

# ЗНАЧИМОСТЬ ФАКТОРОВ ПАТОГЕННОСТИ УСЛОВНО-ПАТОГЕННЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ ПРИ ОЦЕНКЕ ИХ ЭТИОЛОГИЧЕСКОЙ РОЛИ В РАЗВИТИИ ЗАБОЛЕВАНИЯ

Е.С. Кунилова<sup>1</sup>, Л.А. Краева<sup>2</sup>, Г.Я. Ценева<sup>2</sup>, Г.Н. Хамдулаева<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Лабораторная служба «Хеликс», Санкт-Петербург

<sup>2</sup>ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург

**Резюме.** Изучены следующие факторы патогенности у микроорганизмов, превалирующих при острых воспалительных процессах верхних дыхательных путей: адгезивные свойства, гемолитическая, гемагглютинирующая, нейраминидазная активность. Установлено, что наиболее выраженной адгезивностью обладают микроорганизмы рода *Moraxella*. Высокая гемолитическая и гемагглютинирующая активности присущи микроорганизмам родов *Staphylococcus* и *Streptococcus*. При выделении от больных микробных ассоциаций клинические проявления заболевания были более выраженными, так же как и факторы патогенности ассоциантов.

**Ключевые слова:** стафилококки, стрептококки, моракселлы, факторы патогенности.

## THE IMPORTANCE OF PATHOGENICITY FACTORS OF OPPORTUNISTIC MICROORGANISMS IN THE ASSESSMENT OF THEIR ROLE IN DISEASE DEVELOPMENT

Kunilova E.S., Kraeva L.A., Tseneva G.Y., Hamdulayeva G.N.

**Abstract.** The following pathogenicity factors of microorganisms prevailed in case of acute inflammation of the upper respiratory tract were studied: adhesive characteristics, hemolytic, hemagglutination, neuraminidase activities. It was established that microorganisms of the *Moraxella* genus have strongest adhesive characteristic. The high hemolytic and hemagglutination activity is inherent in microorganisms of the *Staphylococcus* and *Streptococcus* genus. In the case of isolation from patients microbial associations the clinical symptoms and pathogenicity factors of microbes-associates were more apparent. (*Infekc. immun.*, 2012, vol. 2, N 4, p. 699–704)

**Key words:** *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Moraxella*, factors of pathogenicity.

## Введение

В настоящее время все большее значение в развитии острых воспалительных процессов бактериальной этиологии приобретают условно-патогенные микроорганизмы [6]. Реализация условной патогенности решается в индивидуальных системах «макро-микроорганизм», так как зависит от резистентности хозяина и вирулентности микроба [4, 5].

Повышенная чувствительность характерна для лиц с ослабленным иммунитетом — местным или общим, специфическим или неспецифическим [4, 6].

Патогенность (болезнетворность) — видовой признак микроорганизма. Степень патогенности различна и определяет вирулентность внутри штаммов одного вида [9]. Благодаря генетическим изменениям болезнетворность штаммов может колебаться в довольно широ-

поступила в редакцию 29.07.2012  
отправлена на доработку 21.08.2012  
принята к печати 03.09.2012

© Кунилова Е.С. и соавт., 2012

### Адрес для переписки:

Кунилова Елена Сергеевна,  
врач-лаборант Лабораторной службы  
«Хеликс»

197022, Санкт-Петербург,  
Каменноостровский пр., 42, литера А.  
Тел./факс: (812) 309-12-21.  
E-mail: ekunilova@mail.ru

ких пределах: даже для возбудителей особо опасных инфекций могут быть получены авирулентные штаммы, и, наоборот, безвредные бактерии можно сделать носителями генов вирулентности [6]. При этом немаловажное значение имеют условия культивирования микроорганизмов (физические и химические факторы).

Как известно, основными факторами, определяющими болезнетворность микроорганизма, являются: способность к колонизации в зоне первичного инфицирования, инвазивные свойства, токсигенность, способность к персистенции [6]. Изучение перечисленных факторов патогенности особенно актуально при оценке этиологической значимости выделенных из клинического материала бактерий, особенно при обнаружении ассоциаций микроорганизмов [18]. Поэтому целью работы явилось обоснование необходимости изучения факторов патогенности у выделенных из клинического материала бактерий для оценки их роли в развитии заболевания.

## Материалы и методы

Изучено 1878 образцов клинического материала от пациентов с острыми респираторными заболеваниями верхних и средних отделов дыхательных путей: соскобы со слизистых носоглотки, ротоглотки, мокроты. Взятие материала, его посев и идентификацию осуществляли согласно Приказу № 535 «Об унификации микробиологических (бактериологических) методов исследования, используемых в клинико-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений» (от 22.04.1985 г.). Идентификацию выделенных микроорганизмов проводили, используя «Определитель бактерий Берджи» (1997), учебное пособие «Микробиология» под редакцией В.И. Покровского (1999) и Manual of Clinical Microbiology (2 Volume Set), P.R. Murray (2007) [7, 24].

При изучении факторов патогенности у выделенных микроорганизмов были использованы следующие методики: гемолитическая активность исследовалась по В.М. Никитину (1986) в модификации Ж.Н. Маниной с использованием эритроцитов барана и человека 0(I) и А(II) групп крови. Культуры выращивались на мартеновском бульоне при 37°C в условиях относительного анаэробноза в течение 4 суток. После центрифугирования при 5000 об./мин в течение 15 мин надосадочная жидкость использовалась для постановки реакции микрометодом (в планшетах). Учет осуществляли через 2 ч термостатирования при 37°C.

Гемагглютинирующая активность исследовалась подобным же образом, но с эритроцитами барана, а учет осуществлялся через 24 ч (2 ч термостатирования при 37°C, а остальное время — в холодильнике).

Адгезивная активность определялась по методике В.И. Брилиса и соавт. [1, 2, 3] с использованием эритроцитов человека 0(I) группы Rh(+), взятых в день исследования. Учет осуществлялся через 24 ч (2 ч термостатирования при 37°C, а остальное время — в холодильнике). Выраженность адгезии определялась количеством «крестов» (максимальная выраженность — эритроциты устилают дно лунки, 4+).

Нейраминидазная активность определялась по методике В.М. Никитина с использованием эритроцитов человека 0(I) группы и диагностикума вируса гриппа А2 микрометодом. Учет осуществляли через 2 ч инкубации при 37°C.

**ТАБЛИЦА 1. МИКРООРГАНИЗМЫ, ВЫДЕЛЕННЫЕ ПРИ ДИАГНОСТИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ КЛИНИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА ИЗ ВЕРХНИХ ДЫХАТЕЛЬНЫХ ПУТЕЙ**

Название микроорганизмов	Количество выделенных штаммов
<i>Staphylococcus</i> всего:	712
<i>S. aureus</i>	441
<i>S. delphini</i>	43
<i>S. intermedius</i>	57
<i>S. epidermidis</i>	78
<i>S. haemolyticus</i>	64
<i>S. hyicus</i>	29
<i>Streptococcus</i> всего:	508
<i>S. agalactiae</i>	188
<i>S. anginosus</i>	41
<i>S. equi</i>	142
<i>S. pneumoniae</i>	71
<i>S. pyogenes</i>	66
<i>Moraxella catarrhalis</i> всего:	411
<i>Corynebacterium</i> всего:	153
<i>C. auris</i>	7
<i>C. haemolyticum</i>	4
<i>C. pseudodiphtheriticum</i>	66
<i>C. pyogenes</i>	1
<i>C. striatum</i>	6
<i>C. xerosis</i>	69
<i>Klebsiella</i> всего:	80
<i>K. oxytoca</i>	9
<i>K. pneumoniae</i>	71
<i>Candida</i> всего:	54
<i>C. albicans</i>	36
<i>C. glabrata</i>	3
<i>C. krusei</i>	13
<i>C. tropicalis</i>	2
Другие микроорганизмы	88

Математическую обработку полученных данных выполняли на персональном компьютере с использованием стандартного статистического пакета STATISTICA. Для первичной подготовки таблиц и промежуточных расчетов использовали пакет Excel.

## Результаты

При исследовании 1878 образцов клинического материала было выделено 2006 штаммов этиологически значимых микроорганизмов. При этом все обследованные были направлены на бактериологическое исследование для установления причины воспалительного процесса в верхних и средних отделах респираторного тракта. Из них в 13% случаев соотношение бактериальной флоры находилось в норме, в то время, как в остальных 87% был

определен этиологически значимый микроорганизм. В 22% случаев отмечались ассоциации микроорганизмов: 346 ассоциаций по 2 микроорганизма и 13 ассоциаций по 3 микробных агента. При этом наиболее часто встречались стафилококки, стрептококки, моракселлы (табл. 1).

Наиболее часто выявлялись следующие ассоциации микроорганизмов: *Streptococcus* + *Moraxella* и *Staphylococcus* + *Corynebacterium*.

У наиболее часто встречаемых микроорганизмов были изучены следующие факторы патогенности: адгезивные свойства, гемолитическая, гемагглютинирующая, нейраминидазная активность (табл. 2, 3, 4, 5).

Как видно из таблиц, наиболее выраженными адгезивными свойствами обладают представители рода *Moraxella*, в то время как микро-

**ТАБЛИЦА 2. СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА АДГЕЗИВНЫХ СВОЙСТВ У МИКРООРГАНИЗМОВ РОДОВ *STAPHYLOCOCCUS*, *STREPTOCOCCUS*, *MORAXELLA***

Параметры		Реакция позитивна в титрах				
		0	+	++	+++	++++
Среднее значение удельного веса среди штаммов	<i>Staphylococcus</i>	14,00	22,00	41,00	16,00	7,00
	<i>Streptococcus</i>	42,00	31,00	14,00	12,00	1,00
	<i>Moraxella</i>	6,00	13,00	37,00	33,00	11,00

**ТАБЛИЦА 3. СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ГЕМОЛИТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ У МИКРООРГАНИЗМОВ РОДОВ *STAPHYLOCOCCUS*, *STREPTOCOCCUS*, *MORAXELLA***

Параметры		Реакция позитивна в титрах					
		0	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32
Среднее значение удельного веса среди штаммов	<i>Staphylococcus</i>	0,30	7,00	28,00	36,00	26,70	2,00
	<i>Streptococcus</i>	0,40	3,00	23,00	46,00	18,00	9,60
	<i>Moraxella</i>	36,00	31,00	19,00	8,00	6,00	0,00

**ТАБЛИЦА 4. СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ГЕМАГГЛЮТИНИРУЮЩЕЙ АКТИВНОСТИ У МИКРООРГАНИЗМОВ РОДОВ *STAPHYLOCOCCUS*, *STREPTOCOCCUS*, *MORAXELLA***

Параметры		Реакция позитивна в титрах					
		0	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32
Среднее значение удельного веса среди штаммов	<i>Staphylococcus</i>	2,00	8,00	36,00	33,00	16,00	5,00
	<i>Streptococcus</i>	5,00	14,00	27,00	26,00	25,00	3,00
	<i>Moraxella</i>	21,00	33,00	19,00	14,00	8,00	5,00

**ТАБЛИЦА 5. СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА НЕЙРАМИНИДАЗНОЙ АКТИВНОСТИ У МИКРООРГАНИЗМОВ РОДОВ *STAPHYLOCOCCUS*, *STREPTOCOCCUS*, *MORAXELLA***

Параметры		Реакция позитивна в титрах					
		0	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32
Среднее значение удельного веса среди штаммов	<i>Staphylococcus</i>	6,00	8,00	14,00	33,00	20,00	19,00
	<i>Streptococcus</i>	4,00	7,00	17,00	29,00	26,00	17,00
	<i>Moraxella</i>	22,00	27,00	21,00	14,00	8,00	8,00

организмы родов *Staphylococcus* и *Streptococcus* имеют высокую нейраминидазную, гемолитическую и гемагглютинирующую активность. Однако среди представителей одного рода наблюдались неоднородные показатели, отличавшиеся не только между видами внутри рода, но и между штаммами одного вида.

При изучении указанных свойств у представителей микробных ассоциаций было выявлено, что адгезивная и нейраминидазная активность у ассоциантов в среднем в два раза выше, чем у представителей монокультур. В ассоциациях, состоящих из трех этиологически значимых микроорганизмов чаще всего присутствовали дрожжевые клетки рода *Candida*.

## Обсуждение

Колонизация представляет собой прикрепление (адгезию) и дальнейшее размножение бактерий в зоне инфицирования. Этот процесс начинается с адгезии, в основе которой лежит избирательное взаимодействие с рецепторами эпителиоцитов и слизистым слоем [11, 13, 17]. У стафилококков и стрептококков большую роль в этом играет их гидрофобность и наличие капсул, а также липотейхоевых кислот в поверхностных фимбриях [8, 16]. Специфические белки фимбрий у представителей рода *Moraxella* обуславливают их высокую адгезивную активность несмотря на отсутствие у большинства штаммов капсулы [16, 17, 20, 23]. Наличие целого ряда белков наружной мембраны и липолисахаридных комплексов, участвующих в прикреплении к эпителиальным клеткам, у микроорганизмов родов *Staphylococcus*, *Streptococcus* и *Moraxella* обеспечивает пролонгацию первого этапа инфицирования и создает предпосылки для размножения бактерий (табл. 2). При этом прикрепившиеся микроорганизмы должны быть способны противостоять бицидным и биостатическим факторам, которые в разных количествах и в разных соединениях представлены в секретах мукоидного тракта [9, 10]. Среди микроорганизмов, поражающих слизистые оболочки, способность к продукции IgA-протеаз, которые расщепляют IgA, тем самым лишая их антиадгезивного эффекта, в наибольшей мере присуща стафилококкам и стрептококкам. Однако наличие специфичных для грамотрицательных бактерий высокоактивных протеаз позволяет клеткам *Moraxella* преодолевать барьерные функции слизистых оболочек и колонизироваться в месте входных ворот [21, 26]. Отмечено, что у лиц, накануне перенесших ви-

русную инфекцию, превалировали штаммы, обладающие в среднем в 2 раза меньшей адгезивной активностью, чем у лиц с первичной бактериальной инфекцией. Это объясняется, по-видимому, тем, что поврежденный в результате жизнедеятельности вирусных частиц слизистый слой не может противостоять обитающим на нем бактериальным клеткам даже с незначительно выраженными факторами патогенности.

После успешной адгезии микроорганизмов начинается следующий этап — инвазия, то есть способность проникать в ткани, которые лежат за пределами входных ворот инфекции, и размножаться в них. Механизмы инвазии у трех представленных родов микроорганизмов могут быть как внутриэпителиальными и субэпителиальными, так и внутрисосудистыми, проявляющимися в виде бактериемии. Как видно из табл. 5, наибольшие значения нейраминидазной активности, определяющей инвазивные свойства микробов, выявлены у стафилококков и стрептококков. Однако отдельные штаммы представителей вида *Moraxella catarrhalis* имели высокие значения нейраминидазной активности. Эти культуры были выделены из мокроты и материала, взятого при бронхоальвеолярном лаваже, у больных с бронхитами и пневмониями, что указывает на связь выраженности инвазивных свойств микробов и генерализацией процесса при инфицировании ими [15, 30, 31].

Дальнейшему распространению микробов в организме человека способствуют различные токсины, которые вырабатываются микроорганизмами. Поскольку известно, что стафилококки и стрептококки обладают целым рядом подобных гемолизин и гемагглютининов, то штаммы этих двух родов наряду с представителями рода *Moraxella*, были изучены с точки зрения количественной их оценки (табл. 3, 4). Наиболее выражены эти факторы у стафилококков и стрептококков; у микроорганизмов *Moraxella catarrhalis* они проявляются в меньшей степени, однако присущи практически всем штаммам [11, 19, 21, 27]. Причем, наибольшие значения гемолитической и гемагглютинирующей активностей у *Moraxella catarrhalis* были присущи штаммам, выделенным от пациентов с хронической инфекцией [25].

Выявленные свойства во многом объясняют возможность персистенции микроорганизмов, обусловленной их способностью длительное время циркулировать и выживать в патологическом очаге [10, 12, 29]. Этот процесс объясняется тем, что микроорганизм способен длительное время противостоять влиянию за-

щитных факторов макроорганизма. На фоне ослабленного иммунитета (общего и местного) этот процесс может значительно усугубляться. Поэтому своевременное выявление важных факторов патогенности у наиболее значимых микроорганизмов — возбудителей острых воспалительных процессов, может помочь прогнозировать течение инфекционного процесса и вовремя выбрать адекватную тактику лечения.

## Список литературы

1. Карась С.Р. Адгезивные свойства дифтерийных бактерий, выделенных от различных источников: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. — М., 1990. — 22 с.
2. Костюкова Н.Н. Значение адгезии *C. diphtheriae* в эпидемиологии дифтерии // Тез. докл. IV Всерос. съезда микробиол., эпидемиол. и паразитол. — Н. Новгород, 1991. — Т. 1. — С. 34–35.
3. Костюкова Н.Н. Начальный этап инфекционного процесса — колонизация и пути ее предотвращения // ЖМЭИ. — 1989. — № 9. — С. 103–110.
4. Коротяев А.И., Бабичев С.А. Медицинская микробиология. — СПб.: Специальная литература, 1998. — 580 с.
5. Маянский А.Н. Микробиология для врачей. — Н. Новгород: Изд-во НГМА, 1999. — 393 с.
6. Медицинская микробиология / Под ред. В.И. Покровского, О.К. Поздеева. — М.: ГЭОТАР МЕДИЦИНА, 1999. — 1200 с.
7. Определитель бактерий Берджи: в 2 т. / Под ред. Дж. Хоулта, Н. Крита и др.; пер с англ. — М.: Мир, 1997. — 800 с.
8. Akgul G., Erturk A., Turkoz M., Turan T., Ichinose A., Nagatake T., Ahmed K. Role of lipooligosaccharide in the attachment of *Moraxella catarrhalis* to human pharyngeal epithelial cells // *Microbiol. Immunol.* — 2005. — N 49. — P. 931–935.
9. Akira S., Uematsu S., Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity // *Cell.* — 2006. — N 124. — P. 783–801.
10. Attia A.S., Lafontaine E.R., Latimer J.L., Aebi C., Syrogiannopoulos G.A., Hansen E.J. The UspA2 protein of *Moraxella catarrhalis* is directly involved in the expression of serum resistance // *Infect. Immun.* — 2005. — N 73. — P. 2400–2410.
11. Balder R., Hassel J., Lipski S., Lafontaine E.R. *Moraxella catarrhalis* strain O35E expresses two filamentous hemagglutinin-like proteins that mediate adherence to human epithelial cells // *Infect. Immun.* — 2007. — N 75. — P. 2765–2775.
12. Bootsma J.H., van der Heide H.G., van de Pas S., Schouls L.M., Mooi F.R. Analysis of *Moraxella catarrhalis* by DNA typing: evidence for a distinct subpopulation associated with virulence traits // *J. Infect. Dis.* — 2000. — N 181. — P. 1376–1387.
13. Bullard B., Lipski S., Lafontaine E.R. Regions important for the adhesin activity of *Moraxella catarrhalis* Hag // *BMC Microbiol.* — 2007. — N 7. — P. 65.
14. Catlin B.W. *Branhamella catarrhalis*: an organism gaining respect as a pathogen // *Clin. Microbiol. Rev.* — 1990. — N 3. — P. 293–320.
15. Cossart P., Sansonetti P.J. Bacterial invasion: the paradigms of enteroinvasive pathogens // *Science.* — 2004. — N 304. — P. 242–248.
16. Craig L., Pique M.E., Tainer J.A. Type IV pilus structure and bacterial pathogenicity // *Nat. Rev. Microbiol.* — 2004. — N 2. — P. 363–378.
17. Gorter A.D., Oostrik J., van der Ley P., Hiemstra P.S., Dankert J., van Alphen L. Involvement of lipooligosaccharides of *Haemophilus influenzae* and *Neisseria meningitidis* in defensin-enhanced bacterial adherence to epithelial cells // *Microb. Pathog.* — 2003. — N 34. — P. 121–130.
18. Hall-Stoodley L., Costerton J.W., Stoodley P. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases // *Nat. Rev. Microbiol.* — 2004. — N 2. — P. 95–108.
19. Hodak H., Clantin B., Willery E., Villeret V., Loch C., Jacob-Dubuisson F. Secretion signal of the filamentous haemagglutinin, a model two-partner secretion substrate // *Mol. Microbiol.* — 2006. — N 61. — P. 368–382.
20. Holm M.M., Vanlerberg S.L., Foley I.M., Sledziski D.D., Lafontaine E.R. The *Moraxella catarrhalis* porin-like outer membrane protein CD is an adhesin for human lung cells // *Infect. Immun.* — 2004. — N 72. — P. 1906–1913.
21. Holme T., Rahman M., Jansson P.E., Widmalm G. The lipopolysaccharide of *Moraxella catarrhalis* structural relationships and antigenic properties // *Eur. J. Biochem.* — 1999. — N 265. — P. 524–529.
22. Jacques M. Role of lipooligosaccharides and lipopolysaccharides in bacterial adherence // *Trends Microbiol.* — 1996. — N 4. — P. 408–409.
23. Luke N.R., Jurcisek J.A., Bakaletz L.O., Campagnari A.A. Contribution of *Moraxella catarrhalis* type IV pili to nasopharyngeal colonization and biofilm formation // *Infect. Immun.* — 2007. — N 75. — P. 5559–5564.
24. *Microbiology Laboratory Manual* / J. Harley, J.P. Harley; 7th Edition. — USA, 2007. — 2256 p.
25. Murphy T.F., Brauer A.L., Grant B.J., Sethi S. *Moraxella catarrhalis* in chronic obstructive pulmonary disease: burden of disease and immune response // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* — 2005. — N 172. — P. 195–199.
26. Nordström T., Blom A.M., Forsgren A., Riesbeck K. The emerging pathogen *Moraxella catarrhalis* interacts with complement inhibitor C4b binding protein through ubiquitous surface proteins A1 and A2 // *J. Immunol.* — 2004. — N 173. — P. 4598–4606.

27. Pearson M.M., Laurence C.A., Guinn S.E., Hansen E.J. Biofilm formation by *Moraxella catarrhalis* in vitro: roles of the UspA1 adhesin and the Hag hemagglutinin // *Infect. Immun.* — 2006. — N 74. — P. 1588–1596.
28. Reddy M. S., Murphy T.F., Faden H.S., Bernstein J.M. Middle ear mucin glycoprotein: purification and interaction with nontypable *Haemophilus influenzae* and *Moraxella catarrhalis* // *Otolaryngol. Head Neck Surg.* — 1997. — N 116. — P. 175–180.
29. Sethi S., Sethi R., Eschberger K., Lobbins P., Cai X., Grant B.J., Murphy T.F. Airway bacterial concentrations and exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* — 2007. — N 176. — P. 356–361.
30. Spaniol V., Heiniger N., Troller R., Aebi C. Outer membrane protein UspA1 and lipooligosaccharide are involved in invasion of human epithelial cells by *Moraxella catarrhalis* // *Microbes Infect.* — 2008. — N 10. — P. 3–11.
31. Vries S.P.W., Bootsma H.J., Hays J.P., Hermans P.W.M. Molecular aspects of *Moraxella catarrhalis* pathogenesis // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* — 2009. — Vol. 73, N 3. — P. 389–406.