

ХАРАКТЕРИСТИКА БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ОТДЕЛЬНЫХ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ КИШЕЧНОЙ МИКРОФЛОРЫ У ВИЧ-ИНФИЦИРОВАННЫХ ДЕТЕЙ

Ю. В. Захарова, А. А. Марковская, Л. А. Леванова

Кемеровская государственная медицинская академия

Поступила в редакцию 25.11.2010 г.

Аннотация. Изучение биологических свойств индигенной и условно-патогенной микрофлоры у ВИЧ-инфицированных детей для минимизации риска развития эндогенных бактериальных инфекций. Материалы и методы: В работе использованы 33 штамма бифидобактерий и 30 штаммов атипичных кишечных палочек, выделенных от ВИЧ-инфицированных (20 человек) и здоровых детей (15 человек). Выделение и идентификацию микроорганизмов проводили общепринятыми методами. У индигенной и оппортунистической микрофлоры изучены антилизоцимная, адгезивная и антагонистическая активности. Результаты: Установлено, что основу взаимодействия симбионтов составляет изменение персистентного потенциала условно-патогенных микроорганизмов, а также антагонизма и адгезивной активности бифидобактерий.

Ключевые слова: бифидобактерии, кишечные палочки, антагонизм, персистенция, адгезивная активность.

Abstract. To study biological properties of indigenes and opportunistic microflora from VIH-infection children for a risk minimization of endogens bacterial infection. *Materials and methods:* 33 strains of Bifidobacteria and 30 strains atypical Escherichia coli isolated from children with VIH-infection (20 participants) and healthy persons (15 participants) were used for study. Isolation and identification of microorganisms were performed by conventional methods. Antilysozyme, adhesive and antagonistic activity of indigenes and opportunistic bacteria was investigated. *Results.* It is revealed that the basis of interaction between symbionts is determined by change of persistence potential of opportunistic microorganisms and antagonism and adhesive activity of bifidobacteria.

Keywords: Bifidobacteria, Escherichia coli, antagonism, persistence, adhesive activity.

ВВЕДЕНИЕ

До сегодняшнего дня ВИЧ-инфекция остается одной из проблем современной медицины, в том числе и в педиатрической практике, так как доля детей в общей структуре ВИЧ-инфицированных увеличивается [1]. Вторичные бактериальные инфекции нередко являются клинической манифестацией ранней ВИЧ-инфекции у ослабленных детей, инфицирование которых произошло до 1,5 –летнего возраста, и уже на стадии первичных проявлений могут приводить к летальному исходу [2]. Резервуаром для микробов-оппортунистов является толстый кишечник, носо- и ротоглотка, где они формируют ассоциативные сожительства с доминантными микросимбионтами. У здорового человека индигенная микрофлора обеспечивает колонизационную резистентность слизистых, а также контролируют экспрессию факторов вирулентности условно-патогенных бактерий, что предупреждает развитие оппортунистических болезней [3–5].

Очевидно, что у ВИЧ-инфицированных детей происходит нарушение определенных механизмов поддержания микроэкологического гомеостаза, что является патогенетической основой формирования эндогенных инфекций [6]. Однако в большинстве случаев при развитии оппортунистических инфекций у детей с иммунодефицитами проводят исследование качественного и количественного состава микрофлоры, тогда как исследование характера взаимоотношений микросимбионтов при формировании ассоциаций изучены недостаточно. Определение у ВИЧ-инфицированных прогностически значимых свойств микрофлоры, которые могли бы использоваться, как критерии возможного развития вторичных бактериальных инфекций является актуальным для своевременной профилактики этих состояний.

Цель исследования — изучение биологических свойств индигенной и условно-патогенной микрофлоры у ВИЧ-инфицированных детей для минимизации риска развития эндогенных бактериальных инфекций.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Стандартным бактериологическим методом проведено исследование фекальной микрофлоры у 20 ВИЧ-инфицированных детей в возрасте $1,7 \pm 0,2$ года [7]. Группу сравнения составили 15 детей с отрицательными результатами иммуноферментного анализа на ВИЧ-антитела того же возраста и пола, что и в опытной. Дизайн исследования по типу «случай-контроль». Идентификацию бактерий и грибов проводили с использованием коммерческих тест систем ANAERO-TEST 23 (Lachema, Чехия), STAPHY-TEST 16 (Lachema, Чехия), STREPTO-TEST 16 (Lachema, Чехия), AUXOCOLOR (BioRad, Франция), СИБ для энтеробактерий набор № 2 (НПО «Микроген», Нижний-Новгород). Биологические свойства изучали у 33 штаммов бифидобактерий (18 штаммов получены от детей опытной группы и 15 штаммов от детей группы сравнения) и у 30 микроорганизмов семейства Enterobacteriaceae (20 штаммов получены от ВИЧ — позитивных, 10 культур от ВИЧ — негативных детей).

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°C в течение 1 часа, регулярно встряхивая смесь. После этого готовили мазок, высушивали, фиксировали 96 % 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 $\text{ИАМ} \leq 1,75$; низкоадгезивными — от 1,76 до 2,5; среднеадгезивными — от 2,51 до 4,0 и высокоадгезивными при $\text{ИАМ} \geq 4,0$.

Активность кислотообразования бифидобактерий определяли титрометрическим методом. С этой целью к суточным культурам бифидобактерий, выращенных на среде Блаурокка в объеме 5 мл добавляли по 2 капли индикатора бромтимолового

синего 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: $T^\circ = A \times K \times 20$, где А — количество 0,1 н щелочи, пошедшее на титрование 5 мл исследуемой жидкости, К-поправка к титру, определяемая при титровании 0,1 н раствора щелочи 0,1 н янтарной кислотой, T° — величина, выражающая количество 0,1 н щелочи, пошедшей на титрование 100 мл исследуемого образца.

Антагонистическую активность бифидобактерий по отношению к клебсиеллам определяли методом перпендикулярных штрихов на плотной питательной среде. На чашку со средой Shadler-agar (Himedia, Индия) петлей диаметром 2 мм наносили культуры бифидобактерий и инкубировали 72 часа в анаэробном состоянии с газогенерирующим пакетом («Новое дело», г. Санкт-Петербург). Далее к выросшей культуре подсеивали аэробных участников ассоциаций, предварительно выращенных на скошенном мясо-пептонном агаре в течение 18 часов. Посев производили петлей диаметром 1 мм в направлении от зоны роста индигенных бактерий, не касаясь ее и перпендикулярно ей. Чашки инкубировали при температуре 37°C 24 часа в аэробных условиях. Учет результатов вели по величине зоны отсутствия роста клебсиелл, которую выражали в мм.

Антилизоцимную активность (АЛА) микроорганизмов семейства Enterobacteriaceae, как фактора персистенции, осуществляли методом отсроченного антагонизма в агаре по Р. М. Muriana, Т. R. Klaehammer, в модификации О. В. Бухарина. Готовили ряд чашек Петри с питательным агаром, содержащим лизоцим в различных концентрациях (от 1 до 10 мкг/мл). На поверхность сред «пяточками» засеивали исследуемые культуры микроорганизмов. После инкубации в течение 24 часов при 37°C выросшие колонии убивали в течение 30—40 минут парами хлороформа. Затем сверху на колонии наслаивали 3—4 мл полужидкого агара, смешанного с 0,1 мл взвеси индикаторной культуры *Micrococcus lysodeikticus* ATCC 15307 мутностью 10 ед. оптического стандарта мутности (ГИСК им. Л. А. Тарасевича). Через сутки инкубации в термостате проводили учет результатов опыта по наличию или отсутствию роста микрококка на поверхности и вокруг колоний исследуемых культур, инактивировавших известную концентрацию лизоцима в питательной среде. Все полученные результаты были обработаны с помощью прикладной компьютерной программы STATISTICA 6,0.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Среди обследованных ВИЧ-инфицированных детей у 35 % микробиологические нарушения были интерпретированы как 1 степень, у 40 % — как 2 степень дисбактериоза ($p < 0,05$), в 25 % случаев у детей были зарегистрированы дисбиотические нарушения 3 степени ($p > 0,05$). При 1 степени микробиологических нарушений титр бифидофлоры составил $8,3 \pm 0,2$ lg КОЕ/г, а при 2 степени не превышал $6,9 \pm 0,3$ lg КОЕ/г. Самый низкий уровень колонизации слизистой бифидобактериями был у детей с 3 степенью дисбактериоза, так как он составил $6,1 \pm 0,2$ lg КОЕ/г. Не зависимо от степени микробиологических нарушений у ВИЧ-инфицированных детей доминировали *Bifidobacterium dentium* (44,4 %), *B. longum* (33,3 %), *B. breve* (22,2 %).

Распространенность микробиологических нарушений 1 и 2 степени у детей из группы сравнения не отличалась от таковой у детей с ВИЧ-инфекцией, так как составляла 33,3 и 46,7 % соответственно ($p > 0,05$). Однако у ВИЧ — негативных детей в 13,3 % случаев состояние микрофлоры кишечника расценивали как эубиотическое ($p > 0,05$), а дисмикробиоценоз 3 степени был зарегистрирован в 3,7 раза реже, чем у ВИЧ-инфицированных ($p < 0,05$). Интенсивность колонизации бифидофлорой слизистой кишечника у детей группы сравнения при 1 и 2 степенях микробиологических нарушений была на 1—2 порядка выше, чем в опытной группе ($9,2 \pm 0,2$ и $8,8 \pm 0,4$ lg КОЕ/г). Даже при 3 степени дисбактериоза количественный уровень доминантных микросимбионтов у ВИЧ-негативных детей не снижался ниже $7,2 \pm 0,2$ lg КОЕ/г. В структуре бифидофлоры доминировали *B. longum* (46,7 %) и *B. breve* (33,3 %). Полученные результаты не согласуются с данными литературы о ведущих видах бифидобактерий у здоровых детей 1—2 лет, так как часто выделение вышеуказанных видов расценивают как дисбактериоз [8]. При этом не нужно забывать о наличии региональных особенностей микрофлоры, которые выражаются не только в количественных, но и качественных характеристиках, что и позволяет интерпретировать полученные данные.

Установлено, что у всех ВИЧ-инфицированных детей в кишечнике вегетировали кишечные палочки с измененными биологическими свойствами — лактозонегативные и гемолизинпродуцирующие ($p < 0,01$). Количественный уровень данных микроорганизмов при 1 и 2 степенях нарушения микрофлоры составил 5,5—6,1 lg КОЕ/г. При глубоких микробиологических нарушениях титр лактозоне-

гативных и гемолизинпродуцирующих эшерихий достигал $8,4 \pm 0,1$ lg КОЕ/г. У детей же из группы сравнения количественный уровень лактозонегативных и гемолитических *Escherichia coli* был достоверно ниже и при 1 степени микробиологических нарушений и составил $3,6 \pm 0,2$ lg КОЕ/г, при 2 степени — $4,4 \pm 0,3$ lg КОЕ/г, а при 3 степени — $6,8 \pm 0,4$ lg КОЕ/г ($p < 0,05$).

Изучение биологических свойств микрофлоры проводили в сравнительном аспекте, что позволило установить некоторые механизмы развития эндогенных заболеваний при ВИЧ-инфекции. Установлено, что адгезивная активность бифидобактерий у ВИЧ-инфицированных детей была достоверно ниже, чем у детей из группы сравнения, так как средние значения ИАМ составили $2,4 \pm 0,2$ и $4,2 \pm 0,3$ соответственно ($p < 0,01$). В большинстве случаев бифидофлора (55,6 %), выделенная от детей первой группы, обладала средней адгезивной активностью, тогда как 66,7 % штаммов, изолированных из кишечника детей группы сравнения были отнесены к высоко адгезивным. Бифидобактерии от ВИЧ-инфицированных детей характеризовались низкой кислотообразующей способностью, которая не превышала $63,2 \pm 0,5$ T°, в группе сравнения данный показатель был в 1,5 раза выше ($p < 0,05$). Нарушение кислотообразующей способности бифидофлоры на фоне ВИЧ-инфекции обуславливает низкую антагонистическую активность данных бактерий по отношению к условно-патогенной микрофлоре, в частности к кишечным палочкам с измененными биологическими свойствами. Зона задержки роста эшерихий после отсроченного культивирования с бифидобактериями, изолированных от ВИЧ-инфицированных детей не превышала $5,2 \pm 0,2$ мм, а в группе сравнения достигала $9,8 \pm 0,2$ мм ($p < 0,01$).

В основе механизма развития микробиологических нарушений лежит изменение не только биологических свойств индигенных микроорганизмов, но и повышение персистентного потенциала условно-патогенных бактерий. Установлено, что лактозонегативные и гемолизинпродуцирующие кишечные палочки у ВИЧ-инфицированных детей характеризовались более высокой АЛА ($7,8 \pm 0,3$ мкг/мл), чем штаммы изолированные от детей группы сравнения ($2,5 \pm 0,4$ мкг/мл), что предопределяет возможность распространения данных бактерий за пределы «привычной» для них экологической ниши за счет нивелирования факторов врожденной противомикробной защиты, в частности лизоцима.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

У ВИЧ-инфицированных детей в 65 % случаев в толстой кишке развиваются микробиологические нарушения 2—3 степени, характеризующиеся угнетением бифидофлоры и ростом числа условно-патогенных бактерий ($p < 0,05$). Нарушение колонизационной резистентности связано с низкой адгезивной активностью бифидобактерий. Изучение характера взаимодействий между нормальной микрофлорой и условно-патогенными бактериями в ассоциациях выявило подавление факторов антагонизма у доминантного микросимбионта и активизацию персистентных свойств минорной микрофлоры. Это позволяет условно-патогенным микроорганизмам избежать регулирующего воздействия на их популяцию индигенной микрофлоры, а также нивелировать действие врожденных факторов защиты, в частности лизоцима. В итоге, у ВИЧ-инфицированных детей растет численность микробов-оппортунистов, следовательно, повышается риск развития эндогенных инфекций.

Работа выполнена при поддержке гранта Президента РФ. № МК-971.2010.7

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Онищенко Г. Г.* Санитарно-эпидемиологическая обстановка в Российской Федерации. Основные про-

блемы и приоритетные направления профилактической деятельности на современном этапе / Г. Г. Онищенко // Вестник РАМН. — 2009. — № 7. — С. 30—36.

2. *Лобзин Ю. В.* ВИЧ-инфекция: клиника, диагностика, лечение / Ю. В. Лобзин, К. В. Жданов, В. Л. Пастушенков. — СПб: Фолиант. — 2003, 144 с.

3. *Бухарин О. В.* Инфекция — модельная система ассоциативного симбиоза / О. В. Бухарин // Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. — 2009. — № 1. — С. 83—86.

4. Видовая характеристика и факторы персистенции бифидофлоры кишечника в норме и при дисбиозах / Е. В. Иванова [и др.] // Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. — 2009. — № 2. — С. 89—93.

5. Enterococcus faecalis from newborn babies regulate endogenous PPARgamma activity and IL-10 levels in colonic epithelial cells / A. Are [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. — 2008. — Vol. 12, № 105. — P. 1943—1948.

6. Molecular and cellular basis of microflora-host interactions / P. Winkler [et al.] // J. Nutr. — 2007. — Vol. 137(3 Suppl 2). — P. 756—772.

7. Отраслевой стандарт «Протокол ведения больных. Дисбактериоз кишечника»: приказ МЗ РФ № 231 от 9 июня 2003 г.

8. Молекулярно-генетический анализ видового и штаммового разнообразия бифидобактерий у детей раннего возраста / А.Н. Шкопоров [и др.] // Вестник РАМН. — 2006. — № 1. — С. 45—50.

Захарова Юлия Викторовна — к.м.н., доцент кафедры микробиологии, иммунологии и вирусологии КемГМА; тел.: (3842) 73-28-71, e-mail: micro@kemsma.ru

Zakharova Julia V. — PhD, the senior lecturer of microbiology, immunology and virology department of Kemerovo State Medical Academy; tel.: (3842) 73-28-71, e-mail: micro@kemsma.ru

Марковская Алина Анатольевна — аспирант кафедры микробиологии, иммунологии и вирусологии КемГМА

Markovskaya Alina A. — the internal post-graduate student of microbiology, immunology and virology department of Kemerovo State Medical Academy

Леванова Людмила Александровна — д.м.н., профессор, заведующая кафедрой микробиологии, иммунологии и вирусологии КемГМА; тел.: (3842)73-28-71, e-mail: micro@kemsma.ru

Levanova Lyudmila A. — PhD, the professor, managing of microbiology, immunology and virology department of Kemerovo State Medical; tel.: (3842) 73-28-71, e-mail: micro@kemsma.ru