

АНТИКАРНОЗИНОВАЯ АКТИВНОСТЬ И ЕЕ РОЛЬ В ПЕРСИСТЕНЦИИ МИКРООРГАНИЗМОВ

На модели экспериментальной стафилококковой инфекции получены доказательства участия антикарнозиновой активности (АКрА) бактерий в их персистенции. Анализ распространенности и выраженности признака у клинических изолятов бактерий показал, что АКрА преимущественно обладают стафилококки; при этом высокие значение признака регистрировались у культур, выделенных из биотопа с высокой концентрацией карнозина (обонятельный эпителий слизистой оболочки носовых ходов), что имеет значение в феномене бактерионосительства этих микроорганизмов.

Введение

Феномен выживания бактерий в организме хозяина рассматривается как одно из важных звеньев в патогенезе инфекционного процесса. Выживание бактерий в макроорганизме реализуется через их адаптацию к факторам защиты хозяина и может быть связано с инактивацией последних [3]. Одним из таких факторов защиты хозяина является природный дипептид карнозин, в отношении которого установлена способность бактерий, преимущественно стафилококков, его инактивировать [5, 6].

Целью настоящей работы явилось экспериментально-клиническое исследование роли антикарнозиновой активности микроорганизмов в их персистенции.

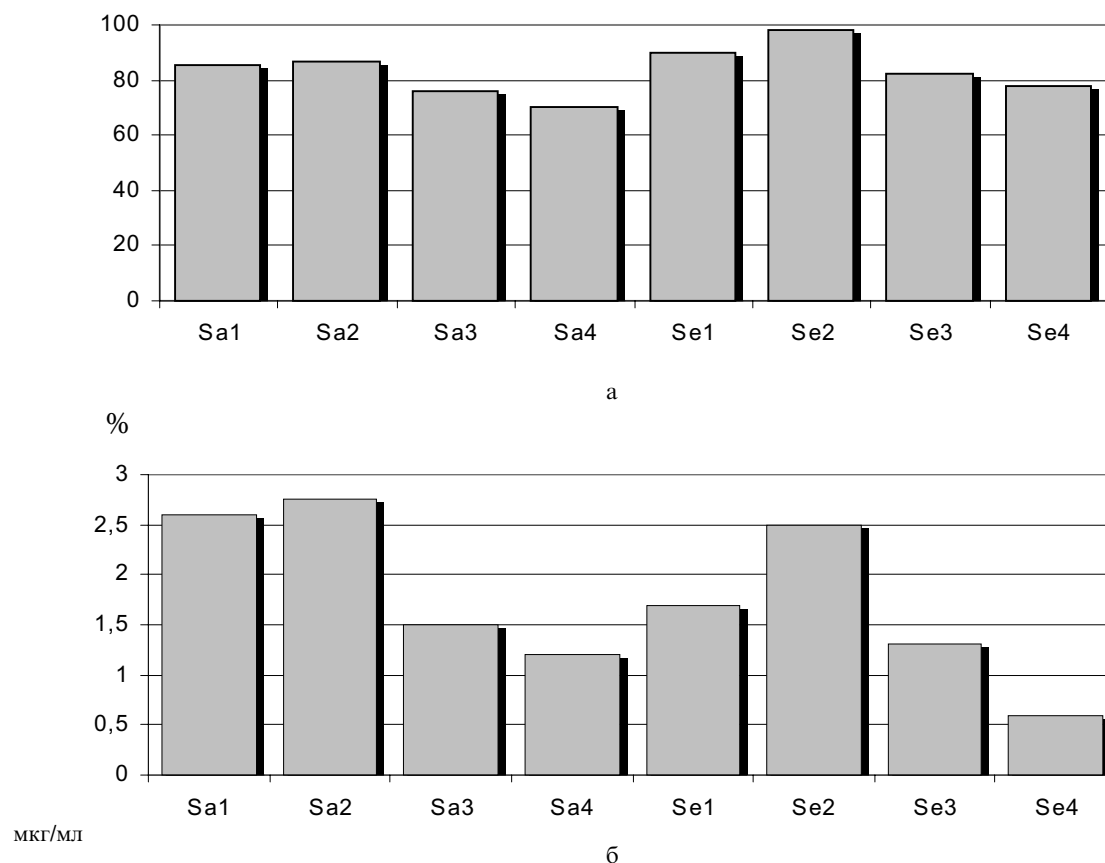
Материалы и методы

Для определения биологической роли АКрА микроорганизмов использовали интраорбитальное заражение [1] мышей-самцов линии СВА массой 18 – 20 г отобранной парой изогенных клонов штамма N 52 *Staphylococcus aureus*, выделенного со слизистой оболочки переднего отдела носа у резидентного бактерионосителя. Штамм обладал типичными биологическими свойствами, проявлял антикарнозиновую активность 3,0 мкг/мл, относился к фаготипу 53/83 III фагогруппы. Из данного штамма методом «реплик» [11] были получены изогенные клоны, отличающиеся по антикарнозиновой активности (3,0 мкг/мл и 0,1 мкг/мл), условно обозначенные нами как «клон с высоким» и «клон с низким» уровнями АКрА. Инфицирование мышей проводили 0,2 мл взвеси суточной агаровой культуры *S. aureus* концентрацией 1×10^9 КОЕ/мл. Для опреде-

ления микробной обсемененности в различные сроки исследования (от 10 до 49 дней) выделяли почки, гомогенизировали и высевали стандартной бактериологической петлей на желточно-солевой агар методом секторных посевов (по 6 мышей каждой группы) [8]. Выделенные штаммы идентифицировали по стандартным биологическим и биохимическим свойствам. Идентичность выделенных культур устанавливали по сходству фаготипа [7].

Для характеристики распространенности и выраженности АКрА клинических изолятов использовали: 134 штамма *Staphylococcus aureus*, 254 – *Staphylococcus epidermidis*, выделенных со слизистой оболочки переднего отдела носа у здоровых лиц (17-18 лет) и часто длительно болеющих (ЧДБ) респираторными заболеваниями детей 9-14 лет, являющихся резидентными бактерионосителями (у которых трижды, с интервалом в 10 дней, выделяли золотистый стафилококк одного и того же фаготипа) [9]. Изолированные штаммы микроорганизмов идентифицированы по морфологическим, тинкториальным, биохимическим и антигенным характеристикам общепринятыми методиками [7]. Кроме того, были изучены золотистые и эпидермальные стафилококки, выделенные от 42 больных с гнойным воспалением околоносовых пазух и 27 больных с постинъекционными абсцессами мягких тканей, а также бактерии семейства *Enterobacteriaceae* (24 штамма), выделенные от больных с патологией кишечника.

Антикарнозиновую активность микроорганизмов определяли известным методом [4]. Статистическую обработку результатов проводили с использованием критерия Стьюдента-Фишера [2].



Sa – *S.aureus*; Se – *S.epidermidis*

1 – выделенные со слизистой носа у здоровых; 2 – выделенные со слизистой носа у часто и длительно болеющих детей; 3 – от больных с абсцессами мягких тканей; 4 – от больных синуситами

Рисунок 1. Распространенность (А) и уровни выраженности (Б) АКрА стафилококков

Результаты и их обсуждение

При оценке АКрА у бактерий разных видов установлено, что способность к инактивации карнозина распространена как среди грамположительных, так и грамотрицательных микроорганизмов. При этом отмечалась значительная межвидовая вариабельность: так, у представителей семейства *Enterobacteriaceae* признак регистрировали в 33%-50% случаев, а выраженность АКрА составляла для *E.coli* $0,6 \pm 0,2$; *Klebsiella oxitosa* $0,6 \pm 0,2$; *Citrobacter freundii* $1,2 \pm 0,4$ и *Enterobacter cloacae* $0,1 \pm 0,05$ мкг/мл.

В отличие от энтеробактерий, подавляющее большинство стафилококков обладало способностью инактивировать карнозин. При этом способность к инактивации карнозина была выявлена у 79,5% штаммов *S.aureus* и 88% штаммов *S.epidermidis*; уровень выраженности признака составлял $2,0 \pm 0,3$ мкг/мл и $1,5 \pm 0,2$ мкг/мл соответственно.

Изучение диапазона распространения АКрА позволило заключить, что признак наиболее часто встречается у стафилококков и значительно реже у представителей семейства *Enterobacteriaceae*.

Вместе с тем была изучена распространенность и уровни выраженности АКрА стафилококков в зависимости от источника выделения (рис.1). Отмечено, что у стафилококков, выделенных со слизистой оболочки переднего отдела носа, АКрА выявлялась значительно чаще (85%-90,9%) в сравнении со штаммами, выделенными при гнойно-воспалительных заболеваниях (70%-82%). АКрА у *S.epidermidis*, выделенных от резидентных бактерионосителей, составляла $1,7 \pm 0,2$ мкг/мл, у *S.aureus*, $2,6 \pm 0,3$ мкг/мл. Высокие значения признака регистрировали у штаммов как золотистых, так и эпидермальных стафилококков ($2,7 \pm 0,4$ мкг/мл и $2,5 \pm 0,4$ мкг/мл соответственно), выделенных от часто дли-

тельно болеющих детей, являющихся резидентными бактерионосителями.

Среди стафилококков, выделенных при гнойно-воспалительных заболеваниях, наиболее часто (у 85% штаммов *S.epidermidis* и 82% штаммов *S.aureus*) и с более высокими значениями ($1,3 \pm 0,1$ мкг/мл и $1,5 \pm 0,2$ мкг/мл соответственно) АКрА регистрировали у культур, выделенных из исследуемого материала у больных с постинъекционными абсцессами мягких тканей в сравнении со штаммами, выделенными из исследуемого материала при синуситах: в 78% случаев у *S.epidermidis* и 70% у *S.aureus* с выраженностью признака $0,6 \pm 0,05$ мкг/мл и $1,2 \pm 0,1$ мкг/мл соответственно.

Таким образом, АКрА наиболее выражена у штаммов стафилококков, выделенных от резидентных бактерионосителей и в меньшей степени у штаммов, выделенных от больных гнойно-воспалительными заболеваниями.

Изучение длительности паразитирования изогенных клонов при интраорбитальном заражении мышей показало, что стафилококк с низким уровнем АКрА выделялся из органов инфицированных мышей в течение 35 дней (в среднем – $17,5 \pm 2,0$ дней), тогда как клон с высоким уровнем признака выделялся более длительно: до 42 дня с момента заражения (в среднем $24,2 \pm 2,8$ дня) ($p < 0,05$).

Поскольку при стафилококковой экспериментальной инфекции в почечной ткани животных наблюдаются стабильные и высокие показатели микробной обсемененности [10], этот орган был выбран для посева микроорганизмов. Бактериологическое исследование

почечной ткани животных выявило более высокий уровень микробной обсемененности практически на всех сроках наблюдения мышей, инфицированных клоном золотистого стафилококка с высоким значением признака в сравнении с изогенным клоном (рис.2).

Экспериментально полученные результаты свидетельствовали о наличии связи антикарнозиновой активности с длительностью пребывания стафилококков в организме инфицированных животных.

Для изучения динамики АКрА стафилококков было проведено исследование популяционной структуры клонов по этому признаку в процессе экспериментальной инфекции. Исходная популяционная структура клонов представлена на рис.3, из которого видно, что распространенность АКрА в популяциях находилась в зависимости от исходного уровня антикарнозиновой активности клона. В ходе инфекционного процесса структура популяций по признаку АКрА существенно изменялась в сторону повышения ее гетерогенности, а на завершающем этапе снижалась. Обобщая результаты проведенных исследований по оценке персистирующей характеристики клонов золотистого стафилококка, обусловленную наличием антикарнозинового признака, следует отметить, что при инфицировании клоном с низким уровнем АКрА с течением времени, наряду со снижением массивности обсеменения стафилококками почек животных, возрастало количество популяций с отсутствием признака, что приводило к полному освобождению организма от воз-

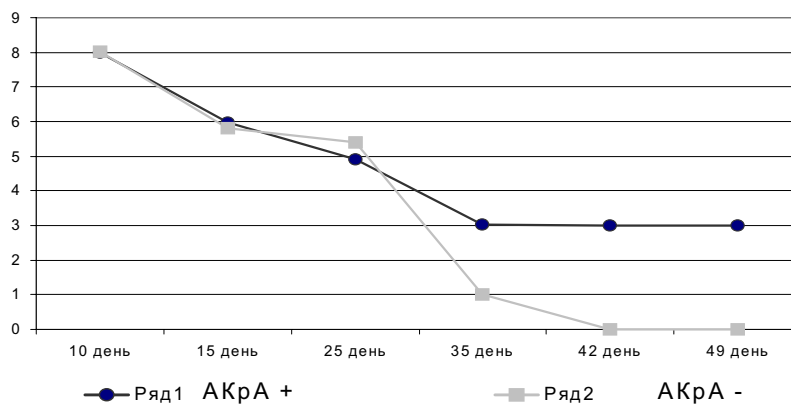


Рисунок 2. Динамика микробной обсемененности почек мышей в зависимости от исходного уровня АКрА

будителя к 42 суткам. Клон с высокой АКрА длительное (в 1,2 раза) персистировал в организме инфицированных мышей; исследование популяционной структуры стафилококков в динамике экспериментальной инфекции показало преобладание в субпопуляциях клонов с высокой АКрА, что позволяло возбудителю длительно находиться в организме экспериментальных животных с последующей элиминацией микроорганизмов лишь на 49 день после заражения.

Полученные в ходе экспериментального инфекционного процесса результаты показали, что клон золотистого стафилококка, обладающий высоким уровнем антикарно-

зиновой активности, длительное выделялся из организма мышей по сравнению с клоном с низкой АКрА. При исследовании клинических изолятов установлено, что АКрА является широко распространенным признаком и существенно зависит от вида микроорганизма и источника выделения: так, чаще способностью к инаktivации карнозина обладали стафилококки, а высокие значения признака были характерны для культур, выделенных из биотопа с высокой концентрацией карнозина (обонятельный эпителий слизистой оболочки носовых ходов) [12], что, по-видимому, имеет значение в феномене бактерионосительства.

Список использованной литературы:

1. Анатолий С. А. Сравнительная характеристика некоторых экспериментальных моделей стафилококковой инфекции. / Анатолий С. А., Антоновская И.И., Таск С.Я. и др. // Журн. микробиол.– 1971.–№9.–С. 60-63.
2. Ашмарин И.П. Статистические методы в микробиологических исследованиях. /Ашмарин И.П., Воробьев А.А.– Л., 1962.–179с.
3. Бухарин О.В. Персистенция патогенных бактерий. М.: Медицина; Екатеринбург: УрО РАН, 1999.–366с.
4. Бухарин О.В. Способность стафилококков к инаktivации карнозина. / Бухарин О.В., Чернова О.Л., Матюшина С.Б. // Бюлл. exper. биол. и мед.– 1999.–№5.– С.545-546.
5. Бухарин О.В. Биологическое значение антикарнозиновой активности бактерий. / Бухарин О.В., Стадников А.А., Чернова О.Л. и др.// Журн. микробиол.– 2000.–№4.–С.56-59.
6. Карташова О.Л. Антикарнозиновая активность стафилококков как критерий оценки их персистентного потенциала. / Карташова О.Л., Киргизова С.Б., Стадников А.А., Шевлюк Н.Н. и др. // Журн. микробиол.– 2006.–№4.–С.13-16.
7. Справочник по микробиологическим и вирусологическим методам исследования. / Под ред. М.О. Биргер. М.: Медицина, 1982.–254с.
8. Фельдман Ю.М. Количественное определение бактерий в клинических материалах. /Фельдман Ю.М.// Лабораторное дело.– 1984.–№10.–С. 616-619.
9. Чистович Г.Н. Эпидемиология и профилактика стафилококковых инфекций. / Чистович Г.Н.– Л., 1969.
10. Шеенков Н.В. Роль антилизозимной активности бактерий в развитии инфекционного процесса. Автореф. дисс.-канд. мед. наук. Челябинск, 1993.
11. Lederberg J., Lederberg E. M. Replica plating and indirect selection of bacterial mutants // J. Bacteriol. 1952, 63: 399-406.
12. Margolis F. Carnosine in the primary olfactory pathway. / F.Margolis // Science.–1974.–V.184, N 4139.–P.909-911.

Работа выполнена при поддержке «Фонда содействия отечественной науке».