УДК 616.915:579.861-053.2
DOI 10.11603/bmbr.2706-6290.2021.2.11689

Н. М. Олійник, Н. Я. Кравець

Тернопільський національний медичний університет імені І. Я. Горбачевського МОЗ України

ВИЗНАЧЕННЯ ФАГОЦИТУВАННЯ ШТАМІВ ЗОЛОТИСТОГО СТАФІЛОКОКА (S. AUREUS), ВИДІЛЕНОГО У ДІТЕЙ, ХВОРИХ НА КІР

Визначення фагоцитування штамів золотистого стафілокока (S. aureus), виділеного у дітей, хворих на кір

Н. М. Олійник, Н. Я. Кравець

Тернопільський національний медичний університет імені І. Я. Горбачевського МОЗ України

Резюме. *Золотистий стафілокок – один із найпоширеніших у світі серед збудників інфекційних захворювань. Як відомо, розвитку інфекції сприяють різні чинники та фактори вірулентності стафілококів. Значно менш відомо про їх взаємодію один з одним та захисними механізмами імунної системи господаря. Важливе значення імунокомпетентних клітин у розвитку запального процесу було підставою для вивчення здатності до фагоцитування штамів золотистого стафілокока, виділеного з носоглотки дітей, хворих на кір.*

Мета дослідження *– визначити здатність до фагоцитування штамів золотистого стафілокока, виділеного у дітей, хворих на кір, нейтрофільними гранулоцитами і моноцитами периферійної крові.*

Матеріали і методи. *Фагоцитарну реакцію оцінювали за допомогою наступних показників: активності фагоцитозу або відсотка фагоцитарноактивних лейкоцитів, індексу фагоцитозу – середньої кількості поглинутих мікробів на один фагоцит. У процесі дослідження було сформовано дві групи: перша – дослідна (35 хворих на кір дітей); друга – контрольна (зразки нормальної мікрофлори від практично здорових людей – 15 осіб). Матеріал із ротоглотки брали стерильним тампоном, досліджували його бактеріологічним методом. Кількісний склад бактерій відображали у кількості колонієутворювальних одиниць (КУО) в перерахунку на розведення дослідного матеріалу. Ідентифікацію мікроорганізмів проводили за стандартними схемами. Дослідження фагоцитозу – за методом Кост і Стенко.*

Результати. *Під час дослідження було виявлено, що вагому роль у процесі фагоцитозу відіграють нейтрофільні гранулоцити. Фагоцитарна активність нейтрофілів відносно культури S. aureus, виділеної у дітей, хворих на кір, нижча на 46,9 %, моноцитів – на 38, 8 % порівняно із групою здорових осіб. Також спостерігалося зниження фагоцитарного індексу в фагоцитуючих лейкоцитах відносно культури S. aureus, виділеної у дітей, хворих на кір: нейтрофілів – на 31,7 %, моноцитів – на 38,6 %.*

Висновки. *Зниження здатності до фагоцитування культури золотистого стафілокока, виділеної у дітей, хворих на кір, фагоцитуючими клітинами у до-*

Determination of phagocytic activity of S. aureus strains isolated from children with measles

N. M. Oliynyk, N. Ya. Kravets

I. Horbachevsky Ternopil National Medical University

e-mail: kravecnj@tdmu.edu.ua

Summary. *S. aureus is one of the world's most common pathogens of infectious diseases. It is known that the development of infection is facilitated by various factors and factors of virulence of staphylococci. Much less is known about their interaction with each other and the protective mechanisms of the host's immune system. The importance of immunocompetent cells in the development of the inflammatory process was the basis for studying the ability to phagocytose strains of Staphylococcus aureus isolated from the nasopharynx of children with measles.*

The aim of the study *– to determine the ability to phagocytose Staphylococcus aureus strains isolated from children with measles by neutrophilic granulocytes and peripheral blood monocytes.*

Materials and Methods*. The phagocytic response was assessed using the following indicators: phagocytosis activity or the percentage of phagocytic-active leukocytes, phagocytosis index – the average number of absorbed microbes per phagocyte. During the study, two groups were formed: group 1 – experimental (35 patients with measles); group 2 – control (samples of normal microflora from almost healthy people – 15 persons). The material from the oropharynx was taken with a sterile swab, examined by bacteriological method. The quantitative composition of bacteria was reflected in the number of colony forming units (CFU) in terms of dilution of the test material. Identification of microorganisms was performed according to standard schemes. Phagocytosis studies were performed by the method of Kost and Stenko.*

Results. *During the study, it was found that neutrophilic granulocytes play an important role in the process of phagocytosis. Phagocytic activity of neutrophils isolated from children with measles and monocytes was less than 46.9 % and 38.8 % compared with the group of healthy individuals. There was also a decrease in the phagocytic index in phagocytic leukocytes relative to the culture of S. aureus isolated from children with measles: neutrophils – 31.7 %, monocytes – 38.6 %.*

Conclusions. *The decrease in the phagocytic ability of Staphylococcus aureus culture isolated from children with measles by phagocytic cells in the experimental group*

©Н. М. Олійник, Н. Я. Кравець, 2021

ISSN 2706-6282(print)
ISSN 2706-6290(online)

слідній групі, очевидно спричинено наявністю факторів вірулентності збудника, що суттєво пригнічують фагоцитоз та зумовлюють здатність мікроорганізмів до тривалої персистенції у середині фагоцитів.

Ключові слова: золотистий стафілокок; *S. aureus*; фагоцитування; моноцити; нейтрофільні гранулоцити; індекс фагоцитозу.

is apparently due to the presence of virulence factors of the pathogen, which significantly inhibit phagocytosis and cause the ability of microorganisms to persist for a long time.

Key words: Staphylococcus aureus; phagocytosis; monocytes; neutrophilic granulocytes; phagocytosis index.

ВСТУП

Актуальною проблемою у сучасній медицині є зростання кількості інфекційно-запальних процесів, які спричинені умовно-патогенними мікроорганізмами, тобто збудниками гнійно-запальних процесів із низьким ступенем патогенності для людини, що проявляється лише при певних умовах. Інша назва цих збудників – «мікроби-опортуністи». Зокрема, у всьому світі неухильно загострюється проблема інфекцій, викликаних грампозитивними мікроорганізмами. Стафілококи – збудники значної частини позалікарняних і нозокоміальних бактеремій, пневмоній, інфекцій шкіри та слизових оболонок людини. Близько 20 % відсотків населення – постійні носії золотистого стафілокока, при цьому бактерія не викликає у них ніяких симптомів. Здорове носійство *S. aureus* в нижніх носових ходах спостерігається у 70–90 % обстежених. Для здорової людини стафілококи, які належать до мікрофлори її організму, не становлять небезпеки, але в разі зниження реактивності імунної системи, – стають збудниками різних захворювань [2].

Проблема полягає не лише в розповсюдженні й високій частоті виділення *S. aureus*, а в зростаючому рівні антибіотикорезистентності цього виду бактерій, інтенсивному використанні інвазивних методів діагностики і лікування, значному розповсюдженні серед пацієнтів набутих імунодефіцитних станів різноманітної етіології та різного ступеня тяжкості [1]. Попри те, що *S. aureus* є одними із найбільш вивчених представників умовно-патогенних мікроорганізмів, він і на сьогодні продовжує викликати увагу спеціалістів різної ланки [3].

Патогенність являє собою багатофакторну полідетермінантну властивість мікроорганізмів. Це генотипова ознака бактерій, фенотиповим проявом якої є вірулентність. Фактори патогенності зумовлюють здатність мікроорганізмів протистояти механізмам захисту організму господаря та розмножуватися в ньому. Зокрема, фактори вірулентності S. aureus суттєво пригнічують фагоцитоз, зумовлюють здатність збудника до тривалої персистенції у середині фагоцитів. До них відносять фактори адгезії (адгезини), які здатні зв'язувати фібронектин. Поверхневі білки виявляють гідрофобні властивості й забезпечують прикріплення стафілококів до клітин тканин. Наявність капсули або капсулоподібної (слизової оболонки) субстанції полісахаридної природи притаманні майже усім штамам *S. aureus*, оскільки гени, що детермінують капсулоутворення, локалізовані на хромосомі. Біологічна активність капсульних полісахаридів визначає їх антифагоцитарні властивості й полягає в опсонізації інкапсульних стафілококів, тобто мікрокапсула захищає бактерії від поглинання поліморфноядерними лейкоцитами, сприяє адгезії та розповсюдженню мікроорганізмів у тканинах. Тейхоєві кислоти активують систему комплементу за альтернативним шляхом, а також полегшують адгезію бактерій до епітеліальних клітин і здатні інгібувати поглинальну активність фагоцитів [3, 4]. Ферменти проявляють різноспрямовану дію: каталаза руйнує пероксид водню, захищає бактерії від токсичних кисневих радикалів, b-лактамаза руйнує молекули b-лактамних антибіотиків, ліпаза полегшує адгезію та проникнення до тканин, зокрема здатна руйнувати сальні «пробки», що полегшує проникнення стафілококів у волосяні фолікули, коагулаза спричиняє згортання плазми крові. Сам фермент не взаємодіє з фібриногеном, а утворює тромбіноподібну речовину. Фібринозна плівка, що при цьому утворюється, відіграє роль додаткової капсули, яка захищає бактерії від фагоцитозу [6].

Ще один фактор захисту клітин *S. aureus* від дії макроорганізму – це їхня здатність синтезувати пероксидазу, яка перешкоджає фагоцитозу стафілококів поліморфно-ядерними нейтрофілами. Кількість активних лейкоцитів збільшується, а їхня поглинальна здатність знижується. Найбільш виражене зниження хемотаксису та бактерицидної активності фагоцититів спостерігається при хронічній стафілококовій інфекції, зокрема за рахунок синтезу лейкоцидинів та b-токсинів *S. aureus*. Лейкоцидини (токсин Пантона – Валентайна) порушують водно-електролітний баланс у клітині, викликають деструкцію лейкоцитів людини. Токсин синдрому токсичного шоку (TSST-1 – Toxic Shock Syndrome Toxin) – екзотоксин, який зумовлює розвиток специфічного симптомокомплексу. Мішені дії TSST-1 – нейтрофіли і, можливо, макрофаги [4].

Процес поглинання та інактивації стафілококів фагоцитами, значною мірою залежить від температурного режиму та концентрації мікроорганізмів. У разі коливання температури нижче 38 та вище 41 С фагоцитарна активність знижується, а при температурі 4 °С дорівнює 6 % проти 96,1 % такої при 37 °С. При концентрації стафілококів 10–150 бактеріальних клітин на 1 фагоцит протягом 20 хв поглинається 78–86 % бактерій; при концентрації 400 клітин на 1 фагоцит – 56 % [3].

Імунна система людини забезпечує її біологічну індивідуальність та захищає організм від чужорідних агентів, антигенів. Вона представлена комплексом органів і клітин, здатних виконувати імунологічні функції, однією із яких є фагоцитоз. Фагоцитоз належить до вроджених консервативних і постійних імунних процесів в організмі людини. Єдиними клітинами, що володіють активним фагоцитозом, є нейтрофіли і моноцити, саме тому їх вважають професійними фагоцитами. Порівнюючи фагоцитарні властивості цих клітин, виявилося, що антимікробна здатність нейтрофілів вище, ніж у макрофагів [1]. Нейтрофільна відповідь – це сама перша відповідь при гострих запаленнях та інфекціях і завжди передує більш специфічній – лімфоцитарній. Нейтрофільні гранулоцити (НГ) одними з перших зустрічають патогенні та умовно-патогенні мікроорганізми, які проникають через захисні бар'єри організму. Секреція широкого спектра цитокінів надає можливість НГ не тільки впливати на активність інших імунокомпетентних клітин, а також регулювати специфічну імунну відповідь. НГ займають одну з найбільш активних позицій у системі гуморально-клітинної кооперації крові, від їх фагоцитарної активності залежить елімінація збудника [7, 8].

Активною фагоцитарною функцією володіють моноцити. Це найбільші клітини периферійної крові, вони являються макрофагами, тобто здатні поглинати відносно великі частинки та клітини і, як правило, не гинуть після фагоцитування. Цим вони відрізняються від мікрофагоцитів, що здатні поглинати відносно невеликі частки і, як правило, гинуть після фагоцитування.

Важливе значення цих імунокомпетентних клітин у розвитку запального процесу було підставою для вивчення здатності до фагоцитування золотистого стафілокока, виділеного з носоглотки дітей, хворих на кір. На сьогодні спалахи даного захворювання викликають особливе занепокоєння в контексті ускладнень, що виникають унаслідок зниження імунного статусу під впливом вірусу кору та активізації гноєтворної мікрофлори, зокрема стафілококової, стрептококової, пневмококової тощо. Стафілококи є одними із найбільш вивчених представників умовно-патогенних мікроорганізмів, які володіють вираженими інвазивними властивостями, суттєво пригнічують фагоцитоз, здатні до тривалої персистенції у середині фагоцитів.

Метою дослідження було визначити здатність до фагоцитування золотистого стафілокока, виділеного у дітей, хворих на кір, нейтрофільними гранулоцитами і моноцитами периферійної крові.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

Фагоцитарну реакцію оцінювали за допомогою наступних показників: активності фагоцитозу або відсотка фагоцитарноактивних лейкоцитів (КФ), індекса фагоцитозу (ІФ) – середньої кількості поглинутих мікробів на один фагоцит [5].

У процесі дослідження було сформовано дві групи: перша – дослідна (35 хворих на кір дітей віком від 5 до 17 років); друга – контрольна (зразки нормальної мікрофлори від практично здорових людей – 15 осіб). Матеріал із ротоглотки брали стерильним тампоном, досліджували його бактеріологічним методом. Кількісний склад бактерій відображали у кількості колонієутворювальних одиниць (КУО) в перерахунку на розведення дослідного матеріалу. Ідентифікацію мікроорганізмів проводили за стандартними схемами. Дослідження фагоцитозу – за методом Кост і Стенко. Принцип методу полягає у використанні здатності лейкоцитів поглинати і перетравлювати мікроорганізми для оцінки їх функціональної активності. Для виготовлення суспензії живих мікроорганізмів у пробірку з одноденною культурою мікробів вносили незначну кількість фізіологічного розчину, перемішували та переносили розведену культуру мікробів піпеткою у хімічну пробірку. Фізіологічним розчином доводили вміст пробірки до ступеня мутності бактерійного стандарту 1 млрд мікробних тіл в 1 мл. У відалівську пробірку вносили 1 капіляр 4 % цитрату натрію, 2 капіляри крові, 1 капіляр одноденної живої культури з 1 млрд мікробних тіл в 1 мл. Зразки інкубували в термостаті при 37 ^{0}С протягом 1 год. Виготовляли на предметних скельцях тонкі мазки, фіксували та фарбували за Романовським – Гімзою. У пофарбованих мазках підраховували 100 лейкоцитів по периферії мазка із імерсійною системою. Відмічали відсоток фагоцитуючих нейтрофілів – показних фагоцитарної активності та середню кількість мікроорганізмів у кожному із фагоцитуючих лейкоцитів – фагоцитарний індекс [5].

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ

Результати вивчення здатності до фагоцитування *S. aureus* наведені в таблиці. Під час дослідження було виявлено, що вагому роль в процесі фагоцитозу відіграють нейтрофільні гранулоцити. Фагоцитарна активність нейтрофілів відносно культури *S. aureus*, виділеної у дітей, хворих на кір, нижча на 46,9 %, моноцитів – на 38, 8 % порівняно із групою здорових осіб. Також спостерігалося зниження фагоцитарного індексу в фагоцитуючих лейкоцитів відносно культури *S. aureus*, виділеної у дітей, хворих на кір: нейтрофілів – на 31,7 %, моноцитів – на 38,6 %.

Перспективами подальших досліджень є продовження вивчення особливостей функціонування клітинної ланки неспецифічної резистентності організму залежно від вираженння патологічного процесу.

ISSN 2706-6282(print)
ISSN 2706-6290(online)

Таблиця. Результати вивчення здатності до фагоцитування *S. aureus*

Фагоцитуюча клітина	Показник	Одиниця виміру	Хворі на кір (n=35)	Практично здорові особи (контрольна група) (n=15)
Нейтрофіли	Фагоцитарна активність	%	54,3	79,8
	Фагоцитарний індекс	ум. од.	5,8	7,7
Моноцити	Фагоцитарна активність	%	55, 4	76, 9
	Фагоцитарний індекс	ум. од.	6, 1	8, 7

ВИСНОВКИ

Зниження здатності до фагоцитування культури золотистого стафілокока, виділеної у дітей, хворих на кір, фагоцитуючими клітинами у дослідній групі, очевидно спричинено наявністю факторів вірулентності збудника, що суттєво пригнічують фагоцитоз та зумовлюють здатність мікроорганізму до тривалої персистенції у середині фагоцитів.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Абул К. Аббас Основи імунології: функції та розлади імунної системи : навч. посіб. / Абул К. Аббас, Ендрю Г. Ліхтман, Шив Піллай – пер. 6-го англ. вид. [наук. ред. пер.: Чоп'як В.] – К. : ВСВ «Медицина», 2020. – 328 с.

2. Анохин В. А. Стафилококковая инфекция у детей и подростков / В. А. Анохин // Практическая медицина. – 2008. – № 7(31). – С. 8–14.

3. Веклич К. А. Елімінація вірусу кору: вирішення питання та майбутні виклики / К. А. Веклич // Міжнародний медичний журнал. – 2019. – № 3. – С. 83–88.

4. Характеристика стафілококів та їх роль у патології дітей / М. А. Гарифуліна, О. С. Воронкова, Т. М. Шевченко, А. І. Вінніков // Вісник Дніпропетровського університету. Біологія, медицина. – 2014. – № 5 (9)12. – С. 115–120.

5. Лабинская А. С. Общая и санитарная микробиология с техникой микробиологических исследований : уч. пособ. – 4-изд. / А. С. Лабинская, Л. П. Блинкова, А. С. Ещина. – М. : Лань-Пресс, 2020. – 592 с.

6. Сравнительная характеристика гуморального имунного ответа у больных ангинами и инфекциями мягких тканей стафилококковой (группы а) этиологии / Д. А. Клейменов, Е. В. Глушкова, Н. Ф. Дмитриева [и др.] // Медицинский альманах. – 2012. – № 3. – С. 144–147.

7. Холодна Л. С. Імунологія : підручник / Л. С. Холодна, Г. А. Любченко, Д. М. Говорун. – К. : ВПЦ «Київський університет», 2017. – 350 с.

8. Bhattacharya G. Exposure to sub-inhibitory concentrations of gentamicin, ciprofloxacin and cefotaxime induces multidrug resistance and reactive oxygen species generation in meticillin-sensitive Staphylococcus aureus / G. Bhattacharya, D. Dey, S. Das, A. Banerjee // J. Med. Microbiol. – 2017. – Vol. 66 (6). – P. 762–769.

REFERENCES

1. Abul KAbbas, Andrew HH. Lichtman, and Shiv Pillai Basic Immunology 6th Edition. Elsevier; 2020.

2. Anokhyn VA. [Staphylococcal infection in children and teenagers]. Prakt med. 2008;7(31): 8-14. Russian.

3. Veklych KA. [Elimination of the measles virus: solving the issues and future challenges]. Mizhnar med. 2019;3: 83-8. Ukrainian.

4. Haryfulina MA, Voronkova OS, Shevchenko TM, Vinnikov AI. [Characteristics of staphylococci and their role in pathology of children]. Visn Dnipropet univer: Biol, med. 2014;5(9)12: 115-20. Ukrainian.

5. Labynskaia AS, Blynkova LP, Eshchyna AS. General and sanitary microbiology with the technique of microbiological research: textbook. manual, 4-ed. [Общая и санитарная микробиология с техникой микробиологических исследований: уч. пособие] Moscow: Lan-Press; 2020. Russian.

6. Kleimenov DA, Hlushkova EV, Dmytryeva NF, Eshchyna AS, Tymofeev YuM, Aksenova AV, et al. [Comparative characteristics of the humoral immune response in patients with tonsillitis and soft tissue infections of staphylococcal (group a) etiology]. Med alman. 2012;3: 144-7. Russian.

7. Kholodna LS, Liubchenko HA, Hovorun DM. Immunology: a textbook. [Імунологія: підручник] Kyiv: VPTs, Kyiv University; 2017. Ukrainian.

8. Bhattacharya G, Dey D, Das S, Banerjee A. Exposure to sub-inhibitory concentrations of gentamicin, ciprofloxacin and cefotaxime induces multidrug resistance and reactive oxygen species generation in meticillin-sensitive Staphylococcus aureus. J Med Microbiol. 2017;66(6): 762-9. Available from: https: // doi.org/ 10.1099/jmm.0.000492.

Отримано 09.04.21