

## ИНФОРМАТИВНОСТЬ ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ И БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ САЛЬМОНЕЛЛ ПРИ ПРОГНОЗИРОВАНИИ ИСХОДА САЛЬМОНЕЛЛЕЗНОЙ ИНФЕКЦИИ

Установлена доминирующая роль факторов иммунитета в формировании реконвалесцентного сальмонеллезного бактерионосительства на основе анализа информативности персистентных свойств сальмонелл, показателей системного и местного иммунитета.

В основе инфекционного процесса, вызванного сальмонеллами лежат, сложные взаимоотношения между макро- и микроорганизмом, где патоген с комплексом биологических свойств, обеспечивающих ему внутриклеточное паразитирование [2], является малоуязвимым для воздействия иммунных механизмов и противоинфекционных мероприятий [13]. Защитная реакция макроорганизма (местная и системная) реализуется путем вовлечения факторов естественной резистентности и различных популяций иммунокомпетентных клеток с поэтапным развитием каскада иммунологических реакций [12]. В реализации иммунных механизмов на уровне интестинального тракта принимает участие лимфоидная ткань, ассоциированная со слизистой оболочкой кишечника, цитокины как факторы межклеточного взаимодействия, продукты секреции иммунокомпетентных и фагоцитарных клеток [10].

Одним из исходов сальмонеллезной инфекции является реконвалесцентное бактерионосительство (БН), в формировании которого могут играть роль как свойства возбудителя, так и иммунные механизмы защиты.

Целью исследования явилась оценка информативности параметров системного, местного иммунитета и биологических свойств сальмонелл на модели «паразит - хозяин» при сальмонеллезной инфекции.

### Материалы и методы

Иммунологическое и бактериологическое обследование было проведено у 181 больного с гастроинтестинальной формой сальмонеллеза, находившегося на лечении в Оренбургской муниципальной клинической инфекционной больнице. У 163 больных заболевание было вызвано *Salmonella enteritidis*, у остальных – *Salmonella typhimurium*. Реконвалесцентное БН *S. enteritidis*, диагностированное трехкратными повторными высевами сальмонелл из фекалий, было зарегистрировано у 18 больных сальмонеллезом

(10% обследованных, группа носителей). У оставшихся 163 больных в период реконвалесценции бактерионосительство не сформировалось.

Выделение и идентификацию культур проводили общепринятыми методами с использованием тест-систем ENTEROtest (Lachema, Чехия).

Серотипирование культур проводили с О- и Н- сыворотками (С.-Пб. НИИВС). У выделенных сальмонелл определяли антилизоцимную (АЛА), антикомплементарную (АКА), «антиинтерфероновую» (способность инактивировать препарат человеческого лейкоцитарного интерферона) (АИА) [2], антилактоферриновую активность (АЛФА) [4], способность инактивировать иммуноглобулины А (AIg(A)A), М (AIg(M)A), G (AIg(G)A) [9].

Количественную оценку параметров клеточного звена иммунного статуса обследуемых проводили путем иммунофенотипирования субпопуляций клеток периферической крови (CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, CD19<sup>+</sup>, CD14<sup>+</sup>, CD16<sup>+</sup>, CD56<sup>+</sup>, CD11b<sup>+</sup>, CD95<sup>+</sup>, HLA-DR<sup>+</sup>) с применением соответствующих моноклональных антител («Сорбент», Россия). Содержание циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК) в сыворотке крови исследовали в реакции преципитации с раствором полиэтиленгликоля, лизоцима – турбидиметрическим методом, альбумина – колориметрическим методом с бромкрезоловым зеленым («Dia Sys», Германия). С помощью ИФА определяли количество: секреторного IgA (sIgA), свободного секреторного компонента (SC), IgA, IgM, IgG, подклассов IgG1-4 («Полигност», Россия); IgE, лактоферрина («Вектор-Бест», Россия); цитокинов ИЛ1, ИЛ6, ИЛ8, ФНО $\alpha$ , («Cytimmune», США), ИФН $\gamma$ , ИЛ1-R $\alpha$ , ИЛ4 и С3 компонента комплемента («Цитокин», Россия). Исследовали фагоцитарный показатель (ФП), фагоцитарный индекс (ФИ), метаболическую активность нейтрофилов в тесте восстановления нитросинего тетразолия – НСТ – тест) [8]. Титр антител (АТ) к О-антигену сальмонелл (О-АГ) определяли в РПГА с эритроцитарным

сальмонеллезным диагностикумом (ГУП по производству бактериальных препаратов им. Г.Н. Габричевского, Россия).

Местный иммунитет оценивался по показателям, определяемым в слюне, собранной утром натощак, и копрофильтратах, получение которых проводилось по разработанной нами ранее методике [3]. Параметры местного иммунитета исследовались по методикам, использованным для определения аналогичных показателей в крови, при этом расчет концентрации анализируемых биологических субстанций производили на мг «общего» или высокомолекулярного белка (ВМБ) в соответствии с рекомендациями [11].

В целом, для оценки информативности параметров, значимых в формировании реконвалесцентного сальмонеллезного бактерионосительства, анализировались 78 признаков, определенных в период разгара инфекции. Для расчета информативности (мера Кульбака) исследуемых признаков использовали неоднородную «последовательную процедуру распознавания образов» [5]. Основными исходными параметрами для расчетов явились частоты встречаемости признаков (их градаций) в дифференцируемых группах (носители и неносители). Для количественных признаков (например, содержание популяций и субпопуляции лимфоцитов) выбор пороговых уровней для расчета информативностей производился, исходя из частоты встречаемости тех или иных значений в группах сравнения. Выбиралось такое пороговое значение признака, при котором наблюдались наибольшие отличия между группами по частоте встречаемости градации признака.

### Результаты

Из 78 анализируемых параметров 60 оказались информативными для оценки прогностической значимости в отношении развития реконвалесцентного БН (мера Кульбака  $>0,45$ ). Частоты встречаемости признаков, информативных в отношении прогноза развития БН, информативность и критерий Стьюдента представлены в таблице 1. Как видно из данных табл. 1 в группу десяти самых высокоинформативных показателей вошли следующие: высокий уровень IgG в копрофильтратах (4,24 ед.), низкие значения поздних активационных маркеров на клетках крови HLA-DR (3,82 ед.), низкое содержание рецепторного антагониста ИЛ1 в копрофильтратах (3,61 ед.), высокий уровень

АЛА возбудителя (3,36 ед.), низкая концентрация sIgA в слюне (3,31 ед.), высокий уровень АКА возбудителя (3,17 ед.), низкое содержание sIgA в сыворотке (3,13 ед.), низкое значение ИРИ (3,0 ед.), низкий уровень антител к О-АГ сальмонелл в слюне (2,97 ед.) и копрофильтратах (2,73 ед.).

Результаты анализа суммарной информативности показателей, объединенных в группы с учетом их принадлежности к свойствам сальмонелл или показателям иммунитета, представлены в таблице 2.

Из данных таблицы видно, что наибольший вклад в развитие бактерионосительства по величине суммарной информативности принадлежал показателям местного иммунитета (52,8 из 103,1 ед.), при этом более значимыми по суммарной информативности оказались показатели, определяемые в копрофильтратах (31,8 ед.) по сравнению со слюной (21,0 ед.). Показатели системного иммунитета, занимали второе место по значимости суммарной информативности (32,6 из 103,1 ед.), опережали группу признаков, характеризующих исследуемые свойства сальмонелл (17,7 ед.). Параметры клеточного и гуморального иммунитета имели примерно равную суммарную информативность (соответственно 16,9 и 15,7 ед.). Степень информативности изученных такое пороговое значение признака, при котором наблюдались наибольшие отличия между группами по частоте встречаемости градации признака, свойств сальмонелл убывала в ряду АЛА > АКА > АИА > А(IgM)А > > А(IgG)А > АЛфА > А(IgA)А.

В целом, результаты оценки информативности признаков, характеризующих свойства сальмонелл, системный и местный иммунитет, позволяют определить их вклад в развитие реконвалесцентного сальмонеллезного бактерионосительства.

### Обсуждение

Инфектологический подход в изучении сальмонеллезной инфекции, одним из вариантов которой является формирование реконвалесцентного сальмонеллезного бактерионосительства, базируется на анализе движущих сил инфекционного процесса, в частности, комплекса признаков, характеризующих биологические свойства возбудителя, состояние системного и местного иммунитета. С учетом этого для прогноза неблагоприятного исхода сальмонеллезной инфекции (развитие сальмонеллезно-

Таблица 1. Частота встречаемости (%) и информативность признаков (I) у больных в разгар сальмонеллезной инфекции

№	Признак	Градация	Частота (%), M±m		T	I	
			носители	неносители			
Показатели иммунограммы							
1	Лейкоциты крови $\times 10^9/\text{л}$		>6	53,8±13,8	38,1±6,1	1,04	0,22
2	Лимфоциты крови, %		>40	61,5±13,5	47,6±6,3	0,94	0,17
3	CD3, %	•	<50	53,8±13,8	17,7±4,9	2,46	1,32
4	CD19, %		<15	69,2±12,8	57,6±6,4	0,81	0,13
5	CD4, %	•	<40	76,9±11,7	46,8±6,3	2,27	0,87
6	CD8, %	•	>20	84,6±10	50,8±6,3	2,86	1,23
7	ИРИ	•	<2	92,3±7,4	42,6±6,3	5,11	3,00
8	CD14, %	•	<14	72,7±13,4	22,2±9,8	3,04	2,45
9	CD16, %	•	<40	91,7±8	68,2±9,9	1,84	0,83
10	CD56, %	•	<20	81,8±11,6	29,4±11,1	3,27	2,71
11	CD95, %	•	<15	63,6±14,5	25±10,8	2,14	1,39
12	CD11b %		<40	66,7±13,6	47,4±11,5	1,09	0,33
13	HLA-DR, %	•	<40	99,0±0	57,9±11,3	3,72	3,82
14	Незрелые нейтрофилы, %	•	<6	92,3±7,4	72,6±5,7	2,12	0,65
15	Зрелые нейтрофилы, %		>70	7,7±7,4	1,6±1,6	0,80	0,21
16	Моноциты, %	•	<1	69,2±12,8	38,7±6,2	2,15	0,84
17	Эозинофилы, %		>2	53,8±13,8	48,4±6,3	0,36	0,03
18	ФП, %		<40	7,7±7,4	3,2±2,2	0,58	0,09
19	ФИ, усл. ед.		<5	84,6±10	72,6±5,7	1,05	0,19
20	НСТ спонтанный, %	•	<15	92,3±7,4	70,2±6,1	2,32	0,78
21	НСТ стимулированный, %	•	<50	84,6±10	39,7±6,4	3,78	2,07
22	Индекс стимуляции НСТ	•	<5	76,9±11,7	47,5±6,4	2,21	0,83
23	ЦИК, ед		>40	99,0±0	93,5±3,1	2,07	0,23
24	IgA, г/л		<3	84,6±10	75,7±5,1	0,79	0,11
25	IgM, г/л	•	>1,7	69,2±12,8	50,0±6,0	1,36	0,34
26	IgG, г/л		>10	69,2±12,8	55,7±5,9	0,96	0,17
27	IgE, МЕ/л		>100	45,5±15,0	30±10,2	0,85	0,22
28	sIgA, мг/л	•	<10	99,0±0	63,4±7,5	4,86	3,13
29	SC, мг/л		<0,5	91,7±8,0	96,9±3,1	-0,61	0,12
30	IgG1, г/л		>6	55,6±16,6	47,1±12,1	0,41	0,06
31	IgG2, г/л	•	>2,3	77,8±13,9	42,1±11,3	1,99	1,22
32	IgG3, г/л	•	>1,2	55,6±16,6	10,5±7,0	2,50	2,31
33	IgG4, г/л	•	>0,7	44,4±16,6	21,1±9,4	1,23	0,56
34	Лактоферрин, нг/мл	•	<1800	91,7±8,0	54±7,0	3,54	1,83
35	СЗ, мкг/мл	•	<700	99,0±0	66,7±9,1	3,67	2,74
36	Антитела к О-АГ сальмонелл, Ig	•	<3	91,7±8,0	69,2±7,4	2,06	0,77
37	Лизоцим, мкг/мл	•	<3	66,7±13,6	45,5±10,6	1,23	0,74
38	Альбумин, г/л	•	<50	25±21,7	46,9±8,8	-0,94	0,46
39	ИЛ 6, пг/мл	•	>250	83,3±15,2	60±21,9	0,88	0,61
40	ИЛ8, пг/мл	•	>350	99,0±0	72,7±13,4	2,03	2,06

Продолжение таблицы 1

Показатели, определяемые в копрофилтрах							
41	Общий белок, мг		>0,11	23,1±11,7	38,4±5,7	-1,18	0,24
42	ВМБ, мг	•	<0,09	84,6±10,0	61,6±5,7	2,00	0,61
43	Альбумин, г/л	•	<3	72,7±13,4	33,3±9,6	2,37	1,41
44	Лизоцим, мкг/мг, белка	•	<30	92,3±7,4	54,9±5,5	4,06	1,86
45	Лактоферрин, нг/мг, белка	•	<30	92,3±7,4	55,6±5,2	4,06	1,81
46	IgA мг/г ВМБ	•	<50	84,6±10,0	59,1±6,1	2,18	0,74
47	Ig M, мг/г ВМБ	•	<10	7,7±7,4	26,2±5,5	-2,01	0,58
48	IgG мг/г ВМБ	•	>5	99,0±0	54,7±6,2	7,28	4,24
49	IgG1, мг/г ВМБ	•	>2,3	99,0±0	67,9±8,8	3,64	2,60
50	IgG2, мг/г ВМБ	•	>2	92,3±7,4	60,7±9,2	2,67	1,41
51	IgG3, мг/г ВМБ	•	>0,4	99,0±0	73,5±7,6	3,50	1,98
52	IgG4, мг/г ВМБ	•	>0,2	92,3±7,4	70,6±7,8	2,02	0,76
53	IgE, МЕ/мг ВМБ		>55	53,8±13,8	46,3±5,5	0,50	0,05
54	sIgA, г/г ВМБ	•	<1,5	92,3±7,4	66,3±5,1	2,90	1,02
55	SC, г/г белка	•	<0,3	92,3±7,4	54,1±5,8	4,07	1,93
56	Антитела к О-АГ сальмонелл, Ig	•	<0,5	84,6±10,0	32,7±6,3	4,38	2,73
57	С3, мкг/мг белка		<20	30,8±12,8	16,4±5,0	1,05	0,26
58	ИЛ4, нг/мг белка	•	<2,5	80±17,9	40±21,9	1,41	1,56
59	ИЛ1-Ra, нг/мг белка	•	<5	80±17,9	20±12,6	2,74	3,61
60	ИЛ6, пг/мг белка	•	<0,4	80±17,9	25±21,7	1,96	2,97
61	ИЛ8, пг/мг белка		<2,5	80±17,9	66,7±13,6	0,59	0,20
Показатели, определяемые в слюне							
62	"Общий белок", мг	•	<0,1	99±0,0	76,9±8,3	2,79	1,63
63	ВМБ, мг	•	<0,05	99±0,0	65,4±9,3	3,71	2,89
64	Лизоцим, мкг/мг белка	•	<20	66,7±27,2	18,8±9,8	1,66	2,25
65	Лактоферрин, мкг/мг белка	•	<50	99,0±0	66,7±13,6	2,45	2,74
66	sIgA, мг/мг белка	•	<10	99,0±0	61,9±10,6	3,60	3,31
67	SC, мг/мг белка	•	<3	75±15,3	25±12,5	2,53	2,39
68	Антитела к О-АГ сальмонелл, Ig	•	<0,5	80±12,6	25±21,7	2,19	2,97
69	С3, мкг/мг белка	•	<100	50±17,7	10±6,7	2,12	1,91
70	Альбумин, г/л	•	<0,5	90±9,5	61,1±11,5	1,94	1,09
Биологические свойства сальмонелл							
71	АЛА, чашечный метод, мкг/мл	•	>7	99,0±0	61,5±6,0	6,37	3,36
72	АЛА, фотометрический метод, мкг/мл/10D	•	>0,7	73,3±11,4	29,2±5,6	3,46	1,82
73	АИА, ед.	•	>0,3	99,0±0	71,2±5,6	5,17	2,23
74	АКА x 10 <sup>6</sup> антиЛЕК	•	>3	99,0±0	63,1±6,0	6,17	3,17
75	АЛФА, нг/мл	•	>6	73,3±11,4	39,4±6,0	2,63	1,06
76	a-IgA, мкг/мл	•	>0,5	6,7±6,4	30,3±8,0	-2,30	0,93
77	a-IgM, мкг/мл	•	>0,25	99,0±0	75,8±7,5	3,25	1,74
78	a-IgG, мкг/мл	•	>3,5	33,3±12,2	6,1±4,2	2,12	1,21

Примечание: С3 – С3-компонент комплемента, SC – свободный секреторный компонент, ВМБ – высокомолекулярный белок, ИРИ – иммунорегуляторный индекс (CD4/CD8), Нly+, Нly– – штаммы, бактерий с гемолитической активностью и без нее, Iac+, Iac– – штаммы кишечной палочки, ферментирующие и не ферментирующие лактозу; Т – критерий значимости Стьюдента; • – информативные признаки/

Таблица 2. Суммарные информативности признаков для прогнозирования бактерионосительства

Группы признаков	Суммарная информативность (ед.)
Показатели местного иммунитета: в копрофильтратах в слюне	52,8 31,8 21,0
Показатели системного иммунитета: клеточный иммунитет гуморальный иммунитет	32,6 16,9 15,7
Свойства возбудителя	17,7
Всего	103,1

го БН) информативные признаки (группы) можно ранжировать в виде следующего убывающего ряда: параметры местного иммунитета > параметры системного иммунитета > свойства возбудителя.

Высокая информативность параметров местного иммунитета, определяемых не только в копрофильтратах, но и в слюне, отражает взаимосвязь локальных представительств иммунной системы, ассоциированной с лимфоидной тканью ЖКТ. Свидетельством этого является установленный параллелизм в информативности ряда показателей, определяемых в слюне и копрофильтратах, в частности низкое содержание sIgA, свободного SC, АТ к О-АГ сальмонелл, лактоферрина. Выявленная высокая информативность данных признаков, определяемых в слюне и копрофильтратах, и характеризующих состояние локальной антимикробной защиты, позволяет рассматривать выявленный дефицит местного иммунитета как значимый фактор в формировании реконвалесцентного бактерионосительства.

Воспалительная реакция в кишечном тракте индуцируется липополисахаридом грамотри-

цательных патогенных энтеробактерий, провоспалительными цитокинами (в частности, рецепторным антагонистом ИЛ1 и ИЛ4) с развитием преимущественно Th1-зависимого воспалительного ответа [10, 14]. Учитывая это, установление высокой информативности низкого уровня цитокинов ИЛ1-Ра и ИЛ4 в копрофильтратах больных, ставших в периоде реконвалесценции бактерионосителями, свидетельствует о нарушении регуляции локального иммунного ответа у больных сальмонеллезом, угрожаемых по формированию реконвалесцентного бактерионосительства.

Перспективность использования расчета информативности признаков, основанного на неоднородной последовательной процедуре распознавания образов, подтверждается данными об использовании подобных подходов в практике, например, при прогнозировании неблагоприятного течения гнойно-воспалительных заболеваний, для оценки риска развития пиелонефрита и осложнений при ожоговой инфекции [1, 6, 7].

Результаты работы позволяют сделать выводы о доминировании иммунитета как движущего фактора в развитии реконвалесцентного бактерионосительства и о важной роли в этом процессе способности возбудителя к инактивации факторов естественной резистентности макроорганизма. Полученные результаты в дальнейшем могут быть использованы для разработки алгоритма прогнозирования сальмонеллезного реконвалесцентного бактерионосительства.

Автор выражает благодарность д.м.н. Брудастову Ю.А. за помощь в математической обработке материалов данного исследования.

**Список использованной литературы:**

1. Брудастов Ю.А., Сборец Т.С., Гриценко В.А. и др. Свойства *Staphylococcus aureus* при неблагоприятном течении ожоговой инфекции // Журн. микробиол. – 2003. – №4. – С.47-51.
2. Бухарин О. В. Персистенция патогенных бактерий. М., Медицина, 1999.
3. Бухарин О.В., Чайникова И.Н., Смолягин А.И. Показатели местного иммунитета и микробиоценоза кишечника больных сальмонеллезной инфекцией // Вестник ОГУ. – 2005. – №5. – С. 4-8.
4. Вальшева И. В., Вальшев А. В., Карташова О. Л. и др. Новый метод определения антилактоферриновой активности микроорганизмов // Журн. микробиол.– 2003.– №4. – С. 64-67.
5. Гублер Е.В., Генкин А.А. Применение непараметрических критериев статистики в медико-биологических исследованиях. – Л., Медицина. 1973.
6. Гриценко В.А., Ляшенко И.Э., Гордиенко Л.М. и др. Информативность маркеров персистенции *Escherichia coli* при бактериологической диагностике хронического пиелонефрита у детей // Журн. микробиол. – 1996. – №3. – С. 80-83.
7. Дерябин Д.Г., Курлаев П.П., Брудастов Ю.А. Роль персистентных характеристик возбудителя в определении затяжного течения гнойно-воспалительного процесса // Журн. микробиол. – 1996. – №3. – С.74-77.
8. Маянский А.Н., Вискман М.Е. Способ оценки функциональной активности нейтрофилов человека по реакции восстановления нитросинего тетразолия. Метод. реком. – Казань, 1979.
9. Способ определения антииммуноглобулиновой активности микроорганизмов. Патент РФ на изобретение №2236465 от 20 сентября 2004 г.
10. Хаитов Р.М. Физиология иммунной системы. – М., 2001.
11. Чернохвостова Е. В., Герман Г. П., Котова Т. С. и др. Методические рекомендации по исследованию иммуноглобулинов и других белков в секретах человека. – М., 1987.
12. Ярилин А.А. Основы иммунологии. – М., 1999.
13. Mdkela P.H., Normaeche C.E. Immunity to Salmonella. Host response to intracellular pathogens. // In: S. H. E. Kaufmann. (ed.). Germany. – 1997. – P. 143-166.
14. Mattsby-Baltzer I., Ahlstrom B., Edebo L., Deman P. Susceptibility of lipopolysaccharide-responsive and -hypo-responsive ItyS Mice to infection with rough mutants of *Salmonella typhimurium*. // Infect. Immun. 1996. – Vol. 64. – №4. – P. 1321-1327.