

Хуснутдинова Л.М.

Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН
Оренбургская государственная медицинская академия, Оренбург, Россия

МОДИФИКАЦИЯ БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ БАКТЕРИЙ В УСЛОВИЯХ АССОЦИИ ИНДИГЕННОЙ И ПАТОГЕННОЙ МИКРОФЛОРЫ

Изучен характер межмикробных взаимодействий среди представителей микробиоценоза слизистой оболочки миндалин. Установлено, что штаммы *S.aureus* усиливают экспрессию факторов патогенности и персистенции кокковой микрофлоры.

Ключевые слова: микробиоценоз, межбактериальные взаимодействия, модификация факторов патогенности.

Введение

В природе не существует так называемых чистых биосистем, и подавляющее большинство явлений, наблюдаемых в естественных условиях, является результатом эволюционно сложившихся форм существования различных ассоциаций [4]. Широкое распространение микроорганизмов, существование в близких территориальных границах, конкуренция за питательные ресурсы, борьба за сохранение вида – все это неизбежно приводит к тесному взаимодействию биологических существ во всем многообразии их проявлений [1].

Многие из микроорганизмов, обитающих на коже и слизистых оболочках организма здорового человека, приспосабливаются к взаимным воздействиям в процессе эволюции их симбиоза. Вырабатывается состояние подвижного равновесия. Среди ассоциаций многочисленны примеры взаимоотношений двух и более микроорганизмов разных видов, при которых создаются взаимовыгодные условия и ассоцианты совместно участвуют в регуляции отношений с организмом хозяина [2].

При попадании в биотоп истинного патогена или снижении активности защитных механизмов организма хозяина равновесие сдвигается в пользу возбудителя, что способствует развитию инфекционного процесса. Изменения в проявлении патогенных свойств представителями микрофлоры миндалин с учетом их симбиотических связей изучены недостаточно. Вместе с тем, данные об изменчивости биологических свойств микробов-ассоциантов могут быть использованы как критерии для диагностики патологического процесса.

Целью настоящего исследования явилось изучение особенностей модификации

факторов патогенности и персистенции при взаимодействии микроорганизмов, выделенных из одного биотопа тела человека.

Материалы и методы.

В работе использовано 456 штаммов микроорганизмов, выделенных из биоценоза слизистой оболочки миндалин здоровых людей; бактерионосителей *Staphylococcus aureus*; больных хроническим тонзиллитом, у которых помимо других видов были изолированы штаммы *S.aureus*; больных хроническим тонзиллитом, у которых *S.aureus* не был выделен. Выделение и идентификацию штаммов микроорганизмов проводили на основании общепринятых методов по морфологическим, тинкториальным, культуральным и биохимическим свойствам [6]. Модификацию факторов патогенности: гемолитической (ГА), лецитовителлазной (ЛецА), лизоцимной (ЛА) и антилизоцимной (АЛА) активностей – изучали с использованием разработанного метода сокультивирования симбионтов, изолированных из одного биотопа, на плотной питательной среде. Суть метода заключалась в следующем: из суточных культур микробов-симбионтов готовились 1 млрд. взвеси каждого микроорганизма в стерильном физиологическом растворе. В чашке Петри (диаметром 9 см) с плотной питательной средой стандартной микробиологической петлей (диаметром 2 мм) производился посев штрихом (длина 15 мм, ширина 2 мм) штамма-1 горизонтально, на противоположной стороне вертикальной полосой высевался штамм-2. Это контрольные посева. В центре чашки проводился посев этих же штаммов с пересечением в центре под прямым углом. Таким

образом, в месте перекреста происходило взаимодействие штаммов между собой. Чашки инкубировались в термостате при $t^0=37^{\circ}\text{C}$ 24 часа. Учет результатов производился путем измерения зоны действия фактора: в опыте - отступая 2 мм от центра пересечения штрихов-посевов микробов-симбионтов, в контроле – на середине штриха-посева. Предложенный метод является качественным, позволяет выявить наличие изменений в свойствах микроорганизмов при симбиотическом выращивании, по сравнению с контрольными посевами.

Полученные результаты были обработаны с использованием параметрических и непараметрических методов математического анализа [5].

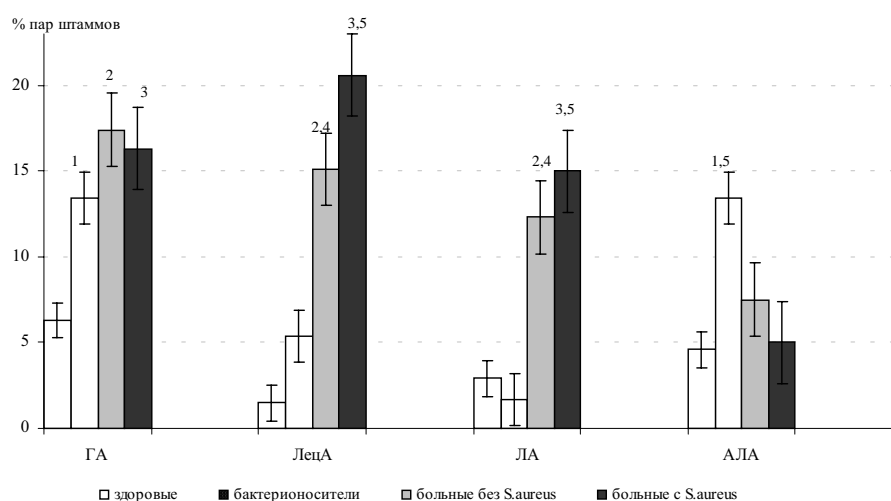
Результаты

Было выделено 42 штамма патогенных видов микроорганизмов (*Streptococcus pyogenes.*, *Staphylococcus aureus*) и 413 штаммов, представителей индигенной (нормальной) микрофлоры слизистой оболочки миндалин (*S.salivarius*, *S.oralis*, *S.milleri*, *S.mutans*, *S.hominis*, *S.epidermidis*, *S.haemolyticus*, *S.warneri*, *Aerococcus viridas*, *Aerococcus viridans*).

В условиях сокультивирования штаммов на плотной питательной среде выявлены раз-

личные формы взаимодействия микроорганизмов по продукции факторов патогенности бактерий: усиление, ослабление и отсутствие изменений (индифферентность). Взаимодействие культур, выделенных от больных, чаще сопровождалось усилением и ослаблением выраженности биологических свойств симбионтов (14,1% и 23,3% против 4,2% и 18,5% соответственно), по сравнению со штаммами, выделенными от здоровых. Штаммы, изолированные из биоценоза здоровых людей, в 77,3% случаев не оказывали влияния на взаимное проявление факторов патогенности. Представители патобиоценоза в условиях совместного культивирования *in vitro* оказывали более интенсивные влияния на выработку факторов патогенности. Чаще отмечалось усиление (8,5 - 23,7%) и подавление (9,7 - 22,1%) выраженности ГА, ЛецА, ЛА и АЛА, по сравнению с микрофлорой, изолированной из нормоценоза (2,4 - 7,9 % и 6,5 - 16,9 % соответственно, $p<0,05$), где преобладали индифферентные эффекты на проявление биологических свойств симбионтов: 48,9 - 87,5% против 36,8 - 77,8% у больных, $p<0,05$.

Таким образом, было установлено, что штаммы микроорганизмов, выделенные из нормоценозов, часто не оказывали влияния друг на друга по факторам патогенности. Основываясь на этом, можно говорить о по-



Примечание: цифрами обозначена достоверность различий при $p<0,05$: 1 – в группах здоровых и бактерионосителей; 2 – в группах здоровых и больных без *S.aureus*; 3 – в группах здоровых и больных с *S.aureus*; 4 – в группах бактерионосителей и больных без *S.aureus*; 5 – в группах бактерионосителей и больных с *S.aureus*.

Рисунок 1. Частота синергизма в экспрессии факторов патогенности при взаимодействии условно-патогенных бактерий

тенциальной возможности бактерий-симбионтов поддерживать стабильность биоценоза в норме. Взаимодействия штаммов, выделенных от больных, носили разнонаправленное действие на проявление факторов патогенности: их усиление или подавление.

На рисунке 1 представлены результаты синергидного эффекта в экспрессии факторов патогенности при взаимодействии условно-патогенных микроорганизмов.

Как видно из приведенного рисунка, усиление ГА чаще наблюдалось при взаимодействии условно-патогенных бактерий, выделенных из биоценозов больных хроническим тонзиллитом и бактерионосителей, по сравнению со штаммами от здоровых ($13,4 \pm 3,2\%$ случаев, $15,1 \pm 1,6\%$ случаев и $17,4 \pm 1,7\%$ случаев против $6,3 \pm 0,9\%$ случаев, $p < 0,05$). Повышение ЛецА и ЛА чаще наблюдалось при взаимодействии штаммов от больных ($15,6 \pm 1,6\%$ случаев, $20,6 \pm 3,2\%$ случаев и $12,3 \pm 1,5\%$ случаев, $15,0 \pm 2,8\%$ случаев соответственно) по сравнению со здоровыми ($1,5 \pm 0,5\%$ случаев и $2,9 \pm 0,7\%$ случаев соответственно, $p < 0,05$) и бактерионосителями ($5,4 \pm 2,1\%$ случаев и $1,7 \pm 1,3\%$ случаев соответственно, $p < 0,05$). Усиление АЛА более часто обнаружено при взаимодействии условно-патогенных видов бактерий, выделенных из биоценозов бактерионосителей ($13,4 \pm 3,2\%$ случаев), по сравнению со здоровыми ($4,6 \pm 0,8\%$ случаев) и больными ($5,0 \pm 1,7\%$ случаев).

Наряду с повышением частоты проявления факторов патогенности, в определенном проценте случаев имело место их подавление при межмикробных взаимодействиях. Взаимодействие условно-патогенных микроорганизмов, выделенных от стафилококковых бактерионосителей, чаще, по сравнению с микроорганизмами от больных людей, характеризовалось снижением лизоцимной активности ($17,0 \pm 3,5\%$ случаев против $6,9 \pm 1,1\%$ случаев, $p < 0,05$).

Индифферентные влияния на проявление биологических свойств чаще проявлялись при взаимодействии штаммов, выделенных от здоровых людей. При взаимодействии условно-патогенных микроорганизмов, представителей нормоценоза, по сравнению со штаммами, выделенными из био-

ценоза больных, чаще наблюдался индифферентный эффект по экспрессии ЛА ($81,3 \pm 3,7\%$ случаев против $66,9 \pm 3,7\%$ случаев, $p < 0,05$) и АЛА ($90,1 \pm 1,2\%$ случаев против $74,1 \pm 4,1\%$ случаев, $p < 0,05$). Кроме того, микроорганизмы, представители нормоценоза, в $47,5 \pm 1,9\%$ случаев не оказывали влияния на ростовые характеристики бактерий-симбионтов.

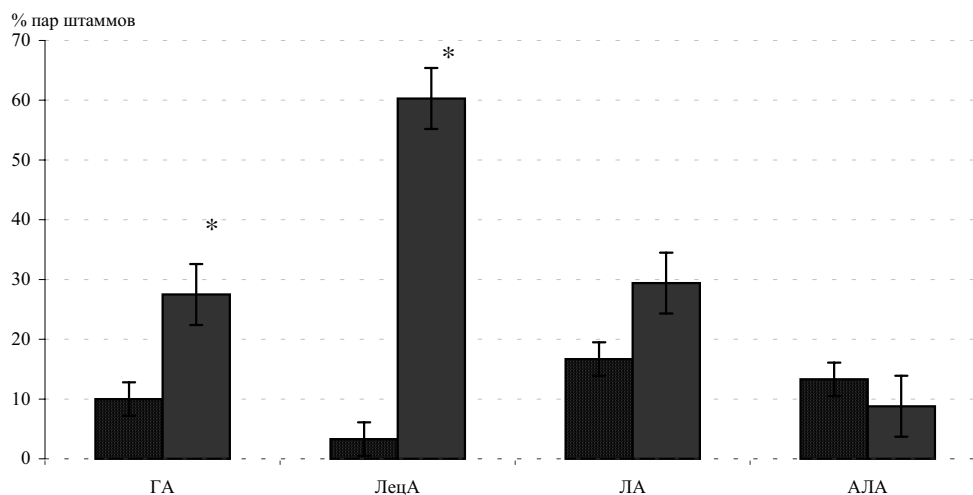
При взаимодействии между штаммами *S.aureus*, выделенными из биоценоза больных и бактерионосителей, наблюдали подавление гемолитической активности в $30,0 \pm 14,4\%$ случаев и $33,3 \pm 19,2\%$ случаев соответственно. Подавление лецитовителлазной активности наблюдали только при взаимодействии штаммов из биоценоза бактерионосителей ($16,7 \pm 15,2\%$ случаев), а антилизоцимной активности – только у штаммов из биоценоза больных ($20,0 \pm 12,6\%$ случаев).

На следующем этапе изучались межбактериальные взаимодействия при сокультивировании штаммов условно-патогенных стафилококков и штаммов *S.aureus* (рис. 2).

Как видно из представленных данных, отмечалось повышение частоты выраженности ГА штаммов из биоценоза больных ($27,5 \pm 5,4\%$ против $10,0 \pm 5,4\%$ случаев, $p < 0,05$) и ЛецА (в $60,3 \pm 5,9\%$ против $3,3 \pm 3,2\%$ случаев, $p < 0,05$).

Штаммы коагулазоотрицательных стафилококков, выделенных из патоценоза, усиливали ЛецА и ЛА патогена (у $52,9 \pm 8,5\%$ и $32,4 \pm 8,0\%$ штаммов, $p < 0,05$), при этом у них самих усиливалась экспрессия ГА и ЛецА (у $32,3 \pm 8,0\%$ и $67,6 \pm 8,0\%$ штаммов, соответственно, $p < 0,05$).

Изменения в экспрессии ГА и ЛецА наблюдались и при взаимодействии условно-патогенных стрептококков с золотистым стафилококком ($26,3 \pm 7,1\%$ симбиотических связей с модификацией ГА у штаммов от больных против $8,8 \pm 4,8\%$ среди штаммов от бактерионосителей и $31,6 \pm 7,5\%$ случаев симбиоза с модификацией ЛецА у штаммов из патоценоза против $2,9 \pm 2,8\%$ у штаммов, выделенных из нормоценоза, $p < 0,05$). Штаммы рода *Streptococcus* ослабляли ГА у $36,8 \pm 11,0\%$ штаммов *S.aureus*, но усиливали ЛецА у $47,4 \pm 11,4\%$ штаммов золотистого стафилококка, выделенного из патоценоза.



Примечание: * достоверность отличий $p < 0,05$ ■ бактерионосители ■ больные

Рисунок 2. Распространенность синергидных взаимодействий штаммов *S.aureus* и коагулазоотрицательных стафилококков, выделенных от бактерионосителей и больных хроническим тонзиллитом.

| Индикаторные пары | Обследуемые (микробиоценозы) | ГА | ЛецА | ЛА | АЛА |
|-------------------|------------------------------|----|------|----|-----|
| индиген-индиген | Больные | у | у | у | п |
| | Бактерионосители | у | и | п | у |
| | Здоровые | и | и | и | и |
| патоген-индиген | Больные | у | у | у | п |
| | Бактерионосители | и | и | и | и |

Примечание: у взаимное усиление выраженности фактора

п взаимное подавление выраженности фактора

и индифферентное действие

Рисунок 3. Особенности функционирования индикаторных пар бактерий по выраженности факторов патогенности.

Усиление выраженности факторов патогенности у представителей индигенной флоры под действием золотистого стафилококка может подтверждать его роль возбудителя. Увеличивая численность штаммов условно-патогенных микроорганизмов, обладающих ГА, ЛецА и ЛА, *S.aureus* может способствовать поддержанию воспалительного процесса. Снижение антилизоцимной активности может привести к элиминации нормофлоры из биоценоза, что подтверждалось формированием дисбиоза на слизистой оболочки миндалин у больных хроническим тонзиллитом: уменьшение количественного и качественного состава микробиоценоза.

Обсуждение

Установлено, что взаимодействия между представителями индигенной микрофлоры,

выделенными из биоценоза слизистой оболочки миндалин больных хроническим тонзиллитом, носят синергидный характер по экспрессии ГА, ЛецА и ЛА, антагонистический - по АЛА и ростовым показателям. Данный тип функциональной связи между ассоциантами, очевидно, способствует поддержанию дисбиоза и хроническому течению патологического процесса. Взаимодействия микроорганизмов, изолированных из биоценоза бактерионосителей *S.aureus*, характеризуются усилением ГА, АЛА и снижением ЛА. ЛецА в условиях симбиоза бактерий не меняется. Данный тип симбиоза может характеризовать дисбиоз и персистенцию возбудителя при резидентном стафилококковом бактерионосительстве. Взаимодействия представителей нормофлоры, выделенных от здоровых людей, носили индиф-

ферентный характер по проявлению факторов патогенности, что может объяснить формирование стабильного зубиоза на слизистой оболочке миндалин здоровых лиц.

Схематически наиболее характерные особенности функционирования по выраженности факторов патогенности бактерий, выделенных из нормоценозов и патоценозов, можно представить следующим образом (рисунок 3).

Как видно из рисунка 3, взаимодействия между микроорганизмами – представителями нормальной микрофлоры, выделенными от больных хроническим тонзиллитом, носят синергидный характер по выраженности ГА, ЛецА и ЛА, антагонистический - по АЛА. Взаимодействия штаммов из биоценоза бактерионосителей при межмикробных взаимодействиях характеризуются усилением ГА и АЛА, снижением ЛА, а ЛецА не меняется. Взаимодействия микроорганизмов

представителей нормофлоры, изолированных от здоровых людей, носили, индифферентный характер по проявлению факторов патогенности.

Выявленные особенности межбактериальных взаимодействий в индикаторных парах позволяют предложить микробиологические критерии диагностики хронического тонзиллита. Предлагаемый способ (патент РФ на изобретение №2188422 от 27 августа 2002 года) позволял повысить эффективность диагностики, а именно повысить точность и сократить ее сроки. Результаты исследования изложены в информационно-методическом письме ГУЗО Оренбургской области «Микробиологические основы диагностики хронического тонзиллита» (Оренбург, 2003) и внедрены в практику бактериологических лабораторий МГКБ №6 г.Оренбурга и Отделенческой клинической больницы станции Оренбург.

Список использованной литературы:

1. Белобородова Н.В. Гомеостаз малых молекул микробного происхождения и его роль во взаимоотношении микроорганизмов с организмом хозяина / Н.В. Белобородова, Г.А. Осипов // Вестник РАМН. – 1999. – №7. – С. 25-31.
2. Беляков В.Д. Гипотеза направленной самоперестройки популяции микроорганизмов и ее общепатологическое значение / В.Д. Беляков, Г.Д. Каминский, С.Г. Каминская // Журн. микробиол. – 1985. -№1.– С.93-100.
3. Бухарин О.В. Некоторые особенности микрофлоры миндалин и межмикробного взаимодействия (в норме и при патологии) / О.В. Бухарин, Б.Я. Усвяцов, Л.М. Хуснутдинова // Журн.микробиол.-2000.-№4 приложение – С. 82-85.
4. Воробьев А.А., Гинцбург А.Л., Бондаренко В.М. Мир микробов. Вестник РАМН. 2000, 11:11-14.
5. Лакин Г.Ф. Биметрия. М.Высшая школа. 1990.
6. Справочник по микробиологическим и вирусологическим методам исследования. Под ред. Биргер М.О. М., «Медицина» 1982.

Исследования поддержаны грантом РФФИ №04-04-96151-р2004урал_а.