

УДК 616.2-036.12-008.87.579

ИССЛЕДОВАНИЕ ПЕРСИСТЕНТНЫХ СВОЙСТВ МИКРОФЛОРЫ РЕСПИРАТОРНОГО ТРАКТА БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКИМИ НЕСПЕЦИФИЧЕСКИМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ НИЖНИХ ДЫХАТЕЛЬНЫХ ПУТЕЙ

Е.В. Беляева, Е.В. Борискина, Г.Б. Ермолина, Н.А. Любавина,
Е.В. Макарова, В.А. Никифоров, ФГУН «Нижегородский научно-исследовательский институт
эпидемиологии и микробиологии им. акад. И.Н. Блохиной Роспотребнадзора»,
ГОУ ВПО «Нижегородская государственная медицинская академия Минздравсоцразвития»

Беляева Елена Вячеславовна – e-mail: micro@sinn.ru

Проанализирована частота встречаемости стафилококков, энтеробактерий и неферментирующих глюкозу бактерий в составе микрофлоры нижних и верхних дыхательных путей больных хроническими заболеваниями: ХОБЛ, хронические бронхиты, бронхиальная астма. Проведено изучение факторов персистенции у выделенных культур микроорганизмов. Не выявлено различий в уровне антилизосимной активности бактерий, но показан более высокий уровень антилактоферриновой активности у исследованных культур стафилококков по сравнению с энтеробактериями. Показано, что изоляты от больных ХОБЛ чаще проявляли антииммуноглобулиновую активность, чем изоляты от больных бронхиальной астмой и хроническим необструктивным бронхитом.

Ключевые слова: хронические заболевания, нижние дыхательные пути, персистенция бактерий.

The frequency of occurrence of staphylococci, enterobacteria and glucose nonfermentative bacteria in the microflora of the lower and upper respiratory passages of patients with chronic diseases: COPD, chronic bronchitis, bronchial asthma was analysed. A study of persistence factors in isolated cultures of microorganisms was carried out. No differences in the level of anti-lysozyme activity of bacteria was revealed, but a higher level of anti-lactoferrin activity in the cultures of studied staphylococci was shown compared with enterobacteria. It was shown that isolates from patients with COPD more often possessed anti-immunoglobulin activity than isolates from patients with bronchial asthma and chronic nonobstructive bronchitis.

Key words: chronic disease, lower respiratory tract, persistence of bacteria.

Наиболее распространенными заболеваниями органов дыхания человека являются хроническая обструктивная болезнь легких (ХОБЛ) и бронхиальная астма (БА), в развитии обострений которых важную роль играют инфекционные агенты, например, при тяжелом течении ХОБЛ в этиологической структуре преобладают представители семейства Enterobacteriaceae, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* [1], а в острый период заболевания БА повышается выделение со слизистой задней стенки глотки неферментирующих глюкозу грамотрицательных бактерий (НФГОб) и энтеробактерий [2]. Ранее нами при изучении состава микробиоценозов верхнего и нижнего отделов респираторного

тракта больных хроническими заболеваниями нижних дыхательных путей (НДП) было показано, что наряду с присутствующими нормальной микрофлоре носоглотки α -гемолитическими стрептококками, нейссериями и стаптококками отмечался большой процент выделения из мокроты энтеробактерий и стафилококков, и был исследован ряд факторов патогенности и персистенции этих микроорганизмов [3]. В целом, изучению персистентных свойств различных бактерий посвящено много исследований [4, 5, 6], однако персистенции микроорганизмов в респираторном тракте, в частности, выделяемых из НДП, уделяется недостаточно внимания [7, 8].

Цель исследования – оценить частоту встречаемости стафилококков, энтеробактерий и неферментирующих глюкозу бактерий (НФГОб) в составе микрофлоры верхних и нижних дыхательных путей больных с хроническими неспецифическими заболеваниями легких (ХНЗЛ) и исследовать факторы, способствующие персистенции этих бактерий в бронхах.

Материалы и методы

Были исследованы образцы мокроты и мазки со слизистых зева и носа больных ХОБЛ (72 чел.), хроническим необструктивным бронхитом (ХНБ) (12 чел.) и БА (25 чел.) в соответствии с Приложением к приказу № 535 МЗ СССР от 22.04.1985 с модификацией количественного определения бактерий по методу секторных посевов. Диагностически значимыми считались изоляты бактерий в количестве более 10^2 КОЕ/мл. В составе микрофлоры этих образцов были выделены 143 культуры бактерий: стафилококки разных видов (103 штамма), представители семейства энтеробактерий (29 штаммов) и 11 культур НФГОб. Идентификацию бактерий до вида проводили по биохимическим свойствам с использованием систем индикаторных бумажных (СИБ) для идентификации микроорганизмов производства НПО «Микроген» МЗ РФ.

У выделенных культур бактерий определяли факторы персистенции: антилизоцимную активность (АЛА) фотометрическим методом [4], антииммуноглобулиновую активность (АИА) методом радиальной иммунодиффузии в агаре [9], антилактоферриновую активность (АЛФА) твердофазным иммуноферментным методом [10]. Статистическую обработку результатов проводили общепринятыми методами.

Результаты и обсуждение

В составе микрофлоры НДП больных ХОБЛ были обнаружены стафилококки различных видов (20 изолятов), энтеробактерии (19 изолятов) и НФГОб (4 изолята) с соответствующей частотой выделения 27,8%, 26,4% и 5,6% (таблица 1). При этом частота выделения бактерий со слизистой зева этих больных была значительно ниже – 13,9% для стафилококков, 1 изолят *E. coli* (1,4%), 2 изолята НФГОб (2,8%), в то время как со слизистой носа были выделены только стафилококки (50,0%).

У больных ХНБ в одной трети случаев в мокроте были обнаружены стафилококки и у одного больного – НФГОб. Со слизистых зева и носа этих больных были выделены стафилококки с частотой 16,6% и 58,3%, соответственно, и одна культура *P. aeruginosa* со слизистой зева.

У больных БА в мокроте были обнаружены стафилококки в 56,0%, энтеробактерии в 36,0% и НФГОб в 8,0% случаев. Со слизистой зева был выделен 1 изолят *Acinetobacter lwoffii*, а со слизистой носа – стафилококки в 36,0% случаев.

Таким образом, частота выделения стафилококков из мокроты больных БА практически вдвое превышала таковую при хронических бронхитах, как обструктивных, так и необструктивных, при том, что в составе микрофлоры слизистой

зева больных БА стафилококки обнаружены не были. Вероятно, персистирование стафилококков на слизистых оболочках НДП является дополнительным угрожающим фактором развития аллергического процесса, что согласуется с данными В.Н. Федосеевой и др. [11]. Большой процент выявления стафилококков в мазках со слизистой носа больных ХНЗЛ был обусловлен, в основном, выделением коагулазоотрицательных стафилококков (КОС) в незначительных количествах.

Следует отметить значительный процент выделения энтеробактерий из мокроты больных ХОБЛ и БА при практически полном отсутствии их в составе микрофлоры верхних дыхательных путей этих больных. Поскольку у больных ХНБ в мокроте не были обнаружены энтеробактерии, можно предположить, что их персистирование в бронхах является фактором, утяжеляющим течение ХНЗЛ. Что касается НФГОб, то их представители были выделены из мокроты больных ХОБЛ, ХНБ и БА примерно в одинаковых единичных количествах.

ТАБЛИЦА 1.

Частота выделения и видовой состав бактерий, выделенных от больных ХНЗЛ

Виды бактерий	ХОБЛ (72 чел.)			ХНБ (12 чел.)			БА (25 чел.)		
	мокрота	зев	нос	мокрота	зев	нос	мокрота	зев	нос
<i>Staphylococcus aureus</i>	7	2	2	3		1	6		2
<i>S.epidermidis</i>	10	8	33	1	2	5	8		7
<i>S.chromogenes</i>		1							
<i>S.schleiferi</i>				1		1			
<i>S.cohnii</i>		1							
<i>S.kloosi</i>	1		1						
<i>Escherichia coli</i>	4		1						1
<i>Enterobacter cloacae</i>		3							5
<i>E.aerogenes</i>		2							1
<i>E.sakazakii</i>		2							
<i>Klebsiella oxytoca</i>		1							1
<i>K.pneumoniae</i>		3							
<i>Citrobacter freundii</i>		3							
<i>Proteus mirabilis</i>		1							
<i>Serratia rubidae</i>									1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	3		2	1		1			
<i>Acinetobacter lwoffii</i>		1					2		1

У бактерий, выделенных из мокроты больных ХНЗЛ, был определен комплекс факторов персистенции, включающий антилизоцимную, антилактоферриновую и антииммуноглобулиновую активности. АЛА бактерий, подавляющая мощный фактор неспецифической резистентности организма – лизоцим, является признанным показателем персистенции микроорганизмов на слизистых оболочках, причем значения активности 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]. Распределение различных видов бактерий, выделенных из мокроты больных ХНЗЛ, по уровням АЛА (таблица 2) показало, что активность более 2 мкг/мл проявили 7 из 15 культур *S. aureus*, все 5 исследованных штаммов КОС, 11 из 22 культур энтеробактерий и ни один из представителей НФГОБ. Среди энтеробактерий более высокими значениями АЛА отличались энтеробактерии и клебсиеллы.

Было проведено сравнение уровней АЛА стафилококков и энтеробактерий, выделенных при различных заболеваниях НДП (таблица 3). В целом, при ХОБЛ доля культур, обладающих АЛА, была меньше, чем при БА и ХНБ, однако разница в значениях АЛА, выявленных как для стафилококков, так и для энтеробактерий, при различных ХНЗЛ была незначительной при $p < 0,1$.

ТАБЛИЦА 2.
Распределение бактерий, выделенных из мокроты больных ХНЗЛ, по уровням антилизосимной активности

Бактерии	Число культур	АЛА	АЛА	АЛА	АЛА
		0	<2 мкг/мл	2-4 мкг/мл	> 4 мкг/мл
<i>S.aureus</i>	15	4	4	3	4
КОС	5	0	0	3	2
<i>E.coli</i>	3	1	1	0	1
<i>Enterobacter spp.</i>	12	2	3	2	5
<i>Klebsiella spp.</i>	3	0	1	1	1
<i>C.freundii</i>	3	1	1	0	1
<i>S.rubidae</i>	1	0	1	0	0
НФГОБ	3	1	2	0	0

ТАБЛИЦА 3.
Антилизосимная активность бактерий, выделенных при различных ХНЗЛ

ХНЗЛ	Бактерии	Число штаммов	Число АЛА+ штаммов (%)	АЛА (мкг/ед.о.п.)
ХОБЛ	<i>Staphylococcus spp.</i>	10	70	3,9±1,3
ХОБЛ	Энтеробактерии	14	78,6	2,2±0,6
БА	<i>Staphylococcus spp.</i>	6	83,3	4,6±2,2
БА	Энтеробактерии	8	87,5	5,1±2,1
ХНБ	<i>Staphylococcus spp.</i>	4	100	2,5±0,4

Одним из факторов персистенции бактерий является АЛФА, направленная против лактоферрина – железосвязывающего белка, входящего в состав многих секретов макроорганизма и обладающего бактерицидным действием [13]. Определение АЛФА бактерий, выделенных из мокроты больных ХНЗЛ, показало, что уровень активности 15 исследованных культур стафилококков (39,9±1,7 нг/мл) был в 1,5 раза выше, чем у 16 исследованных культур энтеробактерий (25,8±4,8 нг/мл), разница достоверна при $p < 0,02$.

Исследование антииммуноглобулиновой активности бактерий из НДП больных ХНЗЛ выявило практически одинаковый уровень АИА у стафилококков и энтеробактерий. Из 12

культур стафилококков АИА против IgG обладали 7, против IgM – 9, против IgA – 3 штамма, тогда как из 16 исследованных культур энтеробактерий АИА против IgG проявили 8 штаммов, против IgM – 10, против IgA – 2 штамма. Было проведено сравнение уровней АИА бактерий, выделенных при различных заболеваниях НДП. Из 19 изолятов бактерий от больных ХОБЛ 2 штамма не обладали АИА, 7 проявили АИА против одного из иммуноглобулинов IgG, IgM или IgA, 9 – одновременно против двух из них и 1 против всех трех классов иммуноглобулинов, то есть АИА против двух и более классов иммуноглобулинов обладали 52,6% изолятов. Исследованные изоляты от больных ХНБ (4 штамма) обладали активностью только против IgM. Из 9 штаммов бактерий, выделенных из мокроты больных БА, 3 проявляли АИА против двух классов иммуноглобулинов (33,3%), 5 – против одного иммуноглобулина (IgG или IgM) и 1 культура не обладала АИА. Таким образом, исследованные культуры бактерий, выделенные из мокроты больных ХОБЛ, проявляли более выраженную АИА по сравнению с изолятами от больных ХНБ и БА.

Заключение

Анализ встречаемости стафилококков, энтеробактерий и НФГОБ в составе микрофлоры респираторного тракта больных ХНЗЛ показал, что у четверти и трети больных ХОБЛ и ХНБ, соответственно, в мокроте присутствовали стафилококки (в основном, *S. aureus* и *S. epidermidis*), причем вдвое чаще, чем на слизистой зева. Частота выделения стафилококков из мокроты больных БА вдвое превышала таковую у больных хроническими бронхитами, как обструктивными, так и необструктивными, что может свидетельствовать о важной роли этих бактерий в развитии обострений БА.

Энтеробактерии были выделены из мокроты четверти и трети больных ХОБЛ и БА, соответственно, и не были обнаружены у больных ХНБ, что позволяет предположить наличие связи персистенции энтеробактерий в бронхах с патогенезом заболеваний.

Выделение НФГОБ в единичных количествах при всех исследованных нозоформах ХНЗЛ не позволило сделать однозначного вывода об участии этих бактерий в патологическом процессе.

Исследование факторов персистенции выделенных бактерий не показало достоверной разницы в уровнях АЛА стафилококков и энтеробактерий, выделенных из мокроты больных различными ХНЗЛ. У исследованных культур стафилококков был выявлен более высокий уровень АЛФА и практически одинаковый уровень АИА по сравнению с культурами энтеробактерий. Изоляты бактерий от больных ХОБЛ чаще проявляли АИА против двух и трех классов иммуноглобулинов, чем бактерии, выделенные от больных ХНБ и БА.



ЛИТЕРАТУРА

1. Яковлев С.В. Клинико-микробиологические обоснования выбора антибактериальных препаратов при обострении хронического бронхита. Инфекции и антимикробная терапия. Т. 2. № 2. С. 54-58.

2. Воропаева Е.А. Микробная этиология и гистаминообразующая активность микроорганизмов задней стенки глотки детей, больных бронхиальной астмой: Автореф. дис...канд. биол. наук. М. 2002. 26 с.
3. Беляева Е.В. и др. Биологическая характеристика бактерий, колонизирующих слизистые оболочки дыхательных путей, при хронических заболеваниях. Медицинский альманах. 2009. № 2 (7). С. 114-117.
4. Бухарин О.В. Персистенция патогенных бактерий. М.: Медицина, 1999. 364 с.
5. Бухарин О.В., Гинцбург А.П., Романова Ю.М., Эль-Регистан Г.И. Механизмы выживания бактерий. М.: Медицина, 2005. 367 с.
6. Карташова О.Л., Киргизова С.Б., Потехина Л.П., Бухарин О.В. Диагностическое значение персистентных характеристик стафилококков при бактерионосительстве. Ж. микробиологии. 2007. № 5. С. 13-16.
7. Хуснутдинова Л.М. Микрофлора слизистой оболочки миндалин человека в норме и при патологии. Ж. микробиологии. 2006. № 1. С. 60-63.
8. Абрамзон О.М., Елагина Н.Н., Карташова О.Л. и др. Характеристика микрофлоры, выделенной при острых воспалительных заболеваниях легких и плевры. Ж. микробиологии. 2003. № 4. С. 44-47.
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. Вальшева И.В., Вальшев А.В., Карташова О.Л. и др. Новый метод определения антилактоферриновой активности микроорганизмов. Ж. микробиологии. 2003. № 4. С. 64-67.
11. Федосеева В.Н., Молотиллов Б.А., Ларина О.Н., Федоскова Т.Г.. Бактериальная аллергия. Пенза. 2004. 213 с.
12. Вальшев А.В. Факторы персистенции энтеробактерий и влияние на них пробиотиков при дисбиозе кишечника: Автореф. дис...канд. мед. наук. Оренбург. 1997. 18 с.
13. Вальшева И.В. Антилактоферриновая активность микроорганизмов: Автореф. дис...канд. биол. наук. Оренбург. 2005. 20 с.