МИКРОБИОЛОГИЯ/MICROBIOLOGY

DOI: https://doi.org/10.23670/IRJ.2023.138.177

АДГЕЗИВНАЯ АКТИВНОСТЬ КЛИНИЧЕСКИХ ИЗОЛЯТОВ МИКРООРГАНИЗМОВ, СЕРОПОЗИТИВНЫХ К ТОКСОКАРАМ ЛИЦ В УСЛОВИЯХ IN VITRO

Научная статья

Канина И.В.[1, *]

[1] ORCID : 0000-0002-8419-1697;

[1] Рязанский государственный медицинский университет, Рязань, Российская Федерация

* Корреспондирующий автор (kanina.irina1987[at]yandex.ru)

Аннотация

Поверхность личинок некоторых гельминтов, обладая большой адсорбционной площадью, может служить одним из факторов накопления и персистенции микроорганизмов в организме хозяина с одной стороны. С другой стороны, высокоадгезивные свойства штаммов способствуют скоплению микроорганизмов на поверхности личинки, что также может послужить дополнительным этиологическим фактором развития инфекционного патологического процесса. В исследовании проводили оценку индексов первичной адгезии штаммов к личинкам нематод Toxocara canis, выделенных от серопозитивных к токсокарам лиц (anti-Toxocara IgG+). Результаты опыта показали высокоадгезивную активность клинических изолятов штаммов, выделенных от пациентов серопозитивных по токсокарозу.

Ключевые слова: токсокароз, адгезивная активность, индекс адгезии, инокуляция.

ADHESIVE ACTIVITY OF CLINICAL MICROBIAL ISOLATES OF MICROORGANISMS OF INDIVIDUALS SEROPOSITIVE TO TOXOCARIASIS UNDER IN VITRO CONDITIONS

Research article

Kanina I.V.[1, *]

[1] ORCID : 0000-0002-8419-1697;

[1] Ryazan State Medical University, Ryazan, Russian Federation

* Corresponding author (kanina.irina1987[at]yandex.ru)

Abstract

The surface of the larvae of some helminths, possessing a large adsorption area, can serve as one of the factors of accumulation and persistence of microorganisms in the host organism on the one hand. On the other hand, the highly adhesive properties of strains contribute to the accumulation of microorganisms on the surface of the larva, which may also serve as an additional etiological factor in the development of infectious pathological process. In the study, the primary adhesion indices of strains to Toxocara canis nematode larvae isolated from Toxocara seropositive individuals (Apti-Toxocara IgG+) were evaluated. The results of the experiment showed highly adhesive activity of clinical isolates of strains isolated from toxocarosis seropositive patients.

Keywords: toxocarosis, adhesive activity, adhesion index, inoculation.

Введение

Инвазирование организма человека паразитическими нематодами происходит, главным образом, при попадании инвазионных яиц с частичками почвы, контаминированной растительной пищей или с шерстью поражённых домашних животных [3], [4]. В макроорганизме гельминты претерпевают ряд изменений в ходе которых формируется инвазионная личинка, способная к миграции в тканях и с током крови [4], [5]. Пищеварительный тракт считается крупнейшим резервуаром бактерий, плотность которых увеличивается от проксимальных отделов к дистальным [6], [9]. В результате паразитарной инвазии, напрямую или опосредованно через влияние на регуляторные звенья иммунной системы, происходит изменение бактериального сообщества кишечника [6], [7], [9]. Личинки некоторых гельминтов, мигрируя с током крови, способны адсорбировать на поверхности микроворсинок кутикулы или в пределах своего организма бактерии в виде скоплений [2], [10]. Резервирование микроорганизмов личинками и их транспорт в отдалённые от места патологического процесса органы и ткани может способствовать качественным и количественным изменениям микробного сообщества биотопов последних, с развитием инаппарантных форм инфекционно-инвазионного процесса у человека. В организме животных происходит инокуляция стенок кишечника хозяина патогенными и условнопатогенными микроорганизмами, при условии их адсорбции на поверхности личиночной формы нематоды, что приводит к развитию острых септических состояний [10].

Изучение явления персистенции патогенных микроорганизмов в личинках мигрирующих нематод осуществлялось только в рамках ветеринарной микробиологии [1], [2], [8], [10]. Третьяков А.М. констатировал факт так называемого «микробного носительства» некоторыми возбудителями паразитарных инвазий, что способствует дальнейшей реализации их персистенции в макроорганизме. Элементы накопления микроорганизмов в складках эпикутикулы и пищеварительной системе нематод при их миграции с током крови могут расцениваться как этиологические факторы возникновения инфекционных заболеваний [1]. Моделирование процесса адгезии микроорганизмов и грибов на поверхности личинок нематод ранее не проводилось.

Цель исследования – Изучение адгезивных свойств клинических изолятов *S.aureus* и грибов рода *Candida*, выделенных от серопозитивных к T.canis лиц, по отношению к биологическому субстрату в условиях invitro.

Методы и принципы исследования

Исследования проводились на базе научной лаборатории кафедры микробиологии ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России. В качестве материала использовали различные культуры микроорганизмов, выделенные от обследуемых с anti-Toxocara IgG+: коагулазопозитивные *S.aureus*, грибы рода *Candida*.

В качестве биологического субстрата применяли живые личинки нематоды Toxocara canis III стадии. Личинки гельминтов получали после длительного культивирования инвазионных яиц в питательном субстрате с ежедневным контролем их жизнеспособности [11].

Из суточной бульонной культуры, полученной на скошенном питательном агаре, смывали 5 мл инокулята забуференным физиологическим раствором (0,15 М) с последующим двухкратным центрифугированием при 1500 об/мин (RCF= 314g) в течение 10 минут. Далее готовили суспензию бактерий, количество которых составляло $2x10^9$ КОЕ/мл по стандарту оптической мутности 0,5 Мак-Фарланда (1 ЕД McF по стандарту мутности McFarland); грибов рода Candida — 10^5 КОЕ/мл.

Иммобилизацию бактерий на поверхности личинок осуществляли в асептических условиях. Для этого в стерильных центрифужных пробирках смешивали взвесь личинок и исследуемых штаммов в эквивалентном объёме: 0,5 мл инокулюма и 0,5 мл взвеси личинок с последующим инкубированием образцов в условиях термостата при 37^0С в течение 30 минут, 1 и 2 часов (образец №1, №2, №3).

В качестве контроля использовали нативную суспензию личинок в физиологическом растворе.

По истечении времени инкубации образцов освобождали смесь от неиммобилизированных микроорганизмов трёхкратным центрифугированием в буферном растворе при величине RCF= 50g (600 об/мин) в течение 10 минут. В асептических условиях по 1 мл полученного супернатанта каждого образца вносили в чашки Петри, равномерно заливали расплавленным и остуженным питательным агаром. Аналогичные манипуляции проводили с использованием среды Сабуро для культивирования дрожжеподобных грибов рода Candida. Для получения статистически достоверных результатов каждый опыт повторяли трёхкратно. Посевы инкубировали в условиях термостата при 37 ^{0}С с учётом питательных потребностей, также в обычных условиях при комнатной температуре — для дрожжеподобных грибов.

Макроскопическое изучение колоний осуществляли при помощи стереомикроскопа МБС-10М с определением их количества, выраженного в колониеобразующих единицах на 1 мл (КОЕ/мл). В контрольных образцах роста выявлено не было. Полученные данные переводили в десятичные логарифмы степени микробной адгезии и рассчитывали индекс адгезии для каждого тест-штамма согласно методике, предложенной В. Н. Царёвым с некоторыми модификациями [13]:

$$Ia= lgA/lgN,$$

где **Ia** – индекс первичной адгезии; **A** – количество бактерий, адсорбированных на субстрате; **N** – исходное количество бактерий смеси (10^9). Далее формировали собственную шкалу показателей адгезии. Уровни адгезии отдельных штаммов бактерий (грибов) условно дифференцировали на 4 степени активности: неадгезивные (Ia=0); низкоадгезивную (Ia=0,25-0,93); среднеадгезивную (Ia = 1,02-1,29); высокоадгезивную (Ia = 1,31-1,75).

Статистический анализ проводился с использованием программы StatTech v. 3.1.8 (разработчик – ООО "Статтех", Россия). Достоверность различия показателей оценивали в соответствии с t-критерием Стьюдента, при $P < 0,05$.

Основные результаты

Степень адгезии оценивали индексом адгезии, полученным при вычислении частного от среднего количества бактерий адсорбировавшихся на субстрате, и количества бактерий не прикрепившихся к нему. Неадгезивными считали штаммы с индексом адгезии Ia = 0, низкоадгезивными – Ia =0,25-0,93; среднеадгезивными с Ia = 1,02-1,29; высокоадгезивными при Ia = 1,31-1,75. В ходе исследования адгезивных свойств изучаемых культур (12 штаммов), были выявлены различия в адгезивной способности штаммов бактерий и грибов рода Candida в зависимости от времени экспозиции инкубационной смеси. Результаты исследования представлены в таблице 1.

Таблица 1 - Показатели адгезии испытуемых образцов

DOI: https://doi.org/10.23670/IRJ.2023.138.177.1

Время экспозиции взвеси при t 37^0С	*Грибы рода Candida, M±m*	*Staphylococcus spp., M±m*
Контроль	Отсутствие роста	Отсутствие роста
30 мин	Отсутствие роста	Единичные колонии
1 час	0,8±0,09**	1,09±0,07
2 часа	1,33±0,03*	1,32±0,09*

*Примечание: * — показатели адгезии достоверно выше по сравнению с образцами при 60 мин экспозицией, (P < 0,05)-t-критерий Стьюдента для связанных совокупностей; ** — показатели адгезии грибов рода Candida достоверно ниже по сравнению с образцами стафилококков при 60 мин экспозиции*

Адсорбция микроорганизмов на поверхности личинок происходит за счёт ионного и электростатического взаимодействия. Такой способ иммобилизации наиболее оптимален для живых клеток [12]. Согласно полученным результатам, степень адгезивной способности микроорганизмов изменяется при увеличении времени экспозиции, при

котором происходит взаимодействие между субстратом (личинкой) и микроорганизмами. Ввиду короткого времени экспозиции инкубационной смеси, в образцах под №1 выявлялись наименьшие показатели адгезии или адгезия не выявлялась.

Средние показатели адгезии *Staphylococcus spp.* при инкубации смеси в течение 1 и 2 часов составили 1,09±0,07 и 1,32±0,09 условных единиц соответственно. Выявлено статистически значимое изменение значений показателей адгезии штаммов к различным образцам в соответствии с временем экспозиции, что указано в таблицах 1-2 (P < 0,05).

Таблица 2 - Результаты корреляционного анализа взаимосвязи показателей адгезии Staphylococcus spp

DOI: https://doi.org/10.23670/IRJ.2023.138.177.2

Показатель	Характеристика корреляционной связи		
	P	Теснота связи по шкале Чеддока	p
Staph. 1 час – Staph. 2 часа	0,641	Заметная	0,025

*Примечание: * – различия показателей статистически значимы (p < 0,05)*

Максимальные показатели адгезии отмечаются у *Staphylococcus spp.* при двухчасовой экспозиции практически у всех штаммов, их значения составляют 1,39-1,75 (в среднем 1,32±0,09) условных единиц.

Показатели адгезии грибов рода *Candida* к биологическому субстрату были умеренно выражены для всех образцов, что отображено на сравнительной диаграмме 1 (рис. 1). Показатели адгезии варьировали от 0.55 до 1.43 условных единиц при максимальном значении 1,53. Штаммы *Staphylococcus spp. и Candida spp.* следует отнести к группе высокоадгезивных согласно разработанной шкале. При этом, данные достоверно ниже таковых показателей для стафилококков при одинаковом времени инкубации смеси (p < 0,05). Средние значения показателя адгезии составили 1,33±0,03 и 0,8±0,09 при двухчасовой и 60 минутной экспозиции соответственно.

При сравнении показателей тест-штаммов грибов рода *Candida* и *Staphylococcus spp.* была выявлена следующая картина, которая отображена на диаграмме 1 (рис. 1).

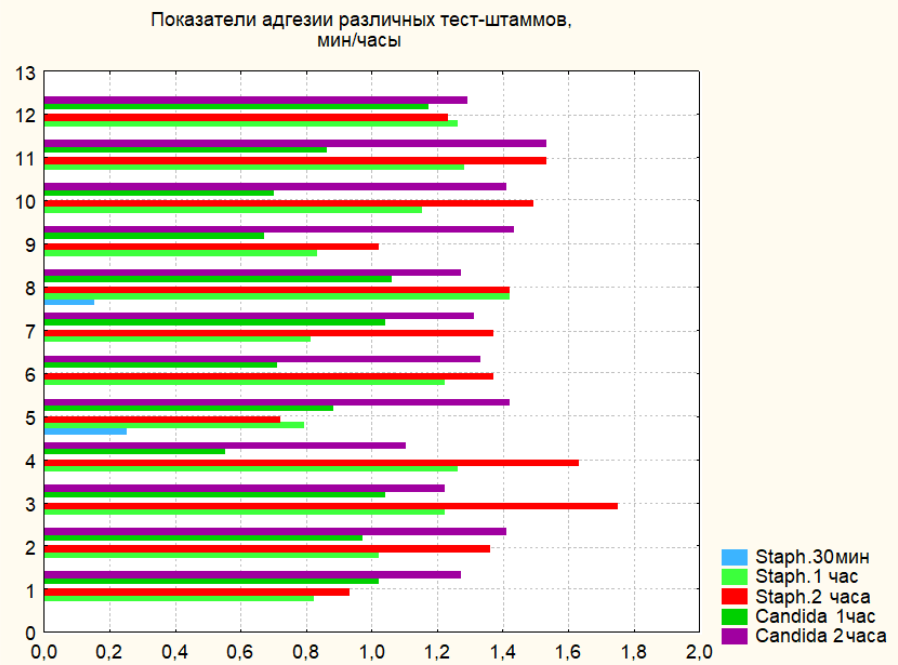

Рисунок 1 - Сравнительная характеристика тест-штаммов грибов рода Candida и Staphylococcus spp. при разном времени инкубации смеси

DOI: https://doi.org/10.23670/IRJ.2023.138.177.3

Оценка взаимосвязи между показателями адгезии установила прямую корреляционную связь. При увеличении времени экспозиции смеси на час, следует ожидать увеличение показателей адгезии испытуемых штаммов. Результаты исследований показали, что исследуемые штаммы отличаются степенью адгезии к биологическому субстрату и относятся к категории микробов с высокоадгезивными свойствами. Максимальные показатели адгезии отмечаются у *Staphylococcus spp.* при двухчасовой экспозиции практически у всех штаммов. Поверхность личинок гельминтов, обладая большой адсорбционной площадью, может служить одним из факторов накопления и персистенции

микроорганизмов в организме хозяина с одной стороны. С другой стороны, высокоадгезивные свойства штаммов обеспечивают скопление бактерий/грибов на поверхности личинки, что также может послужить дополнительным этиологическим фактором развития инфекционного патологического процесса.

Заключение

В период миграции личинки травмируют ткани и кровеносные сосуды, вызывая развитие некротических и воспалительных явлений в области инокуляции, дополнительная микробная нагрузка поверхности личинок приводит к формированию длительного очага воспаления и развитию хронических форм инфекции. Таким образом, изучение адгезивных свойств штаммом к элементам эпикутикулы нематод наиболее актуально при мигрирующих формах паразитарных инвазий.

Благодарности

Зав.кафедрой микробиологии ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России, к.м.н., Евдокимовой О.В.; профессору кафедры микробиологии, д.б.н., Новак А.И.

Конфликт интересов

Не указан.

Рецензия

Все статьи проходят рецензирование. Но рецензент или автор статьи предпочли не публиковать рецензию к этой статье в открытом доступе. Рецензия может быть предоставлена компетентным органам по запросу.

Acknowledgement

The author expresses their gratitude to Evdokimova O.V., Candidate of Medical Sciences, Head of the Department of Microbiology, FSBEI HE RyazGMU of the Ministry of Health of Russia; Professor of the Department of Microbiology, Doctor of Biological Sciences, Novak A.I.

Conflict of Interest

None declared.

Review

All articles are peer-reviewed. But the reviewer or the author of the article chose not to publish a review of this article in the public domain. The review can be provided to the competent authorities upon request.

Список литературы / References

1. Третьяков А. М. Бактерионосительство гельминтами и влияние антигельминтиков на микробный статус организма животных: автореф. дисс. ... канд. вет. наук / А. М. Третьяков. — Барнаул. — 2001. — 22 с.

2. Шендрик И. Н. Способность личинок Strogyloides papillosus резервировать M. bovis / И. Н. Шендрик, К. Н. Шендрик // Паразитарные системы и паразитоценозы животных: материалы V научно-практической конференции Международной ассоциации паразитоценологов, г. Витебск, 24-27 мая 2016 г. — Витебская государственная академия ветеринарной медицины. — Витебск: ВГАВМ, 2016. — С. 201-203.

3. Аркелова М.Р. Нематода Toxocara canis как вероятная эпидемическая и санитарно-гигиеническая угроза здоровью населения в южном субъекте Российской Федерации / М.Р. Аркелова, З.Т. Гогушев, И.А. Биттиров [и др.] // Здоровье населения и среда обитания – ЗНиСО. — 2023. — 31(3). — 64-71. — DOI: 10.35627/2219-5238/2023-31-3-64-71.

4. Миропольская Н.Ю. Клинико-эпидемиологические аспекты токсокароза у детей г. Хабаровска / Н.Ю. Миропольская, Т.В. Мжельская, Г.М. Воронкова // Дальневосточный журнал инфекционной патологии. — 2007. — № 10. — С. 105-109.

5. Rapin Alexis. Trends Immunol / Alexis Rapin, Nicola L. Harris. —September 2018. — 39 (9). — 724-733. — DOI: 10.1016/j.it.2018.06.002.

6. Микробиота / Монография под редакцией Е.Л. Никонова и Е.Н. Поповой. — Москва, 2019. — 66 с.

7. Восканян А.Г. Глистная инвазия в структуре респираторных аллергозов бронхиальная астма и синдром Лёффлера / А.Г. Восканян, Ануш Восканян // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. — 2016. — № 4 (часть 2) — С. 371-375

8. Ерхан Д.К. Гельминты и простейшие – резервуарные хозяева и возбудители гиперпаразитарных сочетанных инфекционных и инвазионных болезней / Д. К. Ерхан, Д. И. Панасюк, С. Д. Панасюк [и др.] — Кишенев, 1995. — 333 с.

9. Зольникова О. Ю. Микробиота кишечника и дыхательных путей как патогенетическое звено бронхиальной астмы: дис. на соиск. учен. степ. д-ра мед. наук: 14.01.04 / Зольникова Оксана Юрьевна; Первый москв. гос. мед. ун-т им. И. М. Сеченова. — Москва, 2020. — 207 с.

10. Муромцев А.Б. Гельминтозы лошадей в калининградской области / А.Б. Муромцев, Э.Х. Даугалиева // Журнал Novainfo.ru. — 2011. — №4. — С. 50-52.

11. Канина И.В. Получение иммунодиагностических препаратов из антигенов Toxocara canis для серодиагностики токсокароза у человека / И.В. Канина А.И. Новак, М.Д. Новак, О.В. Евдокимова // Журнал Инфекция и Иммунитет, 2022. — Т.2. — С. 146.

12. Белова Д.Д. Подбор носителей и параметров иммобилизации консорциума м/о / Д.Д. Белова // Вестник КрасГАУ. — 2018. — №2. — с. 294-299.

13. Царев В.Н. Методы микробиологического исследования, применяемые в стоматологии / В.Н. Царев, М.М. Давыдова, Е.Н. Николаева [и др.] // В кн.: Микробиология, вирусология иммунология полости рта // Под ред. проф. Царева В.Н. — М.: ГЭОТАР-Медиа, 2019.

Список литературы на английском языке / References in English

1. Tret'yakov A. M. Bakterionositel'stvo gel'mintami i vliyanie antigel'mintikov na mikrobnyj status organizma zhivotnyh [Bacteriocarriage by Helminths and the Effect of Anthelmintics on the Microbial Status of the Animal Organism]: abst. diss. ... PhD in Veterinary Sciences / A. M. Tret'yakov. — Barnaul. — 2001. — 22 p. [in Russian]

2. SHendrik I. N. Sposobnost' lichinok Strogyloides papillosus rezervirovat' M. bovis [The Ability of Strongyloides Papillosus Larvae to Preserve M. bovis] / I. N. SHendrik, K. N. SHendrik // Parazitarnye sistemy i parazitocenozy zhivotnyh: materialy V nauchno-prakticheskoj konferencii Mezhdunarodnoj associacii parazitocenologov, g. Vitebsk, 24-27 maya 2016 g. [Parasitic Systems of Parasitocenoses of Animals: materials in the Scientific and Practical Conference of the International Association of Parasitocenologists, Vitebsk, May 24-27, 2016]. — Vitebsk State Academy of Veterinary Medicine. — Vitebsk: VSAVM, 2016. — P. 201-203 [in Russian].

3. Arkelova M.R. Nematoda Toxocara canis kak veroyatnaya epidemicheskaya i sanitarno-gigienicheskaya ugroza zdorov'yu naseleniya v yuzhnom sub"ekte Rossijskoj Federacii [The Nematode Toxocara Canis as a Probable Epidemiological and Sanitary-hygienic Threat to Public Health in the Southern Subject of the Russian Federation] / M.R. Arkelova, Z.T. Gogushev, I.A. Bittirovet [et al.] // Zdorov'e naseleniya i sreda obitaniya – ZNiSO [Public Health and Habitat – PHH]. — 2023. — 31(3). — 64-71. — DOI: 10.35627/2219-5238/2023-31-3-64-71 [in Russian].

4. Miropol'skaya N.YU. Kliniko-epidemiologicheskie aspekty toksokaroza u detej g. Habarovska [Clinical and Epidemiological Aspects of Toxocarosis in Children of Khabarovsk] / N.YU. Miropol'skaya, T.V. Mzhel'skaya, G.M. Voronkova // Dal'nevostochnyj zhurnal infekcionnoj patologii [Far Eastern Journal of Infectious Pathology]. — 2007. — № 10. — P. 105-109 [in Russian].

5. Rapin Alexis. Trends Immunol / Alexis Rapin, Nicola L. Harris. —September 2018. — 39 (9). — 724-733. — DOI: 10.1016/j.it.2018.06.002.

6. Mikrobiota [Microbiota] / Monograph edited by E.L. Nikonov and E.N. Popova. — M., 2019. — 66 p. [in Russian]

7. Voskanyan A.G. Glistnaya invaziya v strukture respiratornyh allergozov bronhial'naya astma i sindrom Lyofflera [Helminthic Invasion in the Structure of Respiratory Allergoses Bronchial Asthma and Leffler Syndrome] / A.G. Voskanyan, Anush Voskanyan // Mezhdunarodnyj zhurnal prikladnyh i fundamental'nyh issledovanij [International Journal of Applied and Fundamental Research]. — 2016. — № 4 (part 2). — P. 371-375 [in Russian]

8. Erhan D.K. Gel'minty i prostejshie – rezervuarnye hozyaeva i vozbuditeli giperparazitarnyh sochetannyh infekcionnyh i invazionnyh boleznej [Helminths and Protozoa – Reserve Farms and Pathogens of Hyperparasitic Combined Infectious and Invasive Diseases] / D. K. Erhan, D. I. Panasyuk, S. D. Panasyuket [et al.] — Kishenev, 1995. — 333 p. [in Russian]

9. Zol'nikova O. YU. Mikrobiota kishechnika i dyhatel'nyh putej kak patogeneticheskoe zveno bronhial'noj astmy [The Microbiota of the Intestine and Respiratory Tract as a Pathogenetic Link of Bronchial Asthma]: diss. PhD in Medical Sciences: 14.01.04 / Zol'nikova Oksana YUr'evna; First Moscow State Medical University named after I. M. Sechenov. — Moscow, 2020. — 207 p. [in Russian]

10. Muromcev A.B. Gel'mintozy loshadej v kaliningradskoj oblasti [Helminthiasis of Horses in the Kaliningrad Region] / A.B. Muromcev, E.H. Daugalieva // ZHurnal Novainfo.ru [Journal Novainfo.ru]. — 2011. — №4. — P. 50-52 [in Russian].

11. Kanina I.V. Poluchenie immunodiagnosticheskih preparatov iz antigenov Toxocara canis dlya serodiagnostiki toksokaroza u cheloveka [Obtaining Immunodiagnostic Drugs from Toxocara canis Antigens for Serodiagnostics of Toxocarosis and Humans] / I.V. Kanina A.I. Novak, M.D. Novak, O.V. Evdokimova // ZHurnal Infekciya i Immunitet [Infection and Immunity Journal], 2022. — V.2. — P. 146 [in Russian].

12. Belova D.D. Podbor nositelej i parametrov immobilizacii konsorciuma m/o [Selection of Carriers and Immobilization Parameters of the m/o Consortium] / D.D. Belova // Vestnik KrasGAU [Bulletin of KrasSAU]. — 2018. — №2. — p. 294-299 [in Russian].

13. Carev V.N. Metody mikrobiologicheskogo issledovaniya, primenyaemye v stomatologii [Methods of Microbiological Research Used in Dentistry] / V.N. Carev, M.M. Davydova, E.N. Nikolaeva [et al.] // V kn.: Mikrobiologiya, virusologiya immunologiya polosti rta [In: Microbiology, Virology, Immunology of the Oral Cavity] // Edited by Prof. Carev V.N. — M.: GEOTAR-Media, 2019 [in Russian].