тест-штамма *Bifidobacterium longum* МС-42 как «доминанта», путем предварительного соинкубирования с метаболитами исследуемых культур («ассоциантов») и формирования обратной связи в паре «доминант–ассоциант». Оценка результата проводилась по изменению параметров репродукции (рост/размножение) и адаптации (образование биопленок и антилизозимный тест) микробных культур в соответствии с описанной методикой, после чего производилось сравнение результатов, полученных с использованием этих двух методов микробного распознавания «свой–чужой». Все полученные результаты в РА полностью совпадали с результатами исследований, проведенных ранее методом межмикробного распознавания «свой–чужой» в паре «доминант–ассоциант». Если к этому добавить простоту постановки РА и затраченное на получение результата время (1 сутки против 5 суток при межмикробном распознавании), то РА становится более предпочтительным методом для скрининговых исследований по отбору штаммов для научных и производственных целей.

Ключевые слова: персистенция, пептидогликан, метод определения «свой–чужой», реакция агглютинации.

Адрес для переписки:

Перунова Наталья Борисовна
460000, Россия, Оренбург, ул. Пионерская, 11,
Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН.
Тел.: 8 922 555-30-80.
E-mail: perunovanb@gmail.com

Contacts:

Natalia B. Perunova
460000, Russian Federation, Orenburg, Pionerskaya str., 11,
Institute of Cellular and Intracellular Symbiosis UB RAS.
Phone: +7 922 555-30-80.
E-mail: perunovanb@gmail.com

Библиографическое описание:

Бухарин О.В., Перунова Н.Б., Чайникова И.Н., Иванова Е.В., Андриющенко С.В. Ускоренный метод определения «свой–чужой» микроорганизмов в реакции агглютинации // Инфекция и иммунитет. 2020. Т. 10, № 4. С. 792–796. doi: 10.15789/2220-7619-AAM-1482

Citation:

Bukharin O.V., Perunova N.B., Chainikova I.N., Ivanova E.V., Andryushchenko S.V. An accelerated method for determining «self/non-self» microorganisms in the agglutination reaction // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2020, vol. 10, no. 4, pp. 792–796. doi: 10.15789/2220-7619-AAM-1482

Работа выполнена при грантовой поддержке фундаментальных исследований по Программе УрО РАН «Фундаментальные науки – медицине», проект № 18-7-8-34.

© Бухарин О.В. и соавт., 2020

DOI: <http://dx.doi.org/10.15789/2220-7619-AAM-1482>

AN ACCELERATED METHOD FOR DETERMINING «SELF/NON-SELF» MICROORGANISMS IN THE AGGLUTINATION REACTION

Bukharin O.V., Perunova N.B., Chainikova I.N., Ivanova E.V., Andryushchenko S.V.

Institute of Cellular and Intracellular Symbiosis, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Orenburg, Russian Federation

Abstract. A simple accelerated method for determining «self/non-self» microorganisms by using the agglutination reaction (RA) and therapeutic/prophylactic serum (Immunoglobulin complex preparation, lyophilized IgG, IgA, IgM immunoglobulins, developed by CSC Immuno-Gem, Moscow) is proposed to test for pathogenic, opportunistic and dominant probiotic *Bifidobacteria* spp. In parallel, all the microbial cell cultures examined were registered in the databases of Russia-wide and international collections and tested by the intermicrobial “self/non-self” recognition method, previously developed by us. 16 collection strains of various microorganisms were assessed by the RA with relevant therapeutic and prophylactic serum. Biological samples were obtained from the collection bacterial strains of *Bifidobacterium bifidum* 791, *Escherichia coli* LEGM-18, *Klebsiella pneumoniae* 278, *Lactobacillus fermentum* 90T-C4, *Bifidobacterium longum* MC-42, *Escherichia coli* M-17, *Shigella sonnei* 177b, *Shigella flexneri* 170, *Escherichia coli* 157, *Staphylococcus aureus* 209, *Candida albicans* 10231 and *Salmonella* serovar Enteritidis ATCC 10708. In addition, cell cultures obtained from the Museum of the Institute of Cellular and Intracellular Symbiosis UB RAS such as *Bifidobacterium longum* ICIS-505, *Lactobacillus acidophilus* ICIS-1127, *Bifidobacterium bifidum* ICIS-202, *Bifidobacterium bifidum* ICIS-310 were also included into the study. To assess microbial peptidoglycan foreignness, the intermicrobial “self/non-self” recognition method was also used based on inducing metabolites produced by the “dominant” test strain *Bifidobacterium longum* MC-42 after pre-incubation with metabolites collected from the studied cell cultures (“associates”) followed by established “dominant–associate” feedback loop. The data were evaluated by assessing change-fold in reproduction (growth/replication) and adaptation (biofilm formation and anti-lysozyme test) of microbial cultures in accordance with the described technique followed by comparing these two methods for intermicrobial “self/non-self” recognition. All the RA data were found to fully agree with those obtained after previous studies by using intermicrobial “self/non-self” recognition method coupled to “dominant–associate” system. Moreover, compared to analogous “intermicrobial recognition” method (5 days), ease of use and test timeframe (24 hours) allow to consider RA attractive for screening studies to select strains for scientific and industrial purposes.

Key words: persistence, peptidoglycan, «self/non-self» determination method, agglutination reaction.

Введение

В инфектологии персистенция микроорганизмов (длительное присутствие патогена в организме хозяина) рассматривается как форма симбиоза про- и эукариотических клеток. При изучении состава клеточной стенки бактерий (как грамположительных, так и грамотрицательных) был определен пептидогликан (ПГ), отсутствующий в эукариотических клетках хозяина. Логично напрашивался вывод, что ПГ, имеющийся у прокариот и отсутствующий у эукариот, может рассматриваться в качестве «биомишени» — мощного раздражителя иммунной системы хозяина [3].

Также были описаны механизмы защиты микробного ПГ от обнаруживающей его иммунной системы организма, такие как экранирование клеточной стенки бактерий (наличие капсулы), секреторные факторы персистенции, потеря ПГ (L-формы бактерий), «антигенная мимикрия» (схожесть детерминант паразита и хозяина). Не исключены и другие механизмы защиты (сохранения ПГ) микробных клеток в организме хозяина [1]: модификация ПГ для обеспечения устойчивости бифидобактерий к природному «антисептику» хозяина — лизоциму [10]; метаболическая сегрегация микроорганизмов.

Все это открывает перспективу в изучении новых механизмов персистенции бифидофлоры [9]. Проблема наличия ПГ в бактериях еще более остро встает при отборе штаммов для создания новых комплексных препаратов пробиотического ряда. Если также учесть, что различные механизмы защиты ПГ у бактерий активно изучаются в последнее время, то приходится лишь сожалеть о том, сколько еще природоподобных технологий не создано, в то время как «инфекционная симбиология» — это базовая платформа для решения подобных вопросов [2, 8].

Разработка нового ускоренного метода определения «свой–чужой» имеет прямое отношение к обозначенной проблеме: как отличить «свои» микроорганизмы от «чужих»? А ведь на этом основано создание новых микробных композиций пробиотического ряда.

Материалы и методы

Материалом для исследования послужили штаммы бактерий Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов НИЦ «Курчатовский институт» — ГосНИИгенетика (*Bifidobacterium bifidum* 791, *Escherichia coli* ЛЭГМ-18), отечественной коллекции ГИСК им. Л.А. Тарасевича (*Klebsiella pneumoniae* 278, *Lactobacillus fermentum*

90Т-С4, *Bifidobacterium longum* МС-42, *Escherichia coli* М-17, *Shigella sonnei* 1776, *Shigella flexneri* 170, *Escherichia coli* 157, *Staphylococcus aureus* 209) и коллекции АТСС (*Candida albicans* 10231 и *Salmonella* серовар Enteritidis АТСС 10708). Также в работе были использованы культуры из музея ИКВС УрО РАН, депонированные в ГКНМ ФБУН «Московский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Габричевского» Роспотребнадзора [*Bifidobacterium longum* ICIS-505 (ГКНМ № 1260), *Lactobacillus acidophilus* ICIS-1127 (ГКНМ № 1274), *Bifidobacterium bifidum* ICIS-202 (ГКНМ № 1257), *Bifidobacterium bifidum* ICIS-310 (ГКНМ № 1258)] [5, 6, 7]. Для проведения агглютинации из исследуемых 12–24-часовых агаровых культур были подготовлены бактериальные взвеси на физиологическом растворе хлорида натрия (3 McF, 1,2 × 10⁹ КОЕ/мл).

Для оценки иммунологической активности штаммов был использован комплексный иммуноглобулиновый препарат (КИП) (ЗАО «Иммуно-Гем», Москва), содержащий в своем составе иммуноглобулины классов А, М, G.

Реакцию агглютинации проводили в иммунологических 96-луночных круглодонных стерильных планшетах. С этой целью в каждом ряду лунок готовили двукратные серийные разведения препаратов иммуноглобулинов в физиологическом растворе от 1:2 до 1:1024. Затем в каждую лунку вносили по 0,05 мл (одна капля) взвеси тестируемых микроорганизмов. В качестве контроля использовали цельный раствор препарата иммуноглобулинов и физиологический раствор с исследуемой взвесью микроорганизмов. После встряхивания планшеты помещали в термостат с температурой 37°C на 60 мин, затем 12–15 ч выдерживали при 4°C в холодильнике (для более четкого прочтения результата), после чего оценивали результаты агглютинации. Все реакции агглютинации проводились в дублях в трех независимых исследованиях.

Для оценки чужеродности пептидогликана микроорганизмов был также использован метод межмикробного распознавания «свой–чужой» на основе индукции метаболитов тест-штамма

Таблица. Сравнительная оценка определения «свой–чужой» микробных культур по степени их чужеродности методом межмикробного распознавания в паре «доминант–ассоциант» и предлагаемым ускоренным методом в реакции агглютинации

Table. A comparative assessment of the definition of «self/non-self» of microbial cultures by the degree of their foreignness by the method of intermicrobial recognition in a pair of «dominant–associate» and the proposed accelerated method in the agglutination reaction

Вид микроорганизмов Microbial species	Титр агглютинации в РА Agglutination titer in RA	Результат «свой–чужой» “Self/non-self” recognition	
		РА RA	в паре «доминант–ассоциант» in “dominant–associate” system
<i>B. longum</i> МС-42	ЦС/WS	«свой»/“self”	«свой»/“self”
<i>B. longum</i> ICIS-505	ЦС/WS	«свой»/“self”	«свой»/“self”
<i>B. bifidum</i> 791	ЦС/WS	«свой»/“self”	«свой»/“self”
<i>B. bifidum</i> ICIS-310	ЦС/WS	«свой»/“self”	«свой»/“self”
<i>B. bifidum</i> ICIS-202	ЦС/WS	«свой»/“self”	«свой»/“self”
<i>L. acidophilus</i> ICIS-1127	1:2	«свой»/“self”	«свой»/“self”
<i>L. fermentum</i> 90 ТС-4	1:4	«свой»/“self”	«свой»/“self”
<i>E. coli</i> ЛЭГМ-18	1:4	«свой»/“self”	«свой»/“self”
<i>E. coli</i> 157	1:64	«чужой»/“non-self”	«чужой»/“non-self”
<i>K. pneumoniae</i> ICIS-278	1:64	«чужой»/“non-self”	«чужой»/“non-self”
<i>S. aureus</i> 209	1:128	«чужой»/“non-self”	«чужой»/“non-self”
<i>Salmonella</i> Enteritidis АТСС 10708	1:64	«чужой»/“non-self”	«чужой»/“non-self”
<i>E. coli</i> М-17	1:1024	«чужой»/“non-self”	«чужой»/“non-self”
<i>S. sonnei</i> 1776	1:1024	«чужой»/“non-self”	«чужой»/“non-self”
<i>S. flexneri</i> 170	1:1024	«чужой»/“non-self”	«чужой»/“non-self”
<i>C. albicans</i> АТСС 10231	1:1024	«чужой»/“non-self”	«чужой»/“non-self”

Примечание: ЦС — цельная (не разведенная) сыворотка; РА — реакция агглютинации.

Note: WS — whole (undiluted) serum; RA — agglutination reaction.

Bifidobacterium longum MC-42 как «доминанта», путем предварительного соинкубирования с метаболитами исследуемых культур («ассоциантов») и формированием обратной связи в паре «доминант–ассоциант» [4]. Оценка результата проводилась по изменению параметров репродукции (рост/размножение) и адаптации (образование биопленок и антилизоцимный тест) микробных культур в соответствии с описанной методикой, после чего производилось сравнение полученных результатов с использованием обоих методов микробного распознавания «свой–чужой».

Результаты

Результаты проведенной работы суммированы в таблице. Как и следовало ожидать, РА всех тестируемых штаммов была выявлена у всех культур с цельной сывороткой (не разведенной), поскольку все исследованные микроорганизмы (независимо от того, «свои» они или «чужие») имели ПГ, то есть ту «биомишень», которая их характеризует. Не трудно видеть, что штаммы нормофлоры, как правило, агглютинировались с цельной сывороткой (ЦС) либо укладывались в рабочее разведение сыворотки 1:2–1:4. Эти штаммы были отнесены в РА к «своим», что очень хорошо согласовывалось с оценкой реакции межмикробного распознавания «свой–чужой» в паре «доминант–ассоциант». Предельно минимальный агглютинационный титр (ЦС 1:2–1:4) имели 8 штаммов: *B. longum* MC-42, *B. longum* ICIS-505, *B. bifidum* 791, *B. bifidum* ICIS-310, *B. bifidum* ICIS-202, *L. acidophilus* ICIS-1127, *L. fermentum* 90 TC-4, *E. coli* ЛЭГМ-18. Результаты оценки этих штаммов, которые отби-

раются для пробиотических композиций, очень важны, и они все оказались в группе «своих».

Иная картина складывалась у бактерий, отнесенных к «чужим». Эти микроорганизмы четко выявили свои количественно-качественные «претензии» к иммунной системе хозяина, продемонстрировав это своими агглютинационными титрами, которые колебались в более широких пределах титров — от 1:16 до 1:1024 — с той же самой сывороткой, отражая явную «чужеродность» тестируемых штаммов.

Обсуждение

В заключение следует отметить, что проблема определения «своих» и «чужих» микроорганизмов весьма сложна, и детали этого определения выяснены еще не до конца. Четкое разделение «своих» и «чужих» микроорганизмов для иммунной системы хозяина даже для авторов работы было несколько неожиданным. Не исключено, что улучшение биотехнологических препаратов (хорошо очищенная иммуноглобулиновая сыворотка отечественного производства) во многом способствовало получению четких и однозначных результатов. Следует отметить и еще одно важное преимущество описанного «старого» метода РА. Это выигрыш и во времени, и в затратах. Для оценки и постановки РА для указанных целей достаточно 1 дня, тогда как для разработанного нами метода межмикробного распознавания «свой–чужой» необходимо 5 суток.

Отмеченные особенности дают основание рекомендовать этот ускоренный метод постановки РА для получения быстрого ответа в предварительной оценке «свой–чужой» в научных и производственных целях.

Список литературы/References

1. Андриященко С.В., Перунова Н.Б., Бухарин О.В. Молекулярные механизмы взаимодействия бактерий с лизоцимом и их роль в микросимбиозе // Успехи современной биологии. 2015. Т. 135, № 5. С. 453–463. [Andryuschenko S.V., Perunova N.B., Bukharin O.V. Molecular mechanisms of bacterial interaction with lysozyme and their role in microbiocenosis. *Uspehi sovremennoj biologii = Biology Bulletin Reviews*, 2015, vol. 135, no. 5, pp. 453–463. (In Russ.)]
2. Бухарин О.В. Инфекционная симбиология — новое понимание старых проблем // Вестник РАН. 2016. Т. 86, № 10. С. 915–920. [Bukharin O.V. Infectious symbiology: a new understanding of old problems. *Vestnik Rossiiskoi akademii nauk = Herald of the Russian Academy of Sciences*, 2016, vol. 86, pp. 396–401. doi: 10.7868/S0869587316070033 (In Russ.)]
3. Бухарин О.В. Персистенция патогенных бактерий. М.: Медицина, 1999. 365 с. [Bukharin O.V. Persistence of bacterial pathogens. *Moscow: Medicine*, 1999. 365 p. (In Russ.)]
4. Бухарин О.В., Перунова Н.Б. Феномен микробного распознавания как медико-биологическая проблема. В кн.: Микросимбиоз. Екатеринбург: УрО РАН, 2014. С. 181–217. [Bukharin O.V., Perunova N.B. Microbial recognition phenomenon as medico-biological problem. In: *Microsymbiogenesis. Ekaterinburg: UrO RAN*, 2014, pp. 181–217. (In Russ.)]
5. Andryuschenko S.V., Ivanova E.V., Perunova N.B., Bukharin O.V. Genome sequence and biochemical properties of *Bifidobacterium longum* strain ICIS-505, isolated from the intestine of a healthy woman. *Microbiol. Recour. Announc.*, 2019, vol. 8, no. 33, pp. e00491–19. doi: 10.1128/MRA.00491-19
6. Andryuschenko S.V., Ivanova E.V., Perunova N.B., Zdvizhkova I.A., Bekpergenova A.V., Bukharin O.V. Draft genome sequence of *Bifidobacterium bifidum* strain ICIS 310 Isolated from a feces of a healthy 5-year-old child from Orenburg. *Microbiol. Recour. Announc.*, 2018, vol. 7, no. 18, pp. e01271–18. doi: 10.1128/MRA.01271–18
7. Andryuschenko S.V., Zdvizhkova I.A., Perunova N.B., Bukharin O.V. Draft genome sequence of *Klebsiella pneumoniae* strain ICIS-278_PBV, isolated from the feces of a healthy 59-year-old man from Orenburg, Russia. *Genome Announc.*, 2018, vol. 6, no. 27, pp. e00576–18. doi: 10.1128/genomeA.00576-18.

8. Bukharin O.V. Adaptive strategies of pathogen–host interrelationships under infection. *Her. Russ. Acad. Sci.*, 2018, vol. 88, no. 4, pp. 294–299. doi:10.1134/S1019331618040020
9. Lilja E.E., Johnson D.R. Segregating metabolic processes into different microbial cells accelerates the consumption of inhibitory substrates. *ISME J.*, 2016, vol. 10, no. 7, pp. 1568–1578. doi: 10.1038/ismej.2015.243
10. Sakurai T., Hashikura N., Minami J., Yamada A., Odamaki T., Xiao J.Z. Tolerance mechanisms of human-residential bifidobacterial against lysozyme. *Anaerobe*, 2017, no. 47, pp. 104–110. doi:10.1016/j.anaerobe.2017.05.001

Авторы:

Бухарин О.В., академик РАН, д.м.н., профессор, главный научный сотрудник Института клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН, ФГБУН Оренбургский федеральный исследовательский центр УрО РАН, г. Оренбург, Россия;

Перунова Н.Б., д.м.н., профессор РАН, ведущий научный сотрудник (с исполнением обязанностей зав. лабораторией) лаборатории биомониторинга и молекулярно-генетических исследований Института клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН, ФГБУН Оренбургский федеральный исследовательский центр УрО РАН, г. Оренбург, Россия;

Чайникова И.Н., д.м.н., профессор, ведущий научный сотрудник лаборатории биомониторинга и молекулярно-генетических исследований Института клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН, ФГБУН Оренбургский федеральный исследовательский центр УрО РАН, г. Оренбург, Россия;

Иванова Е.В., д.м.н., доцент, ведущий научный сотрудник лаборатории биомониторинга и молекулярно-генетических исследований Института клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН, ФГБУН Оренбургский федеральный исследовательский центр УрО РАН, г. Оренбург, Россия;

Андрющенко С.В., к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории биомониторинга и молекулярно-генетических исследований Института клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН, ФГБУН Оренбургский федеральный исследовательский центр УрО РАН, г. Оренбург, Россия.

Authors:

Bukharin O.V., RAS Full Member, PhD, MD (Medicine), Head Researcher, Institute of Cellular and Intracellular Symbiosis, Orenburg Federal Research Center, Ural Branch of RAS, Orenburg, Russian Federation;

Perunova N.B., PhD, MD (Medicine), Professor of RAS, Leading Researcher (with the Duties of the Head of the Laboratory), Biomonitoring and Molecular Genetic Research Laboratory, Institute of Cellular and Intracellular Symbiosis, Orenburg Federal Research Center, Ural Branch of RAS, Orenburg, Russian Federation;

Chainikova I.N., PhD, MD (Medicine), Professor, Leading Researcher, Biomonitoring and Molecular Genetic Research Laboratory, Institute of Cellular and Intracellular Symbiosis, Orenburg Federal Research Center, Ural Branch of RAS, Orenburg, Russian Federation;

Ivanova E.V., PhD, MD (Medicine), Associate Professor, Leading Researcher, Biomonitoring and Molecular Genetic Research Laboratory, Institute of Cellular and Intracellular Symbiosis, Orenburg Federal Research Center, Ural Branch of RAS, Orenburg, Russian Federation;

Andryushchenko S.V., PhD (Medicine), Senior Researcher, Biomonitoring and Molecular Genetic Research Laboratory, Institute of Cellular and Intracellular Symbiosis, Orenburg Federal Research Center, Ural Branch of RAS, Orenburg, Russian Federation.