

УДК 579.861.2:616-022.7-053.2

ВЛИЯНИЕ ТЕХНОГЕННОЙ НАГРУЗКИ НА ВИДОВОЙ СОСТАВ И ОСОБЕННОСТИ БИОПЛЕНКООБРАЗОВАНИЯ СТАФИЛОКОККОВ, ИЗОЛИРОВАННЫХ ОТ БАКТЕРИОНОСИТЕЛЕЙ

© 2014 г. С. В. Поспелова, Э. С. Горовиц, *Л. М. Лемкина

Пермская государственная медицинская академия
имени академика Е. А. Вагнера,

* Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, г. Пермь

Изучены видовой состав и пленкообразующая способность стафилококков, колонизирующих полость носа и зева у детей, проживающих в экологически чистом (пос. Сылва) и промышленном (г. Чусовой вблизи крупного металлургического завода) районах Пермского края. Показано, что у детей из экологически благополучного района ($n = 31$) полость носа и зев колонизируются стафилококками, разнообразными по видовому составу. При этом золотистые стафилококки выявляли существенно реже, чем в группе наблюдения. В то же время в группе наблюдения (дети, проживающие в районе загрязнения выбросами металлургического завода, $n = 23$) в указанных биотопах выявляется преимущественно два вида стафилококков – *S. epidermidis* и *S. aureus*. Все штаммы стафилококков различных видов, выделенные от детей группы наблюдения, характеризовались более выраженной способностью к образованию биопленок, которая достигала наибольших значений у представителей коагулазоотрицательных стафилококков.

Ключевые слова: стафилококковое бактерионосительство, техногенные загрязнения, биопленкообразование

Формирование стафилококкового бактерионосительства в полости носа и зева способствует возникновению различных гнойно-септических осложнений. При этом переход симбиотических взаимоотношений в патологический процесс определяется не только особенностями биологических свойств бактерий, но и состоянием организма человека [1, 3]. В свою очередь, состояние макроорганизма и уровень резистентности его различных биотопов, в том числе и носоглотки, определяют как возможность возникновения стафилококкового бактерионосительства, так и его исход. Известно, что неблагоприятные факторы окружающей среды, в частности техногенное загрязнение, могут негативно воздействовать на состояние резистентности макроорганизма, следовательно, могут способствовать и формированию бактерионосительства [2, 6, 7].

В этой связи логично предположить, что стафилококки, главным образом *S. aureus*, колонизирующие носоглотку, и прежде всего у резидентных бактерионосителей, характеризуются наличием определенных факторов персистенции, в их числе и способностью к образованию биопленок [10]. Находясь в микробном сообществе, бактерии получают оптимальные условия для существования и в значительной мере недоступны защитным факторам организма. Учитывая эти обстоятельства, можно полагать, что стафилококки, изолированные от детей, проживающих в регионах с различной техногенной нагрузкой, будут отличаться не только по видовому составу, частоте встречаемости, но и степени выраженности факторов персистенции, в частности биопленкообразованию.

Цель работы – изучение видового разнообразия и пленкообразующей способности стафилококков, колонизирующих полость носа и зева у детей, проживающих в экологически благополучном и промышленном районах.

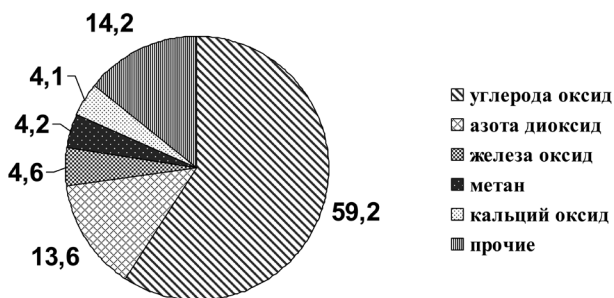
Методы

В качестве территорий с различной техногенной нагрузкой были выбраны пос. Сылва («экологически благополучный») и район г. Чусового вблизи ОАО «Чусовской металлургический завод» (ЧМЗ) Пермского края.

В соответствии с данными Краевого управления федеральной службы Роспотребнадзора первый из них характеризуется благоприятной экологической обстановкой, тогда как второй отличается высоким содержанием в воздухе загрязняющих веществ. На основании результатов проведенного в 2010–2012 годах мониторинга состояния атмосферного воздуха в зоне влияния ЧМЗ лабораториями отдела химико-аналитических методов исследования ФБУН «Федеральный научный центр медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения» (ФБУН ФНЦ МПТ УРЗН) г. Пермь качество воздуха на исследованной территории не соответствует действующим нормативным

документам (ст. 30 ФЗ «Об охране атмосферного воздуха» и раздела 4 СанПиН 2.1.6.1032-01 «Гигиенические требования к обеспечению качества атмосферного воздуха населенных мест») [4, 5].

Так, в атмосферный воздух г. Чусового в результате деятельности ЧМЗ ежегодно поступает более 8 тыс. тонн вредных веществ, при этом загрязняющие примеси включают около 80 различных компонентов (рис. 1).



Структура выбросов в окружающий воздух стационарных источников загрязнения в г. Чусовом в 2010 году

Важным показателем потенциальной опасности выбросов для здоровья населения является присутствие в пылегазовых смесях веществ I и II классов (чрезвычайно и высоко опасных веществ), из них наиболее значимы пятиокись ванадия и соединения марганца. Следует подчеркнуть, что при определении этих химических веществ в сыворотках крови практически здоровых детей г. Чусового (n = 45) уровень пятиокиси ванадия и соединений марганца превышал аналогичные показатели у детей, проживающих в пос. Сыльва (n = 45), соответственно в 8,8 и 2 раза.

В течение марта 2012 года проведено бактериологическое обследование типа «случай – контроль» 54 практически здоровых детей, посещающих детские дошкольные учреждения: 31 ребенка, проживающего в пос. Сыльва, – группа сравнения и 23 жителей г. Чусового – группа наблюдения. Обе группы детей сопоставимы по полу и возрасту. Основными критериями для включения служили отсутствие на момент обследования каких-либо клинических проявлений заболеваний и возраст 5–6 лет. Исследования проводили в соответствии со стандартами Хельсинкской декларации 1975 года и ее пересмотра 1983-го с положительным заключением комитета по этике при ФБУН ФНЦ МПТ УРЗН. В качестве исследуемого материала использовали отделяемое из полости носа и полости зева, которое забирали стерильными ват-

ными тампонами, посев осуществляли на кровяной и желточно-солевой агары в соответствии с Приказом МЗ СССР № 535 [8]. Идентификацию выделенных культур бактерий рода *Staphylococcus* проводили с использованием Staphy-test 24 производства PLIVA-Lachema (Чехия), оценку результатов осуществляли с помощью компьютерной программы «Микроб-2». Проведена также количественная оценка степени роста стафилококков [8]. Биопленки выделенных культур выращивали в 96-луночных полистероловых планшетах для иммуоферментного анализа (Медполимер, Россия). В 6 лунок каждого ряда планшета вносили по 100 микролитров инокула определенного штамма стафилококка, содержащего 10⁷ КОЕ/мл, после чего планшеты инкубировали в течение 24 часов в термостате (37 °С). Через сутки планктонную культуру из всех лунок удаляли, биопленки дважды аккуратно промывали 10 мМ фосфатным буфером (рН 7,2), затем окрашивали 0,1 % раствором генцианвиолета с последующей спиртовой экстракцией связанного красителя для оценки общей биомассы образовавшихся пленок. Детекцию окрашенных экстрактов биопленок осуществляли на ридере Benchmark Plus (Bio Rad, США) при длинах волн 570 и 490 нм (O'Toole G., 2000). В качестве контроля использовали стерильный мясопептонный бульон. Обработку полученных данных проводили с помощью программ Excel и STATISTICA 6.0 [9]. Сравнение бинарных признаков осуществляли с помощью точного критерия Фишера однонаправленного (p), при построении четырехпольной таблицы сопряженности (2×2). Для оценки степени биопленкообразования определяли средние арифметические величины (M) и стандартное отклонение (M ± SD). Поскольку по критерию Шапиро – Уилкса распределение признака не было нормальным (гауссовым), сравнение пленкообразующей способности стафилококков, выделенных от детей различных групп, проводили с помощью критерия Манна – Уитни (p). О статистически значимых различиях полученных результатов в сравниваемых группах судили по величине цифровых значений p, критический уровень значимости которого в данном исследовании принимался равным 0,05.

Результаты

У 61,2 % детей группы сравнения в полости носа (ПН) были выявлены бактерии рода *Staphylococcus*, в группе наблюдения их изолировали значительно чаще – у 95,6 %. Доля носителей *S. aureus* соответственно составила 12,9 и 26,1 % (табл. 1).

Таблица 1

Частота колонизации у обследованных детей полости носа и зева бактериями рода *Staphylococcus*, %

| Выделенная культура | Полость носа | | | Полость зева | | |
|---|------------------|-------------------|-------|------------------|-------------------|--------|
| | Группа сравнения | Группа наблюдения | p | Группа сравнения | Группа наблюдения | p |
| Бактерии рода <i>Staphylococcus</i> (различных видов) | 61,20±10,99 | 95,60±19,93 | 0,003 | 51,60±9,27 | 68,20±14,22 | 0,147 |
| <i>S. aureus</i> | 12,90±2,32 | 26,10±5,44 | 0,189 | 3,20±0,57 | 52,20±10,88 | <0,001 |

Примечание. p – точный критерий Фишера однонаправленный.

Таблица 2

Доля бактерионосителей стафилококков у обследованных детей с различной степенью обсемененности полости носа и зева, %

| Степень обсемененности | Полость носа | | | Полость зева | | |
|------------------------|------------------|-------------------|--------|------------------|-------------------|-------|
| | Группа сравнения | Группа наблюдения | р | Группа сравнения | Группа наблюдения | р |
| I | 52,60±9,45 | 31,80±6,63 | 0,151 | 56,25±10,10 | 12,50±2,77 | 0,012 |
| II | 21,10±3,61 | 9,10±1,9 | 0,262 | 31,25±5,61 | 62,50±13,91 | 0,078 |
| III | 26,30±4,72 | 13,60±2,84 | 0,265 | 12,50±2,25 | 25,00±4,17 | 0,327 |
| IV | 0 | 45,50±9,49 | <0,001 | 0 | 0 | |

Примечание. р – точный критерий Фишера однонаправленный.

В зеве стафилококки были обнаружены практически у половины – 51,6 % детей группы сравнения и у 68,2 % группы наблюдения. Носительство золотистых стафилококков регистрировали у 3,2 % детей первой группы и у 52,2 % второй (см. табл. 1).

На основании результатов оценки количества выросших при первичном посеве колоний стафилококков у каждого ребенка изучена степень обсемененности слизистых ПН и полости зева (ПЗ) (табл. 2).

Из представленных материалов следует, что у 72,7 % детей группы сравнения в ПН обнаружили I–II степени обсемененности, тогда как обсемененности IV степени не наблюдали. В зеве у этой группы детей выявили те же закономерности – преобладала I–II степень обсемененности (87,5 % случаев); III – у 12,5 %.

В то же время в группе наблюдения обсемененность слизистых носа и зева была значительно выше. Так, почти у половины (45,5 %) детей в ПН выявили IV степень, а в зеве у 66,7 % превалировала II степень обсемененности.

Видовая структура штаммов, изолированных от детей различных групп, существенно отличалась (табл. 3).

Как свидетельствуют представленные материалы, у

детей, проживающих в экологически благополучном районе, из ПН всего было выделено 26 штаммов различных видов, из зева – 16. При этом независимо от исследуемого биотопа отмечалось широкое видовое разнообразие коагулазоотрицательных стафилококков (КОС). Так, у детей этой группы были изолированы штаммы *S. warneri*, *S. chromogenes*, *S. delphini*, *S. caprae*, *S. hominis*, *S. lugdunensis*, *S. xylosus*. При этом превалировали *S. epidermidis* – 35,7 %. У этой же группы детей были выявлены *S. aureus*, которые присутствовали у 6,25 % детей в зеве и у 15,4 % – в полости носа. Идентичные виды стафилококков из ПН и ПЗ были обнаружены в 12,9 % случаев; в 9,7 % это были *S. epidermidis*. Таким образом, среди обследованных детей группы сравнения было выявлено 5 бактерионосителей *S. aureus* (16,1 %), у четырех из них – в ПН.

У детей группы наблюдения и в ПН, и в ПЗ видовой состав стафилококков был ограничен, как правило, двумя видами. Доминирующими являлись *S. aureus* – 48,6 % и *S. epidermidis* – 40,5 %. Значительно чаще, чем у детей группы сравнения, выделяли *S. aureus* как из ПН – 27,3 % так и из ПЗ – 80,0 %. Важно отметить, что у 8 этих детей и ПН, и ПЗ были колонизированы одними и теми

Таблица 3

Видовая принадлежность стафилококков, изолированных из полости носа и зева у обследованных детей

| Вид стафилококков | Частота встречаемости в биотопах, % | | | | | |
|-----------------------|-------------------------------------|-------------------|-------|------------------|-------------------|--------|
| | Полость носа | | | Полость зева | | |
| | Группа сравнения | Группа наблюдения | р | Группа сравнения | Группа наблюдения | р |
| <i>S. aureus</i> | 15,40±2,77 | 27,30±5,69 | 0,256 | 6,25±1,12 | 80,00±16,68 | <0,001 |
| <i>S. epidermidis</i> | 34,60±6,21 | 59,10±12,32 | 0,080 | 37,50±6,74 | 13,30±2,77 | 0,130 |
| <i>S. delphini</i> | 11,50±2,07 | 4,50±0,94 | 0,371 | 12,50±2,25 | – | 0,258 |
| <i>S. chromogenes</i> | 11,50±2,07 | – | 0,150 | 18,75±3,37 | – | 0,125 |
| <i>S. hominis</i> | 7,60±1,37 | – | 0,278 | 6,25±1,12 | – | 0,516 |
| <i>S. intermedius</i> | 3,80±0,68 | – | 0,542 | 6,25±1,12 | – | 0,516 |
| <i>S. warneri</i> | 3,80±0,68 | 4,50±0,94 | 0,712 | – | – | |
| <i>S. lugdunensis</i> | 3,80±0,68 | – | 0,542 | 6,25±1,12 | – | 0,516 |
| <i>S. caprae</i> | 3,80±0,68 | – | 0,542 | 6,25±1,12 | – | 0,516 |
| <i>S. xylosus</i> | 3,80±0,68 | 4,50±0,94 | 0,712 | – | – | |
| <i>S. vitulinus</i> | – | – | – | – | 6,70±1,40 | 0,525 |
| Всего | 26 / 100 | 22 / 100 | – | 16 / 100 | 15 / 100 | |

Примечание. р – точный критерий Фишера однонаправленный.

же видами стафилококков, идентичными по видовым характеристикам. У 6 это были штаммы *S. aureus*, у 2 – *S. epidermidis*.

В серии специальных экспериментов в сравнительном аспекте проанализирована способность выделенных изолятов, как золотистых стафилококков, так и представителей КОС, к образованию биопленок (табл. 4).

Таблица 4

Пленкообразующая способность стафилококков, изолированных со слизистых зева и носа обследованных детей

| Вид стафилококков | Пленкообразующая активность штаммов, изолированных от детей | | p |
|-------------------|---|-------------------|--------|
| | группы сравнения | группы наблюдения | |
| <i>S. aureus</i> | 0,34±0,06 | 0,44±0,10 | 0,031 |
| КОС | 0,53±0,12 | 1,21±0,36 | <0,001 |

Примечание. p – критерий Манна – Уитни.

Степень выраженности данного признака у штаммов, выделенных от детей разных групп, значительно варьировала. Культуры, изолированные от детей группы наблюдения, проявляли более высокую способность к биопленкообразованию. Это касалось штаммов как золотистого стафилококка, так и коагулазоотрицательных видов. При сравнении этого признака у штаммов КОС, изолированных от сравниваемых групп детей, выявлена более значительная разница. Так, если показатели пленкообразования у этих видов стафилококков у детей группы сравнения составили $0,53 \pm 0,12$, то у детей группы наблюдения $1,21 \pm 0,36$ ($p < 0,001$). Аналогичная тенденция прослеживалась и в отношении пленкообразования золотистых стафилококков, но разница не была столь значительной: $0,34 \pm 0,06$ и $0,44 \pm 0,10$ соответственно. В целом следует отметить, что штаммы КОС отличались более выраженной способностью к биопленкообразованию, чем культуры золотистого стафилококка.

Обсуждение результатов

Видовой состав стафилококков, колонизирующих нос и зев детей, проживающих в экологически благополучном районе, отличался широким видовым разнообразием. Доминирующим видом являлся *S. epidermidis*, который был изолирован от 41,9 % детей. У детей, находившихся под влиянием неблагоприятных экологических факторов, видовой спектр стафилококков зева и носа значительно сужается практически до двух видов – *S. epidermidis* и *S. aureus*. Таким образом, под влиянием техногенных загрязнений происходит изменение видового состава бактерий рода *Staphylococcus* в этих биотопах, с которыми связана их колонизационная резистентность. Как следствие, у этой группы детей освобожденные ниши заселяются патогенными штаммами *S. aureus*. Не случайно носительство *S. aureus* в ПЗ выявлено практически у 50 % обследованных детей, проживающих на экологически неблагоприятной терри-

тории. Аналогичные данные, свидетельствующие об увеличении числа бактерионосителей стафилококков у лиц, проживающих в районах с неблагоприятной экологической ситуацией, приводятся и другими авторами [2, 3, 6]. Однако эти исследования касаются преимущественно носительства золотистых стафилококков. Важно также отметить, что на фоне действия металлополлютантов происходит изменение биологических свойств штаммов стафилококков. Все изученные изоляты различных видов стафилококков характеризовались более выраженной способностью к образованию биопленок, которая достигала наибольших значений у представителей КОС. Этот фрагмент исследования представляется наиболее интересным. В свете полученных данных очевидно целесообразно дальнейшее сравнительное изучение ряда биологических свойств (факторов вирулентности и персистенции) различных видов стафилококков, изолированных от детей, проживающих в различных экологических условиях.

Работа выполнена при поддержке гранта Президиума УрО РАН № 12-м-14-2035 и гранта РФФИ-11-04-96025-Р-Урала.

Список литературы

1. Бухарин О. В. Симбиотические взаимоотношения микроорганизмов при инфекции // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2013. № 1. С. 93–97.
2. Бухарин О. В., Зверев А. Ф., Карташова О. Л., Киргизова С. Б. Прогнозирование развития болезней органов дыхания у детей, проживающих на техногенно-загрязненных территориях // Гигиена и санитария. 2010. № 6. С. 76–78.
3. Дерябин Д. Г. Стафилококки: экология и патогенность. Екатеринбург : УрО РАН, 2000. С. 239.
4. Доклад о состоянии и об охране окружающей среды Пермского края в 2010 г. / Министерство природных ресурсов Пермского края. Пермь, 2011. С. 35, www.permecology.ru
5. Доклад о состоянии и об охране окружающей среды Пермского края в 2011 г. / Министерство природных ресурсов Пермского края. Пермь, 2012. С. С.37, www.permecology.ru
6. Крамарь Л. В., Жадченко Ю. В., Хлынина Ю. О., Родионова Н. В. Фенотипические характеристики популяции *S. aureus*, выделенных от различных категорий носителей // Фундаментальные исследования. 2012. № 4 (2). С. 295–298.
7. Поспелова С. В., Горовиц Э. С., Афанасьевская Е. В. Стафилококковое бактерионосительство у детей из районов с различной техногенной нагрузкой // Проблемы медицинской микологии. 2012. Т. 14, № 2. С. 120.
8. Приказ МЗ СССР № 535 по применению унифицированных микробиологических (бактериологических) методов исследования в клинико-диагностических лабораториях, от 22 апреля 1985. М., 1986. 127 с.
9. Реброва О. Ю. Статистический анализ медицинских данных. М., 2006. 305 с.
10. Романова Ю. М., Диденко Л. В., Толордава Э. Р., Гинцбург А. Л. Биопленки патогенных бактерий и их роль в хронизации инфекционного процесса. Поиск средств борьбы с биопленками // Вестник РАМН. 2011. № 10. С. 31–39.

References

1. Bukharin O. V. Symbiotic relationship with microorganisms infection. *Zhurnal Mikrobiologii Epidemiologii i Immunobiologii*. 2013, 1, pp. 93-97. [in Russian]
2. Bukharin O. V., Zverev A. F., Kartashova O. L., Kirgizova S. B. Forecasting of respiratory diseases development in children living in contaminated areas. *Gigiena i sanitariia*. 2010, 6, pp. 76-78. [in Russian]
3. Deryabin D. G. *Stafilokokki: ekologiya i patogennost'* [Staphylococci: ecology and pathogenicity]. Yekaterinburg, Ural Branch Russian Academy of Sciences Publ., 2000, p. 239.
4. *Doklad o sostoyanii i ob okhrane okruzhayushchei sredy Permskogo kraja v 2010 g.* [Report on State and Environmental Protection in Perm Territory in 2010]. Perm, Ministry of Natural Resources of Perm Territory, 2011, p. 35, www.permecology.ru
5. *Doklad o sostoyanii i ob okhrane okruzhayushchei sredy Permskogo kraja v 2011 g.* [Report on State and Environmental Protection in Perm Territory in 2011]. Perm, Ministry of Natural Resources of Perm Territory, 2012, p. 37, www.permecology.ru
6. Kramar' L. V., Zhadchenko Yu. V., Khlynina Yu. O., Rodionova N. V. Phenotypic characteristics of population of staphylococcus aureus isolated from different categories of carriages. *Fundamental'nye issledovaniya* [Fundamental Studies]. 2012, 4 (2), pp. 295-298. [in Russian]
7. Pospelova S. V., Gorovits E. S., Afanas'evskaya E. V. Carriage of staphylococcus in children with various technogenic loadings. *Problemy meditsinskoj mikologii* [Problems of Medical Mycology]. 2012, 14(2), p. 120. [in Russian].
8. *Prikaz MZ SSSR № 535 po primeneniyu unifikirovannykh mikrobiologicheskikh (bakteriologicheskikh) metodov issledovaniya v kliniko-diagnosticheskikh laboratoriyakh, ot 22 aprelya 1985 g.* [MoH USSR Order № 535 on Use of Standardized Microbiological (Bacteriological) Research Methods in Clinical-Diagnostic Laboratories of 22 April 1985], p. 127.
9. Rebrova O. Yu. *Statisticheskii analiz meditsinskikh dannykh* [Statistic Analysis of Medical Data]. Moscow, 2006, 305 p.
10. Romanova Yu. M., Didenko L. V., Tolordava E. R., Gintsburg A. L. Biofilm formation of pathogenic bacteria and their role in chronic infection. Search of tools to combat

biofilms. *Newsletter of Russian Academy of Medical Sciences*. 2011, 10, pp. 31-39. [in Russian]

INFLUENCE OF TECHNOGENIC POLLUTION ON SPECIES COMPOSITION AND PECULIARITIES OF BIOFILM FORMATION OF STAPHYLOCOCCI ISOLATED FROM BACTERIA CARRIERS

S. V. Pospelova, E. S. Gorovits, *L. M. Lemkina

Perm State Academy of Medicine named after Academician E. A. Wagner, Perm

*Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms Ural Branch of Russian Academy of Sciences, Perm, Russia

The objective of the work was to study the species composition and film forming ability of staphylococci colonizing the nasal and throat cavities in children living in ecologically clean (settlement Sylva) and industrial (town Chusovoi, near a large metallurgical plant) regions of the Perm Territory. It was shown that in the children from the ecologically unharmed region (n = 31, the nasal and throat cavities were colonized by staphylococci various in their species composition. Golden staphylococci were detected rarely as compared to the study group. In contrast, in the study group (the children living in the region polluted by the metallurgical plant emissions, n = 23), predominantly two Staphylococci species - *S. epidermidis* and *S. aureus* were detected in the mentioned biotopes. All strains of staphylococci of different species isolated from the children in the study group were characterized by more pronounced abilities to form biofilms which reached the highest values among the representatives of KOS.

Keywords: Staphylococcal bacteria carrying, technogenic pollution, biofilm formation

Контактная информация:

Пospelova Светлана Валерьевна – кандидат медицинских наук, доцент кафедры микробиологии и вирусологии ГБОУ ВПО «Пермская государственная медицинская академия имени академика Е. А. Вагнера» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Адрес: 614000, г. Пермь, ул. Петропавловская, д. 26
E-mail: pospelova_svetlana@mail.ru