

ФАКТОРЫ ВИРУЛЕНТНОСТИ УСЛОВНО ПАТОГЕННОЙ МИКРОФЛОРЫ НИЖНИХ ДЫХАТЕЛЬНЫХ ПУТЕЙ ПРИ ПНЕВМОНИЯХ

Г.Г.Катрецкая

ГБОУ ВПО Пермская государственная медицинская академия им. акад. Е.А.Вагнера Минздравсоцразвития РФ,
614990, г. Пермь, ул. Петропавловская, 26

РЕЗЮМЕ

В структуре этиологически значимых агентов при пневмониях все чаще встречаются условно-патогенные микроорганизмы с приобретенными патогенными свойствами. Проведено изучение приобретенных факторов вирулентности условно-патогенной микрофлоры нижних дыхательных путей у пациентов с внебольничными пневмониями. Исследовано 820 микробных культур, полученных из мокроты пациентов пульмонологического отделения многопрофильного стационара в течение 6 лет (2005-2010 гг.). Проведен анализ микробного пейзажа, изучена лекарственная устойчивость к антибиотикам и антисептикам, адгезивные свойства, антагонизм, способность к образованию биопленок. Выделение и идентификацию микробных культур осуществляли общепринятыми методами. Показан растущий уровень антибиотикорезистентности условно-патогенных микроорганизмов при высоких показателях чувствительности к антисептикам. Установлено, что изученные штаммы обладают выраженными адгезивными, а также антагонистическими свойствами. Большинство бактериальных культур, выделенных из нижних дыхательных путей, способно к образованию биопленок. Дальнейшее изучение комплекса факторов приобретенной патогенности условно-патогенной микрофлоры нижних дыхательных путей позволит глубже понять роль этих свойств микроорганизмов в развитии гнойно-воспалительных заболеваний.

Ключевые слова: пневмония, условно-патогенная микрофлора, факторы вирулентности.

SUMMARY

VIRULENT FACTORS OF OPPORTUNISTIC MICROFLORA OF THE LOWER RESPIRATORY TRACT IN PNEUMONIA

G.G.Katretskaya

Acad. E.A.Vagner Perm State Medical Academy,
26 Petropavlovskaya Str., Perm, 614990,
Russian Federation

In the structure of etiologically significant agents at pneumonias opportunistic microorganisms with acquired pathogenic properties are found in increasing frequency. Acquired factors of virulence of opportunistic microflora of lower respiratory tract in community-acquired pneumonia patients were studied. 820 microbial cultures obtained from the phlegm of patients of pulmonology department of multi profile hospital during

6 years (2005-2010) were studied. Both antibiotic and antiseptic resistance, adhesive properties and antagonism were investigated as well as biofilm formation ability and microflora. The growing level of antibiotic resistance of opportunistic microorganisms was shown in the study, the sensitivity to antiseptics being rather high. It was proved that strains studied had pronounced adhesive properties as well as antagonistic ones. The majority of bacterial cultures separated from the lower respiratory tract are able to form biofilms. The further studying of factors of acquired opportunistic microflora of lower respiratory tract will allow to understand a role of microorganisms properties in development of pyoinflammatory diseases more deeply.

Key words: pneumonia, opportunistic microflora, virulent factors.

Эффективное и действенное лечение пневмоний невозможно без точной расшифровки этиологического фактора. Тенденции последних лет свидетельствуют об изменении микробного пейзажа при гнойно-воспалительных заболеваниях легких. В структуре этиологически значимых агентов при пневмониях, наряду с традиционными возбудителями, обладающими природными факторами вирулентности, все чаще встречаются условно-патогенные микроорганизмы с приобретенными патогенными свойствами. Это различные представители нормофлоры организма человека, прежде всего, верхних дыхательных путей: коагулазонегативные стафилококки, стрептококки, энтеробактерии и др. [3]. В отличие от аналогичных авирулентных культур, штаммы с приобретенными патогенными свойствами (лекарственной устойчивостью, антагонистической активностью, факторами персистенции, адгезивными свойствами и способностью к пленкообразованию) обладают высокой экологической пластичностью и способностью активно участвовать в воспалении [6]. Поэтому необходимым условием для выявления этиологической значимости микробного агента при гнойно-воспалительных заболеваниях легких является обнаружение и оценка факторов не только природной, но и приобретенной патогенности. Изучение комплекса факторов приобретенной патогенности условно-патогенной микрофлоры позволит глубже понять роль этих свойств микроорганизмов в развитии гнойно-воспалительных заболеваний.

В настоящей работе приведена оценка приобретенных факторов вирулентности условно-патогенной микрофлоры нижних дыхательных путей у пациентов с внебольничными пневмониями.

Материалы и методы исследования

Объектом исследования являлись микробные культуры, выделявшиеся из мокроты пациентов пульмонологического отделения многопрофильного стационара в течение 6 лет (2005-2010 гг.). Выделение и идентификацию микробных культур осуществляли общепринятыми методами. Всего изучено 820 микробных культур.

Чувствительность к антибактериальным препаратам основных групп (пенициллины, цефалоспорины, аминогликозиды, макролиды и фторхинолоны) определяли в соответствии с Методическими указаниями №4.2.1890-04 «Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам» от 04.03.2004 г.

Чувствительность к антисептикам (фурациллину, хлоргексидину, диоксидину и мирамистину) исследовали методом серийных разведений в жидкой питательной среде [1]. Изучены выборки основных возбудителей: стафилококки, энтеробактерии, неферментирующие грамотрицательные бактерии и грибы рода *Candida* – всего 140 микробных культур. Помимо минимальной подавляющей концентрации (МПК), для каждого препарата при сравнительном анализе использовали такие данные, как средние показатели МПК для выборок, амплитуда индивидуальных МПК в выборках и частота присутствия резистентных культур, а также индекс активности антисептиков (ИАА). Последний показатель рассчитывали как отношение рабочей концентрации препарата к МПК культуры.

Адгезивные свойства микроорганизмов изучали с использованием нативных эритроцитов человека [4]. Взвесь эритроцитов смешивали с культурами микроорганизмов и инкубировали в течение 30 минут при температуре 37°C. По результатам микроскопии вычисляли ряд показателей: средний показатель адгезии (СПА) – среднее число микробов, адгезированных на одном эритроците; коэффициент адгезии – процент эритроцитов, участвующих в адгезивном процессе; индекс адгезивности микроорганизмов – среднее количество микробных клеток на одном участвующем в адгезивном процессе эритроците, исчисляемое как отношение СПА×100 к коэффициенту адгезии.

Антагонистические отношения выявляли при совместном культивировании микроорганизмов на плотной питательной среде, а также статистическим путем с использованием коэффициента Жаккарда [2], который характеризует способность к совместному существованию различных видов, взятых попарно. В зависимости от его величины можно судить о наличии антагонистических (до 30%), синергических (больше 30%) или мутуалистических взаимодействий между микроорганизмами (больше 70%).

Способность микроорганизмов формировать биопленки определяли в 96-луночных полистироловых планшетах [5]. Изучено 66 культур, в том числе 24 штамма золотистого стафилококка, 15 штаммов коагулазонегативных стафилококков с гемолитическими свойствами, 13 штаммов псевдомонад и 14 культур эн-

теробактерий. Суточные бульонные культуры в разведении 1:100 вносили в лунки по 150 мкл в четыре повторения. После 24 часов инкубации при 37°C содержимое лунок аккуратно эвакуировали. Пленки окрашивали внесением в лунки 170 мкл 0,1% раствора кристаллвиолета на 45 минут. После отмывания несвязанного красителя в лунки для экстракции красителя из пленок вносили по 180 мкл 96% этанола. Интенсивность окрашивания спирта оценивали на планшетном фотометре с длиной волны 540 нм. Количественным выражением интенсивности образования биопленок служили значения оптической плотности (ед. ОП), превышающие контрольные показатели.

Результаты исследования и их обсуждение

Анализ структуры условно-патогенной микрофлоры показал, что в изучаемый период более половины выделенных культур (58%) относилось к грамположительной кокковой флоре, среди которой чаще встречались стрептококки (32,7%) и стафилококки (25,3%). Наблюдалось постепенное увеличение доли коагулазонегативных стафилококков (преимущественно с гемолитической активностью). Начиная с 2006 г., удельный вес коагулазонегативных стафилококков сопоставим с долей выделенных *S. aureus*, причем в 2010 г. на долю *S. aureus* приходилось 10%, а коагулазонегативные стафилококки встречались в 11% случаев.

Второе место по частоте встречаемости занимали грамотрицательные бактерии (27,7%) в том числе представители семейства *Enterobacteriaceae* – 19,2% и неферментирующие грамотрицательные бактерии – 8,5%. Удельный вес грибковой флоры составил 13,4%, при доминировании *C. albicans* – 12%. Доля прочих микроорганизмов составляла менее 1% (рис. 1).

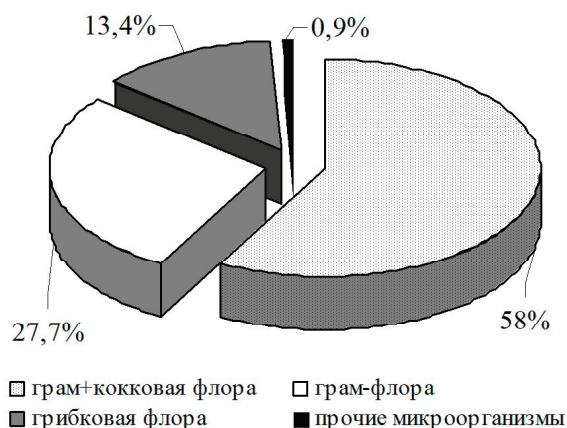


Рис. 1. Структура выделенных штаммов этиологических агентов за 2005-2010 гг.

Анализ динамики уровня чувствительности микроорганизмов к антибиотикам выявил стабильную тенденцию к снижению удельного веса культур, не обладающих резистентностью. Наиболее выраженным этот процесс был среди культур неферментирующих грамотрицательных бактерий (с 50 до 39%), стафилококков (с 86 до 77%), а также стрептококков (с 70 до 62%).

Доля метициллин- или оксациллинрезистентных *S. aureus* штаммов оставалась на относительно стабильном уровне (в пределах 20-25% за изученный период). В это же время массовая доля оксациллинрезистентных коагулазонегативных стафилококков возросла с 18% в 2005 до 59% в 2010 г. (рис. 2).

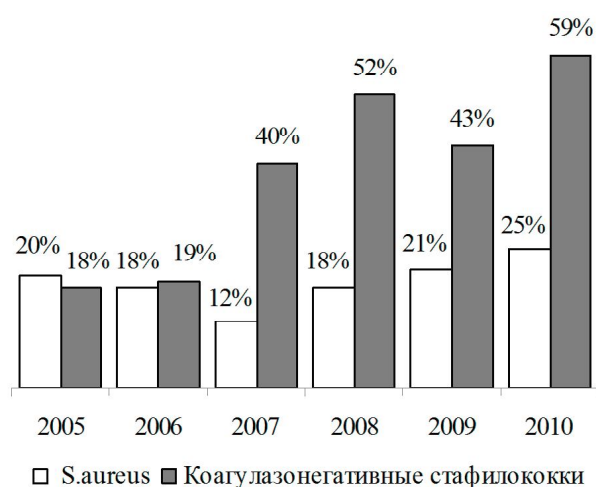


Рис. 2. Удельный вес оксациллинрезистентных стафилококков за 2005-2010 гг.

За описываемый период отмечено падение частоты чувствительности к бета-лактамам антибиотикам и аминогликозидам у бактерий, принадлежащих к семейству *Enterobacteriaceae*. Единственным препаратом, сохранившим полную активность против грамотрицательной флоры, остался ципрофлоксацин.

Изучение чувствительности выделенных штаммов к антисептикам выявило прежде всего наличие высо-

кой чувствительности всех групп микроорганизмов. Так, к хлоргексидину было чувствительно 98,6% культур всех выделенных стафилококков, к мирамистину – 89%, а к диоксидину и фурациллину – 80 и 55%, соответственно. Для каждой из выборок индекс активности препаратов в большинстве случаев намного превышал минимальное значение (ИАА=4), необходимое для эффективного воздействия на микрофлору слизистых.

Все изученные антисептики обладали высокой активностью в отношении стафилококков. Так, среднее значение ИАА хлоргексидина к *S. aureus* составило $397,8 \pm 50,35$, диоксидина – $201,9 \pm 35,7$, фурациллина – $37,15 \pm 22,35$. Аналогичный уровень активности продемонстрировали все препараты в отношении коагулазонегативных стафилококков и энтеробактерий. Против неферментирующих бактерий более эффективными оказались хлоргексидин и диоксидин, ИАА которых составил, соответственно, $138,9 \pm 51,68$ и $356,6 \pm 70,58$. Высокую активность в отношении грибов показали хлоргексидин и мирамистин (средние значения ИАА составили $57,13 \pm 10,56$ и $9,39 \pm 2,5$, соответственно). Доля низкочувствительных культур была невелика и соответствовала спектрам активности препаратов; например, резистентность к мирамистину среди грамотрицательных бактерий встречалась чаще, чем среди грамположительных.

Поскольку для разных групп исследуемых микроорганизмов ИАА препаратов существенно отличались, следует говорить о необходимости дифференцированного подхода к использованию антисептиков в зависимости от выделенной этиологически значимой условно-патогенной микрофлоры (табл.).

Таблица

Показатели чувствительности культур к антисептическим препаратам ($M \pm m$)

Культуры		Препараты			
		хлоргексидин	диоксидин	фурациллин	мирамистин
<i>S. aureus</i>	МПК, мкг/мл	$3,938 \pm 1,313$	$149 \pm 34,9$	$22,46 \pm 2,331$	$9,759 \pm 2,295$
	ИАА	$397,8 \pm 50,35$	$201,9 \pm 35,75$	$37,15 \pm 22,35$	$35,95 \pm 8,643$
Коагулазонегативные стафилококки	МПК, мкг/мл	$2,145 \pm 0,315$	$176,8 \pm 32,04$	$26,47 \pm 5,028$	$7,32 \pm 1,295$
	ИАА	$422,4 \pm 51,79$	$203,6 \pm 49,53$	$29,9 \pm 5,762$	$69,53 \pm 44,19$
Энтеробактерии	МПК, мкг/мл	$28,76 \pm 10,25$	$451,5 \pm 287,6$	$63,08 \pm 9,059$	$39,23 \pm 7,123$
	ИАА	$148,4 \pm 46,08$	$264,6 \pm 59,42$	$6,978 \pm 2,039$	$4,364 \pm 1,205$
Неферментирующие грамотрицательные бактерии	МПК, мкг/мл	$23,57 \pm 5,29$	$126 \pm 33,68$	133	$55,4 \pm 4,233$
	ИАА	$138,9 \pm 51,68$	$356,6 \pm 70,58$	1,5	$2,0 \pm 0,189$
<i>C. albicans</i>	МПК, мкг/мл	$16,95 \pm 3,543$	$6346 \pm 175,9$	133	$16,8 \pm 1,377$
	ИАА	$57,13 \pm 10,56$	$1,611 \pm 0,077$	1,5	$9,391 \pm 2,547$

Культуры, обладавшие низкой чувствительностью либо устойчивостью к антибиотикам, оказались чувствительными ко всем антисептикам, что лишний раз подтверждает перспективность применения антисептиков в лечении гнойно-воспалительных заболеваний, особенно при низкой эффективности антибиотикотерапии. В подтверждение сказанного приводим пример из клинической практики.

Пациент С., 1981 г. рождения, находился на лечении с 23.01 по 08.02.08 с диагнозом: двусторонняя нижнедолевая пневмония, тяжелое течение. Ателектаз нижней доли левого легкого. Хронический бронхит, обострение. Диагноз установлен на основании жалоб (кашель с большим количеством гнойной мокроты, одышка при физической нагрузке и в покое, слабость, головокружение, повышение температуры тела до 40°C), анамнеза (острое начало заболевания с резким подъемом температуры и нарастающей слабостью), лабораторных данных (общий анализ крови: лейкоциты – $13,4 \times 10^9/\text{л}$, СОЭ – 50 мм/час) и рентгенологической картины (на рентгенограмме органов грудной клетки от 24.01.08 определялись правосторонняя нижнедолевая пневмония и левосторонняя нижнедолевая плевропневмония).

Проба мокроты на бактериологический посев взята 23.01.08. Выделены культуры *S. haemolyticus* 106 КОЕ/мл и *K. Ozaenae* 105 КОЕ/мл.

При трахеобронхоскопии, проведенной 28.01.08, установлено, что голосовая щель обычной формы, трахея свободно проходима. Осмотрены бронхи с обеих сторон до 5-го порядка. Слизистая гиперемирована, больше в сегментах 8-9 слева, оттуда в большом количестве отходит слизисто-гнойная мокрота. Проведена их санация (введено 5 мл диоксидина).

Приведено лечение: инфузионная терапия, цефотаксим, амикацин, анальгин, папаверин, бромгексин, амброгексал, парацетамол, азитрал, авелокс, беродуал, верапамил, санация трахеобронхиального дерева диоксидином. Температура нормализовалась, количество мокроты уменьшилось к вечеру 28.01.08.

Рентгенограмма органов грудной клетки от 31.01.08: левосторонняя нижнедолевая пневмония в стадии неполного разрешения; от 07.02.08: слева на месте инфильтрации незначительное усиление легочного рисунка. Диафрагма подвижна. Синусы свободны. Заключение: пневмония нижней доли левого легкого в стадии полного разрешения.

После проведенного лечения пациент выписан 08.02.08 с клиническим выздоровлением.

Изучение адгезии наиболее частых представителей условно-патогенной микрофлоры, выделенных из нижних дыхательных путей – стафилококков, энтеробактерий и псевдомонад, показало, что все изученные бактериальные культуры обладали выраженными адгезивными свойствами. Показатель СПА у грамположительных культур составил в среднем $3,03 \pm 0,277$, у грамотрицательных – $3,36 \pm 0,31$ ($p > 0,05$). Значения индекса адгезивности микроорганизмов у грамположительных культур колебались от 2,74 до 4,87 при среднем значении $3,74 \pm 0,227$, у грамотрицательных –

от 2,54 до 4,47, в среднем $4,14 \pm 0,39$ ($p > 0,05$).

Тот факт, что показатели адгезии у грамположительных бактерий мало отличались от таковых у грамотрицательных бактерий, для которых адгезия является непрямым фактором патогенности, можно расценивать как косвенное свидетельство важности адгезивных свойств у этиологически значимых грамположительных представителей условно патогенной микрофлоры. Полученные результаты позволяют рекомендовать показатели адгезии условно-патогенной микрофлоры в качестве дополнительного критерия при решении вопроса об их этиологической роли.

Анализ возможных симбиотических связей между выделяемыми в ассоциациях микроорганизмами свидетельствовал о преобладании в ассоциациях антагонистических взаимоотношений; в 21 случае из 26 значение коэффициента Жаккарда не превышало 30. В остальных случаях взаимосвязи между видами-ассоциантами трактовались как слабые симбиотические (значения коэффициента не превышали 50).

Способность к формированию биопленок обнаружена у 72% исследованных штаммов. Высокие значения выявлены у всех культур *P. aeruginosa* и у 60% энтеробактерий ($ОП \geq 0,5$). Данный признак встречался у всех штаммов коагулазонегативных стафилококков и у 58% культур *S. aureus* с высокой выраженностью, остальные штаммы *S. aureus* проявили более низкую способность к образованию биопленок ($ОП \leq 0,5$). Наличие этого свойства повышает клиническую значимость выделенных культур, поскольку биопленка является мощным фактором противостояния защитным силам организма и антимикробным препаратам.

Выводы

1. В настоящее время в структуре условно-патогенной микрофлоры при внебольничных пневмониях ведущую роль играет грамположительная кокковая флора.
2. Респираторная условно-патогенная микрофлора характеризуется растущим уровнем антибиотикорезистентности при довольно высоких показателях чувствительности к антисептикам.
3. Условно-патогенная микрофлора, выделенная от больных внебольничными пневмониями, обладает выраженными адгезивными, а также антагонистическими свойствами.
4. Большинство бактериальных культур, выделенных из нижних дыхательных путей, способно к образованию биопленок.

ЛИТЕРАТУРА

1. Красильников А.П., Адарченко А.А. Клиническое значение и методические вопросы определения чувствительности/устойчивости бактерий к антисептикам // Антибиотики и химиотерапия. 1992. Т.37, №9. С.39–44.
2. Меншиков Д.Д., Янискер Г.Я. Экологическая общность облигатно-анаэробных и аэробных возбудителей гнойных процессов // Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 1990. №5. С.28–31.

3. Микробиологические аспекты диагностики внебольничной пневмонии / В.А.Невзорова [и др.] // Бюл. физиол. и патол. дыхания. 2004. Вып.18. С.15–17.

4. Влияние полиоксидония на адгезивные свойства *Corynebacterium diphtheriae* / Г.Г.Харсеева [и др.] // Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 2009. №2. С.11–15.

5. Формирование биопленок клиническими штаммами бактерий комплекса *Burkholderia cepacia* в зависимости от их фенотипических и генотипических характеристик / И.А.Шагинян [и др.] // Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 2007. №1. С.3–9.

6. Romeo T. (ed.). Bacterial Biofilms. Current Topics in Microbiology and Immunology. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 2008. Vol.322. 293 p.

REFERENCES

1. Krasil'nikov A.P., Adarchenko A.A. *Antibiotiki i khimioterapiya* 1992; 37(9):39–44.

2. Men'shikov D.D., Yanisker G.Ya. *Zhurnal mikrobiologii epidemiologii i immunobiologii* 1990; 5:28–31.

3. Nevzorova V.A., Turkutyukov V.B., Martynenko I.M., Mokshina M.V., Mazur M.E. *Bulleten' fiziologii i patologii dyhaniya* 2004; 18:15–17.

4. Kharseeva G.G., Moskalenko E.P., Alutina E.L., Brevdo A.M. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii* 2009; 2:11–15.

5. Shaginyan I.A., Danilina G.A., Chernukha M.Yu. Alekseeva G.V., Batov A.B. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii* 2007; 1:3–9.

6. Romeo T., editor. Bacterial Biofilms. *Current Topics in Microbiology and Immunology Vol.322*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg; 2008.

Поступила 09.12.2011

Контактная информация

Галина Геннадьевна Катрецкая,
врач-бактериолог, заочн. асп. кафедры микробиологии и вирусологии,
614990, г. Пермь, ул. Петropавловская, 26.

E-mail: maltoza7975@mail.ru

Correspondence should be addressed to

Galina G. Katretskaya,
Doctor-bacteriologist, Post-graduate student of Department of Microbiology and Virusology,
Acad. E.A.Vagner Perm State Medical Academy,
26 Petropavlovskaya Str., Perm, 614990, Russian Federation.
E-mail: maltoza7975@mail.ru