Бактерии и полисахаридные соединения в пыли жилых помещений г. Москвы

Ахапкина И. Г., канд. биол. наук, ведущий научный сотрудник ФГБУ «НИИ вакцин и сывороток им. И. И. Мечникова» РАМН, 105064, Москва, Малый Казенный пер., 5а

При попадании в помещения значительная часть бактериальной флоры становится элементом наполнения бытовой пыли. Поэтому пыль является наиболее подходящим объектом для выявления возможной корреляции между общей бактериальной обсемененностью и концентрацией полисахаридных соединений (ПС), способных индуцировать неоднозначный иммунный ответ макроорганизма. В результате проведенного исследования показано, что содержание ПС в образцах пыли колебалось в пределах от 0,3 до 96 мкг/г пыли, при этом увеличение количества ПС в домашней пыли связано с повышением встречаемости в образцах грам-отрицательных палочковидных бактерий. Однако прямой корреляции между содержанием ПС и общей бактериальной обсемененностью пыли не выявлено. Содержание микробов в пыли достаточно разнилось в пределах от $2x10^3$ до $1x10^9$ НВЧК/г пыли.

Ключевые слова: полисахариды, бактерии, окружающая среда, домашняя пыль, гиперчувствительность.

Микроорганизмы окружающей среды привлекают все большее внимание исследователей своей способностью оказывать на макроорганизм не только инфекционное, но и иммуномодулирующее действие. В частности одним из объяснений резкого увеличения количества людей с гиперчувствительностью является недостаточная микробная стимуляция [14]. Даже при остром инфекционном процессе постепенно начинают вырабатываться противовоспалительные цитокины, вследствие чего активируется Th2-тип иммунного ответа – аллергический иммунный ответ. Более того, некоторые микроорганизмы продуцируют так называемые суперантигены, которые запускают синтез цитокинов, приводящий к снижению противоинфекционной защиты и развитию хронического процесса [5, 7, 12]. Как следствие часто наблюдается проявление или усиление аллергических реакций (гиперчувствительности). Большой интерес вызывают элементы строения клеточных стенок микроорганизмов полисахаридной природы – глюканы, маннаны, липополисахариды (ЛПС). Данные соединения обладают пирогенными свойствами, т. е. способны индуцировать выработку цитокинов воспаления. Основным, но не единственным, источником полисахаридных соединений (ПС) в помещениях является бактериальная флора – источник ЛПС. Причем действие ЛПС на организм человека неоднозначно. Например, наряду с установленной способностью ЛПС стимулировать выработку IL12 – цитокина противоинфекционного иммунного ответа (Th-1), ЛПС способны провоцировать симптомы астмы [7]. А при совместном попадании на слизистую поверхность носовой полости способны усиливать действие аллергенов клещей домашней пыли [10]. Более того, воздействие ЛПС на макроорганизм является доза-зависимым процессом. Низкие дозы ЛПС (0,1 мкг) индуцируют Th2-тип иммунного ответа при одновременном введении аллергена, а высокие дозы ЛПС (100 мкг) – Th1-тип иммунного ответа [9]. Следовательно, изучение количественных характеристик бактериальной обсемененности и содержания ПС в жилых и производственных помещениях весьма актуально.

При попадании в помещения микроорганизмы и продукты их распада становятся элементами наполнения бытовой пыли. Поэтому, на наш взгляд, пыль является наиболее подходящим объектом для характеристики помещений с точки зрения бактериальной обсемененности и содержания ПС. Тем более что ранее была показана зависимость концентрации микроорганизмов в воздушной среде помещений от присутствия или отсутствия в них людей в момент отбора проб. Например, в аудиториях, офисах, жилых помещениях Рима концентрация бактерий в присутствии людей составляла 925–1225 КОЕ/м^3, 493 КОЕ/м^3, 2–182 КОЕ/м^3 соответственно, а в отсутствие людей – 190–315 КОЕ/м^3, 126 КОЕ/м^3, 66–80 КОЕ/м^3 [15].

В связи с вышесказанным целью исследования было выявление корреляции между концентрацией соединений полисахаридной природы, способных подвергаться полимеризации в присутствии Lal-реагента, и общей бактериальной обсемененностью пыли жилых помещений г. Москвы.

Материалы и методы

В 80 квартирах г. Москвы были собраны комплексные образцы пыли с постели и постельных принадлежностей, пола около кровати и мягкой мебели. Пыль собирали по инструкции, утвержденной Госсанэпиднадзором Минздрава России [9]. Образцы пыли до проведения анализа хранили 2–4 недели при –20°С. Количественное определение содержания бактерий в пыли проводили при помощи метода предельных разведений [3]. 10 мг пыли помещали в 1 мл стерильного физиологического раствора, перемешивали в течение 1 часа при комнатной температуре, затем готовили пятикратные разведения, 100 мкл каждого разведения вносили в пробирки с 10 мл тиогликолевой среды (НПО «Питательные среды», г. Махачкала). Посевы инкубировали 10 суток при 37°С. Визуальный контроль проводили ежедневно. Наиболее вероятное число микробных клеток (НВЧК/г пыли) определяли по таблице Мак-Креди [3]. Тинкториальные характеристики смешанных культур определяли путем окрашивания мазков по Граму. Определение содержания ПС проводили при помощи гель-тромб-теста по прилагаемой инструкции производителя «Lal-тест» (Associates of Cape Cod Inc.) и ОФС 42-0002-00. Чувствительность Lal-реактива составляла 0,03 ЕЭ/мл. Содержание ПС определяли в пределах от 0,03 до 0,3 мкг/г пыли, от 0,3 до 3 мкг/г пыли, от 3 до 6 мкг/г пыли, от 6 до 9 мкг/г пыли, от 9 до 12 мкг/г пыли, от 9 до 15 мкг/г пыли, от 15 до 30 мкг/г пыли от 30 до 96 мкг/г пыли. Для статистической обработки данных использовали верхние предельные значения содержания ПС. Статистический анализ проводили при помощи программы Statistica 6.

Результаты и обсуждение

В окружающей среде бактерии представлены в значительном количестве и в большом разнообразии. Поэтому для выявления НВЧК была использована среда для контроля стерильности (тиогликолевая среда), способная обеспечить рост бактерий, различных по типу дыхания. При

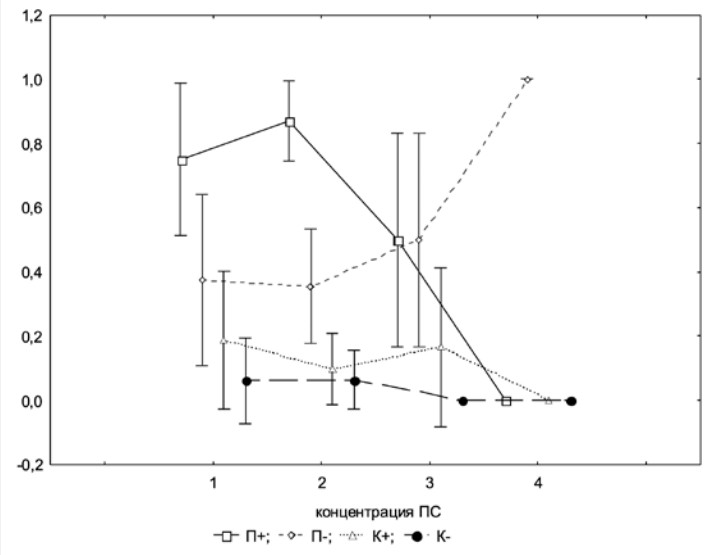

Рис. Численность различных бактерий
(**П+** – грамм-положительные палки;
П– – грам-отрицательные палки;
К+ – грамм-положительные кокки;
К– – грамм-отрицательные кокки) в зависимости от концентрации ПС в домашней пыли (1 – 0,3 мкг/г ; 2 – 3 мкг/г; 3 – 6 мкг/г; 4 – 30 мкг/г пыли)

визуальном контроле было отмечено, что в образцах пыли присутствовали бактерии с различиями в характере роста (придонный, пристеночный или поверхностный), уровне роста, способности к образованию колоний в полужидкой среде и газообразованию. Анализ мазков посевов показал, что в большинстве случаев в одном образце домашней пыли присутствовали грамположительные и грам-отрицательные бактерии одновременно. На рисунке представлено распределение палочковидных и кокковидных грамположительных и грам-отрицательных бактерий в образцах пыли, в которых содержание ПС не превышало указанных величин. Как видно из данных, увеличение количества ПС в домашней пыли связано с повышением встречаемости в образцах грам-отрицательных палочковидных бактерий. Кокковидная флора, по-видимому, в нашем случае не оказывала существенного влияния на количество ПС в пыли.

Метод предельных разведений достаточно удобен для одноэтапного определения количества столь разных по своим свойствам бактерий в одном образце одновременно. Конечный результат является расчетной величиной, поэтому

Таблица

Частота встречаемости предельных значений содержания ПС в образцах домашней пыли и соответствующие им предельные значения НВЧК

Содержание ПС (мкг/г пыли)	Численность бактерий (НВЧК/г пыли)		Количество образцов пыли	
	min	max	абсолютное (n)	В %
0,3	$2x10^5$	$1x10^9$	16	20
3,0	$2x10^3$	$1x10^9$	31	38,75
6,0	$8x10^4$	$5x10^8$	12	15
9,0	$8x10^4$	$1x10^9$	3	3,75
15,0	$1x10^4$	$2x10^7$	4	5,0
30,0	1x105	$2x10^7$	10	12,5
96,0	$4x10^6$	$5x10^8$	4	5,0

не требуется дополнительная статистическая обработка результатов измерения числа бактерий в каждом образце пыли. В нашем случае содержание микробов в образцах пыли достаточно разнилось в пределах от $2x10^3$ до $1x10^9$ НВЧК/г пыли. Полученные нами данные несколько затруднительно напрямую сравнивать с данными исследований, проведенных в странах Центральной и Восточной Европы, поскольку количество бактерий определяли в воздушной среде. Предложены предельные значения содержания бактерий и эндотоксина в жилых помещениях – $5x10^3$ КОЕ/м^3 и 5нг/м^3 (50EU) соответственно, в производственных помещениях допустимы значения – $100x10^3$ КОЕ/м^3 и 200 нг/м^3 (2000EU) [11]. Можно заметить, что проведенный нами ранее сравнительный анализ обсемененности воздуха и пыли жилых помещений показал, что количественная составляющая обсемененности воздушной среды не зависит от времени года, в то время как обсемененность пыли помещений подвержена сезонным колебаниям [2].

Содержание ПС в образцах пыли колебалось от 0,3 до 96 мкг/г пыли. В таблице 1 представлены данные частоты встречаемости ПС различного содержания в исследованных образцах домашней пыли. В основном содержание ПС не превышало 6 мкг/г пыли, причем чаще содержание ПС не превышало 3 мкг/г пыли. Однако в 12,5% жилых помещений содержание ПС было на порядок выше среднего показателя. Практически всем выделенным значениям ПС соответствовало несколько вариантов обсемененности пыли. Так, например, при наиболее высоком значении НВЧК в пыли определялось 0,3, 3 и 9 мкг ПС/г пыли, а при наиболее низком – 6 мкг ПС/г пыли. Возможно, это обусловлено выбранным методом определения содержания ПС. При сравнении данных хроматографического анализа образцов пыли с данными определения активности эндотоксина в этих же образцах, полученных при помощи Lal-теста, было показано, что длинноцепочечные жирные кислоты (C_{16-18}) преобладают в эндотоксине домашней пыли по сравнению с более короткими ЖК (C_{10-14}), но активность ЭД положительно коррелировала с короткоцепочечными ЖК [13]. Соответственно, при использовании Lal-теста можно недооценить общую экспозицию ЛПС. Однако Andersson с сотрудниками было показано, что с острой воспалительной реакцией связано присутствие в окружающей среде ЛПС, содержащих именно 3-OHC_{14} ЖК [6]. Т. е. получение данных для оценки биореактивности помещений при помощи Lal-теста вполне допустимо.

Ответная реакция макроорганизма на любое внешнее воздействие зависит от таких значимых параметров, как генетически обусловленная реактивность организма, иммунная активность организма в момент контакта, количественная и качественная характеристики воздействующего агента. Например, было показано, что активность воспаления при введении эндотоксина зависит от фенотипа человека – при фенотипе CC отмечают уровень IL6 в два раза более высокий, чем при TT [4]. Также при изучении связи между мутациями TLR-4 (D299G и T399I) и уровнем эндотоксина в окружающей среде было отмечено, что у взрослых носителей мутаций высокое содержание эндотоксина проявляло протективный эффект на бронхиальную реактивность [16].

В нашем исследовании мы попытались выявить взаимосвязь между обсемененностью пыли жилых помещений бактериями и содержанием ПС. Как видно из представленных результатов прямой корреляции между содержанием ПС и общей бактериальной обсемененностью пыли не было выявлено. Учитывая, что жизнеспособные микроорганизмы и продукты их распада могут оказывать на макроорганизм не одинаковое действие, мы полагаем, что для получения более полной характеристики биологической реактивности жилых и других помещений необходимо определять, как общую бактериальную обсемененность, так и содержание ПС.

Список использованной литературы

1. Акарологическое и микологическое обследование помещений для профилактики аллергических заболеваний. Методические рекомендации. Москва. – 1999.

2. Ахапкина И. Г., Герасимова С. И., Плотникова Н. В. и др. Сравнительная характеристика микробной обсемененности воздуха и пыли городских жилых помещений//Дез. дело. – 2009. – №1. – С.28-30.

3. Пименова М. Н., Гречушкина Н. Н., Азова Л.Г. Руководство к практическим занятиям по микробиологии. Из-во Моск. Ун-та. 1971. – 221 с.

4. Титов В. Н. С-реактивный белок – вектор переноса жирных кислот к клеткам, которые непосредственно реализуют синдром системного воспалительного ответа//Клин. лаб. диагн. – 2008. – № 6. – С. 3-13.

5. Alouf J. E., Muller-Alouf H. Staphylococcal and streptococcal superantigens: molecular, biological and clinical aspects//Int. J. Med. Microbiol.. – 2003. – V.292, N7-8. – P. 429-440.

6. Andersson A. M., Weiss N., Rainey F., Salkinoja-Salonen M. S. Dust-borne bacteria in animal sheds, schools and children's day care centres//J. Appl. Microbiol. – 1999. – N 86. – P. 622-634.

7. Biaze M. El., Boniface S., Koscher V. et. al. T cell activation, from atopy to asthma: more a paradox than a paradigm//Allergy. – 2003. – N58. – P. 844-853.

8. Buslau M., Kappus R., Gerlach D. et al. Streptococcal and staphylococcal superantigens (ETA, SEB): presentation by human epidermal cell and induction of autologious T-cell proliferation in vitro//Acta. Derm. Venerol. (Stockh). – 1993. – N73. – P. 94-96.

9. Eisenbarth S. C., Piggott D. A., Huleatt J. W. et al. Lipopolysaccharide-enhanced, Toll-like receptor 4-dependent T helper cell type 2 responses to inhaled antigen//J. Exper. Med. – 2002. – V. 196, N12. – P. 1645-1651.

10. Eldridge M., Peden D. Allergen challenge enhance LPS-induced nasal inflammation//J. allergy Clin. Immunol. – 2000. – V. 105, N1. – Pt.2. – S81.

11. Gorny R. L., Dutkiewicz J. Bacterial and fungal aerosols in indoor environment in Central and Eastern European countries//Ann. AgricEnviron Med. – 2002. – V. 9, N1. – P. 17-23.

12. Gjertsson I., Foster S., Tarkowski A. Polarization of cytokine response in B- and T-lymphocytes during staphylococcus aureus infection//Microb. Pathog. – 2003. – V.35, N3. – P. 119-124.

13. Park J. H., Szponar B., Larsson L. et al. Characterization of lipopolysaccharides present in settled house dust//Appl. Environ. Microbiol. – 2004. – V. 70, N1. – P. 262-267.

14. Prioult G., Nagler-Anderson C. Mucosal immunity and allergic responses: lack of regulation and/or lack microbial stimulation?//Immunol. Rew. – 2005. – V.206, N1. – P. 204-218.

15. Sessa R., Di P. M., Schiavoni G. et al. Microbiological indoor air quality in healthy buildings//New Microbiol. – 2002. – V25, N1. – P. 51-56.

16. Werner M., Topp R., Wmmer K., et al. TLR-4 gene variants modify endotoxin effects on asthma//J. Allergy Clin. Immunol. – 2003. – N112. – P. 323-330.

The bacteria and the polysaccharide compounds in dust in Moscow dwellings

Akchapkina I.G., Cand Sci.(Biol) Federal government budgetary establishment Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera RAMS, 105064, Moscow, Malyy Kazennyy per., 5a

A significant part of bacterial flora becomes an element of house dust at ingress indoors. Therefore dust is the most convenient object to reveal the probable correlation between total bacterial contamination and concentration of the polysaccharides, being capable to induct ambiguous immune answer of macroorganism. As a result of the carried out research it was shown, that the contents of the polysaccharides in dust samples ranged from 0,3 up to 96 mcg/g of dust, and the increase of the polysaccharides quantity of in home dust is associated with increasing of frequency of Gram-negative rod-shaped bacteria occurrence in the samples. However of direct correlation between the contents of the polysaccharides and total bacterial contamination of dust wasn't found.. Bacterial content in the house dust is quite different and ranged from $2x10^3$ up to $1x10^9$ MPNC/g (the most probable number of the microbe cells) of the dust.

Key words: polysaccharides, bacteria, environment, home dust, hypersensitivity.