УДК 616-002.77: 576. 8

ФАКТОРЫ ПЕРСИСТЕНЦИИ УСЛОВНО-ПАТОГЕННЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ, ВЫДЕЛЕННЫХ У БОЛЬНЫХ РЕВМАТИЧЕСКИМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ

Гульнева М.Ю., Кулибин А.Ю., Малафеева Э.В.

ГОУ ВПО «Ярославская государственная медицинская академия Минздрав соцразвития России», Ярославль, e-mail: ch-ma@mail.ru

Изучен персистентный потенциал 157 штаммов микроорганизмов, 83 штамма выделены у больных ревматическими заболеваниями. Выявлено повышение распространения антилизоцимной активности условно-патогенных микроорганизмов, колонизирующих организм больных ревматическими заболеваниями. Штаммы стафилококков и кишечных бактерий, выделенные у больных ревматическими заболеваниями, отличались высокой антилизоцимнои активностью, а культуры S. epidermidis и E. coli характеризовались выраженной антилактоферриновой активностью.

Ключевые слова: условно-патогенные микроорганизмы, персистенция, ревматические заболевания

PERSISTENCE FACTORS OF THE CONDITIONALLY-PATHOGENIC MICROORGANISMS IN PATIENTS WITH RHEUMATIC DISEASES

Gulneva M.Yu., Kulibin A.Yu., Malafeeva E.V.

Yaroslavl state medical academy, Yaroslavl, e-mail: ch-ma@mail.ru.

The study of the persistence potential of 157 strains of microorganisms, 83 strains were isolated in patients with rheumatic diseases. The wide spread of the antilysozyme sign of the conditional-pathogenic microorganisms, colonizing patients organism, was detected. Staphylococcus spp. and the intestinal bacteria, isolated in rheumatic patients, were characterized by high antilysozyme activity, cultures of Staphylococcus epidermidis and Escherichia coli were characterized by high antilactoferrin activity.

Keywords: conditionally-pathogenic microorganisms, persistence, rheumatic diseases.

При ревматических заболеваниях создаются условия для длительной микробной персистенции в результате особенностей формирования иммунного ответа хозяина, в частности, дисбаланса Th1 и Th2-клеток в динамике развития заболевания [8]. Наряду с этим, длительное переживание (персистенция) микроорганизмов в организме больных может быть обусловлено свойствами микроорганизмов. В персистировании микроорганизмов имеет значение их индифферентность к воздействующим внешним факторам физико-химической природы, обеспечение стабильных антагонистических эффектов в биоценозе и сохранением жизнеспособности популяции за счёт приобретения устойчивости к защитным механизмам хозяина [2]. Бактерии способны ингибировать факторы естественной резистентности организма хозяина, такие как лизоцим, комплемент, гистоноподобные белки, катионный белок тромбоцитов. Этот дистанционный механизм бактериальной иммуносупрессии хозяина способствует длительному выживанию (персистированию) патогенных и условно-патогенных бактерий в макроорганизме [1].

Цель: изучение персистентного потенциала условно-патогенных микроорганизмов, выделенных у больных ревматическими заболеваниями, на основании исследования их антилактоферриновой и антилизоцимной активности.

Материалы и методы исследования

Изучено 157 штаммов условно-патогенных микроорганизмов, из них 83 штамма, выделенных от больных ревматическими заболеваниями, и 74 клинических штамма, полученных у лиц группы сравнения. Исследованные штаммы получены при бактериологическом обследовании 97 больных ревматическими заболеваниями, из них 59 – ревматоидным артритом и 38 больных системной красной волчанкой. Диагноз ревматоидного артрита устанавливали согласно критериям Американской ревматологической ассоциации (1987). Преобладали пациенты с I–II рентгенологической стадией (71%) и у 29% больных определялась III рентгенологическая стадия поражения суставов. Большинство пациентов (84,7%) имели II степень функциональной недостаточности суставов. Для оценки активности болезни использовали индекс активности болезни – DAS4 (disease activity score). I степень активности РА установлена у 30,5%, II – у 50,8% и III – у 18,6% больных. Серопозитивная форма РА установлена у 86,4% больных, у остальных – серонегативная. Диагноз системной красной волчанки устанавливали согласно критериям Американской ревматологической ассоциации (1982). Степень активности заболевания определяли, используя индекс ECLAM. Обследованы больные I (47,4%) и II (52,6% больных) степени активности, с подострым (57,9%) и хроническим (42,1% больных) течением. Больные обследованы бактериологическим методом, руководствуясь приказом МЗ №535 «Об унификации микробиологических (бактериологических) методов исследования, применяемых в клинико-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений» (2006). Исследуемым материалом служили моча и отделяемое со слизистых оболочек носа. Идентификацию выделенных культур проводили по морфологическим,

тинкториальным, культуральным и ферментативным свойствам согласно руководству по систематике бактерий Берги. Выделенные при ревматических заболеваниях штаммы условно-патогенных микроорганизмов были отнесены к видам стафилококка (Staphylococcus aureus, Staphylococcus haemolyticus, Staphylococcus epidermidis) и бактериям семейства Enterobacteriaceae родов Escherichia, Klebsiella. В качестве группы сравнения были использованы клинические штаммы идентичных по видовой и родовой принадлежности микроорганизмам, полученным у ревматических больных. Клинические штаммы выделены при бактериологическом исследовании материала со слизистой оболочки носа у больных ринитом и из мочи при бактериурии.

Изучение антилактоферриновой активности микроорганизмов (АЛФА) проводилось методом, основанным на определении остаточного количества лактоферрина в инкубационной смеси с помощью иммуноферментного анализа (ИФА) [4]. Антилактоферриновую активность выражали в абсолютных величинах (нг/мл) инактивированного микроорганизмами лактоферрина. Антилизоцимную активность микроорганизмов (АЛА) определяли фотометрическим методом [5]. Антилизоцимную активность микроорганизмов выражали в мкг/мл, оценивая остаточную активность фермента после инкубации супернатанта исследуемой культуры и раствора лизоцима в отношении тест-культуры Micrococcus lyteus. Статистический анализ данных выполнен на IBM PC совместимом компьютере с помощью программы STATISTICA® (Data analysis software system, StatSoft) версия 7.0. Результаты исследований представлены в виде средней ± стандартное отклонение (M ± SD). Сравнение непрерывных величин с нормальным распределением проводилось с помощью t-критерия Стъюдента. Дискретные величины сравнивались с использованием критерия χ^2. Различия между группами считались статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение

Проведенные исследования показали широкое распространение факторов персистенции (антилактоферриновой и антилизоцимной активности) у микроорганизмов, выделенных у больных ревматическими заболеваниями (табл. 1).

Антилактоферриновый признак стафилококки имели в 63,16 – 100% случаев. АЛФА выявлялась у 100% культур S. aureus и S. haemolyticus, изолированных у лиц группы сравнения. У больных ревматическими заболеваниями штаммы стафилококков имели АЛФА в несколько меньшем проценте случаев, однако эти различия не носили существенного характера. Штаммы E. coli проявляли АЛФА в 100% случаев, а бактерии рода Klebsiella имели данный признак в 78,57% случаев у больных ревматическими заболеваниями и в 100% случаев у лиц группы сравнения. Эти различия также не носили существенного характера ($p > 0,05$).

Антилизоцимная активность определялась у 100% штаммов S. aureus. Штаммы S. epidermidis, выделенные у больных ревматическими заболеваниями, также имели АЛА в 100% случаев, и только 50% культур, изолированные у лиц группы сравнения, имели этот признак, что существенно меньше, чем у культур, полученных у больных ($p < 0,05$). Штаммы E. coli, полученные у больных, также отличались существенно большей частотой АЛА. АЛА культур бактерий рода Klebsiella выявлялась с высокой частотой от 71,43 до 100%.

Таблица 1

Распространение антилактоферриновой и антилизоцимной активности у штаммов микроорганизмов, выделенных у больных ревматическими заболеваниями

Микроорганизмы	*n*	Количество штаммов			
		с АЛФА		с АЛА	
		абс.	%	абс.	%
S. aureus	19	15	78,95	19	100
	16	16	100	16	100
S. haemolyticus	19	15	78,95	18	94,74
	16	16	100	14	87,50
S. epidermidis	19	12	63,16	19	100*
	16	15	93,75	8	50
E. coli	12	12	100	12	100*
	12	12	100	8	66,67
Klebsiella spp.	14	11	78,57	14	100
	14	14	100	10	71,43

Примечание: числитель – микроорганизмы, выделенные у больных РЗ; знаменатель – клинические штаммы микроорганизмов группы сравнения; * – статистически достоверные различия, $p < 0,05$.

При определении выраженности маркёров персистенции установлена различная величина проявления антилактоферриновой и антилизоцимной защиты изученных культур условно-патогенных микроорганизмов (табл. 2).

Штаммы S. aureus, выделенные у больных ревматическими заболеваниями, имели АЛФА в пределах 20,08 ± 1,41 нг/мл и существенно не отличались по активности данного фактора от штаммов, полученных у лиц группы сравнения. Культуры S. haemolyticus, выделенные при ревматических заболеваниях, имели значительно меньшую АЛФА в пределах 11,50 ± 1,45 нг/мл, чем культуры, изолированные у лиц группы сравнения. Штаммы S. epidermidis и E. coli., выделенные у больных ревматическими заболеваниями, характеризовались существенно большей АЛФА, чем культуры данных микроорганизмов, полученные у лиц группы сравнения.

Выделенные у больных штаммы S. aureus характеризовались существенно более выраженной антилизоцимной активностью, равной 10,10 ± 2,17 мкг/мл, а у культур, выделенных у лиц группы сравнения, этот показатель был равен 4,40 ± 1,12 мкг/мл

($p < 0,05$). Величина АЛА S. haemolyticus и S. epidermidis, выделенных у больных, была значительно больше, чем у культур, полученных у лиц группы сравнения. Более значительным антилизоцимным потенциалом отличались бактерии семейства Enterobacteriaceae, полученные у больных ревматическими заболеваниями. Штаммы E. coli и Klebsiella spp. имели достоверно большие значения АЛА ($p < 0,05$).

Таблица 2

Антилактоферриновая и антилизоцимная активность микроорганизмов, выделенных у больных ревматическими заболеваниями

Микроорганизмы	*n*	Антилактоферриновая активность, нг/мл	Антилизоцимная активность, мкг/мл
		M ± SD	
S. aureus	15	22,72 ± 1,88	10,1 ± 2,17*
	16	20,08 ± 1,41	4,40 ± 1,12
S. haemolyticus	15	11,50 ± 1,45*	9,91 ± 0,82*
	16	22,84 ± 1,41	4,19 ± 0,61
S. epidermidis	12	7,83 ± 1,13*	8,92 ± 2,45*
	15	5,65 ± 0,62	1,24 ± 0,25
E. coli	12	23,87 ± 0,67*	2,58 ± 0,27*
	12	18,17 ± 3,20	1,64 ± 0,15
Klebsiella spp.	12	19,40 ± 2,47	3,24 ± 0,27*
	14	18,13 ± 0,64	1,83 ± 0,28

Примечание: числитель – микроорганизмы, выделенные у больных РЗ; знаменатель – клинические штаммы микроорганизмов группы сравнения; * – статистически достоверные различия, $p < 0,05$.

Таким образом, при ревматических заболеваниях выделяются микроорганизмы, отличающиеся выраженным персистентным потенциалом. Отдельные штаммы условно-патогенных микроорганизмов, полученные при ревматических заболеваниях, имеют более выраженные персистентные характеристики по сравнению с клиническими штаммами, выделенными при воспалительных процессах на слизистых оболочках носа и мочевыводящих путей. У больных ревматическими заболеваниями слизистые оболочки колонизированы стафилококками и бактериями семейства Enterobacteriaceae, чаще проявляющими антилизоцимную активность. Эпидермальные стафилококки и кишечная палочка, заселяющие организм больных ревматическими заболеваниями, имеют более выраженный антилактоферриновый потенциал, что может играть роль в патогенезе заболевания, снижая уровень лактоферрина и нарушая выживание нейтрофилов [6]. Наряду с этим, все штаммы отдельных видов стафилококков и кишечных бактерий проявляют существенно большую антилизоцимную активность. Высокий уровень антилизоцимной и антилактоферриновой защиты у микроорганизмов, выделенных при ревматических заболеваниях, может способствовать колонизации организма больных условно-патогенными бактериями. Колонизация условно-патогенными микроорганизмами слизистых может в свою очередь сопровождаться развитием ревматических заболеваний [7]. Наличие факторов персистенции у бактерий, заселяющих организм больного, также может способствовать развитию длительных воспалительных коморбидных инфекций при ревматических заболеваниях [3].

Выводы

1. При ревматических заболеваниях существенно чаще выделяются условно-патогенные микроорганизмы, имеющие антилизоцимную активность, при этом их антилактоферриновая активность обнаруживается с такой же частотой, как и у возбудителей воспалительных процессов слизистых оболочек носа и мочевыводящих путей.

2. Микроорганизмы, выделенные у больных ревматическими заболеваниями, отличаются большей антилизоцимной активностью, а эпидермальный стафилококк и кишечная палочка имеют высокую антилактоферриновую защиту.

Список литературы

1. Бухарин О.В. Персистенция патогенных бактерий: теория и практика // Журн. микробиол. – 2000 – № 4 – С. 4–7.

2. Механизмы выживания бактерий / О.В. Бухарин, А.Л. Гинцбург, Ю.М. Романова [и др.]. – М.: Медицина, 2005. – 367 с.

3. Мустафаев М.Ш. Факторы персистенции микроорганизмов, выделенных при гнойно-воспалительных осложнениях переломов челюстных костей / М.Ш. Мустафаев, Ш.С. Кудаев, З.Ф. Хараева // Фундаментальные исследования. – 2005. – № 5 – С. 78–79.

4. Новый метод определения антилактоферриновой активности микроорганизмов. / И.В. Валышева, А.В. Валышев, О.А. Карташова [и др.] // Журн. микробиол. – 2003 – № 4 – С. 64–67.

5. Фотометрическое определение антилизоцимной активности микроорганизмов / О.В. Бухарин, А.В. Валышев, Н.Н. Елагина [и др.] // Журн. микробиол. – 1997 – № 4 – С. 117–120.

6. Lactoferrin is a survival factor for neutrophils in rheumatoid synovial fluid / S.H. Wong, N. Francis, H. Chahal [et al.] // Rheumatology (Oxford). – 2009. – №48(1) – P. 39–44.

7. Sarjomaa M. From tonsillitis to coxitis / M. Sarjomaa, R.V. Liyanarachi, H. Brekke // Tidsskr. Nor. Laegeforen. – 2009. – № 129 (17). – P. 1754–1755.

8. Spellberg B. Type1/type2 immunity in infections diseases / B. Spellberg, J.E. Edwards // Clin.Infect. Dis. – 2001. – № 32. – P. 76–102.

Рецензенты:

Раков А.А., д.м.н., профессор, зав. кафедрой фармакологии ГОУ ВПО «Ярославская государственная медицинская академия Минздравсоцразвития России», г. Ярославль;

Шорманов С.В., д.м.н., профессор кафедры патологической анатомии ГОУ ВПО «Ярославская государственная медицинская академия Росздрава», г. Ярославль.

Работа поступила в редакцию 22.03.2011.