

УДК [616.34-076:616.98-053.2]: 579

ВЛИЯНИЕ АДГЕЗИВНОЙ АКТИВНОСТИ БАКТЕРИЙ НА ИХ КОЛИЧЕСТВЕННОЕ СОДЕРЖАНИЕ В КИШЕЧНИКЕ У ВИЧ-ИНФИЦИРОВАННЫХ ДЕТЕЙ

Захарова Ю.В., Марковская А.А.

ГОУ ВПО «Кемеровская государственная медицинская академия», Кемерово, e-mail: yvz@bk.ru

Проведен анализ результатов исследований адгезивной активности и количества кишечных микроорганизмов, полученных от 50 ВИЧ-инфицированных детей. Показано, что снижение уровня бифидобактерий и лактобацилл в кишечнике коррелировало с адгезивной активностью. Статистически значимой связи между адгезией и численностью условно-патогенных бактерий не установлено.

Ключевые слова: микроорганизмы, адгезия, количество, колонизационная резистентность

THE INFLUENCE OF ADHESION ACTIVITY OF BACTERIA ON THE QUANTITY IN INTESTINE OF HIV-INFECTION CHILDREN

Zakharova J.V., Marcovskaya A.A.

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

The analysis of results adhesion activity and quantity of intestinal microorganisms research from 50 HIV-infections children is carried out. Reduce level of Bifidobacteria and Lactobacillus in intestine correlated with adhesive activity was shown. Statistically significant correlation between adhesiveness and the number of opportunistic microorganisms was not established.

Keywords: microorganisms, adhesion, quantity, colonization resistance

В настоящее время одним из приоритетных направлений в профилактической деятельности и в борьбе с ВИЧ-инфекцией в педиатрической практике являются увеличение продолжительности жизни инфицированных детей и минимизация риска развития вторичных бактериальных осложнений [4]. Самым крупным резервуаром условно-патогенных микроорганизмов является кишечник, поэтому сохранение стабильности микробиоценоза и его нормализация при нарушениях значительно снижает риск развития эндогенных инфекций. В связи с целесообразностью повышения эффективности у ВИЧ-инфицированных детей методов и средств коррекции кишечной микрофлоры возникает необходимость изучения некоторых механизмов развития микробиологических нарушений.

Значение адгезивных характеристик бактерий для макроорганизма может рассматриваться с двух позиций. С одной стороны, адгезивный потенциал индигенной микрофлоры является одним из факторов реализации колонизационной резистентности слизистой кишечника и препятствия прикреплению к рецепторам слизистой патогенных микроорганизмов. С другой стороны, при развитии дисбиотических нарушений адгезивные свойства оппортунистической микрофлоры рассматривают в роли фактора патогенности, так как они позволяют микробам закрепиться на поверхности кожи, слизистых и колонизировать

данный биотоп, достигая определенного популяционного уровня [1, 2]. В настоящее время уже показан характер изменений адгезивных характеристик микробов при развитии микробиологических нарушений рото- и носоглотки, влагалитиса, предложены подходы к снижению адгезии у условно-патогенных бактерий. В то же время данные о биологических свойствах представителей микробиоты кишечника довольно немногочисленны, что, вероятно, обусловлено видовым разнообразием данного биотопа [5]. Особую значимость приобретает изучение влияния адгезивных свойств бактерий на их количество в кишечном биотопе у детей с иммунодефицитами, так как при ВИЧ-инфекции нередко собственная условно-патогенная микрофлора, достигая высоких концентраций, является этиологическим фактором развития инфекционных осложнений.

Цель исследования – оптимизация методов коррекции микробиологических нарушений кишечника у ВИЧ-инфицированных детей.

Материал и методы исследования

Были изучены способность к адгезии и колонизационный уровень микросимбионтов кишечника у 50 ВИЧ-инфицированных детей в возрасте $2,0 \pm 0,2$ года. Исследование кишечного микробиоценоза проводили с помощью количественного бактериологического метода. Для выделения облигатно-анаэробных бактерий применяли анаэробные 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]. Было идентифицировано 269 культур микроорганизмов. Проведено 886 опытов по изучению биологических свойств участников симбиотических ассоциаций.

Адгезивные свойства микроорганизмов изучали согласно методике В.И. Брилиса. Для этого культуры выращивали в течение 24 часов на скошенном мясо-пептонном агаре с учетом типа дыхания. Взвесь микроорганизмов готовили на стерильном изотоническом растворе хлорида натрия в концентрации 10^9 КОЕ/мл. Клеточным субстратом служили формализованные эритроциты человека 0 (I) группы Rh (+), густотой 100 млн/мл. Эритроциты и взвесь микроорганизмов в равных объемах по 50 мкл соединяли в пробирках и инкубировали при 37 °С в течение 1 часа, регулярно встряхивая смесь. После этого готовили мазок, высушивали, фиксировали 96%-м спиртом 15 мин и окрашивали по Романовскому-Гимза. Изучение адгезии проводили под световым микроскопом, подсчет вели на 50 эритроцитах. Оценку результатов опыта вели по индексу адгезивности микроорганизма (ИАМ), который характеризует среднее количество микробных клеток на одном участвующем в адгезивном процессе эритроците. Микроорганизмы считали неадгезивными при $ИАМ \leq 1,75$; низкоадгезивными – от 1,76 до 2,5; среднеадгезивными – от 2,51 до 4,0 и высокоадгезивными при $ИАМ \geq 4,0$.

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. Для анализа связей между колонизационным уровнем бактерий и их адгезивной активностью применяли коэффициент корреляции Спирмена.

Результаты исследования и их обсуждение

Среди многочисленных функций, выполняемых индигенной микрофлорой, ведущей признается обеспечение колонизационной резистентности. Это придает индивидуальную и анатомическую стабильность микрофлоре, обеспечивает предотвращение заселения биотопа посторонними микроорганизмами и распространение нормофлоры за пределы их естественного места обитания [1, 2]. В связи с этим у доминантных микросимбионтов кишечника ВИЧ-инфицированных детей была изучена *in vitro* способность к адгезии, как основного механизма, позволяющего им формировать биопленку на слизистой. Установлено, что бифидобактерии характеризовались средней адгезивной ак-

тивностью, так как среднее значение ИАМ в выборке составило 3,29 (от 1,19 до 7,48). Среди бифидобактерий только 16,25% были отнесены к высокоадгезивным штаммам, тогда как большинство из них проявляли низкую (40,85%) или среднюю (42,9%) способность к адгезии. Возможно, это обусловлено изменением видовой структуры этих микросимбионтов, так как на долю *Bifidobacterium bifidum*, которые должны доминировать среди бифидофлоры, приходилось только 7,69%. В структуре видовой состава бифидобактерий наибольший удельный вес занимали *B.breve* (34,62%). На долю *B.dentium* приходилось 30,76%, *B.longum* – 29,92%.

Лактобациллы, так же как и бифидобактерии, характеризовались среднеадгезивными особенностями. ИАМ в выборке составил 2,78 (от 2,01 до 6,5), 54,43% лактобацилл были отнесены к микроорганизмам со средней адгезивной активностью, а 42,8% – к низкоадгезивным. Только 2,77% штаммов проявляли высокую способность к адгезии.

Установлена прямая корреляционная связь между ИАМ и интенсивностью колонизации слизистой кишечника бифидобактериями и лактобациллами ($r = 0,56$; $p = 0,00$). При этом преобладание среднеадгезивной активности у данных микроорганизмов обуславливает у ВИЧ-инфицированных детей невысокий популяционный уровень бифидобактерий (7,62 lg КОЕ/г) и лактобацилл (6,42 lg КОЕ/г), при региональных значениях нормы 9–10 lg КОЕ/г и 8–9 lg КОЕ/г соответственно. Дефицит анаэробной части доминантных микросимбионтов у детей с ВИЧ-инфекцией компенсируется избыточным ростом типичных кишечных палочек, количественный уровень которых составил 8,3 lg КОЕ/г при норме не более 8 lg КОЕ/г. Однако в популяции *Escherichia coli lac+* преобладали низкоадгезивные штаммы, доля которых достигала 52,94%. Средней адгезивной активностью обладали 29,41% штаммов, на высокоадгезивные эшерихии приходилось только 17,65% культур.

По данным литературы, к доминантным микросимбионтам помимо бифидобактерий, лактобацилл и типичных кишечных палочек относят *Enterococcus faecalis* [1, 2]. Интенсивность колонизации слизистой кишечника данными бактериями составила 6,46 lg КОЕ/г, что свидетельствует о недостаточном популяционном уровне энтерококков в биоценозе ВИЧ-инфицированных детей, так как в норме их количество должно достигать 7–8 lg КОЕ/г фекалий. При этом установлено, что связь между адгезивной активностью *E.faecalis* и интенсивно-

стью колонизации слизистой отсутствовала ($r = 0,14$; $p = 0,72$), что позволяет говорить о наличии специфических механизмов поддержания определенного популяционного уровня у данных микроорганизмов.

Нарушение колонизационной резистентности слизистой кишечника у детей с ВИЧ-инфекцией сопровождалось формированием многокомпонентных ассоциаций, состоящих из дрожжевых грибов и условно-патогенных бактерий, представленных золотистыми стафилококками и клебсиеллами. При этом отмечали, что *Staphylococcus aureus* и *Klebsiella* spp, так же как и постоянные представители, характеризовались среднеадгезивной активностью – ИАМ составил 3,7 (от 0,1 до 10,42) и 3,05 (от 0,9 до 6,59) соответственно. Среди стафилококков 30,6% штаммов были охарактеризованы как высокоадгезивные, 44,4% культур являлись среднеадгезивными и только 19,4% проявляли низкую адгезивную активность. Высокоадгезивные клебсиеллы были выделены в 13,6% случаев, в большинстве случаев данные микроорганизмы проявляли низкую и среднюю способность к адгезии (31,8 и 36,4% соответственно), а 18,2% были неадгезивными.

При изучении количественного уровня условно-патогенной микрофлоры было установлено, что содержание золотистых стафилококков в кишечнике детей с ВИЧ-инфекцией в среднем составило 3,21 lg КОЕ/г (от 2 до 6 lg), несмотря на высокую долю в популяции штаммов с высокой и средней способностью к адгезии. В то же время содержание клебсиелл, которые были неадгезивными или низкоадгезивными, достигало 6,94 lg КОЕ/г (от 4 до 9 lg). Связи между адгезивной активностью условно-патогенных бактерий и их количественным уровнем выявлено не было ($r = 0,14$; $p = 0,47$), что дает право предполагать о наличии иных, чем у доминантной микрофлоры механизмов формирования популяционного уровня. Таким образом, полученные результаты раскрывают дальнейшие перспективы исследований, направленных на изучение механизмов интерференции (вытеснения) условно-патогенной микрофлорой доминантных микросимбионтов.

Выводы

1. Популяционный уровень бифидобактерий и лактобацилл в кишечном микро-

биоценозе ВИЧ-инфицированных детей прямо зависит от адгезивных характеристик данных бактерий ($r = 0,56$; $p = 0,00$), тогда как связи между адгезивной активностью и количеством условно-патогенных микроорганизмов выявлено не было ($r = 0,14$; $p = 0,47$).

2. Восстановление колонизационной резистентности кишечника у ВИЧ-инфицированных детей целесообразно проводить на основе использования высокоадгезивных штаммов бифидобактерий и лактобацилл. В то же время модуляция адгезивных свойств условно-патогенной микрофлоры не позволит повлиять на их количественное содержание в кишечнике.

Работа выполнена на средства Гранта Президента РФ МК-971.2010.7

Список литературы

1. Бондаренко В.М., Рябиченко Е.В. Роль дисфункции кишечного барьера в поддержании хронического воспалительного процесса различной локализации // 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. Онищенко Г.Г. Санитарно-эпидемиологическая обстановка в Российской Федерации. Основные проблемы и приоритетные направления профилактической деятельности на современном этапе // Вестник РАМН. – 2009. – № 7. – С. 30–36.
5. Шитов Л.Н., Романов В.А. Влияние иммунодепрессантов на популяционный уровень и адгезивные свойства условно-патогенных бактерий толстой кишки белых мышей // Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2009. – № 6. – С. 12–16.

Рецензенты:

Глушанова Н.А., д.м.н., профессор кафедры микробиологии ГОУ ДПО «Новокузнецкий государственный институт усовершенствования врачей Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию», г. Новокузнецк;

Кувшинов Д.Ю., д.м.н., профессор, зав. кафедрой нормальной физиологии ГОУ ВПО «Кемеровская государственная медицинская академия Росздрава», г. Кемерово.