



УДК 616.34-008.87

Адгезивные свойства микроорганизмов, колонизирующих различные биотопы организма человека

Е. И. Иванова, С. М. Попкова, Н. М. Шабанова, И. В. Петрова,
Е. Л. Горбунова, М. В. Савелькаева, И. Н. Данусевич

Учреждение Российской академии медицинских наук Научный центр проблем
здоровья семьи и репродукции человека Сибирского отделения РАМН, Иркутск
E-mail: ivanova.iem@gmail.com

Аннотация. Рассмотрена адгезивность микроорганизмов как фактор, влияющий на развитие инфекционного процесса. Проанализированы на модели эритроцитов адгезивные свойства бактерий, выделенных из разных биотопов. Более существенно адгезивные свойства проявлялись у бактерий семейства *Enterobacteriaceae*.

Ключевые слова: *Escherichia coli*, условно-патогенная микрофлора, адгезия, биотопы.

Введение

Естественный образ жизни большинства микроорганизмов связан с их закреплением на определённых субстратах [8]. Важной стадией процесса «приживания» как представителей нормальной микрофлоры, так и патогенных микроорганизмов в организме человека является взаимодействие микроорганизмов с эпителием мембран – адгезия [2]. Адгезию микроорганизмов к поверхности эпителия можно рассматривать как начальный этап колонизации различных биотопов организма, который предшествует инвазии патогена [1; 10]. При ряде заболеваний, особенно вызванных микроорганизмами, постоянно встречающимися у человека (так называемыми условно-патогенными микроорганизмами), представляет интерес определить адгезивность всех выросших на чашке колоний первичного посева [9], так как именно степень агрессии при взаимодействии между патогеном и клеткой-мишенью в результате бактериальной адгезии является определяющим звеном в развитии инфекционного процесса [5]. Целью данного исследования являлось определение популяционной адгезивной активности микроорганизмов, выделенных из различных биотопов организма человека.

Материалы и методы

В работе исследованы 75 образцов культур представителей семейства *Enterobacteriaceae*, выделенных из кишечного биотопа: типичная *Escherichia coli* (25), *Enterobacter spp.* (25),

Klebsiella spp. (25), а также 47 образцов культур *Staphylococcus spp.*, выделенных из вагинального (8) и носоглоточного биотопов (39). Материал забирался в течение 2008–2009 гг. у жителей г. Иркутска, проходивших обследование в клинике НЦ ПЗСРЧ СО РАМН. Культуры индигенной и условно-патогенной микрофлоры семейства *Enterobacteriaceae* выделялись из копрологических проб детей от 1 мес. до 17 лет, имеющих функциональные нарушения желудочно-кишечного тракта и обследованных на дисбиоз кишечника. Материал из вагинального биотопа (мазки) взят у женщин репродуктивного возраста с воспалительными заболеваниями нижнего этажа полового тракта (НЭПТ) (цервицит, хронический сальпингоофорит, эндометриоз, кольпит). Мазки из носоглотки взяты от взрослых пациентов без установленного диагноза.

Для исследования микрофлоры изучаемых биотопов использовали стандартный комплекс микробиологических методов [7]. Первичный посев материала и идентификацию изолятов осуществляли общепринятыми бактериологическими методами, согласно методическим указаниям [6].

Наиболее универсальной моделью для изучения адгезии различных микроорганизмов является система эритроциты – микроорганизм. В данной работе адгезивную активность оценивали с помощью методики, предложенной для энтеробактерий [9], которая позволяет охарактеризовать общую популяционную адгезивную активность аутоштаммов, и адаптиро-

ванной нами для исследуемых микроорганизмов [3]. После выделения и идентификации исследуемых микроорганизмов готовили 1 млрд взвесь выделенной культуры согласно стандарту мутности и производили десятикратные разведения. Из разведения 10^{-6} осуществляли посев на мясо-пептонный агар (0,5 мл), либо высеив секторами по методу Гольда. Инкубирование в термостате производилось при температуре 37 °С в течение 18–20 ч. Для более точного подсчёта учитывались все выросшие колонии размером 2–5 мм. Для изучения адгезивной активности использовали эритроциты человека. 1 мл крови разводили до 5%-ной суспензии физиологическим раствором объёмом 20 мл. Кровь хранили при температуре –4 °С. Проросшие на чашке колонии заливали эритроцитарной суспензией до образования ровного слоя, покрывающего все колонии. Процесс адгезии и результаты визуализировались на белом фоне с использованием лупы или бинокулярного микроскопа. Скорость адгезии оценивалась с учётом времени (с), от запуска эксперимента до времени начала ореолообразования (начала прилипания эритроцитов к колонии).

Результаты и обсуждение

Время начала ореолообразования эритроцитов вокруг колоний аутоштаммов *E. coli* составляло от 5 до 60 с, представителей родов *Klebsiella* и *Enterobacter* – от 2 до 22 с и от 4 до 16 с соответственно.

Результаты свидетельствовали о том, что начальная стадия адгезии данных микроорганизмов кишечного биотопа в основном достаточно быстрая (84–88 % аутоштаммов из всех

исследуемых), и только 12–16 % аутоштаммов имели большой временной показатель, т. е. низкую начальную адгезивную активность [4].

Временной показатель начала ореолообразования микроорганизмов рода *Staphylococcus*, выделенных из вагинального биотопа, составил 11–49 с, а из носоглоточного – от 6 сек до 3 мин 25 с.

Таким образом, средняя скорость адгезивной активности представителей грамотрицательных микроорганизмов семейства *Enterobacteriaceae* из кишечного биотопа составила для *Klebsiella spp.* – $7 \pm 1,1$ с, *Enterobacter spp.* – $10 \pm 0,1$ с и *E. coli* – $23 \pm 3,9$ с (рис. 1). Средняя скорость адгезивной активности представителей рода *Staphylococcus*, выделенных из носоглотки составила $77 \pm 8,5$ с, а из вагинального биотопа – $27 \pm 1,2$ с (разница статистически значима при $p < 0,05$). Такие отличия в скорости адгезии свидетельствуют о разной адгезивной активности исследованных аутоштаммов (рис. 2).

Изучение адгезивного потенциала исследуемых аутоштаммов показало, что высокоадгезивные свойства проявляли бактерии *Klebsiella spp.*, *Enterobacter spp.* и *E. coli*. Вероятно, это связано с тем, что у грамотрицательных микроорганизмов адгезивные свойства проявляются быстрее за счёт наличия фимбриальных структур клетки, каковых не обнаруживается у грамположительных. У последних в адгезии участвуют афимбриальные структуры (тейхоевые и липотейхоевые кислоты, компоненты клеточной стенки, капсулы и капсулоподобной оболочки), имеющие более низкое сродство к рецепторам клеток слизистых биотопа.

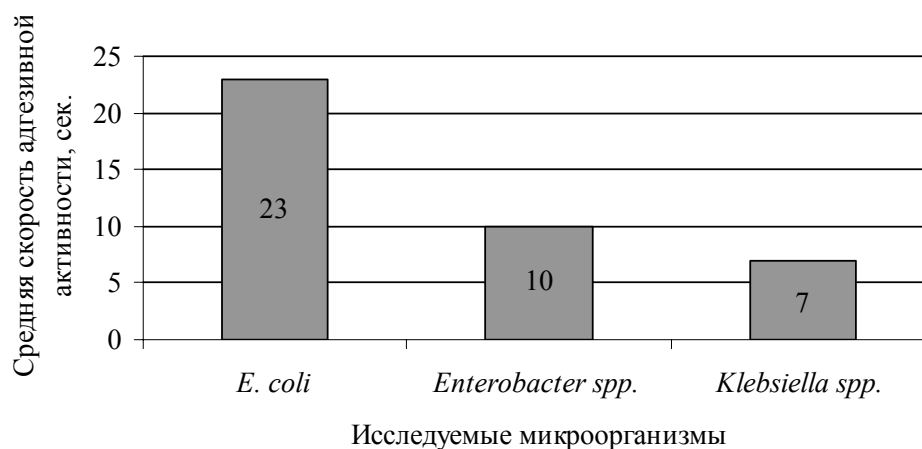


Рис. 1. Показатели средней скорости адгезивной активности микроорганизмов кишечного биотопа

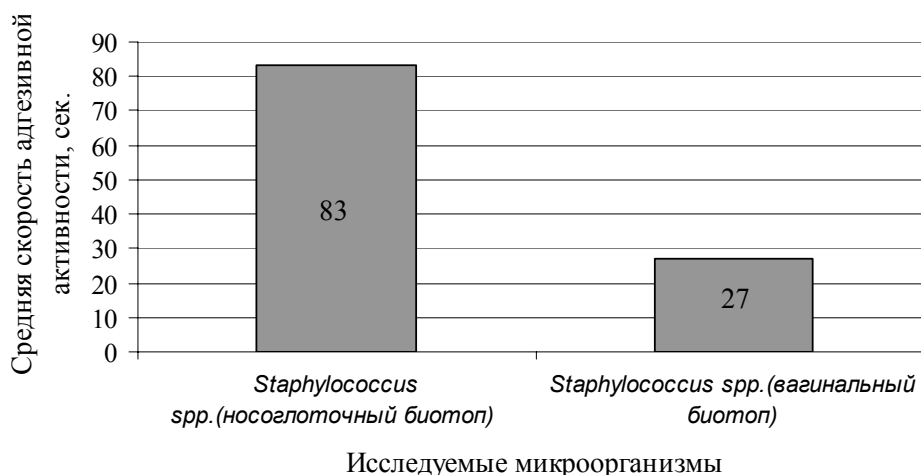


Рис. 2. Показатели средней скорости адгезивной активности рода *Staphylococcus* носоглоточного и вагинального биотопов

При сравнении результатов изучаемых показателей для *E. coli* с нормальной ферментативной активностью и исследуемых условно-патогенных микроорганизмов кишечного биотопа нами было отмечено, что скорость адгезивной активности микроорганизмов родов *Enterobacter* и *Klebsiella* выше в 2–3 раза по сравнению с *E. coli*.

Увеличение адгезивной активности *E. coli* lac⁺ в присутствии условно-патогенных микроорганизмов (*Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., *Citrobacter* spp., *Proteus* spp., *Staphylococcus* spp., *Candida* spp. и *Clostridium* spp.) регистрировалось на уровне тенденции. Вероятно, данная ситуация обеспечивает выживаемость этого компонента нормальной микрофлоры в условиях ассоциативного симбиоза.

При сравнении адгезивной активности разных видов рода *Staphylococcus* (*S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. saprophyticus*, *S. warneri*, *S. haemolyticus*), установлено, что золотистый стафилококк характеризуется более высокой скоростью адгезивного процесса (32 с) по сравнению с другими видами стафилококка (от 37 с и выше). В единичных наблюдениях установлено, что адгезивная скорость *S. aureus* (выделенного из зева) на фоне ассоциации с грибами рода *Candida* резко уменьшалась и составляла в среднем 81 с.

Таким образом, мы полагаем, что скорость адгезивного процесса, определяемого по началу ореолообразования эритроцитов вокруг колоний аутоштаммов, можно расценивать как один из важных показателей при оценке адгезивной активности аутоштаммов популяций как нормальной *E. coli*, так и условно-

патогенных микроорганизмов родов *Enterobacter*, *Klebsiella* и *Staphylococcus*.

Выводы

1. Скорость популяционной адгезивной активности кишечной палочки – симбионта кишечного микробиоценоза, имеет определенную зависимость от фонового состава (ассоциаций) условно-патогенной микрофлоры кишечника: чем выше концентрация условно-патогенного микроорганизма, тем выше адгезивность *E. coli*.

2. Более высокая адгезивность условно-патогенных микроорганизмов представителей рода *Klebsiella* spp. и *Enterobacter* spp. кишечного биотопа по сравнению с *E. coli* свидетельствует о их конкурентных преимуществах за сайты адгезии к эпителиоцитам слизистой кишечника человека по сравнению с нормальной *E. coli*, также это может быть связано с особенностями кишечных биоценозов пациентов, у которых сформировался дисбиоз (патоценоз).

3. Снижение скорости адгезивной активности *S. aureus* на фоне ассоциации с дрожжеподобными грибами рода *Candida* обусловлено, вероятно, конкуренцией за адгезируемый субстрат.

4. При оценке адгезивной активности аутоштаммов *E. coli* и условно-патогенных микроорганизмов родов *Enterobacter*, *Klebsiella* и *Staphylococcus* информативным показателем оценки адгезивности является время начала ореолообразования с момента запуска эксперимента.

Литература

1. Бондаренко В. М. Дисбактериоз кишечника как клиничко-лабораторный синдром. Современное

состояние проблемы / В. М. Бондаренко, Т. В. Мацулевич. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2007. – 302 с.

2. Бондаренко В. М. Ранние этапы развития инфекционного процесса и двойственная роль нормальной микрофлоры / В. М. Бондаренко, В. Г. Петровская // Вестн. РАМН. – 1997. – № 3. – С. 7–10.

3. Иванова Е. И. Адгезивные свойства микроорганизмов, колонизирующих различные биотопы организма человека / Е. И. Иванова, С. М. Попкова, Н. М. Шабанова // Достижения молодых учёных в развитии инновационных процессов в экономике, науке, образовании : сб. тр. III Междунар. науч.-практ. конф. – Брянск : БГТУ, 2011. – С. 240–241.

4. Иванова Е. И. Сравнительная характеристика адгезивных свойств различных типов *Escherichia coli* в ассоциациях с условно-патогенной микрофлорой кишечного биотопа / Е. И. Иванова, С. М. Попкова // Актуальные вопросы охраны здоровья населения регионов Сибири : сб. тр. XIII науч.-практ. конф. мол. учёных. – Красноярск, 2010. – С. 17–18.

5. Порт Е. В. Изучение адгезивных свойств штаммов синегнойной палочки // Вісн. Харк. нац. ун-ту. – 2004. – № 639. – С. 12–14.

6. Правила и техника работы с материалом, поступающим для исследования в микробиологическую лабораторию : метод. указ. / К. И. Савицкая [и др.]. – М., 1999.

7. Об унификации микробиологических методов исследования, применяемых в клинко-диагностических лабораториях и лечебно-профилактических учреждениях : приказ № 535 МЗ СССР. – М., 1985.

8. Сидоренко С. В. Инфекционный процесс как «диалог» между хозяином и паразитом / С. В. Сидоренко // КМАХ. – 2001. – Т. 3, № 4. – С. 301–315.

9. Способ оценки состояния микрофлоры кишечника человека по количеству адгезивно-активных бактерий и типу адгезинов / С. С. Гизатулина [и др.] // Журн. микробиол. – 1991. – № 2. – С. 21–23.

10. Adhesive properties of *Enterobacter sakazakii* to human epithelial and brain microvascular endothelial cells / J. Mange [et al.] // BMC Microbiology. – 2006. – Vol. 6, N 58. – P. 1186–1471.

Adhesive properties of microorganisms colonising different biotopes of the human body

E. I. Ivanova, S. M. Popkova, N. M. Shabanova, I. N. Petrova, E. L. Gorbunova, M. V. Savelkaeva, I. V. Danusevich

Scientific Centre of the Family Health and Human Reproduction Problems SB RAMS, Irkutsk

Abstract. Adhesion is studied as the factor influencing on development of infectious process. Adhesive properties on erythrocyte model of microorganisms isolated from different biotopes were analyzed. Bacteria of *Enterobacteriaceae* family have shown significantly higher adhesive properties.

Key words: *Escherichia coli*, opportunistic microorganisms, adhesion, biotopes.

Иванова Елена Иннокентьевна
Институт эпидемиологии и микробиологии НЦ
ПЗСРЧ СО РАМН

664025, г. Иркутск, ул. К. Маркса, 3
младший научный сотрудник
тел. (3952)33–39–52

Попкова София Марковна
Институт эпидемиологии и микробиологии
НЦ ПЗСРЧ СО РАМН

664025, г. Иркутск, ул. К. Маркса, 3
доктор биологических наук,
заведующий лабораторией микроэкологии
тел. (3952)33–34–41

Шабанова Наталья Михайловна
Институт эпидемиологии и микробиологии НЦ
ПЗСРЧ СО РАМН

664025, г. Иркутск, ул. К. Маркса, 3
младший научный сотрудник
тел. (3952)33–39–52

Ivanova Elena Innokentyevna
Institute of Epidemiology and Microbiology, Scientific
Centre of Family Health and Human Reproduction
Problems SB RAMS

3 K. Marx St., Irkutsk, 664025
junior research scientist
phone: (3952)33–39–52

Popkova Sofia Markovna
Institute of Epidemiology and Microbiology,
Scientific Centre of Family Health and Human
Reproduction Problems SB RAMS

3 K. Marx St., Irkutsk, 664025
D. Sc. of Biology,
Head of Laboratory of Microecology
phone: (3952)33–34–41

Shabanova Natalia Mikhaylovna
Institute of Epidemiology and Microbiology, Scientific
Centre of Family Health and Human Reproduction
Problems SB RAMS

3 K. Marx St., Irkutsk, 664025
junior research scientist
phone: (3952)33–39–52

Петрова Ирина Викторовна
Клиника НЦ ПЗСРЧ СО РАМН

664025, г. Иркутск, ул. К. Маркса, 3
Врач-аллерголог-иммунолог
тел. (3952)33–34–45

Горбунова Елена Леонидовна
Клиника НЦ ПЗСРЧ СО РАМН

664025, г. Иркутск, ул. К. Маркса, 3
Врач-гастроэнтеролог
тел. (3952)33–34–45

Савелькаева Марина Владимировна
Клиника НЦ ПЗСРЧ СО РАМН

664025, г. Иркутск, ул. К. Маркса, 3
Врач-гастроэнтеролог, заведующий отделением
детской гастроэнтерологии
тел. (3952) 33–34–45

Данусевич Ирина Николаевна
Клиника НЦ ПЗСРЧ СО РАМН

664003, г. Иркутск, ул. Тимирязева, 16
кандидат медицинских наук, научный сотрудник,
врач-акушер-гинеколог
тел. (3952)20–76–32

Petrova Irina Victorovna
Clinic of Scientific Centre of Family Health
and Human Reproduction Problems SB RAMS
3 K. Marx St., Irkutsk, 664025
allergist-immunologist
phone: (3952)33–34–45

Gorbunova Elena Leonidovna
Clinic of Scientific Centre of Family Health
and Human Reproduction Problems SB RAMS
3 K. Marx St., Irkutsk, 664025
gastroenterologist
phone: тел. (3952) 33–34–45

Savelkaeva Marina Vladimirovna
Clinic of Scientific Centre of Family Health
and Human Reproduction Problems SB RAMS
3 K. Marx St., Irkutsk, 664025
gastroenterologist, Head of Section of Children's
Gastroenterology
тел. (3952) 33–34–45

Danusevich Irina Nikolaevna
Clinic of Scientific Centre of Family Health
and Human Reproduction Problems SB RAMS
16 Timirjazev St., Irkutsk, 664003
Ph. D. in Medicine, research scientist,
obstetrician-gynecologist
тел. (3952)20–76–32