

МІКРОБІОЛОГІЯ

© О.В. Менкус

УДК 616.093-098:616.2

О.В. Менкус

ВИВЧЕННЯ АНТИКОМПЛЕМЕНТАРНОЇ АКТИВНОСТІ МІКРООРГАНІЗМІВ У ХВОРИХ З ЗАХВОРЮВАННЯМИ ДИХАЛЬНИХ ШЛЯХІВ

ДУ «Інститут мікробіології та імунології ім. І.І.Мечникова АМН України» (м. Харків)

Дослідження проведені в межах виконання планової НДР «Бактеріологічне обґрунтування розробки поживних середовищ із рослинної сировини з використанням модифікованих факторів», № держреєстрації 0210U00121045.

Вступ. Хронічні захворювання органів дихання є серйозною проблемою сучасної медицини, що обумовлено широким розповсюдженням цієї патології та високими показниками інвалідності. В середньому ними страждають не менше 75 % людської популяції.

Проблема адекватної діагностики, лікування і профілактики захворювань органів дихання зберігає актуальність для спеціалістів різного профілю. Комплексний підхід до її рішення базується на інтеграції різних галузей – від молекулярної біології до гігієни та санітарії.

У питаннях діагностики та лікування багато уваги приділяється вивченню ролі умовно-патогенної флори в розвитку захворювань дихальних шляхів. Організм людини містить сотні різних видів мікроорганізмів, більшість з яких – сапрофіти - комменсали. Видовий склад мікробних біоценозів періодично змінюється, до того ж кожному індивіду притаманні більш або менш характерні бактеріальні асоціації [4].

Більшість захворювань органів дихання виникають ще в ранньому дитинстві, які при відсутності своєчасного лікування можуть залишити слід в дорослому віці у вигляді хронічної патології. При цьому створюються умови для довготривалої мікробної персистенції в результаті особливостей формування імунної відповіді організму хазяїна [9].

Тривала персистенція умовно-патогенних мікроорганізмів в організмі хворої людини обумовлюється властивостями мікроорганізмів, їх індіферентністю до зовнішніх факторів. Стійкість до захисних механізмів людини забезпечує стабільні антагоністичні ефекти у біоценозі та збереження життєздатності популяції. Мікроорганізми здатні подавляти дію факторів природної резистентності організму хазяїна, таких як лізоцим, комплемент, лактоферин та ін. Феномен виживання умовно-патогенних бактерій у макроорганізмі розглядається як одна із важливих ланок у патогенезі запального процесу, а їхня здатність до інактивації комплементу (антикомплементарна активність (АКА)) є складовою

персистентного потенціалу. Система комплементу є важливим механізмом протидії макроорганізму агентам, що спричиняють хворобу. Функції комплементу різноманітні: він бере участь у багатьох імунологічних реакціях та спричиняє лізис бактерій, приєднуючись до комплексу антиген - антитіло, проявляє хемотаксичну активність, приймає участь в анафілаксії та відіграє важливу роль в фагоцитозі та позаклітинному кілінгу мікроорганізмів. Оцінювання АКА можливо застосовувати у діагностиці та при прогнозуванні тяжкості перебігу інфекційних захворювань. Патогени, що мають АКА, здатні утворювати більш стійкі біоценози ніж ті, що не володіють цією здатністю [1,2,6,7].

Метою дослідження було вивчення АКА у штамів мікроорганізмів родів *Staphylococcus* та *Streptococcus*, виділених від пацієнтів із захворюваннями органів дихання.

Об'єкт і методи дослідження. Об'єктами дослідження були 312 штамів мікроорганізмів родів *Staphylococcus* та *Streptococcus*, з них 180 штамів (1 група) вилучено від хворих з гострими запальними процесами дихальних шляхів: 64 штамів *S. aureus*, 24 штамів – *S.epidermidis*, 45 штамів – *S.pyogenes*, 13 штамів - *S. pneumoniae*, 14 штамів *S. mitis*, 20 штамів – *S.anginosus* та 132 штамів (2 група) – виділені від осіб групи зрівняння – контрольна група (26 штамів - *S. aureus*, 39 штамів – *S. epidermidis*, 23 штама – *S. pyogenes*, 5 штамів – *S. pneumoniae*, 24 штама – *S. mitis*, 15 штамів - *S.anginosus*). Штами виділені зі слизової оболонки носових ходів, задньої стінки глотки та мокротиння. Всі пацієнти 1 групи були обстежені в стадії загострення захворювання, мазок зі слизової оболонки носоглотки був взятий до початку антибактеріальної терапії. Усі використані для дослідів штамів були за своїми морфологічними, культуральними та біохімічними властивостями типовими представниками родів: *Streptococcus* та *Staphylococcus*.

Суспензії мікроорганізмів готували відповідно до оптичного стандарту каламутності 1,0 одиниць за шкалою McFarland за допомогою приладу Densi-La-Meter згідно з інструкцією до приладу та інформаційним листом про нововведення в системі охорони здоров'я № 163-2006 «Стандартизація приготування мікробних суспензій», м. Київ [8].

Антикомплементарну активність (АКА) досліджуваних штамів визначали за допомогою фотометричного методу, який базується на вимірюванні оптичної щільності та, відповідно, визначення ступеня гемолізу при взаємодії комплекменту (після співкультивування з патогеном) із приготовленою гемолітичною системою. Як джерело комплекменту використовували ліофілізовану сироватку морської свинки (ВАТ «Біолік», м. Харків) [5,10].

У дослідних роботах об'єднували по 0,1 мл маточної суспензії мікроорганізмів (оптична щільність -1,0 за McFarland) і комплекменту, концентрація якого в фізіологічному розчині становила 20 С_Н₅₀. Контролем були проби, до яких замість суспензії досліджуваних штамів додавали буферний розчин. Проби інкубували впродовж 2-х годин при 37 °С. Потім додавали по 2 мл 5 % суспензії еритроцитів барана в фосфатному буфері (рН 7,2 – 7,4), сенсibiliзованих гемолітичною сироваткою, після чого суміш інкубували при 37 °С упродовж однієї години. Реакцію зупиняли, витримуючи пробірки 10 хвилин у холодильнику при температурі 4 °С. Проби центрифугували при 2000 об/хв. протягом 10 хвилин і вимірювали екстинцію зразків при λ=540 нм. АКА виражали в анти- С_Н₅₀ одиницях та розраховували за формулою:

$$АКА = \frac{(E_k - E_d) \times C}{E_s}$$

де E_к і E_д - контрольне і дослідне значення екстинції (од.опт.густ.),

C- початкова концентрація комплекменту (С_Н₅₀- одиниць),

E_s- екстинція суспензії мікроорганізмів.

Статистичну обробку результатів проводили за допомогою комп'ютерних програм Microsoft Excel,

2003. Для характеристики показників антикомплементарної активності використовували параметричні критерії з визначенням середнього значення (M) і його стандартного відхилення (σ). Оцінку достовірності різниці між порівнюваними показниками визначали за допомогою критерію Стьюдента. Різницю між показниками, що порівнювалися, вважали статистично значимою при (p<0,05) [3].

Результати досліджень та їх обговорення.

У зразках 1 групи пацієнтів вилучено: бактерії роду *Streptococcus* у 82% хворих (*S. pyogenes* - 48,9%; *S. pneumoniae* – 14,1%; *S. anginosus* – 21,7%; *S.mitis* - 15,2%) . Частота виділення складала для *S. pyogenes* від 3,0 Іг КУО/ мл до 7,0 Іг КУО/ мл, для *S. pneumoniae*- від 4,0 Іг КУО/ мл до 7,0 Іг КУО/ мл, для *S. anginosus* – від 3,0 Іг КУО/ мл до 5,0 Іг КУО/ мл, для *S.mitis* - від 2,0 Іг КУО/ мл до 4,0 Іг КУО/ мл.

Штами *Staphylococcus spp.* вилучено у 88% хворих (*S. aureus* –72,7%; *S. epidermidis* - 27,2%) у кількості *S. aureus* від 4,0 Іг КУО/ мл до 8,0 Іг КУО/ мл, *S. epidermidis* – від 2,0 Іг КУО/ мл до 6,0 Іг КУО/ мл.

Усі представники *Streptococcus spp.* та *Staphylococcus spp.* у 88,5% випадках зустрічались в асоціаціях.

У пацієнтів 2 групи виділено: *Streptococcus spp.* – 65% пацієнтів (*S. pyogenes* - 34,3%; *S. anginosus* – 22,4%; *S.mitis* – 32,8%, *S. pneumoniae* - 10,4%). Частота виділення яких складала для *S. pyogenes* від 3,0 Іг КУО/ мл до 5,0 Іг КУО/ мл; для *S. pneumoniae* від 2,0 Іг КУО/ мл до 3,0 Іг КУО/ мл; для *S. anginosus* від 2,0 Іг КУО/ мл до 4,0 Іг КУО/ мл; для *S.mitis* від 2,0 Іг КУО/ мл до 3,0 Іг КУО/ мл.

Staphylococcus spp. вилучено у 83,3% хворих (*S. aureus* – 29,0%; *S.epidermidis* - 71,0%) у кількості *S. aureus* - від 2,0 Іг КУО/ мл до 5,0 Іг КУО/ мл, *S. epidermidis* – від 2,0 Іг КУО/ мл до 4,0 Іг КУО/ мл. Штами *Streptococcus spp.* та *Staphylococcus spp.* у 76,5% випадках зустрічались в асоціаціях

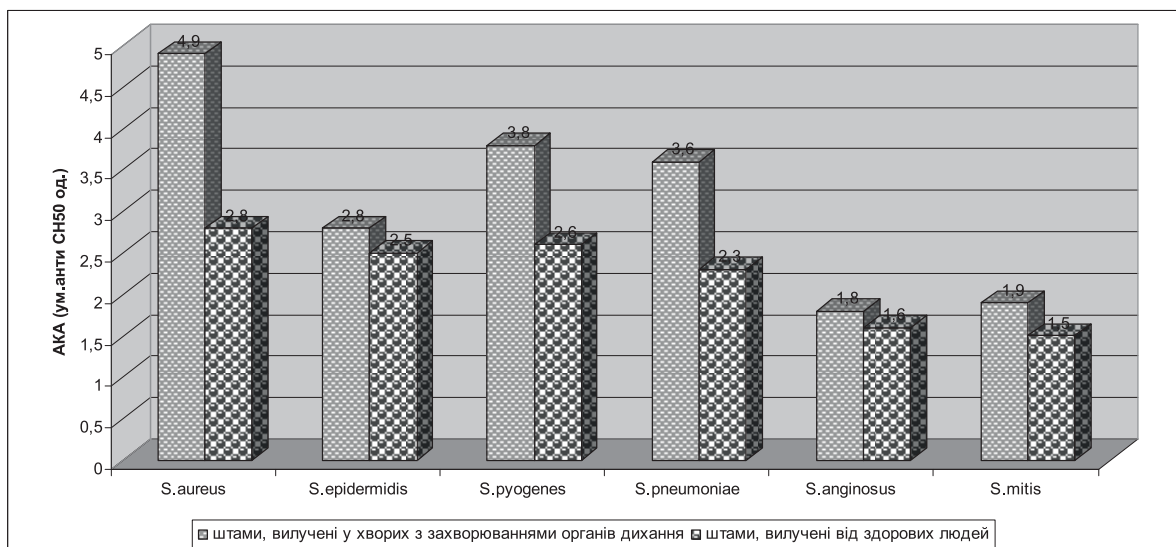


Рис. АКА штамів мікроорганізмів, вилучених від хворих на захворювання дихальних шляхів та від здорових осіб.

Згідно літературних даних у багатьох видів патогенних бактерій виявлена здатність до інактивації системи комплементу, яка реалізується як за рахунок секреції специфічних протеаз, так і завдяки наявності спеціалізованих сполук клітинної мембрани, що відповідають за інактивацію окремих компонентів комплементу [5]. Більшість досліджених нами штамів мали здатність інактувати комплемент.

Дані АКА штамів мікроорганізмів, вилучених у хворих на захворювання органів дихання та у здорових людей, представлені **на рис.**

У результаті проведених досліджень встановлено, що в 1 групі пацієнтів 94,0% штамів стафілококів та 85,0% штамів стрептококів, характеризувалися антикомплемментарною активністю. Серед контрольної групи АКА проявляли 78,3% штамів стафілококів, 67,1% штамів стрептококів.

Слід відзначити, що АКА проявляли 100 % штамів *S. aureus*, вилучених у хворих з захворюваннями органів дихання, проти 73% випадків у контрольній групі. Серед стрептококів найбільша здатність до інактивації комплементу спостерігалась у штамів *S. pyogenes*, вилучених також у 1 групи пацієнтів та склала 96% випадків, проти 70% випадків серед штамів, вилучених від здорових людей ($p < 0,05$).

Встановлено, що у всіх досліджуваних штамів мікроорганізмів був різний ступінь прояву АКА. Найбільші значення АКА були визначені у культур, виділених від 1 групи пацієнтів. Так середній рівень АКА штамів *S. aureus* становив $4,9 \pm 0,9$ ум. од., що у 1,8 разів більше ніж у контрольній групі - $2,8 \pm 0,3$ ум. од. У штамів *S. pyogenes*, вилучених від пацієнтів 1 групи середній рівень АКА склав $3,8 \pm 0,3$ ум. од., що в 1,5 разів більше ніж у штамів, виділених від 2 групи обстежених $2,6 \pm 0,3$ ум. од ($p < 0,05$).

Серед штамів *S. epidermidis* АКА зустрічалась у 79,2% випадках в 1 групі проти 74,4% в 2 групі. При цьому, середній рівень АКА становив $2,8 \pm 0,6$ ум. од. та $2,5 \pm 0,5$ ум. од. відповідно, ($p > 0,05$).

При аналізі АКА штамів *S. anginosus* та *S. mitis* встановлено, що цей показник у мікроорганізмів, вилучених від хворих на захворювання органів дихання, суттєво не відрізнявся від аналогічного показника в 2 групі обстежених. Так, досліджено, що АКА притаманна 71,4% штамам *S. mitis* та 80% штамам *S. anginosus*, вилучених від пацієнтів 1 групи. В 2 групі обстежених АКА мали 68,8% штамів *S. mitis* та 64,7% штамів *S. anginosus*. Середнє значення АКА в 1 групі для *S. anginosus* становило в середньому $1,8 \pm 0,2$ ум. од., для *S. mitis* - $1,9 \pm 0,3$ ум. од. Штами, вилучені від пацієнтів контрольної групи мали середні показники АКА $1,6 \pm 0,1$ ум. од. та $1,5 \pm 0,1$ ум. од. відповідно ($p > 0,05$).

Висновки. Таким чином, нами встановлено, що АКА властива більшості досліджуваних нами штамів *Staphylococcus spp.* та *Streptococcus spp.*, виділених як у здорових, так і у людей, які страждають на захворювання органів дихання. При цьому інтенсивність АКА для штамів *S. aureus* та *S. pyogenes* мало більш високі значення у хворих з вищезначеною патологією, ніж у здорових осіб.

Середні значення АКА для штамів *S. epidermidis*, *S. anginosus* та *S. mitis* суттєво не відрізнялись від аналогічних показників в контрольній групі.

Отримані результати свідчать про найбільший патогенний потенціал *S. aureus* та *S. pyogenes* при даних видах захворювання.

Проведені дослідження підтверджують безпосередню участь факторів персистенції (АКА) в механізмах хронізації захворювань органів дихання.

Перспективи подальших досліджень. Дослідження біологічних властивостей та особливостей міжмікробних взаємовідносин штамів *Staphylococcus spp.* та *Streptococcus spp.* за різних умов, удосконалення методів лабораторної діагностики для визначення лікування хворих з хронічними запаленнями органів дихання

Список літератури

1. Бухарин О.В. Персистенция патогенных бактерий: теория и практика / О.В. Бухарин // Журн. микробиол., эпидемиол., иммунобиол. - 2000. - №4 (прил.). - С.4-7.
2. Брудастов Ю.А. Антикомплемментарная активность бактерий: автореф. дис.канд.мед.наук/ Ю.А. Брудастов - Челябинск, 1992. - 22 с.
3. Гельман В.Я. Медицинская информатика. Практикум/ В.Я. Гельман. - сакт-Петербург.:Питер, 2002. - 480 с.
4. Извин А.И. Микробный пейзаж слизистой оболочки верхних дыхательных путей в норме и патологии/А.И. Извин, Л.В., Катаева // Весник оториноларингологии. - 2009. - №2. - С.64-67.
5. Калініченко С.В. Вплив електромагнітних полів на біологічні властивості токсинуотворюючих коринебактерій: автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. мед. наук/ С.В. Калініченко. - 2006. - 24 с.
6. Рижкова Т.А. Антикомплемментарна активність циркулюючих у різні роки коринебактерій/Т.А. Рижкова, Є.М. Бабиц, С.В. Калініченко // Вісник проблем біології і медицини. - 2007. - Вип.4. - С.146-149
7. Скляр Н.І. Особливості між мікробних взаємовідносин в біоценозах гастродуоденального тракту/Н.І. Скляр//Вісник Харківського національного університету ім. В.Н. Каразіна. Серія: Медицина. -2005. -№ 658. Вип. 10. - С.33-39
8. Стандартизація приготування мікробних суспензій/ Ю.Л. Волянський, Л.Г. Мироненко, С.В. Калініченко [та ін.] // Інформаційний лист про нововведення в системі охорони здоров'я № 163-2006. Міністерство охорони здоров'я України; Український центр наукової медичної інформації та патентно-ліцензійної роботи (Укрмедпатентінформ), 2006.
9. Тихомирова И.А. Дифференцированные схемы лечения хронических заболеваний лорорганов у детей с применением бактериальных лизатов/ И.А. Тихомирова, С.В. Рязанцев //Российская оториноларингология. - 2009. -№1. -С.188-193.
10. Bermuder L.E. Exposure to low oxygen tension and increased osmolarity enhance the ability of *Mycobacterium avium* to enter intestinal epithelial (HT-29) cells/ L.E. Bermuder, M.Petrovsky, J.Goodman// Infection and Immunity. - 1997. - V.65, № 9. - P. 3768-3773.

УДК 616.093-098:616.2

ИЗУЧЕНИЕ АНТИКОМПЛЕМЕНТАРНОЙ АКТИВНОСТИ МИКРООРАГНИЗМОВ У БОЛЬНЫХ С ЗАБОЛЕВАНИЯМИ ДЫХАТЕЛЬНЫХ ПУТЕЙ.

Менкус Е.В.

Резюме. Изучена антикомплементарная активность условно-патогенной микрофлоры, изолированной от больных с заболеваниями органов дыхания. Способность инактивировать комплемент выявлена у большинства исследуемых штаммов. Более высокие значения антикомплементарной активности получены у штаммов *S. pyogenes*, *S. aureus*, преимущественно выделенных у больных с заболеваниями дыхательных путей. Это свидетельствует о селективном отборе штаммов, имеющих более высокие значения антикомплементарной активности, необходимой для длительной персистенции в эконисах.

Ключевые слова: антикомплементарная активность, *Streptococcus spp*, *Streptococcus spp*.

УДК 616.093-098:616.2

ВИВЧЕННЯ АНТИКОМПЛЕМЕНТАРНОЇ АКТИВНОСТІ МІКРООРГАНІЗМІВ У ХВОРИХ З ЗАХВОРЮВАННЯМИ ДИХАЛЬНИХ ШЛЯХІВ

Менкус О.В.

Резюме. Вивчена антикомплементарна активність умовно-патогенної мікрофлори, що ізольована від хворих на захворювання органів дихання. Здатність інактувати комплемент виявлена у більшості досліджуваних штамів. Більш високі значення антикомплементарної активності отримані у штамів *S. pyogenes*, *S. aureus*, переважно виділених від хворих з захворюваннями дихальних шляхів. Це свідчить про селективний відбір штамів, що мають більш високі значення антикомплементарної активності, необхідної для тривалої персистенції в еконисах.

Ключові слова: антикомплементарна активність, *Streptococcus spp*, *Streptococcus spp*.

UDC 616.093-098:616.2

Study Anticomplementary Activity Of Mikrooragnizmov In Patients With Disease Of Respiratory Organs Menkus O.V.

Summary. The anticomplementary activity of conditional-pathogenic micloflora, isolated from patients with diseases of respiratory organs has been studied. The ability to inactivate collement among the majority of investigated strains has been revealed. The higher significance of anticomplementary activity has been got among stocks *S. pyogenes*. *S. aureus* which were singled out mainly among sick people with diseases of respiratory organs. This is an evidence of stocks selection which have a higher anticomplementary activity which is necessary for prolonged persistence in econiches.

Key words: anticomplementary activity, *Streptococcus spp*, *Streptococcus spp*.

Стаття надійшла 14.03.2012 р.

Рецензент проф. Лобань Г.А.