

УДК: [616.34-076:616.98-053.2]:579

БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ДОМИНАНТНЫХ И АССОЦИАТИВНЫХ МИКРОСИМБИОНТОВ КИШЕЧНИКА У ВИЧ-ИНФИЦИРОВАННЫХ ДЕТЕЙ

Захарова Ю.В., Сухих А.С., Марковская А.А.

Кемеровская государственная медицинская академия, Кемерово, e-mail: yvz@bk.ru

Оптимизация принципов коррекции микроэкологических нарушений кишечника у ВИЧ-инфицированных детей. Материалы и методы: В работе использованы 378 штаммов, изолированных из кишечника 68 ВИЧ-инфицированных детей. Были изучены факторы колонизации доминантной микрофлоры, вирулентность у микросимбионтов из минорных ассоциаций и взаимодействие между микроорганизмами. Результаты. Установлено, что снижение уровня доминантной микрофлоры было связано с их низкой адгезивной и антагонистической активностью. У *Bifidobacterium breve* отмечали наличие прооксидантных свойств. *Enterococcus faecalis* от ВИЧ-инфицированных детей характеризовались наличием гемолитической и липазной активности. Условно-патогенные бактерии формировали ассоциации с *Candida* spp. В ассоциациях симбионты высоко экспрессировали факторы вирулентности. При коррекции микроэкологических нарушений кишечника у ВИЧ-инфицированных детей рекомендовано элиминировать бактериально-грибковые ассоциации, а также использовать монокомпонентные пробиотики и антиоксиданты.

Ключевые слова: ВИЧ-инфицированные дети, ассоциативный симбиоз, адгезия, колонизация, антагонизм, факторы вирулентности

BIOLOGICAL PROPERTIES OF DOMINANT AND ASSOCIATIVE MICROSymbionTS OF THE INTESTINE HIV- INFECTION CHILDREN

Zakharova J.V., Sukhikh A.S., Markovskaya A.A.

Kemerovo State Medical Academy, Kemerovo, e-mail: yvz@bk.ru

Optimization principle of correction microecological disturbansis of intestine in HIV-infection children. Materials and methods. 378 strains isolated from intestine of 68 HIV-infection children were used for the study. Factors of colonization in dominant microflora, virulent factors in minor associative microsymbionts and interactions between microorganisms were determined. Results. It is revealed that the reduce level of dominant microflora in intestine correlated with low adhesive and antagonism activity was shown. Prooxidant properties *Bifidobacterium breve* was established. *Enterococcus faecalis* from HIV-infection children was characterized haemolytical and lipases activity. Opportunistic bacteria formed association with *Candida* spp. In association symbionts factors of virulent were high expressed. Elimination of fungi-bacterial association, monocomponents probiotics, antioxidant for correction intestinal microecological disturbansis in HIV-children were recommended.

Keywords: HIV-infection children, associative symbiosis, adhesive, colonization, antagonism, factors of virulent

Симбиотические ассоциации – это форма существования микрофлоры в экологических нишах тела человека. Самым многочисленным как по числу видов, так и в количественном отношении является ассоциативный симбиоз толстого кишечника. Доминантная микрофлора оказывает мутуалистическое влияние на организм хозяина (макросимбионта), включение же в этот симбиоз условно-патогенных микроорганизмов (ассоциативных микросимбионтов) может иметь разные последствия для макроорганизма. Это связано с тем, что межмикробные взаимодействия внутри ассоциаций – от синергизма до антагонизма – могут изменять биологические свойства микробов, что нередко является патогенетической основой формирования эндогенных инфекций [1, 2]. В связи с этим предупреждение микроэкологических нарушений на основе приема пробиотических препаратов, как способ снижения риска развития инфекционных осложнений эндогенного генеза у иммунокомпромиссных пациентов широко используют в различных областях медицинской практики. Применяемые сред-

ства коррекции микрофлоры, а точнее заместительная терапия пробиотиками с целью создания временного микробиоценоза, иногда не приносят ожидаемых результатов [6]. Связано это с тем, что используемые подходы в коррекции часто не учитывают особенностей микроорганизмов, формирующих микробиоценоз и их взаимоотношений друг с другом. Очевидным является необходимость в дифференцированном выборе принципов и средств для коррекции микрофлоры кишечника у ВИЧ-инфицированных детей с учетом патогенетических особенностей развития дисбиотических состояний и биологических свойств микробов.

Цель исследования – оптимизация принципов коррекции микроэкологических нарушений кишечника у ВИЧ-инфицированных детей.

Материалы и методы исследования

Исследование было построено по типу «случай-контроль». В опытную группу вошли 68 детей с ВИЧ-инфекцией (II–III стадия), средний возраст которых составил $2,3 \pm 0,2$ года. Группа сравнения включала 45 ВИЧ-негативных относительно здоро-

вых детей. Группы были сопоставимы по возрасту и полу. Объектом исследования были 378 микроорганизмов, выделенных из содержимого толстой кишки детей с ВИЧ-инфекцией и 223 штамма от детей группы сравнения.

Исследование кишечного микробиоценоза проводили с помощью количественного бактериологического метода. Для выделения облигатно-анаэробных бактерий применяли анаэроостаты (BBL, США) и газогенерирующие пакеты (НПО «Новое дело», Санкт-Петербург). Идентификацию бактерий и грибов осуществляли с использованием коммерческих тест систем ANAERO-TEST 23 (Lachema, Чехия), ПБДС (Нижний Новгород), STREPTO-TEST 16 (Lachema, Чехия), AUXOCOLOR (BioRad, Франция), СИБ для энтеробактерий набор № 2 (НПО «Микроген», Нижний-Новгород). Интерпретацию результатов исследования кишечного микробиоценоза вели согласно региональным значениям нормы [3].

Адгезивные свойства микроорганизмов изучали согласно методике В.И. Брилиса [4]. Микроорганизмы считали неадгезивными при $IAM \leq 1,75$; низкоадгезивными – от 1,76 до 2,5; среднеадгезивными – от 2,51 до 4,0 и высокоадгезивными при $IAM \geq 4,0$.

Активность кислотообразования бифидобактерий и лактобацилл определяли титрометрическим методом. С этой целью к суточным культурам бактерий, выращенных на элективных жидких питательных средах, добавляли по 2 капли индикатора фенол-фталеина и титровали 0,1 н NaOH. Количество щелочи, пошедшей на титрование, соответствует количеству образуемой кислоты в 5 мл культуральной жидкости. Окончательный результат выражали в градусах Тернера: $T^0 = A \cdot K \times 20$, где A – количество 0,1 н щелочи, пошедшее на титрование 5 мл исследуемой жидкости, K – поправка к титру, определяемая при титровании 0,1 н раствора щелочи 0,1 н янтарной кислотой, T^0 – величина, выражающая количество 0,1 н щелочи, пошедшей на титрование 100 мл исследуемого образца.

Антагонистическую активность микроорганизмов определяли методом перпендикулярных штрихов на плотной питательной среде. На чашку с плотной питательной средой петлей 2 мм наносили полодку культуры бактерий и инкубировали 24–48 часов с учетом типа дыхания. Далее к выросшей культуре подсевали участников ассоциаций, предварительно выращенных на скошенном мясо-пептонном агаре в течение 18 часов. Посев производили петлей диаметром 1 мм в направлении от зоны роста изучаемых бактерий, не касаясь ее и перпендикулярно ей. Чашки инкубировали при температуре 37°C 24 часа. Учет результатов вели по величине зоны отсутствия роста микроба-ассоцианта в мм.

Липолитическую и ДНКазную активность условно-патогенных бактерий и грибов исследовали методом посева на Trybutyrit Base Agar (HiMedia) и DNA Base Agar (HiMedia). Изучение гемолитической активности микроорганизмов проводили на МПА с добавлением эритроцитов человека.

Определение антиоксидантной активности бифидобактерий проводили по методике И.Д. Стальной и Т.Г. Гаришвили [5].

Для статистического анализа использовали пакет прикладных программ Statistica (версия 6.1 лицензионное соглашение ВХХР 006ВО92218 FAN 11). Статистическая обработка информации строилась с учетом характера распределения данных, которое

не соответствовало нормальному. Характер распределения переменных величин в рассматриваемой совокупности определяли с помощью построения гистограмм.

Результаты исследования и их обсуждение

По данным литературы, среди доминантных симбионтов в кишечном микробиоценозе чаще встречаются бифидобактерии и лактобациллы, основной функцией которых является формирование колонизационной резистентности [2, 6]. В свою очередь колонизационная резистентность поддерживается многочисленными механизмами, в том числе адгезивной активностью, способностью колонизировать биотоп, вступать в антагонизм с ассоциативными микросимбионтами. Установлено, что среди бифидобактерий, выделенных от детей с ВИЧ-инфекцией, преобладали штаммы со средней или низкой адгезивной активностью, доля которых в структуре бифидофлоры составила 81,2%. В группе сравнения таковых культур было только 44,4%, т.е. 55,6% проявляли высокую способность к адгезии. Отмечали различия в видовом составе бифидобактерий. У детей с ВИЧ-инфекцией были идентифицированы следующие виды: *Bifidobacterium breve* (32,7%), *B. longum* (31,1%), *B. dentium* (15,5%), *B. bifidum* (13,1%), *B. adolescentis* (7,6%). В группе сравнения структура бифидофлоры была иная – доминировали *B. bifidum* (48,2%) и *B. longum* (44,6%), у некоторых ВИЧ-негативных детей выделяли *B. adolescentis* (7,2%).

Среди лактобацилл от детей с ВИЧ-инфекцией 51,2% штаммов были отнесены к микроорганизмам со средней адгезивной активностью, а 44,6% – к низкоадгезивным, на высокоадгезивные культуры приходилось не более 4,2%. В группе сравнения среди лактофлоры преобладали также среднеадгезивные бактерии (48,7%), однако доля высокоадгезивных штаммов была достоверно выше (46,4%, $p = 0,00$). Преобладание среднеадгезивной активности у данных анаэробов обуславливает у ВИЧ-инфицированных детей низкий популяционный уровень бифидобактерий (7,5 lg КОЕ/г) и лактобацилл (6,3 lg КОЕ/г), при 8,9 lg КОЕ/г и 8,1 lg КОЕ/г соответственно у детей группы сравнения.

Существенную роль в поддержании колонизационной резистентности играет также антагонистическая активность доминантной микрофлоры [6]. Было установлено, что бифидофлора у детей с ВИЧ-инфекцией чаще проявляет антагонизм по отношению к факультативно-анаэробной индигенной микрофлоре – к *Escherichia coli*

lac⁺ (38 на 100 штаммов) и *Enterococcus faecalis* (24 на 100 штаммов). Это свидетельствует об ослаблении распространения регулирующей функции бифидофлоры у ВИЧ-инфицированных детей на всех представителей кишечного микробиоценоза и сохранении ее только в отношении индигенных представителей, что, вероятно, связано с низкой кислотообразующей активностью данных микросимбионтов, которая в среднем составила 58,24° Т. У детей из группы сравнения активность кислотообразования бифидобактерий была в 1,5 раза выше ($p = 0,06$), а антагонистические взаимоотношения формировались с *Klebsiella* spp. (42 на 100 культур) *Staphylococcus* spp. (36,4 на 100 культур), *E. coli* lac⁺ (23,3 на 100 культур). Появление в литературе данных об антиоксидантных свойствах доминантных микросимбионтов [2, 6] предопределило изучение данного признака у бифидофлоры, выделенной от ВИЧ-позитивных детей. В опытах *in vitro* было установлено, что *V. breve* обладали прооксидантными свойствами, которые усиливались пропорционально длительности инкубирования бактерий. Все остальные виды бифидофлоры характеризовались наличием антиоксидантной активности, в большей степени выраженной у *V. bifidum* и *V. longum*. Так как в структуре бифидофлоры у ВИЧ-инфицированных детей преобладали *V. breve*, а доля *V. bifidum* была достаточно низкой, то это позволяет предполагать накопление у таких детей токсических форм кислорода, что предопределяет необходимость проведения у них антиоксидантной терапии.

Лактобациллы как у детей основной группы, так и у детей группы сравнения обладали выраженной способностью к антагонизму, так как распространенность этого признака достигала 88 и 91 на 100 культур соответственно. Способность к кислотообразованию была выше у лактофлоры от здоровых детей и составила 97,6° Т, против 86,7° Т у детей с ВИЧ-инфекцией. Антагонистическая активность лактобацилл у детей основной группы была выражена в отношении условно-патогенных микросимбионтов: *Candida albicans* (21 на 100 культур), *Staphylococcus* spp (19 на 100 культур), *Klebsiella* spp (16 на 100 культур лактобацилл). Таким образом, у детей с ВИЧ-инфекцией регуляция числа условно-патогенных бактерий в кишечном биоценозе осуществляется в основном лактобациллами.

Дефицит анаэробной части доминантных микросимбионтов у детей с ВИЧ-инфекцией компенсируется высоким количественным уровнем типичных ки-

шечных палочек (8,2 lg КОЕ/г), тогда как у детей группы сравнения их титр был ниже (7,8 lg КОЕ/г). Однако в популяции *Escherichia coli* lac⁺, выделенных от детей основной группы, преобладали низкоадгезивные штаммы, доля которых составила 53%. Средней адгезивной активностью обладали 32,4% штаммов, на высокоадгезивные эшерихии приходилось только 14,6% культур. У детей группы сравнения 38,2% штаммов типичных кишечных палочек были отнесены к высокоадгезивным ($p = 0,03$), 44,6% к среднеадгезивным бактериям. Доля низкоадгезивных культур не превышала 17,2% ($p = 0,00$). Распространенность антагонизма к условно-патогенной микрофлоре среди эшерихий, выделенных от детей с ВИЧ-инфекцией составила только 6,7 на 100 культур, от здоровых – 25,6 на 100 культур. Указанные характеристики микрофлоры при ВИЧ-инфекции, не позволяют типичным кишечным палочкам адекватно обеспечивать колонизационную резистентность, даже если их количественный уровень достаточно высок, что свидетельствует о специализации у микроорганизмов выполняемых в биоценозе функций.

По данным литературы, к доминантным микросимбионтам, помимо бифидобактерий, лактобацилл и типичных кишечных палочек, относят *Enterococcus faecalis* [6]. Интенсивность колонизации слизистой кишечника данными бактериями у детей основной группы составила 6,5 lg КОЕ/г, против 7,5 lg КОЕ/г у детей группы сравнения, что свидетельствует о недостаточном популяционном уровне энтерококков в биоценозе ВИЧ-инфицированных детей. Фекальные энтерококки, изолированные из толстой кишки ВИЧ-инфицированных детей, не обладали антагонизмом по отношению к другим представителям микробиоценоза, но среди них были выявлены штаммы, проявляющие липолитическую и гемолитическую активность, распространенность признаков составила 26,5 и 34,5 на 100 культур соответственно. Среди энтерококков от детей группы сравнения гемолитических штаммов обнаружено не было, тогда как распространенность липолитической активности была статистически ниже, чем в основной группе и составила 9,8 на 100 культур ($p = 0,00$). В связи с этим фекальные энтерококки у детей с ВИЧ-инфекцией можно позиционировать как ассоциативных микросимбионтов, которые могут играть этиологическую роль в возникновении гнойно-воспалительных процессов.

При изучении ассоциативных микросимбионтов у детей основной группы была

установлена высокая распространенность бактериально-грибковых ассоциаций (66,1 из 100 ВИЧ-инфицированных детей). Среди детей группы сравнения ассоциации грибов и бактерий встречались реже (28 на 100 относительно здоровых детей). При этом у ВИЧ-инфицированных пациентов наибольшую распространенность имели трех- и четырехкомпонентные ассоциации грибов рода *Candida* и условно-патогенных бактерий (35,7 и 10,7 на 100 детей). У детей группы сравнения грибы *Candida* встречались не только в ассоциациях (28,4 на 100 здоровых детей), но и в монокультурах (31,4 на 100 здоровых детей).

При изучении количественного уровня условно-патогенной микрофлоры было установлено, что содержание стафилококков в кишечнике детей с ВИЧ-инфекцией в среднем составило 3,5 lg КОЕ/г, грибов рода *Candida* 4,1 lg КОЕ/г, условно-патогенных энтеробактерий – 6,96 lg КОЕ/г, актиномицетов 7,2 lg КОЕ/г. У детей группы сравнения количественный уровень грибов *Candida* spp. в ассоциациях не отличался от такового при ВИЧ-инфекции (3,9 lg КОЕ/г), тогда как в монокультурах титр данных эукариот достигал только 2,2 lg КОЕ/г. Интенсивность колонизации кишечника детей группы сравнения стафилококками и условно-патогенными энтеробактериями была ниже, чем в основной группе и составила 3 lg КОЕ/г и 5,2 lg КОЕ/г.

Было установлено, что микроорганизмы, входящие в состав ассоциаций, как у ВИЧ-инфицированных детей, так и у относительно здоровых детей не проявляют друг к другу антагонистических взаимоотношений, более того дрожжевые грибы рода *Candida* потенцируют рост клебсиелл. Серия опытов по совместному культивированию *K. pneumoniae* и *S. albicans* показала, что в течение 2 часов количество клебсиелл после инкубирования с грибами достигает 8 lg КОЕ/г, тогда как в контроле (монокультура *Klebsiella* spp.) для достижения такого количественного уровня требуется 6 часов.

Бактерии, входящие в состав минорных ассоциаций ВИЧ-инфицированных детей, проявляли антагонизм по отношению к доминантной микрофлоре. В антагонистические взаимоотношения с типичной кишечной палочкой вступали гемолизин-продуцирующие эшерихии (распространенность признака составила 18,2 на 100 культур), а с фекальными энтерококками разные виды стафилококков, входящих в ассоциации (22,2 на 100 культур). Распространение антагонизма среди ассоциативных микро-

симбионтов по отношению к доминантным бактериям у детей группы сравнения составило только 8,9 на 100 культур.

Формирование ассоциативных сожительства микроорганизмов способствует не только поддержанию определенного популяционного уровня условно-патогенных бактерий, но и более высокой экспрессии факторов вирулентности у отдельных представителей. Так, распространенность ДНКазной, липазной и гемолитической активности среди стафилококков в ассоциациях у ВИЧ-позитивных детей составила 27,78; 80,56 и 88,89 на 100 культур соответственно. Если стафилококки были выделены от детей группы сравнения, то распространенность ДНКазной и липазной активности не превышала 10,34 и 35,6 на 100 культур соответственно, а гемолитической – 28,56 на 100 штаммов ($p = 0,02$).

У грибов рода *Candida*, выделенных из ассоциаций у детей основной группы, распространенность гемолитической и липазной активности составила 39,29 и 71,43 на 100 культур соответственно. Микромицеты, выделяемые в монокультурах от детей группы сравнения характеризовались наличием только липазной активности, распространенность, которой не превышала 32,3 на 100 культур.

Выводы

1. У детей с иммунодефицитами, развившимися при ВИЧ-инфекции, установлено нарушение колонизационной резистентности кишечника за счет снижения способности бифидобактерий и лактобацилл к адгезии и колонизации данного биотопа. Нарушение продукции органических кислот, как основного фактора антагонизма доминантной микрофлоры, обуславливает формирование многокомпонентных бактериально-грибковых ассоциаций. В состав ассоциаций, независимо от числа участников, входят грибы рода *Candida* spp.

2. Микробы-ассоцианты вступают в антагонизм с доминантными симбионтами и вызывают их интерференцию (вытеснение) из биотопа. Межбактериальные взаимодействия по типу нейтрализма или синергизма внутри ассоциаций способствуют тому, что условно-патогенные микроорганизмы достигают высокого популяционного уровня и начинают экспрессировать факторы вирулентности, имеющие патогенетическое значение в формировании дисфункции слизистой кишечника.

3. Для снижения риска развития эндогенных бактериально-грибковых инфекций

у ВИЧ-инфицированных детей необходимо проводить своевременную коррекцию микробиоценоза толстой кишки, которую необходимо вести в двух направлениях:

- устранение ассоциативных микробных сообществ;
- нормализация количества и функций доминантных микросимбионтов.

Практические рекомендации:

1. Для коррекции микробиоценоза у детей с иммунодефицитами не целесообразно применять комбинированные пробиотики, в состав которых входят энтерококки, так как в составе симбиоза у этих детей они ведут себя, как микробы-ассоцианты, проявляющие вирулентные свойства.

2. При выборе пробиотика предпочтение следует отдавать монокомпонентным препаратам на основе *B. bifidum* с выраженными антагонистическими свойствами по отношению к условно-патогенным микроорганизмам.

3. Для устранения ассоциаций микросимбионтов у ВИЧ-позитивных детей первоочередным является элиминация грибов рода *Candida*, что позволит снизить темпы размножения условно-патогенных энтеробактерий.

4. В комплекс мероприятий по коррекции микробиоценоза у детей с ВИЧ-инфекцией целесообразно вводить антиоксиданты.

Работа выполнена на средства Гранта Президента РФ МК-971.2010.7.

Список литературы

1. Бондаренко В.М. Роль дисфункции кишечного барьера в поддержании хронического воспалительного процесса различной локализации / В.М. Бондаренко, Е.В. Рябиченко // Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2010. – № 1. – С. 92–100.
2. Бухарин О.В. Инфекция – модельная система ассоциативного симбиоза // Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2009. – № 1. – С. 83–86.
3. Возрастные особенности микробиоценоза кишечника у жителей г. Кемерово / Л.А. Леванова, В.А. Алешкин, А.А. Воробьев и др. // Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2001. – № 3. – С. 72–75.
4. Методика изучения адгезивных процессов микроорганизмов / В.И. Брилис, Т.А. Брилине, Х.П. Ленцнер и др. // Лабораторное дело. – 1986. – № 4. – С. 9–12.
5. Современные методы в биохимии: под ред. В.Н. Ореховича. – М.: Медицина, 1977. – 66 с.
6. Шендеров Б.А. Медицинская микробная экология и функциональное питание: в 3-х т. – М.: Грань, 2001.

Рецензенты:

Галактионова Л.П., д.б.н., профессор ГБОУ ВПО «Алтайский государственный медицинский университет» » Министерства здравоохранения и социального развития РФ, г. Барнаул;

Лисаченко Г.В., д.м.н., профессор кафедры патологической физиологии ГБОУ ВПО «Кемеровская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения и социального развития РФ, г. Кемерово.

Работа поступила в редакцию 27.10.2011.