

ФАКТОРЫ ВИРУЛЕНТНОСТИ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ БАКТЕРИАЛЬНОГО ГНОЙНОГО ВЕРХНЕЧЕЛЮСТНОГО СИНУСИТА

Ловпаче З. Н., Хулаев И. В., Сижажева А. М., Тхазаплизева М. Т.

ФГБОУ ВПО «Кабардино-Балкарский государственный университет им. Х. М. Бербекова», Медицинский колледж, amina_0109@bk.ru.

Воспалительные заболевания околоносовых пазух занимают одно из ведущих мест в структуре заболеваемости ЛОР-органов. Среди синуситов наблюдается явное доминирование поражений верхнечелюстных пазух. Верхнечелюстные синуситы составляют 56–73 % среди воспалительных процессов околоносовых пазух. Эти заболевания распространены очень широко, нередко носят рецидивирующий характер, большинство из них сопровождается временной потерей трудоспособности. Согласно современным представлениям об этиологии синуситов, ключевым звеном в их развитии является инфекционное поражение условно-патогенными микроорганизмами. Факторы вирулентности продуцировали 88,2 % выделенных штаммов бактерий. Адгезивными свойствами характеризовались 55,1 % изученных культур, антилизосимной активностью – 64,6 %, гемолитической способностью – 58,2 %. Отмечены определенные различия в распределении факторов вирулентности у различных представителей исследованных бактерий. Грамотрицательные бактерии чаще продуцировали факторы вирулентности по сравнению с грамположительными.

Ключевые слова: микроорганизмы, штаммы, антибиотик, синусит, бактерии, фактор вирулентности.

THE VIRULENCE FACTORS OF BACTERIAL PATHOGENS OF PURULENT MAXILLARY SINUSITIS

Lopace Z. N., Khulaev I. V., Sizhazheva A. M., Thazaplizheva M. T.

FSEBI HPE «Kabardino-Balkarian State university named by X. M. Berbekov», Medical college, amina_0109@bk.ru.

Inflammatory diseases of the paranasal sinuses is one of the leading places in the structure of morbidity LR-bodies. Among sinusitis there is a clear dominance of lesions of the maxillary sinuses. Maxillary sinusitis are 56–73 % of inflammation of the paranasal sinuses. These diseases are quite common, often recurrent in nature, most of them accompanied by temporary loss of working capacity. According to the modern views on the etiology of sinusitis, a key element in their development is infection by opportunistic microorganisms. Virulence factors had produced 88,2 % of bacterial isolates. Adhesive properties were characterized for 55.1% of the studied crops, the antilysozyme activity – 64,6 %, hemolytic spsobnosti and 58.2 %. Marked differences in the distribution of virulence factors among different representatives of the studied bacteria. Gram-negative bacteria had produced more virulence factors than gram-positive.

Keywords: microorganisms, strains, antibiotic, sinusitis, bacteria, virulence factor.

Воспалительные заболевания околоносовых пазух занимают одно из ведущих мест в структуре заболеваемости ЛОР-органов. Эти заболевания повсеместно имеют высокие показатели распространенности, достигающие до 30 % [1]. По имеющимся данным [2], хроническими синуситами страдают 10 % населения. Среди синуситов наблюдается явное доминирование поражений верхнечелюстных пазух. Верхнечелюстные синуситы составляют 56–73 % среди воспалительных процессов околоносовых пазух [2]. Эти заболевания распространены очень широко, нередко носят рецидивирующий характер, большинство из них сопровождается временной потерей трудоспособности [3].

Актуальность темы. Согласно современным представлениям об этиологии синуситов, ключевым звеном в их развитии является инфекционное поражение условно-патогенными микроорганизмами.

Состав микрофлоры и ее вирулентность сказываются на клиническом проявлении патологического процесса. Если при безлихорадочном течении процесса высеваются в основном представители нейссерий, коринебактерий, эшерихий, клебсиелл, то при более тяжелой клинической картине заболевания чаще обнаруживаются стрептококки и стафилококки [2, 3].

Учитывая это, знание патогенных свойств микроорганизмов, высеваемых при гнойных верхнечелюстных синуситах, может способствовать прогнозу течения заболевания.

При установлении путей распространения микроорганизмов, вызывающих инфекционные заболевания или какие-либо патологические процессы, важную роль играет использование различных свойств бактерий, так называемых эпидемиологических маркеров [4]. Установление таких маркеров – эпидемиологическое маркирование – осуществляется различными методами.

В качестве эпидемиологического маркера бактерий может рассматриваться их потенциальная патогенная способность. Такая способность выражается в наличии у бактерий факторов вирулентности (патогенности), которые разграничиваются по механизму действия на факторы адгезивности, персистенции и токсичности [5, 6].

Целью настоящей работы было изучение факторов вирулентности бактерий, вызывающих гнойный верхнечелюстной синусит.

Для этого необходимо решить следующую задачу: исследовать распространение факторов вирулентности у бактерий в зависимости от формы заболевания и источника их выделения.

Материалы и метода. Исследования проводились на базе стоматологической поликлиники Кабардино-Балкарского государственного университета в 2014–2015 гг.

Материалом для исследования служили 127 штаммов аэробных и факультативно анаэробных бактерий, выделенных из различного патологического материала от 115 больных острыми и хроническими верхнечелюстными синуситами.

Адгезивную способность бактерий определяли с использованием формализированных эритроцитов человека группы 0(I)Rh+, согласно методике В. И. Брилиса и соавт. (1986). Определяли средний процент адгезии, коэффициент участия эритроцитов и индекс адгезивности микроорганизмов (ИАМ), на основании чего бактерии дифференцировались на неадгезивные (ИАМ<1,75), низкоадгезивные (ИАМ= 1,76–2,5),

среднеадгезивные (ИАМ = 2,51–4,0) и высокоадгезивные (ИАМ > 4,0). Подсчет вели на 50 эритроцитах.

Гемагглютинирующую активность исследовали в реакции гемагглютинации на плексигласовых панелях с 3 % взвесью свежих эритроцитов человека группы O(I)Rh+ и барана. D-Маннозрезистентная гемагглютинация выявлялась при добавлении к взвеси эритроцитов 1,5 % D-маннозы. Способность бактерий адсорбировать краситель конго красный устанавливалась на 1,5 % питательном агаре с 0,02 % казаминовых кислот и 0,01 % конго красного.

Антилизосимную активность исследовали по методике О. В. Бухарина и соавт. (1984), основанной на принципе «отсроченного антагонизма», в диапазоне концентраций от 1 до 8 мкг/мл. Для определения лизосимной активности бактерий использовался тот же принцип «отсроченного антагонизма», тест-культурой служил тот же штамм микрококка.

Определение гемолитической активности бактерий проводили на питательном агаре с 3–5 % отмытых в растворе Хенкса эритроцитов кролика. Тиолзависимые гемолизины выявляли на питательном агаре с 0,002 % L-цистеина. Культуры засеивались уколом, гемолиз учитывали через 24–48 часов.

Результаты исследования. Проведено исследование выделенных штаммов бактерий на наличие у них факторов вирулентности. Определялись факторы вирулентности, относящиеся по механизму действия к 3 различным группам: факторы адгезивности, персистенции и токсичности.

У исследованных штаммов определяли адгезивность на эритроцитах человека группы O(I)Rh+ , наличие гемагглютинирующей способности в отношении эритроцитов человека и барана, а также способности бактерий адсорбировать краситель конго красный.

При рассмотрении результатов исследования адгезивности бактерий в отношении эритроцитов человека к адгезивноактивным культурам мы относили штаммы, для которых величины ИАМ составляли > 2,5, т.е. штаммы, которые можно рассматривать как среднеадгезивные. Такими штаммами оказались 80 исследованных культур, или $63 \pm 4,3$ %. У представителей разных систематических групп частота обнаружения адгезивноактивных штаммов колебалась в пределах от 40,0 % до 100,0 %.

Наиболее часто адгезивноактивные штаммы встречались среди протеев, псевдомонад и эшерихий – $93,3 \pm 6,4$ %, $92,8 \pm 6,9$ %, $83,3 \pm 15,2$ % соответственно. Реже всего такие штаммы были представлены у морганелл и стафилококков – $40 \pm 21,9$ % и $50 \pm 6,5$ % соответственно. Адгезивно-активные штаммы встречались у стафилококков достоверно реже, чем у эшерихий, псевдомонад и протеев.

Высокоадгезивные штаммы, имеющие значения ИАМ > 4,0, среди исследованных культур составили 16,5 %. Всего выявлен 21 такой штамм. Высокоадгезивные штаммы наиболее часто встречались среди культур *Escherichia*, *Pr.mirabilis*, *Pseudomonas* – на их долю приходилось соответственно 50, 41,7 и 28,6 % среди всех исследованных штаммов, или 60, 45,4 и 30,8 % среди адгезивноактивных культур. Обращает на себя внимание тот факт, что среди штаммов *S.epidermidis* высокоадгезивные штаммы составляли значительную часть культур – около 1/3 адгезивноактивных штаммов, превосходя в этом отношении штаммы *S.aureus*.

В то же время среди изученных культур выявлено лишь 8 штаммов, не обладавших адгезивной способностью в отношении эритроцитов человека (ИАМ < 1,75), что составляет 6,5 %. Такие штаммы обнаружены среди культур *S.aureus* (4 штамма), *S.epidermidis* (3 штамма) и *Pseudomonas* (1 штамм).

Средние значения величины ИАМ у изученных культур составляли $2,94 \pm 0,06$. Эти значения соответствовали среднеадгезивным штаммам. Колебания средних значений показателя ИАМ у культур, представляющих разные систематические группы, составляли 2,31–3,46.

Наиболее высокие значения ИАМ отмечены у протеев, псевдомонад и энтеробактеров, причем эти величины у протеев и энтеробактеров достоверно превышали аналогичные значения у стафилококков ($P < 0,05$). У штаммов *Str.pyogenes* и *Str.faecalis* наблюдались достоверные различия в величине ИАМ – культуры *Str.faecalis* имели более высокие значения этого показателя.

Гемагглютинирующая способность у изученных культур была выражена слабее. Способностью агглютинировать эритроциты человека и барана обладали по 50 штаммов ($39,4 \pm 4,3$ %). Результаты агглютинации бактериями эритроцитов человека и барана совпадали у 19 штаммов (14,9 % исследованных культур), причем такие штаммы встречались среди различных бактерий. Выявленные у изученных бактерий гемагглютинины относились в большинстве случаев к маннозорезистентным – в отношении эритроцитов человека маннозорезистентные гемагглютинины обнаружены у 28 штаммов (56 % гемагглютинирующих штаммов), а в отношении эритроцитов барана – у 31 штамма (62 %).

Способностью адсорбировать краситель конго красный обладали 58 штаммов ($45,7 \pm 4,4$ %). Это свойство было лучше всего выражено у стафилококков (75,8 %) и энтеробактеров (66,7 %), хуже всего – у морганелл, цитробактеров, протеев.

При окончательном установлении адгезивной способности у изученных бактерий мы исходили из следующих критериев: адгезивными считались культуры, обладавшие сочетанием по крайней мере 2 показателей адгезивных свойств, из которых один – ИАМ >

2,5, а второй – гемагглютинирующая способность либо адсорбция конго красного. Кроме того, к адгезивным относили все штаммы, имевшие величины ИАМ 4,0 и выше. Исходя из указанных критериев, адгезивными признаны 70 штаммов или 55,1 %.

Адгезивные свойства бактерий, выделенных при острых и хронических гнойных верхнечелюстных синуситах, несколько различались между собой. Штаммы, выделенные при острых синуситах, характеризовались близкими значениями частоты обнаружения адгезивноактивных штаммов – 53,3–66,7 %. У культур, изолированных при хронических синуситах, наблюдались более значительные колебания показателя адгезивности – от 38,5 % до 93,3 %. Эти колебания были обусловлены в основном грамотрицательными бактериями.

Штаммы, выделенные при хронических гнойных верхнечелюстных синуситах, достоверно чаще агглютинировали эритроциты барана по сравнению со штаммами, изолированными при острых процессах (44,1±5,1 % против 26,5±7,5 %). В то же время у культур, изолированных при острых гнойных верхнечелюстных синуситах, агглютинация эритроцитов человека отмечалась недостоверно чаще (52,9±8,5 % против 34,4±4,9 %), чем у культур, выделенных при хронических гнойных верхнечелюстных синуситах.

Маннозорезистентные гемагглютинины в отношении эритроцитов человека резко преобладали у штаммов, выделенных при острых гнойных верхнечелюстных синуситах (72,2 % гемагглютинирующих штаммов), тогда как у культур, изолированных при хронических процессах, такие штаммы составили 46,9 %. Аналогичная картина отмечена и в отношении агглютинации эритроцитов барана маннозорезистентные гемагглютинины выявлялись у культур, выделенных при острых и хронических гнойных верхнечелюстных синуситах, соответственно в 77,8 % и 58,5 % случаев.

Средние значения ИАМ у различных бактерий, выделенных при острых гнойных верхнечелюстных синуситах, были близкими и составляли 2,44–3,43. Доля адгезивных штаммов, установленных по комплексу изученных характеристик, в обеих рассмотренных группах была близкой – 53,8 % и 58,8 %.

Среди штаммов стафилококков, выделенных при острых процессах, адгезивными свойствами обладали в целом несколько больше штаммов, чем среди культур, выделенных при хронических процессах – 53,3–66,7 % против 38,5–50 %.

Полученные результаты показывают, что 55,1 % штаммов, выделенных при гнойных верхнечелюстных синуситах, обладают выраженными адгезивными свойствами.

Как показатель персистенции бактерий нами использована антилизоцимная активность. В результате проведенных исследований установлено, что такой способностью обладают 82 штамма, или 64,6±4,2 %. Среди представителей разных родов частота

обнаружения антилизозимактивных штаммов колебалась в широких пределах – от 14,3 % до 100 %.

Антилизозимная способность выявлена у всех исследованных штаммов *Pr.mirabilis* и *Morganella*. Это свойство было слабо выражено у культур стрептококков – способностью нейтрализовать лизоцим обладали лишь по 1 из 7 исследованных штаммов *Str. pyogenes* и *Str.faecalis*. У стафилококков в целом антилизозимная активность обнаружена у 65,5 % культур. Однако отмечены существенные различия в распространении этого свойства между культурами *S.aureus* и *S.epidermidis*. У штаммов *S.aureus* антилизозимная активность встречалась достоверно чаще, чем у *S.epidermidis* – $78,6\pm 7,7$ % против $53,3\pm 9,1$ %).

Средние значения уровня антилизозимной активности у исследованных штаммов составили $2,75\pm 0,26$ мкг/мл, а у 82 антилизозимактивных штаммов – $4,26\pm 0,28$ мкг/мл. Наиболее высокие значения этого показателя наблюдались у морганелл, протеев, энтеробактеров – 6,2, 4,4, 4,0 мкг/мл соответственно. Наиболее низким уровнем антилизозимной активности характеризовались штаммы стрептококков, эшерихий и цитробактеров – 0,57, 1,83 и 2,2 мкг/мл соответственно. При анализе среднего уровня антилизозимной активности антилизозимактивных штаммов существенных различий между представителями разных систематических групп бактерий не установлено.

У культур *S aureus* уровень антилизозимной активности достоверно превышал таковой у штаммов *S.epidermidis* ($3,32\pm 0,51$ мкг/мл против $1,83\pm 0,47$ мкг/мл). Однако при рассмотрении антилизозимактивных штаммов этих бактерий различий между ними практически не отмечалось.

У большинства исследованных штаммов (75,6 %) уровень антилизозимной активности был средним и составлял 3–6 мкг/мл. Подобные соотношения отмечены почти у всех представителей исследованных бактерий. Лишь у эшерихий преобладали штаммы с низким уровнем антилизозимной активности (1–2 мкг/мл), а у штаммов *S.epidermidis* такие культуры составили 50 %.

Антилизозимная активность отмечалась у штаммов, выделенных при острых и хронических процессах с близкой частотой – 64,7 % и 64,5 %. Антилизозимная способность у культур *S.epidermidis*, выделенных при острых гнойных верхнечелюстных синуситах, отмечалась достоверно чаще, чем у штаммов этих бактерий, выделенных при хронических процессах ($75,0\pm 15,3$ % против $45,4\pm 10,6$ %). Распространение лизоцимной активности у бактерий рассмотренных двух групп было близким.

При рассмотрении уровня антилизозимной активности у штаммов, выделенных при острых и хронических гнойных верхнечелюстных синуситах, отмечено, что большинство культур имели средний либо высокий уровень этой активности. Лишь у штаммов

S.epidermidis, выделенных при острых процессах, культуры с низким уровнем антилизотимной активности составляли половину антилизотимактивных штаммов.

Между культурами бактерий, выделенных из верхнечелюстных пазух и из полости среднего уха, по распространению антилизотимактивных штаммов существенных различий не установлено. Средний уровень антилизотимной активности у бактерий, выделенных из верхнечелюстных пазух и из полости среднего уха, существенно не различался.

Рассмотренные штаммы, выделенные из разных полостей больных с гнойными верхнечелюстными синуситами, не различались по распределению культур с разным уровнем антилизотимной активности.

Проведенные исследования показали, что 64,6 % культур, выделенных от больных с гнойными верхнечелюстными синуситами, обладают антилизотимной активностью.

В качестве факторов токсичности у выделенных бактерий проведено определение двух типов гемолизинов – α -гемолизинов и тиолзависимых гемолизинов. Гемолитические свойства обнаружены у 74 штаммов из 127 исследованных (58,2 \pm 4,4 %). Среди выявленных гемолизинов отмечено резкое преобладание α -гемолизинов. Такие гемолизины обнаружены у 71 штамма (55,9 \pm 4,4 %). Тиолзависимые гемолизины продуцировали лишь 3 штамма (2,4 \pm 1,3 %). Один из этих штаммов принадлежал к *S.aureus*, второй – к *Str.pyogenes*, третий – к *Enterobacter*.

Существенных различий в частоте обнаружения гемолитических свойств между бактериями разных родов не выявлено. У стафилококков такими свойствами обладали 63,8 \pm 6,3 % штаммов, у стрептококков – 50,0 \pm 13,3 %, у энтеробактерий – 52,5 \pm 7,9 %, у псевдомонад – 57,1 \pm 13,2 % .

У представителей разных видов стафилококков (*S.aureus* и *S.epidermidis*) частота обнаружения гемолитической активности была близкой – 67,8 и 60,0 % соответственно. У всех культур *Str.pyogenes* выявлены α -гемолизины, тогда как ни у одного штамма *Str.faecalis* такие свойства не были установлены. У штаммов, выделенных при острых гнойных верхнечелюстных синуситах, гемолитические свойства были выражены несколько лучше, чем у культур, изолированных при хронических формах заболевания.

У штаммов стафилококков, выделенных при острых процессах, частота обнаружения гемолизинов была выше, чем у культур, изолированных при хронических процессах – 73,9 \pm 9,1 % против 57,1 \pm 8,3, однако эти различия были недостоверными. Аналогичная картина наблюдалась и у стрептококков.

Выводы:

1. Факторы вирулентности продуцировали 88,2 % выделенных штаммов бактерий.

2. Адгезивными свойствами характеризовались 55,1 % изученных культур, антилизоцимной активностью – 64,6 %, гемолитической способностью – 58,2 %.
3. Отмечены определенные различия в распределении факторов вирулентности у различных представителей исследованных бактерий. Грамотрицательные бактерии чаще продуцировали факторы вирулентности по сравнению грамположительными.

Список литературы

1. Ловпаче З. Н., Бакова Ф. Т., Солонченко В. В. Патогенные свойства микрофлоры, выделенной при хронических гнойных синуситах // Вопросы теоретической и клинической медицины. – Нальчик, 1997. – С. 20-21.
2. Ловпаче З. Н. Факторы вирулентности возбудителей гнойного верхнечелюстного синусита // Актуальные вопросы биологии и медицины. – Нальчик, 1999. – С. 19-23.
3. Ловпаче З. Н. Эпидемиологическое маркирование бактерий, выделенных при гнойных верхнечелюстных синуситах: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. – Ростов-на-Дону, 1999. – 24 с.
4. Пальчун В. Т., Михалева Л. М., Гуров А. В., Мужичкова А. В. Особенности формирования хронического воспаления в верхнечелюстной пазухе // Вестник оториноларингологии. – 2011. – № 2. – С. 5-7.
5. Пальчун В. Т., Магомедов М. М., Лучихин Л. А. Оториноларингология. – М: Медицина 2002. – 298 с.
6. Кочеровец В. И., Янов Ю. К., Каргальцева Н. М., Айрапетян К. В. Забор материала для микробиологического исследования у больных с заболеваниями ЛОР органов // Рос. оторинол. – 2008. – № 2. – С. 48-59.

Рецензенты:

Хараева З. Ф., д.м.н., профессор, заведующая кафедрой микробиологии, вирусологии и иммунологии ФГБОУ ВПО «Кабардино-Балкарский государственный университет им. Х. М. Бербекова», г. Нальчик;

Блашкова С. Л., д.м.н., профессор, заведующая кафедрой терапевтической стоматологии ГБОУ ВПО «Казанский государственный медицинский университет», РТ, г. Казань.