

УДК 616.23/.24-036.1:616.2:579

АНАЛИЗ ФАКТОРОВ ПЕРСИСТЕНЦИИ У БАКТЕРИЙ, ВЕГЕТИРУЮЩИХ НА СЛИЗИСТОЙ ВЕРХНИХ И НИЖНИХ ДЫХАТЕЛЬНЫХ ПУТЕЙ У БОЛЬНЫХ С ОСТРЫМИ И ХРОНИЧЕСКИМИ БРОНХОЛЕГОЧНЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ

А.С. Ильнишкая, В.В. Кичикова,

ФГУН «Нижегородский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. акад. И.Н. Блохиной»

Ильнишкая Алла Станиславовна – e-mail: labnikif@mail.ru

Проведено изучение факторов персистенции у культур микроорганизмов, выделенных из отделяемого бронхов и со слизистой зева и носа больных бронхолегочными заболеваниями. Данные культуры бактерий в различной степени обладали антилизосимной и антииммуноглобулиновой активностями, а также способностью к образованию биопленки. Наиболее широким набором активностей по отношению к лизоциму и трем классам иммуноглобулинов обладали бактерии, выделенные при хронических обструктивных болезнях легких. Способностью к пленкообразованию в большей степени была выражена у коагулазоотрицательных стафилококков, *S. aureus* и неферментирующих грамотрицательных бактерий.

Ключевые слова: персистенция бактерий, антилизосимная активность, антииммуноглобулиновая активность, биопленки.

A study of the persistence factors of microbial cultures isolated from the bronchial discharge, oral and nasal mucosa of patients with bronchopulmonary diseases has been carried out. These cultures possessed antilysozyme, anti-immunoglobulin activities to a variable degree and the ability to formation of biofilms as well. The bacteria isolated from patients with chronic obstructive pulmonary disease had the most broad assortment of activities against lysozyme and three classes of immunoglobulins. Coagulase-negative staphylococci, *S. aureus* and glucose nonfermentative gram-negative bacteria were characterized by the most expressive ability to the biofilm formation.

Key words: persistence of bacteria, antilysozyme activity, anti-immunoglobulin activity, biofilms.

Введение

В последние годы большое внимание уделяется изучению персистенции возбудителей как следствия эволюционно закрепившихся взаимоотношений симбионтов в системе «паразит-хозяин» [1, 2, 3, 4] и ее механизмов. Так, известно, что условно-патогенные микроорганизмы, стремясь выжить в условиях биотопа, реализуют персистентные свойства, к числу которых относят наличие антилизосимной (АЛА), антииммуноглобулиновой активности (АИГА), и образуют биопленки. В результате этого они приобретают способность противостоять факторам естественной резистентности макроорганизма и антимикробным агентам различного происхождения [5, 6, 7, 8, 9]. Анализ факторов персистенции бактерий – возбудителей воспалительных заболеваний на сегодняшний день остается актуальным, так как может дать возможность прогнозирования течения воспалительного процесса, в том числе осложнений на фоне основного патологического процесса.

Цель исследования: оценка персистентных свойств изолятов условно-патогенных бактерий, вегетирующих на слизистой верхних и нижних дыхательных путей у лиц с хроническими и острыми бронхолегочными заболеваниями.

Материал и методы

В работе использованы штаммы условно-патогенных бактерий, выделенных из отделяемого бронхов и со слизистой зева и носа больных бронхолегочными заболеваниями. Среди них различные виды стрептококков, неферментирующие грамотрицательные бактерии (НГОб) (представители родов *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Moraxella*, *Flavobacterium*), *Staphylococcus aureus* и коагулазоотрицательные стафилококки (КОС), энтеробактерии (представители родов *Escherichia*, *Proteus*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Citrobacter* и *Serratia*). У исследуемых бактерий определяли

следующие факторы персистенции. Антилизосимная активность была определена у 130 культур бактерий фотометрическим методом [1]. Антииммуноглобулиновую активность определяли у 92 культур – методом ИФА [10] с использованием наборов реагентов для иммуноферментного определения концентрации общих иммуноглобулинов классов А, G, М в сыворотке крови (ЗАО «Вектор-Бест»). Способность к образованию биопленок (87 культур) исследовали с помощью определения адгезии штаммов микроорганизмов на поверхности 96-луночного полистиролового планшета [11]. Количественным выражением степени образования биопленки, окрашенной кристалвиолетом, служит уровень абсорбции красителя этанолом, измеренный в единицах оптической плотности (ОП) при длине волны 630 нм. Статистическую обработку результатов проводили с использованием программы Primer of Biostatistics (Version 4.03) по критерию Стьюдента.

Результаты и их обсуждение

У исследуемых бактерий был определен комплекс биологических свойств с функцией защиты от факторов неспецифического и специфического иммунитета хозяина, включающий антилизосимную и антииммуноглобулиновую активности, которые могут способствовать длительному выживанию микроорганизмов на слизистых оболочках респираторного тракта больных. Способность бактерий специфически инактивировать лизоцим – антилизосимная активность (АЛА) – была определена у 79 изолятов при хронических обструктивных болезнях легких (ХОБЛ), 17 – при хронических необструктивных бронхитах (ХНБ), 21 – при бронхиальной астме (БА), 13 – при пневмониях (ПН). При этом известно, что значения АЛА бактерий более 2 мкг/мл свидетельствуют о высоком патогенном потенциале бактерий, а значения АЛА менее 2 мкг/мл у возбудителей обычно соответствуют

благоприятному течению заболеваний [12]. Исследование АЛА у 11 культур α -гемолитических стрептококков, выделенных из мокроты больных ХОБЛ и БА и со слизистой зева больных хроническим фаринготонзиллитом, показало либо отсутствие, либо очень низкие значения АЛА, что соответствует менее 1 мкг/мл. Данное явление, по-видимому, является характерным для представителей нормальной микрофлоры респираторного тракта. Проанализирована встречаемость АЛА-положительных штаммов среди стафилококков, энтеробактерий и НГОБ, выделенных при различных заболеваниях нижних дыхательных путей (НДП), и уровни АЛА этих бактерий. В целом АЛА чаще обладали культуры, выделенные при хронических бронхитах и БА, чем при ПН, а также выделенные при ХОБЛ энтеробактерии чаще проявляли АЛА, чем стафилококки ($p < 0,01$). Однако достоверных различий между значениями АЛА бактерий, выделенных из отделяемого бронхов и со слизистых оболочек верхних дыхательных путей (ВДП) больных бронхолегочными заболеваниями, а также зависимости уровней АЛА выделенных бактерий от различных заболеваний НДП не было выявлено. Не обладали АЛА 28,1±4,6% культур, выделенных из отделяемого бронхов, и 38,2±8,3% культур, выделенных со слизистых оболочек ВДП. Высокую АЛА (более 2 мкг/мл) проявляли 43,8±5,1% исследованных культур из НДП и 47,1±8,6% культур со слизистых оболочек зева и носа. Распределение бактерий по уровням АЛА выглядело следующим образом: активность > 2 мкг/мл проявляли 51,2±7,6% энтеробактерий, 44,0±10,1% *S. aureus*, 70,0±15,3% КОС и 11,1±7,6% НГОБ, выделенных из отделяемого бронхов больных неспецифическими заболеваниями легких, и 33,3±21,1% энтеробактерий, 54,5±15,7% *S. aureus* и 53,3±13,3% КОС, выделенных со слизистых оболочек зева и носа этих больных. Еще более высокие значения АЛА (> 4 мкг/мл) были выявлены у 34,9±7,3% энтеробактерий, 16,0±7,5% *S. aureus*, 40,0±16,3% КОС и 5,6±5,6% НГОБ, выделенных из отделяемого бронхов, и у 27,3±14,1% *S. aureus* и 26,7±11,8% КОС, выделенных со слизистых зева и носа больных хроническими заболеваниями НДП и пневмонией. Таким образом, из исследованных групп бактерий только НГОБ, в основном, проявляли более низкую активность (< 2 мкг/мл, $p < 0,01$), а более трети энтеробактерий и КОС отличались очень высоким уровнем АЛА.

Использование метода ИФА для определения АИГА позволило выявить высокую частоту встречаемости этого признака у всех исследованных бактерий. Кроме того, сравнение уровней активности (таблица) показало, что исследованные культуры *S. aureus* обладали в 2 раза более высокой активностью, чем энтеробактерии, против IgG при ХОБЛ и БА (разница достоверна при $p < 0,02$) и против IgM – при ХОБЛ, БА и ХНБ (разница достоверна при $p < 0,05$), а также по сравнению с НГОБ против IgG и IgM при ХОБЛ (разница достоверна при $p < 0,005$). Выделенные при ХОБЛ КОС проявили АИГА против IgG в 7 раз ниже, чем *S. aureus*, и в 3 раза ниже, чем энтеробактерии при ХОБЛ (разница достоверна при $p < 0,02$). Сравнение уровней АИГА бактерий, выделенных при различных заболеваниях НДП, показало, что энтеробактерии обладали более высокой активностью против IgG, если были выделены от больных ХНБ (в 2 раза выше по сравнению с АИГА энтеробактерий при ХОБЛ и БА и в 5 раз выше, чем при ПН, разница достоверна при $p < 0,03$), также

АИГА против IgM культур *S. aureus* от больных ХНБ была в 1,5 раза выше, чем таковая при ХОБЛ (разница достоверна при $p < 0,02$). АИГА против IgA у всех исследованных бактерий была примерно одинакова, только культуры *S. aureus*, выделенные от больных ХНБ, показали уровень активности в 3 раза ниже, чем от больных БА (разница достоверна при $p = 0,002$).

ТАБЛИЦА 1.
Значения антииммуноглобулиновой активности (%) бактерий, выделенных при различных заболеваниях НДП

Заболевания	Бактерии	Число штаммов	Анти – IgA (%)	Анти – IgG (%)	Анти – IgM (%)
ХОБЛ	<i>Staphylococcus aureus</i>	20	20,8±3,8	56,2±6,8* ^{2,3,7}	33,0±3,5* ^{10,11,12}
	КОС	8	35,3±4,7	7,3±3,0* ^{2,4}	19,5±6,5
	Энтеробактерии	22	28,1±3,8	21,8±3,5* ^{3,4,8}	15,9±3,9* ¹⁰
	НГОБ	8	30,5±5,1	19,6±6,9* ⁷	13,4±2,7* ¹¹
БА	<i>Staphylococcus aureus</i>	6	33,6±4,6* ¹	46,7±10,3* ⁵	39,9±5,4* ¹³
	Энтеробактерии	10	33,8±5,5	22,3±3,5* ^{5,9}	14,6±3,7* ¹³
	НГОБ	1	28,1	48,1	4,9
ХНБ	<i>Staphylococcus aureus</i>	5	10,9±1,0* ¹	62,6±13,5	50,6±6,5* ^{12,14}
	Энтеробактерии	2	17,5±4,4	50,0±2,5* ^{6,8,9}	18,7±3,1* ¹⁴
	НГОБ	2	19,8±10,2	2,5±7,2	23,7±1,6
ПН	<i>Staphylococcus aureus</i>	1	11,1	54,7	11,1
	КОС	1	18,8	59,7	71,6
	Энтеробактерии	5	25,4±3,6	12,9±4,1* ⁶	27,8±8,2
	НГОБ	1	35,3	0	30,7

Примечание: * – разница достоверна при $p \leq 0,005$ (1,7,9,10,11), $p \leq 0,001$ (2,3,6,13), $p \leq 0,05$ (4,5,8,12,14).

Было также проведено сравнение АЛА и АИГА бактерий, выделенных при хронических бронхитах. Выяснилось, что бактерии, выделенные при ХОБЛ, обладали более широким набором активностей по отношению к лизоциму и трем классам иммуноглобулинов, чем таковые при ХНБ. Так, из 11 культур, выделенных при ХНБ, 6 обладали АЛА и активностью против одного из иммуноглобулинов, 5 – только одной активностью, либо АИГА, либо АЛА. Из 39 культур, выделенных при ХОБЛ, 30 обладали одновременно АЛА и АИГА, причем в основном против 2 или 3 классов иммуноглобулинов (53,8±8,1% культур).

Способность к образованию биопленки бактериями является одним из механизмов их выживания на поверхности различных тканей и органов благодаря механическому экранированию микробного полисахарида внеклеточным матриксом, затрудняющим проникновение антимикробных веществ внутрь биопленки [8]. Было проанализировано распределение исследованных культур бактерий по степени адгезии к полистиролу. Энтеробактерии показали, в основном, низкую способность к формированию биопленки ($< 0,5$ ед. ОП) – 61,1±8,1% культур, стафилококки – среднюю и высокую ($> 0,5$ ед. ОП): *S. aureus* – 53,3±9,1%, КОС – 87,5±12,5%, а НГОБ – высокую ($> 1,0$ ед. ОП) – 66,7±14,2% культур. Однако средние значения ОП для бактерий, выделенных при различных заболеваниях нижних дыхательных путей, не показали достоверных различий.

Закключение

Исследование факторов персистенции условно-патогенных бактерий, вегетирующих на слизистой верхних и нижних дыхательных путей у лиц с хроническими и острыми бронхолегочными заболеваниями, позволило констатировать их высокую агрессивность по отношению к макроорганизму. Как видно из представленных результатов, более трети энтеробактерий и КОС отличались очень высоким уровнем АЛА, что может свидетельствовать о большом персистентном потенциале этих микробов. У всех исследованных в эксперименте бактерий высока частота встречаемости АИГА. Однако наиболее широким набором активностей по отношению к лизоциму и трем классам иммуноглобулинов обладали бактерии, выделенные при ХОБЛ, сочетание этих активностей, на наш взгляд, может быть ассоциировано с тяжестью заболевания. Способностью к пленкообразованию у исследуемых изолятов микроорганизмов, обладающих секретирруемыми факторами персистенции, обладали в большей степени коагулазоотрицательные стафилококки, *S. aureus* и НГОБ. Однако при интерпретации результатов всегда нужно иметь в виду тот факт, что на процесс образования биопленок *in vivo* влияют факторы окружающей среды (макроорганизм) [5, 8]. Кроме того, взаимодействие микроорганизмов в биопленке также оказывает влияние на формирование персистентного потенциала ассоциантов. Это в свою очередь, может иметь существенное значение в развитии инфекционного процесса и формировании хронической инфекции.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бухарин О.В. Персистенция патогенных бактерий. М.: Медицина, 1999. 364 с.
2. Бухарин О.В., Гинцбург А.П., Романова Ю.М., Эль-Регистан Г.И. Механизмы выживания бактерий. М.: Медицина, 2005. 367 с.
3. Бухарин О.В., Лобакова Е.С., Немцева Н.В., Черкасов С.В. Ассоциативный симбиоз. Екатеринбург: УрО РАН, 2007. 270 с.
4. Беляева Е.В., Борискина Е.В., Ермолина Г.Б., Любавина Н.А. Исследование персистентных свойств микрофлоры респираторного тракта больных хроническими неспецифическими заболеваниями нижних дыхательных путей. Медицинский альманах. 2010. №2 (11). С. 266-269.
5. Экология микроорганизмов человека. Под ред. Бухарина О.В. Екатеринбург: УрО РАН, 2006. 477 с.
6. Costerton J.W., Stewart P.S., Grenberg E.P. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infection. Science. 1999. № 284. P. 1318-1322.
7. Karen I., Kaidalu N., Spoering A. et al. Persister cells and tolerance to antimicrobial. Fems Microbial. Let. 2004. V. 1 № 234 (1). 187 p.
8. Перунова Н.Б., Иванова Е.В. Влияние бифидобактерий на антилизоцимную активность микроорганизмов и их способность к образованию биопленок. Журн. Микробиол. 2009. № 4. С. 46-49.
9. Михайлова Е.А., Луда А.П., Бигеев М.И. Антииммуноглобулиновая активность бактерий и ее диагностическая ценность. Персистенция бактерий: Сб. науч. тр. Под ред. О.В. Бухарина. Куйбышев. 1990. С. 107-111.
10. Пат. №2236465 РФ. Способ определения антииммуноглобулиновой активности микроорганизмов. /Бухарин О.В., Чайникова И.Н., Валышев А.В. и др. Приоритет от 24.09.2002; опубл. 20.09.2004. Бюл. № 26.
11. Карпова Т.И. Дронина Ю.Е., Алексеева Н.В. и др. Формирование биопленок *Legionella* spp. в эксперименте. Журнал микробиологии. 2008. № 1. С. 3-7.
12. Валышев А.В. Факторы персистенции энтеробактерий и влияние на них пробиотиков при дисбиозе кишечника: Автореф. дис. канд. мед. наук. Оренбург. 1997. 18 с.

