

## МЕЖМИКРОБНЫЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ СТРЕПТОКОККОВ С АССОЦИАНТАМИ НА СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКЕ МИНДАЛИН

Соболева Ю.В.<sup>1</sup>, Фадеев С.Б.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза Уральское отделение РАН (ИКВС УрО РАН), Оренбург, Россия (460000, Оренбург, ул. Пионерская, 11), e-mail: [sjulia111@gmail.com](mailto:sjulia111@gmail.com)

**Цель:** оценка межбактериальных взаимодействий стрептококков с ассоциантами в условиях микросимбиоза миндалин здоровых и больных хроническим тонзиллитом. **Материалы и методы:** выделена и изучена микрофлора 100 микробиоценозов слизистой оболочки миндалин здоровых лиц и 45 - больных хроническим тонзиллитом в стадии ремиссии. У выделенных штаммов изучали гемолитическую, антилизозимную, лизоцимную активность, ростовые характеристики и их модификацию под влиянием симбионтной микрофлоры. **Результаты:** выявлено, что на слизистой оболочке миндалин здоровых лиц стрептококки (*S. salivarius*, *S. miti*, *S. sanguis* и *S. oralis*) подавляют экспрессию факторов патогенности и персистенции симбионтов, а также подавляют их рост, в основном стафилококков и аэрококков. Влияние симбионтов на стрептококки было единичным и носило преимущественно стимулирующий характер. У больных хроническим тонзиллитом чаще наблюдалась стимуляция патогенных и персистентных свойств симбионтной микрофлоры стрептококками (*S. sanguis*, *S. oralis* и *S. ferus*). **Заключение:** установлено, что на миндалинах здоровых лиц стрептококки подавляют экспрессию факторов патогенности и рост симбионтов, а при хроническом тонзиллите, напротив, стимулируют персистентные и патогенные свойства симбионтов.

**Ключевые слова:** стрептококки, хронический тонзиллит, межмикробные взаимодействия.

## INTERMICROBIC INTERACTIONS BETWEEN STREPTOCOCCI AND ASSOCIATED BACTERIA ON THE MUCOSA OF THE TONSILS

Soboleva Y.V.<sup>1</sup>, Fadeev S.B.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institute of cellular and intracellular symbiosis UB RAS, Orenburg, Russia (460000, Orenburg, Pionerskaya street, 11), e-mail: [sjulia111@gmail.com](mailto:sjulia111@gmail.com)

**Aim:** investigation of intermicrobic interactions streptococci with assotsiant in the microbiocenosis of tonsils health and sick people. **Materials and methods:** tonsil surface swabs were taken from 100 microbiocenosis health people and 45 – people with chronic tonsillitis in the remission. Strains were identified. Hemolytic, antilysozyme, lysozyme activity, growth of isolated strains and its modification under the influence of symbiotes was studied. **Results:** the dates showed, that streptococci (*S. salivarius*, *S. miti*, *S. sanguis* и *S. oralis*) from mucus of tonsils health people suppressed expression of pathogenity and persistence factors and growth symbiotes, mainly staphylococci and aerococci. Influence the symbiotes by streptococci was solitary and more often stimulated. In the sick people more often observed stimulations of pathogenity and persistence factors symbiotes by streptococci (*S. sanguis*, *S. oralis* и *S. ferus*). **Conclusion:** we established that the streptococci from mucus of tonsils health people suppressed expression of pathogenity and persistence factors and growth symbiotes, while streptococci from mucus of tonsils sick people the opposite stimulated of pathogenity and persistence factors symbiotes.

**Keywords:** streptococcus, chronic tonsillitis, intermicrobic interactions.

### Введение

Стрептококки относятся к наиболее распространенной группе микроорганизмов, высеваемых с поверхности слизистых оболочек миндалин человека, играющих важную роль как в развитии ряда заболеваний, так и в формировании нормобиоценотического микробного сообщества на тонзиллярной поверхности. Так, ряд российских и зарубежных исследователей указывают на то, что наиболее частой причиной развития тонзиллита являются  $\beta$  -гемолитические стрептококки группы А, несколько реже – стрептококки группы

C и G [5, 8]. С другой стороны, есть данные, что около половины здоровых обследованных являются носителями условно-патогенных и патогенных микроорганизмов [3].

Кроме  $\beta$ -гемолитических стрептококков группы А и *Streptococcus pneumoniae*, на слизистой оболочке миндалин, как в норме, так и при патологии, часто обнаруживаются другие стрептококки, роль которых также неоднозначна. Ряд авторов указывают, что *S. mutans*, *S. milleri*, *S. mitis*, *S. sanguis*, *S. salivarius*, *S. acidominimus* являются неотъемлемой частью нормальной микрофлоры [2]. Однако другими исследователями было показано, что *Streptococcus mitis* и *Streptococcus oralis* обнаруживаются при хроническом тонзиллите [10], а S.Y. Hwang с соавторами относит *Streptococcus viridans* к патогенным микроорганизмам [9]. Хотя еще три десятилетия назад было высказано предположение, что *S. viridans* считается непатогенной группой только потому, что исследователи не проводят биотипирование данного микроорганизма и сообщают о негемолитических штаммах [7]. Однако в настоящее время известно, что патогенность, приписываемая одному возбудителю, зависит не только от его биологических свойств в монокультуре, но и может быть интегрированным результатом действия нескольких симбионтов паразитоценоза хозяина.

Исходя из этого, целью нашего исследования явилась оценка межбактериальных взаимодействий стрептококков с ассоциантами в условиях микросимбиоза миндалин здоровых и больных хроническим тонзиллитом.

### **Материалы и методы исследования**

За время исследования было изучено 100 биоценозов слизистой оболочки миндалин здоровых лиц и 45 – больных хроническим тонзиллитом в стадии ремиссии. В исследование были включены учащиеся ВУЗов г. Оренбурга в возрасте от 18 до 30 лет. Для исследования брали мазок со слизистой оболочки миндалин и осуществляли посев на 5% кровяной агар. Для выделения чистых культур и количественного определения обсемененности материала использовали модификацию метода Gould [4]. Выделенные культуры идентифицировали до вида с помощью дифференциально-диагностических тест-систем LaChema (Чехия).

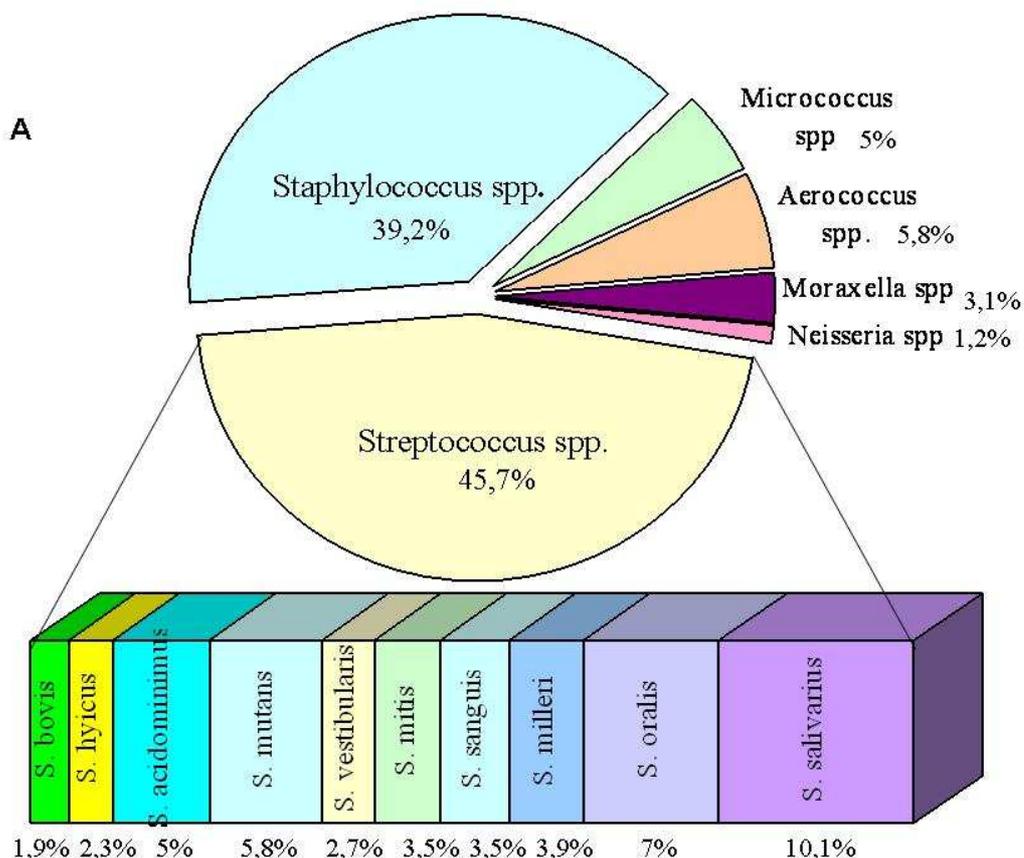
У выделенных штаммов микроорганизмов изучали гемолитическую, антилизосимную, лизосимную активности и влияние на рост по общепринятым методикам [4]. Для оценки модификации факторов патогенности и персистенции микроорганизмов использовали метод перекрестного посева штаммов-симбионтов [6].

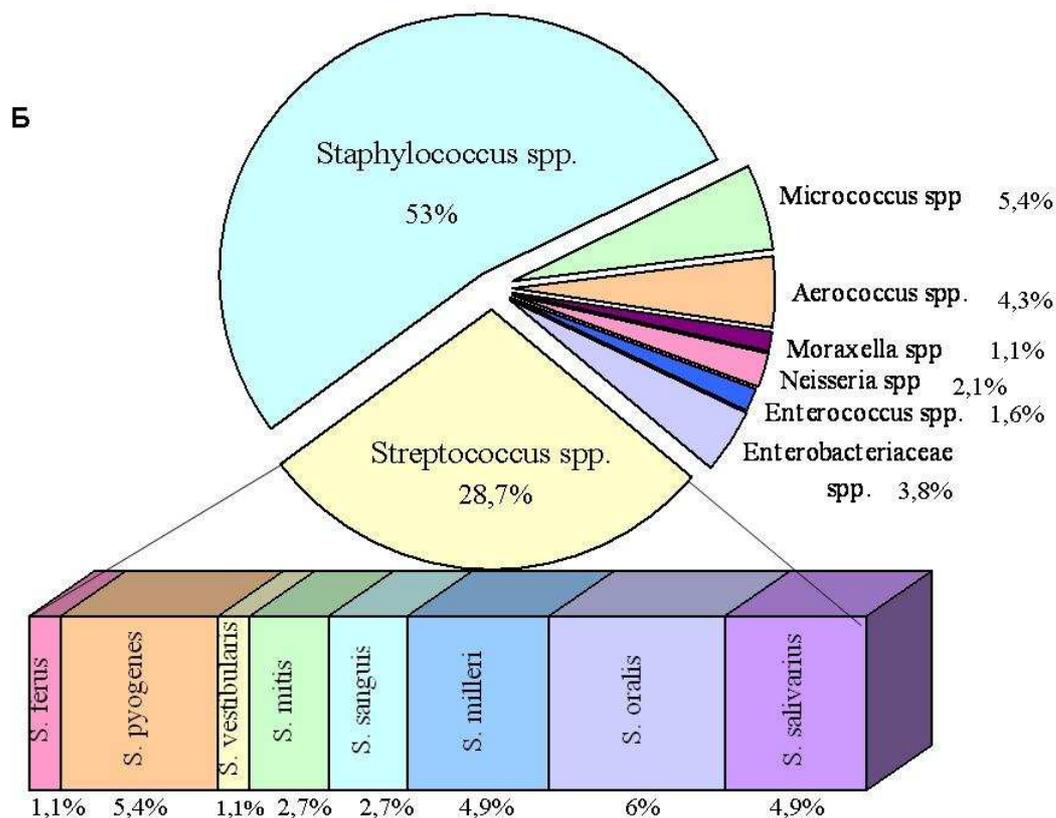
Полученные результаты были обработаны с использованием методов вариационной статистики с применением лицензионного пакета прикладных статистических программ BIOSTAT, STATISTICA v.5.0, а также с помощью процессора электронных таблиц «Microsoft Excel 2003» в составе пакета программ «Microsoft Office 2003 for Windows XP».

### **Результаты и обсуждение**

Из биотопа слизистой оболочки миндалин всего было выделено 443 штамма микроорганизмов. 258 штаммов от здоровых и 185 штаммов от больных хроническим тонзиллитом. При изучении видового состава показано, что стрептококки явились самой многочисленной группой микроорганизмов на слизистой оболочке миндалин здоровых лиц и составили 45,7% (Рис. 1А), тогда как у больных хроническим тонзиллитом представители этого рода выявлялись в 1,6 раза реже (28,7%) ( $p < 0,05$ ) (Рис. 1Б).

Выявлены различия видового состава микроорганизмов рода *Streptococcus* у здоровых и больных лиц. У больных тонзиллитом отсутствовали: *S. mutans*, *S. acidominimus*, *S. bovis* и *S. hyicus*, а от здоровых людей не высевались *S. ferus* и патоген *S. pyogenes*. Кроме того, у больных, по сравнению со здоровыми, наблюдалось снижение доли таких видов как: *S. sanguis* – в 1,3 раза ( $p < 0,05$ ), *S. salivarius* – в 2 раза ( $p < 0,05$ ) и *S. vestibularis* в 2,5 раза ( $p < 0,05$ ).





**Рис. 1.** Таксономический состав микробиоценозов слизистой оболочки миндалин здоровых лиц (А) и больных хроническим тонзиллитом (Б).

При количественной оценке результатов исследования было установлено, что общий показатель микробной обсемененности (ПМО) слизистой оболочки миндалин у здоровых лиц составлял  $10^6$  КОЕ/тампон, тогда как у больных хроническим тонзиллитом он был на 2 порядка выше –  $10^8$  КОЕ/тампон. При этом у больных, по сравнению со здоровыми, снижалось количество нормальной стрептококковой флоры ( $10^{3-4}$  КОЕ/тампон против  $10^{5-6}$  КОЕ/тампон) (Табл. 1).

Таблица 1 Количество стрептококков, выделенных со слизистой оболочки миндалин здоровых и больных хроническим тонзиллитом

Вид микроорганизма	ПМО (КОЕ/тампон)	
	Здоровые	Больные
<i>S. vestibularis</i>	$10^5-10^6$	$10^3-10^{4*}$
<i>S. milleri</i>	$10^4-10^6$	$10^3-10^{4*}$
<i>S. mutans</i>	$10^5-10^6$	-
<i>S. acidominimus</i>	$10^5-10^6$	-
<i>S. sanguis</i>	$10^4-10^6$	$10^3-10^{4*}$
<i>S. salivarius</i>	$10^5-10^6$	$10^3-10^{4*}$
<i>S. bovis</i>	$10^4-10^6$	-
<i>S. hyicus</i>	$10^5-10^6$	-
<i>S. mitis</i>	$10^5-10^6$	$10^3-10^{4*}$
<i>S. oralis</i>	$10^5-10^6$	$10^3-10^{4*}$
<i>S. pyogenes</i>	-	$10^2-10^3$
<i>S. ferus</i>	-	$10^3-10^4$

\*различия достоверны при  $p < 0,05$

При изучении факторов патогенности и персистенции показано, что стрептококки, выделенные со слизистой оболочки миндалин здоровых лиц, в монокультуре в 2 раза реже проявляли гемолитическую (16,9%) и антилизосимную (16,9%) активности, чем изолированные у больных (37,7% и 35,8 % соответственно). При этом уровень лизоцимной активности не имел значимых различий у стрептококков, выделенных от больных и здоровых лиц (22,8% против 22,6% соответственно).

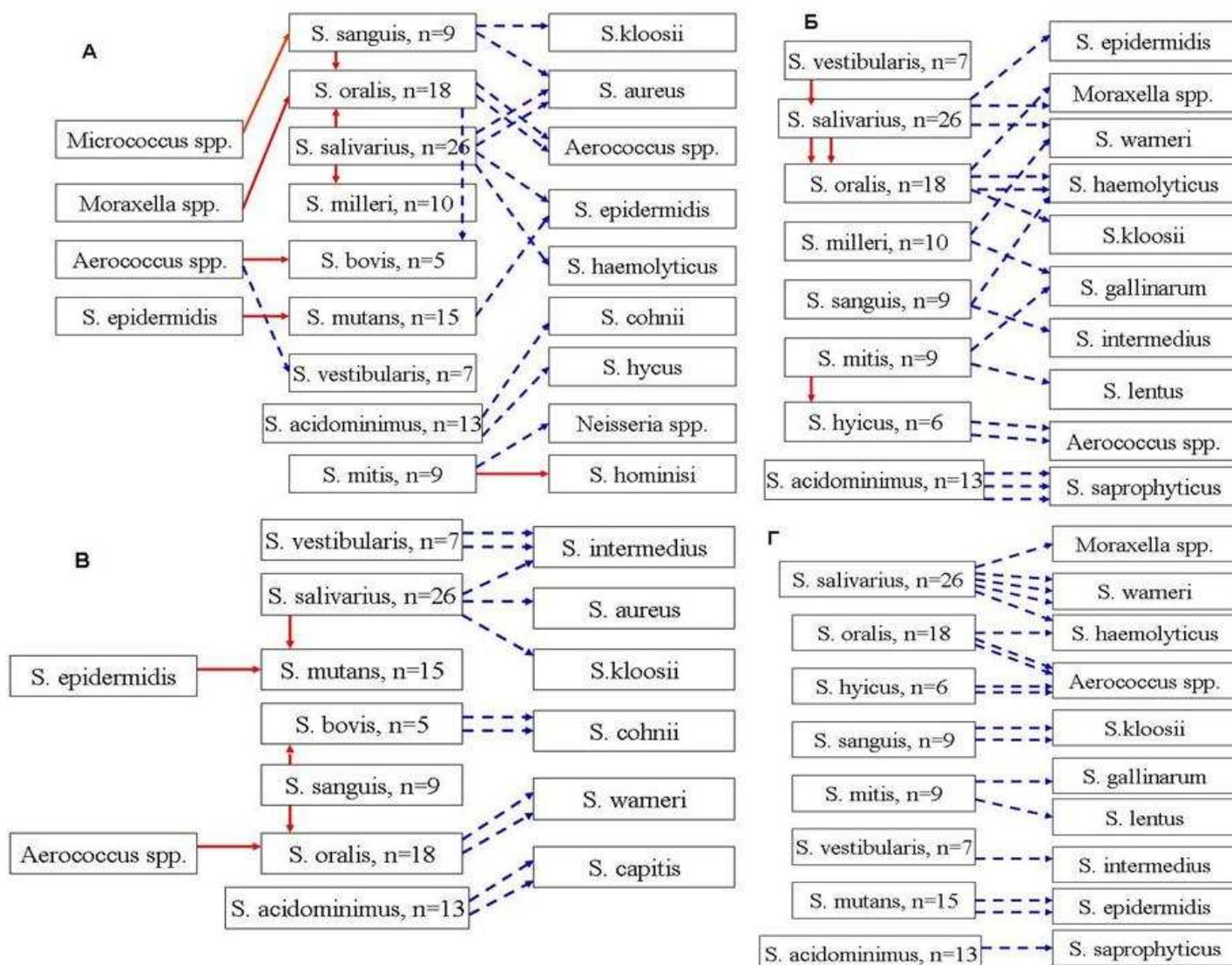
Анализ многообразия межмикробных взаимодействий позволил установить, что на слизистой оболочке миндалин здоровых лиц стрептококковая флора оказывает преимущественно подавляющее влияние на экспрессию факторов патогенности и персистенции симбионтов (Рис. 2).

Стрептококки, выделенные из биотопов здоровых лиц, оказывали влияние на ГА симбионтов. Это модифицирующее действие, прежде всего, было направлено на подавление ГА патогенных стафилококков: *S. salivarius* подавлял ГА *S. haemolyticus*, а *S. sanguis* и *S. salivarius* подавляли ГА *S. aureus* и ряда условно-патогенных стафилококков (Рис. 3). Стимуляция ГА была зафиксирована в нескольких случаях внутри рода *Streptococcus*, кроме того, ГА стрептококков подвергалась воздействию со стороны симбионтной микрофлоры.

Реже стрептококки влияли на АЛА симбионтов. Наиболее часто модификации подвергалась АЛА стафилококков, причем в 100% случаев стрептококки ее угнетали. Наиболее активно это делали *S. salivarius*. Зафиксированы два случая усиления АЛА стрептококками внутри вида и выявлены два сигнала на усиление АЛА стрептококков со стороны симбионтной микрофлоры.

Стрептококки оказывали значительное влияние на рост симбионтов. В большинстве случаев наблюдалось подавление роста стафилококков и аэрококков. Подавление роста внутри вида, как и подавление роста со стороны симбионтной микрофлоры, не зафиксировано ни в одном случае. Активнее всего на рост симбионтов влияли *S. salivarius* и *S. oralis*.

Наиболее часто стрептококки, выделенные от здоровых лиц, влияли на ЛА симбионтов, однако сами стрептококки не испытывали влияние на ЛА со стороны других микроорганизмов. Чаще всего модификации подвергалась ЛА стафилококков, причем стрептококки в 100% случаев ее подавляли. Наиболее активно влияли на симбионтов следующие виды: *S. salivarius*, *S. acidominimus*, и *S. oralis*. Усиление ЛА наблюдалось только при межстрептококковых взаимодействиях.



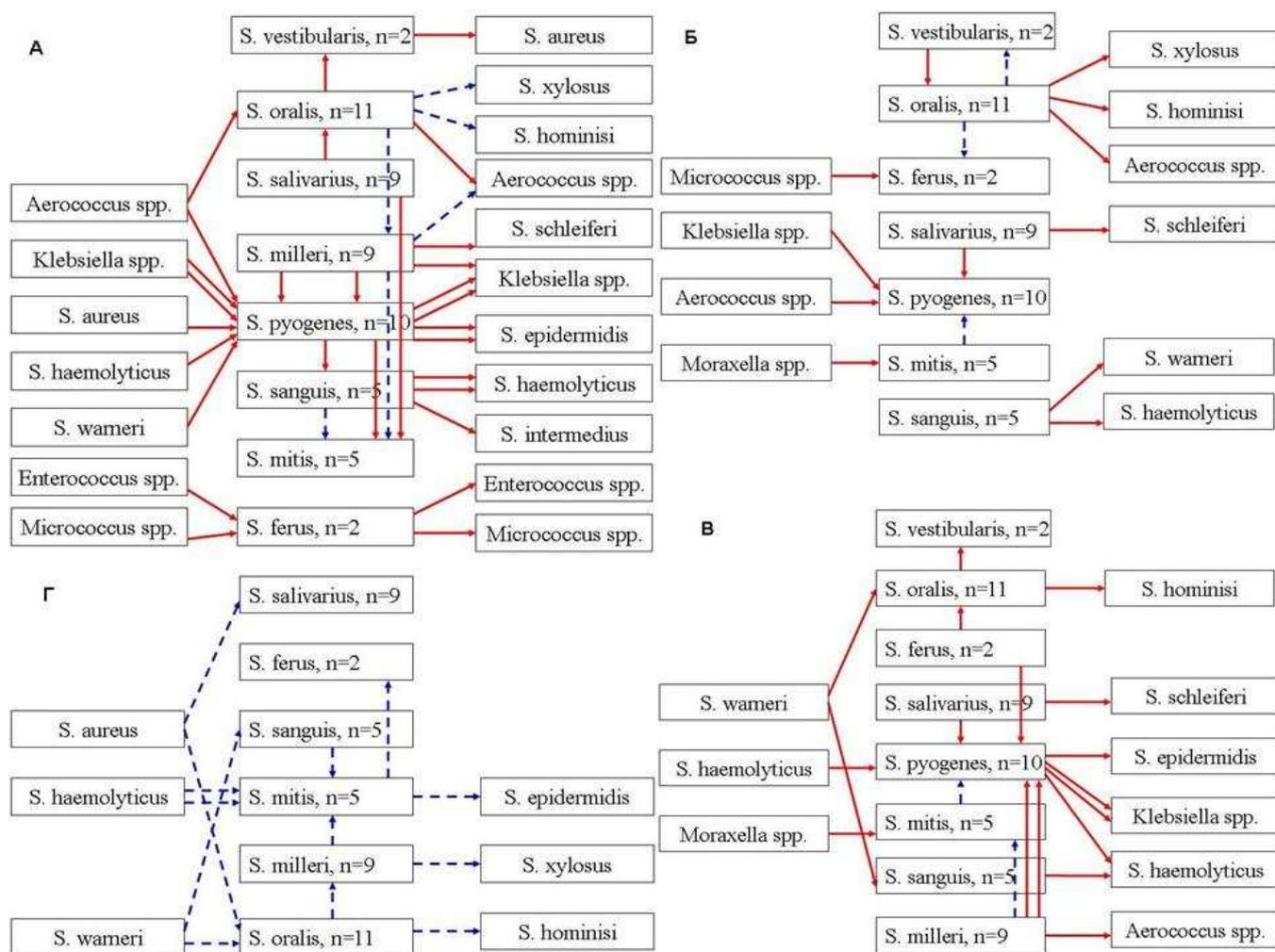
**Рис. 2.** Влияние стрептококков, выделенных из биотопов здоровых лиц на гемолитическую (А), лизоцимную (Б), антилизоцимную (В) активности и рост (Г) симбионтов.

→ усиление свойства  
 - - - - - ослабление свойства

На миндалинах больных хроническим тонзиллитом, несмотря на снижение численности, стрептококки также оказывали значительное влияние на симбионтную микрофлору, модифицируя факторы ее персистенции, патогенности, колонизации и влияя на ростовые характеристики (Рис. 3).

В микросимбиоценозе миндалин при хроническом тонзиллите стрептококки активнее всего усиливали ГА симбионтов: стафилококков, энтеробактерий, энтерококков, изолируемых преимущественно из патоценозов. Кроме того, было отмечено значительное стимулирующее влияние симбионтной микрофлоры на ГА стрептококков и, прежде всего, на патогенный вид *S. pyogenes*. Его ГА усиливали: *S. haemolyticus*, *S. aureus*, *S. warneri* и *Klebsiella spp.*

Достаточно часто отмечалось усиление АЛА симбионтов стрептококками, выделенными от больных (прежде всего *S. pyogenes*). Но более часто происходило усиление АЛА одних стрептококков другими. Также зафиксировано стимулирующее влияние симбионтной микрофлоры на модификацию АЛА стрептококков.



**Рис. 3.** Влияние стрептококков, выделенных из биотопов больных хроническим тонзиллитом на гемолитическую (А), лизоцимную (Б), антилизоцимную (В) активности и рост (Г) симбионтов.

→ усиление свойства  
 - - - -> ослабление свойства

Наиболее редко стрептококки, выделенные из биоценоза миндалин больных хроническим тонзиллитом, оказывали влияние на ЛА симбионтов. Это влияние было направлено преимущественно на усиление ЛА стафилококков и осуществлялось такими видами, как: *S. sanguis*, *S. oralis* и *S. salivarius*. Воздействие на ЛА внутри рода *Streptococcus* было разнонаправленным. Также было зафиксировано увеличение ЛА *S. pyogenes* под действием симбионтной микрофлоры (*Aerococcus* spp. и *Klebsiella* spp.).

Влияние стрептококковой флоры на рост симбионтов в биотопах слизистой оболочки миндалин больных хроническим тонзиллитом не было столь значительным, как у здоровых лиц. Межстрептококковые взаимоотношения характеризовались подавлением ростовых

характеристик. Кроме того, стрептококки испытывали на себе угнетающее действие симбионтной микрофлоры, а именно патогенных стафилококков.

### **Заключение**

В ходе проведенных исследований было установлено, что в норме микросимбиоз слизистой оболочки миндалин представляет собой сложную микробиологическую систему, доминирующим таксоном которой являются стрептококки. Эти данные согласуются с результатами, полученными другими исследователями [2, 10].

В ходе исследования было показано, что на слизистой оболочке миндалин здоровых лиц стрептококковая флора (*S. salivarius*, *S. mitis*, *S. sanguis* и *S. oralis*) оказывает преимущественно подавляющее влияние на экспрессию факторов патогенности и персистенции симбионтов, а также подавляет рост симбионтной микрофлоры, в основном стафилококков и аэрококков. При этом сами стрептококки подвергались воздействию со стороны симбионтов в единичных случаях.

У больных хроническим тонзиллитом наблюдалась противоположная картина. Стрептококковая флора (*S. sanguis*, *S. oralis* и *S. ferus*) чаще стимулировала факторы патогенности и персистенции, редко подавляла рост симбионтной микрофлоры, тогда как сама испытывала подавляющее влияние на рост со стороны стафилококков.

Подобные особенности были выявлены при анализе межмикробных взаимодействий бифидобактерий с ассоциантами при дисбиозе кишечника и в норме [1].

Таким образом, стрептококковая флора, являясь доминирующей у здоровых лиц, поддерживает состояние нормоценоза. При возникновении хронического патологического процесса на слизистой оболочке миндалин происходят качественные и количественные изменения стрептококковой флоры, вследствие чего она утрачивает свою первоначальную роль.

### **Список литературы**

1. Бухарин О.В. Взаимодействие *Bifidobacterium bifidum* с представителями нормальной микрофлоры в микросимбиозе кишечника человека О.В. Бухарин, Н.Б. Перунова, Е.В. Иванова // Журн. микробиол. – 2012. – №4. – С. 51-56.
2. Извин А.И. Микробный пейзаж слизистой оболочки верхних дыхательных путей в норме и патологии / А.И. Извин, Л.В. Катаева // Вестник оториноларингол. – 2009.- №2. – С. 64-68.
3. Кузнецов В.Ф. Некоторые иммунологические механизмы формирования бессимптомного носительства условно-патогенной и патогенной микрофлоры небных

миндалин у первичных доноров плазмы крови / В.Ф. Кузнецов, Е.Г. Орлова, Д.В. Ланин, Ю.Н. Маслов, Т.А. Ключева // Цитокины и воспаление. – 2003. – №4. – С. 27-30.

4. Справочник по микробиологическим и вирусологическим методам исследования / М.О. Биргер. – М. «Медицина», 1982. – 462 с.

5. Сыркин А.А. Системная антибактериальная терапия при хирургическом лечении хронического тонзиллита, сопряженного с сердечно-сосудистой патологией / А.А. Сыркин, А.Ю. Овчинников, А.Л. Долецкий и др. // Вестник оториноларинголог. – 2008. -№1. – С. 61-64.

6. Хуснутдинова Л.М. Межбактериальные взаимодействия на слизистой оболочке миндалин человека: Автореф. дис. ... канд. мед. наук / Л.М. Хуснутдинова. – Оренбург, 2004.

7. Blayney AW. Complications of sinusitis caused by *Streptococcus milleri* / Blayney, AW, Frootko NJ, Mitchell RG. // J Laryngol Otol. 1984. – 98:895-9.

8. Brook I. Current management of upper respiratory tract and head and neck infections / I. Brook MD, MSc. // Eur. Arch. Otorhinolaryngol. – 2009.- №266. – P. 315-323.

9. Hwang S.Y. *Streptococcus viridans* has a leading role in rhinosinusitis complications / S.Y. Hwang, K.K. Tan. // Ann Otol Rhinol Laryngol. – 2007. - №116(5). – P. 381-385.

10. Skoulakis Ch. Level of *Streptococcus pyogenes* in patients with recurrent tonsillitis and tonsillar hypertrophy / Ch. Skoulakis, E. Tigiroglou, K. Gkarelis, D. Klapsa, A. Damani, Ch. Papadakis, E. Petinaki. // Scand J Infect Dis. – 2008. - №40 (11-12). – P. 899-903.

#### **Рецензенты:**

Чайникова И.Н., д.м.н., профессор, и.о. зав. кафедрой микробиологии, вирусологии, иммунологии ФГБОУ ВПО Оренбургской государственной медицинской академии, г.Оренбург.

Челпаченко О.Е., д.м.н., профессор, ведущий научный сотрудник лаборатории биомониторинга и молекулярно-генетических исследований ИКВС УрО РАН, г.Оренбург.