

## МИКРОБИОЛОГИЯ / MICROBIOLOGY

DOI: <https://doi.org/10.23670/IRJ.2023.135.42>

## СОСТАВ МИКРОБИОТЫ ГЛОТКИ У СЕРОПОЗИТИВНЫХ К АНТИГЕНАМ ТОКСОКАР ЛИЦ

Научная статья

Канина И.В.<sup>1,\*</sup>, Новак А.И.<sup>2</sup>, Евдокимова О.В.<sup>3</sup><sup>1</sup>ORCID : 0000-0002-8419-1697;<sup>1,2,3</sup>Рязанский государственный медицинский университет, Рязань, Российская Федерация

\* Корреспондирующий автор (kanina.irina1987[at]yandex.ru)

**Аннотация**

Целью исследования послужило изучение состава микробного сообщества условно здоровых добровольцев с положительными тестами на антитела к возбудителю токсокароза (anti-Toxocara IgG+) в иммуноферментном анализе. В качестве объекта исследования использовали мазки орофарингеального биотопа от 85 добровольцев после предварительного проведения скрининговых исследований сывороток крови методом иммуноферментного анализа. На основании изучения микробиома обследуемых выявлены статистически значимые изменения микробного пейзажа серопозитивных к токсокарозу добровольцев ( $p < 0,05$ ). Наиболее распространённые таксоны представлены бактериями родов *Staphylococcus spp.* (69,41%), *Streptococcus spp.* (30,59%), *Bordetella spp.* и *Corynebacterium spp.* (74,12 и 80% соответственно). Нетипичная и условно-патогенная флора преимущественно представлена: *E. coli*, *Klebsiella spp.*, которая не выявлялась в контрольной группе обследуемых ( $n=53$ , anti-Toxocara IgG-).

**Ключевые слова:** серопозитивность, антитела, токсокароз, орофарингеальный биотоп, микробный пейзаж, микробиом.

## THE COMPOSITION OF THE PHARYNGEAL MICROBIOTA IN INDIVIDUALS SEROPOSITIVE FOR TOXOCARIASIS ANTIGENS

Research article

Kanina I.V.<sup>1,\*</sup>, Novak A.I.<sup>2</sup>, Yevdokimova O.V.<sup>3</sup><sup>1</sup>ORCID : 0000-0002-8419-1697;<sup>1,2,3</sup>Ryazan State Medical University, Ryazan, Russian Federation

\* Corresponding author (kanina.irina1987[at]yandex.ru)

**Abstract**

The aim of the study was to examine the composition of the microbial community of conditionally healthy volunteers with positive tests for antibodies to the causative agent of toxocarosis (Anti-Toxocara IgG+) in enzyme immunoassay. Oropharyngeal biotope swabs from 85 volunteers were used as the object of study after preliminary screening tests of blood sera by enzyme-linked immunosorbent assay. Based on the research of the microbiome of the subjects, statistically significant changes in the microbial landscape of volunteers seropositive to toxocarosis were detected ( $p < 0.05$ ). The most common pathogenic taxa were represented by bacteria of the genera *Staphylococcus spp.* (69.41%), *Streptococcus spp.* (30.59%), *Bordetella spp.* and *Corynebacterium spp.* (74.12 and 80%, respectively). Atypical and opportunistic flora was predominantly represented by: *E. coli*, *Klebsiella spp.* which was not detected in the control group of subjects ( $n=53$ , anti-Toxocara IgG-).

**Keywords:** seropositivity, antibodies, toxocarosis, oropharyngeal biotope, microbial landscape, microbiome.

**Введение**

В настоящее время значительное внимание уделяется подтверждению общепринятого положения о том, что микробиота разных биотопов организма человека находится в состоянии динамического равновесия. Влияние микроорганизмов-симбионтов на развитие физиологических изменений в состоянии макроорганизма является научно доказанным фактом, поэтому любые нарушения динамического равновесия приводят к изменениям микробного пейзажа всех биотопов организма человека. Не является исключением изменение микробного сообщества респираторного тракта при миграционных формах гельминтозов, поэтому микробный пейзаж разных его биотопов может служить маркёром сопутствующих бронхо-лёгочных патологий [1], [6], [7].

Токсокароз – зоонозная инвазия, характеризующаяся хроническим рецидивирующим течением, распространенная повсеместно на земном шаре с преобладанием в регионах с низким уровнем санитарной культуры и теплым климатом. Согласно литературным данным [7], в южных широтах (25°) в странах Бразилии серопозитивность к антигенам токсокар составила 5,31%, уровень антител у населения стран Ближнего Востока (18°-30° северной широты) достигает от 51% до 80%, на территориях с 20° по 40° северной широты – в среднем 26,3%. Возбудитель – *Toxocara canis*, нематода семейства *Anisakidae*, обладает уникальными способностями к персистенции в организме паразитического хозяина. В ходе миграции и инкапсуляции в тканях личинки секретируют метаболиты, приводящие к сенсibilизации организма человека, развитию очагов воспаления и изменению видового состава микробиома соответствующих биотопов. Помимо этого личинки способны инокулировать представителей кишечной микрофлоры с последующим транспортом в органы с током крови [2], [3], [4]. Таким образом, разнообразие микробиоты респираторного тракта может изменяться как посредством специфического влияния на регуляторное звено иммунной системы, так и путём транслокации кишечной микрофлоры [1], [2], [3]. При этом дисбиотические изменения микробиома кишечника, сопутствующие токсокарозу, сопровождаются замещением индигенной микрофлоры респираторного тракта на

нехарактерные для биотопа виды микроорганизмов. Наиболее часто регистрируются грамотрицательные энтеробактерии и коагулазопозитивные стафилококки [2], [3], [4], [5].

В норме нижние отделы респираторного тракта колонизированы представителями родов *Pseudomonas*, *Streptococcus*, *Prevotella*, *Fusobacterium*, *Veillonella* в количестве  $2 \times 10^3$  КОЕ на  $1 \text{ см}^2$ . При этом согласно исследованиям E.S. Charlson [10, С. 957], состав микробиома нижних и верхних дыхательных путей идентичен вследствие микроаспирации основных представителей из оро- и назофарингеального биотопов. Незначительные изменения таксономического состава могут быть обусловлены индивидуальными особенностями макроорганизма [8], [9]. Согласно вышеизложенному, варибельность состава микробиома респираторного тракта у серопозитивных к токсокарам обследуемых в значительной мере может отличаться от такового клинически здоровых добровольцев.

Цель исследования – изучение качественного и количественного состава микробиоты слизистой оболочки задней стенки глотки у серопозитивных к токсокарам лиц.

### Методы и принципы исследования

Научная работа проводилась в 2021-2022 гг. на базе научно-исследовательской лаборатории кафедры микробиологии ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России. В работе использованы иммунологические, микробиологические и статистические методы анализа.

Биологические материалы отобраны случайно при плановом профилактическом осмотре обучающихся из стран Ближнего Востока 1-6 курсов РязГМУ. От 85 клинически здоровых добровольцев обоих полов получены сыворотки крови и орофарингеальные мазки. Все обследуемые информированы о ходе исследования и дали письменное согласие на изучение образцов материала. Цикл научных исследований одобрен ЛЭК ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России (протокол №2 от 07.10.2020 г.). Серопозитивность к токсокарам (наличие anti-Тохосара IgG) определяли с помощью тест-системы «Токсокара-IgG-ИФА-БЕСТ» (АО «Вектор-Бест», г. Новосибирск, Россия). По результатам серологического исследования сформирована контрольная группа (n=53) с отрицательными результатами ИФА на наличие антител к токсокарам. В основную группу (n=32) включены серопозитивные лица обоих полов. В дальнейшем анализе половую принадлежность и различия в возрасте обследуемых не учитывали. Критериями исключения из исследования служили отказ обучающегося и наличие катаральных явлений. Отбор биологического материала проводили методом мазков стерильным хлопковым тампоном в пробирке с транспортной средой Эймса со слизистой оболочки задней стенки глотки, избегая контакта с поверхностью миндалин, корня языка и мягкого нёба, согласно действующим нормативным документам. Первичный посев клинических изолятов осуществляли на высокоселективные питательные среды: желточно-солевой агар, кровяной агар (с добавлением 5% крови крупного рогатого скота), шоколадный агар, коринебакагар, бордетелагар, Сабуро-агар, агар Эндо (ФБУН ГНЦ ПМБ, г. Оболонск).

Выделение и определение микроорганизмов до рода проводили на основании изучения культуральных, морфологических, тинкториальных и некоторых биохимических свойств (согласно методическим рекомендациям «Методы бактериологического исследования условно-патогенных микроорганизмов в клинической микробиологии» от 19.12.1991 г.). Видовая идентификация в большинстве случаев не проводилась. Количество микроорганизмов (lg КОЕ/г) определяли путем подсчета количества колониеобразующих единиц.

Статистическая обработка результатов выполнена с использованием программы StatTech v. 3.1.7 (разработчик – ООО «Статтех», Россия, 23), процессора электронных таблиц «Microsoft Excel 2016». Достоверность различия показателей в совокупностях оценивали согласно бинарному t-критерию Стьюдента при  $p \leq 0,05$ .

### Основные результаты

В результате выполненных исследований установлен разнообразный таксономический состав микробиоты у серопозитивных и серонегативных к антигенам токсокар лиц с преобладанием родов *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Bordetella spp.* и *Corynebacterium spp.* Только у серопозитивных к антигенам токсокар обследуемых высеваны *Candida spp.* (18,75±6,90%), *Klebsiella spp.* (12,50±5,85%), *Neisseria spp.* (15,63±6,42%). Частота встречаемости и интенсивность колонизации микроорганизмами у серопозитивных и серонегативных к токсокарам обследуемых представлены в таблице. Заметны статистически значимые различия микробной контаминации в сравниваемых группах.

В опытной группе достоверно чаще встречались *Candida spp.*, условнопатогенные *Staphylococcus spp.* ( $p < 0,05$ ). Также высевались другие представители нетипичной и условно-патогенной флоры: *E. coli*, *Klebsiella spp.*, которые не отмечались в контрольной группе обследуемых (n=53, anti-Тохосара IgG)–. Бактерии рода *Streptococcus* составили 53,1%, что достоверно выше чем в контрольной группе (16,98%,  $p < 0,05$ ). При этом отмечалось значительное снижение количества негемолитических стрептококков относительно контрольной группы – 23,5% и 47,5% соответственно.

Таблица 1 - Состав микробного сообщества орофарингеального биотопа у серопозитивных и серонегативных к токсокарам лиц

DOI: <https://doi.org/10.23670/IRJ.2023.135.42.1>

Таксоны микроорганизмов	Частота встречаемости, %	Интенсивность контаминации, lg КОЕ/г	Частота встречаемости, %	Интенсивность контаминации, lg КОЕ/г
	основная группа (n=32)		контрольная группа (n=53)	
<i>Streptococcus β-hem+</i>	53,13±8,82	9,20±2,20*	16,98±5,16	4,80±2,50*
<i>Streptococcus γ-</i>	15,63±6,42	-	37,74±6,66	-

hem+				
<i>Staphylococcus spp.</i>	87,50±5,85	11,80±3,20*	58,42±6,77	3,89±2,00*
<i>Staphylococcus aureus</i>	78,13±7,31	6,70±0,30*	9,43±4,02	3,60±0,70*
<i>Neisseria spp.</i>	15,63±6,42	4,89±1,70*	0	0
<i>Klebsiella spp.</i>	12,50±5,85	3,50±1,10*	0	0
<i>Candida spp.</i>	18,75±6,90	3,75±0,71*	0	0
<i>E. coli</i>	37,50±8,56	3,40±1,60*	0	0
<i>Corynebacterium spp.</i>	87,50±5,85	5,30±2,70	66,04±6,51	4,20±2,90
<i>Bordetella spp.</i>	78,13±7,31	4,90±2,40	56,60 ±6,81	3,40±2,60

Примечание: \*  $p \leq 0,05$

Степень контаминации слизистой оболочки задней стенки глотки представителями микробиоты позволяет судить о физиологическом состоянии биотопа. В основной группе обследуемых ( $n=32$ , anti-Toxocara IgG+) доминирующая группа микроорганизмов представлена родом *Staphylococcus*. Интенсивность контаминации ими составила  $11,8 \pm 3,2$  lg КОЕ/г. В контрольной группе этот показатель значительно ниже –  $3,89 \pm 2,0$  lg КОЕ/г. Частота встречаемости стафилококков от общего числа штаммов в основной и контрольной группах – соответственно  $87,50 \pm 5,85\%$  и  $58,42 \pm 6,77\%$ . Доля *Staphylococcus aureus* с выраженной лецитиназной активностью среди выделенных штаммов: в основной группе –  $78,13 \pm 7,31\%$ ,  $6,7 \pm 0,3$  lg КОЕ/г; в контрольной –  $9,43 \pm 4,02\%$ ,  $3,6 \pm 0,7$  lg КОЕ/г. Отмечена достаточно высокая интенсивность контаминации  $\beta$ -гемолитическими бактериями рода *Streptococcus*: в основной группе –  $9,2 \pm 2,2^*$  lg КОЕ/г, в контрольной –  $4,8 \pm 2,5^*$  lg КОЕ/г. Частота встречаемости в основной группе отмечена на уровне  $53,13 \pm 8,82\%$ , что достоверно выше, чем в контрольной –  $16,98 \pm 5,16\%$  ( $p < 0,05$ ). При этом в контрольной группе преимущественно регистрируются негемолитические стрептококки –  $37,74 \pm 6,66\%$  против  $15,63 \pm 6,42\%$  у серопозитивных к токсокарам лиц. Степень контаминации слизистой оболочки задней стенки глотки грибами рода *Candida spp.* в среднем составила  $3,75 \pm 0,71$  lg КОЕ/г у  $18,75 \pm 6,90\%$  лиц из основной группы. В группе серонегативных к антигенам токсокар обследуемых дрожжеподобные грибы практически не выявляли.

У серопозитивных к токсокарам обследуемых достоверно чаще встречались условно-патогенные *Staphylococcus spp.*, в том числе *Staphylococcus aureus* ( $p < 0,05$ ),  $\beta$ -гемолитические представители рода *Streptococcus*. Высеивались другие представители нетипичной и условно-патогенной флоры: *E. coli*, *Klebsiella spp.*, *Neisseria spp.* при интенсивности контаминации  $3,40 \pm 1,60$ ;  $3,50 \pm 1,10$  и  $4,89 \pm 1,70$  lg КОЕ/г и встречаемости  $37,50 \pm 8,56\%$ ;  $12,50 \pm 5,85\%$ ;  $15,63 \pm 6,42\%$  соответственно. Указанные таксоны не зарегистрированы у обследуемых в контрольной группе, с отрицательными результатами ИФА на наличие антител к *Toxocara canis*. К постоянным обитателям слизистой зева относятся *Staphylococcus spp.*, *Streptococcus spp.*; к дополнительным – *Corynebacterium spp.* (соответственно в основной и контрольной группах –  $87,50 \pm 5,85\%$  и  $66,04 \pm 6,51\%$ ), *Bordetella spp.* ( $78,13 \pm 7,31\%$  и  $56,60 \pm 6,81\%$ ). Колонизация представителями данных родов выявлена в достаточно сходных количествах. Не характерными для серонегативных к токсокарам лиц таксонами оказались виды из родов *Neisseria*, *Klebsiella*, *Candida*, а также представители семейства *Enterobacteriaceae*. Вариабельность микробного сообщества орофарингеального биотопа в обеих группах ассоциирована с постоянным смешиванием и микроаспирацией индигенной флоры ротовой полости и носоглотки [2].

Таким образом, анализ состава микробного пейзажа изучаемого биотопа выявил различия в частоте встречаемости и степени контаминации отдельными таксонами микроорганизмов слизистой оболочки задней стенки глотки, что позволяет продолжать исследования в данной области. В ходе работы в основной группе обследуемых выявлена избыточная колонизация слизистой оболочки изучаемого биотопа индигенной микрофлорой с преобладанием несвойственных данной экологической нише микроорганизмов, что подтверждается данными различных исследователей [2], [3], [4]. Изменения микробного состава респираторного тракта и активности процесса контаминации слизистых оболочек при миграционных формах гельминтозов, в частности при токсокарозе, в литературных источниках практически не описаны, поэтому представляют неоспоримый научный интерес и требуют дальнейшего изучения.

### Заключение

Состав микробного сообщества орофарингеального биотопа (слизистой оболочки задней стенки глотки) у серопозитивных к токсокарам (anti-Toxocara IgG+) обследуемых характеризуется статистически достоверными отличиями от серонегативных лиц, что позволяет судить о системных изменениях иммунной реактивности и снижении иммунного статуса при миграционных формах гельминтозов. В представленном исследовании впервые изучен микробный пейзаж одного из биотопов респираторного тракта у лиц с положительными результатами в иммуноферментном анализе на антитела к возбудителю токсокароза. Полученные результаты свидетельствуют о необходимости дальнейшего изучения изменений микробного сообщества респираторного тракта у серопозитивного к токсокарозу контингента в качестве маркёров бронхо-лёгочных патологий, обусловленных миграцией личинок *Toxocara canis*.

**Конфликт интересов**

Не указан.

**Рецензия**

Все статьи проходят рецензирование. Но рецензент или автор статьи предпочли не публиковать рецензию к этой статье в открытом доступе. Рецензия может быть предоставлена компетентным органам по запросу.

**Conflict of Interest**

None declared.

**Review**

All articles are peer-reviewed. But the reviewer or the author of the article chose not to publish a review of this article in the public domain. The review can be provided to the competent authorities upon request.

**Список литературы / References**

1. Ильясова Т. В. Микробные ассоциации возбудителей заболеваний дыхательных путей у детей до 17 лет с заболеваниями органов дыхания при сопутствующем дисбиозе кишечника / Т.В. Ильясова // Бюллетень ВСНЦ СО РАМН. — 2007. — № 3. — С. 23-26.
2. Зольникова О.Ю. Микробиота кишечника и дыхательных путей как патогенетическое звено бронхиальной астмы : дис. ... д-ра мед. наук : 14.01.04 / Зольникова Оксана Юрьевна; Первый москв. гос. мед. ун-т им. И.М. Сеченова. — Москва, 2020. — 207 с.
3. Зотина Г.П. Особенности поражения органов дыхания при паразитарных инвазиях / Г.П. Зотина // Практическая медицина. — 2011. — № 3. — С. 79-80.
4. Федосенко С.В. Характеристика состава орофарингеальной микробиоты у больных с ХОБЛ / С.В. Федосенко, Л.М. Огородова, А.С. Попенко [и др.] // Современные проблемы науки и образования. — 2015. — № 3. — С. 178-182.
5. Канина И.В. Изучение изменений микробиома верхних дыхательных путей у серопозитивных к *Toxocara canis* добровольцев / И.В. Канина // Неделя Науки: материалы международного молодежного форума. — Ставрополь: Изд-во Ставропольского ГМУ, 2021. — С.486-488.
6. Наумкина Е.В. Особенности микробиоты дыхательных путей при заболеваниях респираторного тракта / Е.В. Наумкина, Е.В. Матущенко, И.И. Калитина [и др.] // Бактериология. — 2017. — Том. 2. — № 3. — С. 16-20.
7. Никонова Е.Л. Микробиота: монография / Е.Л. Никонова, Е.Н. Попова. — М.: Изд-во «Медиа Сфера», 2019. — С. 249.
8. Канина И.В. Микробный пейзаж орофарингеального биотопа у серопревалентных к токсокарозу добровольцев / И.В. Канина, А.И. Новак, О.В. Евдокимова // Материалы первого Российского конгресса по медицинской микробиологии и инфектологии (Москва, 02 – 03 марта 2023 года). — М.: Изд-во «У Никитских ворот», 2023. — С. 100-101.
9. Hilty M. Disordered Microbial Communities in Asthmatic Airways / M. Hilty, C. Burke, H. Pedro [et al.] // PLoS One. — 2010. — № 5. — P. 857.
10. Charlson E.S. Topographical Continuity of Bacterial Populations in the Healthy Human Respiratory Tract // E.S. Charlson, K. Bittinger, A.R. Haas // Am J Respir Crit Care Med. — 2011. — № 184(8). — P. 957-963.

**Список литературы на английском языке / References in English**

1. Ilyasova T.V. Mikrobnye associacii vozbuditelej zabolevanij dyhatel'nyh putej u detej do 17 let s zabolevaniyami organov dyhaniya pri soputstvuyushchem disbioze kishechnika [Microbial Associations of Causative Agents of Respiratory Diseases in Children under 17 Years of Age with Respiratory Diseases with Concomitant Intestinal Dysbiosis] / T.V. Ilyasova // Byulleten' VSNC SO RAMN [Bulletin of the VSNC SO RAMS]. — 2007. — № 3. — P. 23-26. [in Russian]
2. Zolnikova O.Yu. Mikrobiota kishechnika i dyhatel'nyh putej kak patogeneticheskoe zveno bronhial'noj astmy [Microbiota of the Intestine and Respiratory Tract as a Pathogenetic Link in Bronchial Asthma] : dis. ... Doctorate in Medicine : 14.01.04 / Zolnikova Oksana Yurievna; First Moscow State Medical University named after I.M. Sechenov. — Moscow, 2020. — 207 p. [in Russian]
3. Zotina G.P. Osobennosti porazheniya organov dyhaniya pri parazitarnyh invaziyah [Features of the Defeat of the Respiratory System in Parasitic Invasions] / G.P. Zotina // Prakticheskaya medicina [Practical Medicine]. — 2011. — № 3. — P. 79-80. [in Russian]
4. Fedosenko S.V. Harakteristika sostava orofaringeal'noj mikrobioty u bol'nyh s HOBL [Characteristics of the Composition of the Oropharyngeal Microbiota in Patients with COPD] / S.V. Fedosenko, L.M. Ogorodova, A.S. Popenko [et al.] // Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya [Modern Problems of Science and Education]. — 2015. — № 3. — P. 178-182. [in Russian]
5. Kanina I.V. Izuchenie izmenenij mikrobioma verhnih dyhatel'nyh putej u seropozitivnyh k *Toxocara canis* dobrovol'cev [Study of Changes in the Microbiome of the Upper Respiratory Tract in Volunteers Seropositive to *Toxocara Canis*] / I.V. Kanina // Nedelya Nauki: materialy mezhdunarodnogo molodyozhnogo foruma [Week of Science: materials of the International Youth Forum]. — Stavropol: Publishing House of the Stavropol State Medical University, 2021. — P. 486-488. [in Russian]
6. Naumkina E.V. Osobennosti mikrobioty dyhatel'nyh putej pri zabolevaniyah respiratornogo trakta [Features of the Microbiota of the Respiratory Tract in Diseases of the Respiratory Tract] / E.V. Naumkina, E.V. Matushchenko, I.I. Kalitina [et al.] // Bakteriologiya [Bacteriology]. — 2017. — Vol. 2. — № 3. — P. 16-20. [in Russian]
7. Nikonova E.L. Mikrobiota: monografiya [Microbiota: monograph] / E.L. Nikonova, E.N. Popov. — M.: Publishing House "Media Sphere", 2019. — P. 249. [in Russian]
8. Kanina I.V. Mikrobnyj pejzazh orofaringeal'nogo biotopa u seroprevalentnyh k toksokarozu dobrovol'cev [Microbial Landscape of the Oropharyngeal Biotope in Volunteers Seroprevalent to Toxocariasis] / I.V. Kanina, A.I. Novak, O.V. Evdokimova // Materialy pervogo Rossijskogo kongressa po medicinskoj mikrobiologii i infektologii (Moskva, 02 – 03 marta

2023 goda) [Proceedings of the first Russian Congress on Medical Microbiology and Infectology (Moscow, March 02 - 03, 2023)]. — М.: Publishing House "At the Nikitsky Gates", 2023. — P. 100-101. [in Russian]

9. Hilty M. Disordered Microbial Communities in Asthmatic Airways / M. Hilty, C. Burke, H. Pedro [et al.] // PLoS One. — 2010. — № 5. — P. 857.

10. Charlson E.S. Topographical Continuity of Bacterial Populations in the Healthy Human Respiratory Tract // E.S. Charlson, K. Bittinger, A.R. Haas // Am J Respir Crit Care Med. — 2011. — № 184(8). — P. 957-963.