

Бухарин О.В.*, Чайникова И.Н.**, Смолягин А.И.**,
Вальшев А.В.*, Перунова Н.Б.*, Власова Е.В.**, Калинина Т.Н.*

*Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН

**Оренбургская государственная медицинская академия

ПОКАЗАТЕЛИ МЕСТНОГО ИММУНИТЕТА И МИКРОБИОЦЕНОЗА КИШЕЧНИКА БОЛЬНЫХ САЛЬМОНЕЛЛЕЗНОЙ ИНФЕКЦИЕЙ

Выявлено, что выраженные количественные и качественные нарушения состояния микробиоценоза толстого кишечника у больных сальмонеллезом сопровождаются синхронным изменением показателей местного иммунитета в копрофильтратах и слюне.

Существенное влияние на возникновение, течение и исход кишечных инфекций оказывает состояние колонизационной резистентности кишечника. Важнейшими показателями колонизационной резистентности являются факторы местного иммунитета и нормальная микрофлора кишечника с ее важнейшими функциями – защитной, обменной, иммуномодулирующей и др. [11]. В то же время инфекционный процесс может также оказывать определенное влияние на состояние микробиоценоза кишечника, способствуя развитию дисбиоза. Для характеристики состояния местного иммунитета при кишечных инфекциях определяют иммунологические показатели как в копрофильтратах [9, 12], так и слюне [5].

Целью исследования явилась оценка состояния местного иммунитета и микробиоценоза кишечника у больных сальмонеллезом и у реконвалесцентных бактерионосителей.

Материалы и методы

Обследовано 34 больных гастроинтестинальной формой сальмонеллеза, вызванного *Salmonella enteritidis*, в период разгара и реконвалесценции, а также 14 реконвалесцентных бактерионосителей в разгар болезни и 7 из них – в период реконвалесценции. Сравнимую группу составили 15 человек без каких-либо клинических проявлений инфекционных заболеваний. Показатели местного иммунитета исследовались в копрофильтратах и слюне. Все пробы копрофильтратов и слюны обрабатывались не позднее 3-4 ч. с момента взятия фекалий и слюны. Учитывая, что в копрофильтратах определялись иммуноглобулины, чувствительные к действию кишечных и микробных протеаз, была отработана специальная методика получения копрофильтратов с поэтапным добавлением ингибиторов протеаз. Для получения копрофильтратов 4 г фекалий гомогенизировали на холоду с 10 мл забуференного фи-

зиологического раствора (0,15 М, рН = 7,2), в который предварительно добавляли соевый ингибитор трипсина, универсальный ингибитор протеаз – контрикал, Твин 20 и раствор ЭДТА до конечной концентрации каждого из перечисленных реагентов, равной соответственно 1 мг/мл; 500 ЕД/мл; 0,05% и 50 мМ. Далее пробы центрифугировали (710g, 30 мин, +4° С), получали супернатант и к нему повторно добавляли контрикал в той же концентрации и центрифугировали (9950g, 15 мин, +4° С). К полученному супернатанту добавляли бычий сывороточный альбумин и азид Na до конечной концентрации 1 мг/мл и 0,2 мг/мл соответственно. Затем пробы копрофильтратов делили на аликвоты и замораживали при -20° С. Слюну в объеме 5 мл собирали утром натощак после предварительного полоскания ротовой полости. Собранную слюну центрифугировали (500g, 15 мин, +4° С), супернатант делили на аликвоты и замораживали. В дальнейшем в пробах копрофильтратов и слюны после их размораживания определяли показатели иммунитета. Исследование состава микрофлоры кишечника проводилось в соответствии с методическими рекомендациями [2]. Идентификацию культур осуществляли по морфологическим, культуральным и биохимическим признакам общепринятыми методами [7]; ферментативную активность бактерий определяли с использованием коммерческих систем ENTEROtest (Lachema). Для оценки местного иммунитета в копрофильтратах и слюне иммуноферментным методом определяли уровень Ig A, Ig M, IgG, секреторного иммуноглобулина A (sIgA), свободного секреторного компонента (SC), фракции IgG1 – G4 («Полигност»), IgE, лактоферрина (ЛФ) («Вектор – Бест»), С3 компонента комплемента («Цитокин»), а также содержание лизоцима (турбидиметрический метод [1]), титр антител к О-антигену сальмонелл (О-АГ) в реакции пассивной гемагглютинации (РПГА). Для оценки проницаемости гистогема-

тического барьера (ГГБ) в сыворотке, слюне и копрофильтратах определялась концентрация альбумина колориметрическим методом с бромкрезоловым зеленым («Dia Sys») и рассчитывался коэффициент проницаемости – Q (Alb):

$$Q(\text{Alb}) = (\text{Alb бж.}/\text{Alb ск.}) \cdot 10^3,$$

где Alb бж – концентрация альбумина в биологической жидкости; Alb ск. – концентрация альбумина в сыворотке крови [8]. Статистическая обработка результатов проводилась параметрическими и непараметрическими методами с использованием критерия Стьюдента [6] и критерия Вилкоксона – Манна – Уитни [3]. Для анализа результатов исследования дисбиоза кишечника и для оценки доли вероятности сожителства двух видов микроорганизмов вычисляли χ^2 по формуле:

$$\chi^2 = \frac{N^3}{ab \cdot (N-a) \cdot (N-b)} \cdot (c-P)^2,$$

где N – общее число выборок, a – число выборок с видом А, b – число выборок с видом В, c – число выборок, содержащих оба вида, P – вероятное число выборок, в котором 2 случайно попавших вида живут совместно, равное ab/N . При этом считали: если $P > c$, то оба вида исключают друг друга, если $P = c$, то они могут распределяться случайно, если $P < c$, то оба вида склонны к совместному обитанию [4].

Результаты и обсуждение

Результаты исследования микробиологического состояния толстой кишки у больных сальмонеллезом представлены на рис. 1. Хотя бифидобактерии в разгар сальмонеллезной инфекции определялись у всех больных, у 48,5% больных сальмонеллезом выявлялись дисбиотические нарушения, сопровождающиеся снижением бифидобактерий до 10^7 , а у 6% – ниже 10^7 КОЕ/г. На фоне снижения количества бифидобактерий отмечалось увеличение частоты встречаемости кишечной палочки с гемолитической активностью (у 21,2%), не ферментирующей лактозу (у 15,2%), других условно-патогенных энтеробактерий (особенно представителей родов *Proteus* и *Klebsiella*), золотистого стафилококка (9,1%) и грибов рода *Candida* (46,9%). В период реконвалесценции у больных сальмонеллезом происходило дальнейшее ухудшение микробиологического состояния кишечника, что проявлялось увеличением числа больных, имеющих сниженное количество бифидобактерий до 10^7 КОЕ/г (56,3%), кишечной палочки с

нормальной ферментативной активностью (75%) и, напротив, увеличенное содержание кишечной палочки с гемолитической активностью (50%), а также золотистого стафилококка (21,9%). При изучении микробиоценоза толстого кишечника у реконвалесцентных бактерионосителей были выявлены дисбиотические нарушения кишечника III-IV степени, характеризующиеся у 70% носителей снижением бифидобактерий до 10^7 КОЕ/г, а у 20% – ниже 10^7 КОЕ/г. По сравнению с реконвалесцентами без бактериовыделения у бактерионосителей в 2 раза чаще (40%) из фекалий высевался золотистый стафилококк, и у 50% носителей возрастало количество УПБ (преимущественно за счет увеличения бактерий рода *Proteus*) и кишечной палочки, не ферментирующей лактозу (30%).

При расчете χ^2 для выяснения вероятности соответствия совместного обнаружения видов микроорганизмов в группах больных в разгар болезни, в период реконвалесценции и у реконвалесцентных бактерионосителей не было выявлено достоверных ($\chi^2 > 3,84$) исключаящих и случайных парных сочетаний обнаруженных видов микроорганизмов, за исключением сочетания наличия грибов и количества бифидобактерий. Было установлено, что грибы присутствуют в микробиоценозе кишечника у реконвалесцентных бактерионосителей, больных сальмонеллезом в разгар инфекции и в период реконвалесценции только при дефиците бифидофлоры (10^7 КОЕ/г и менее).

Исследования местного иммунитета у тех же людей обследуемых групп, у которых изучалось состояние микробиоценоза кишечника, показало наличие существенных изменений исследуемых показателей не только в копрофильтратах (рис. 2А, табл.), но и в слюне (рис. 2Б, табл.). Как видно из данных рис. 2А и табл., в копрофильтратах больных в разгар сальмонеллезной инфекции, по сравнению со здоровыми, выявлялся 50-кратный рост уровня IgM, 14-кратное увеличение ЛФ, свободного секреторного компонента, 9-кратное нарастание количества sIgA и 7-кратное – титра антител к О-АГ сальмонелл. В копрофильтратах происходило увеличение содержания IgA и лизоцима в 3-5 раз, количество IgG увеличивалось в 2 раза, преимущественно за счет фракции IgG1, IgG2 и IgG4. В слюне у больных в разгар инфекции были выявлены изменения, подобные тем, которые обнаруживались в копрофильтратах, но менее значительные в количественном выраже-

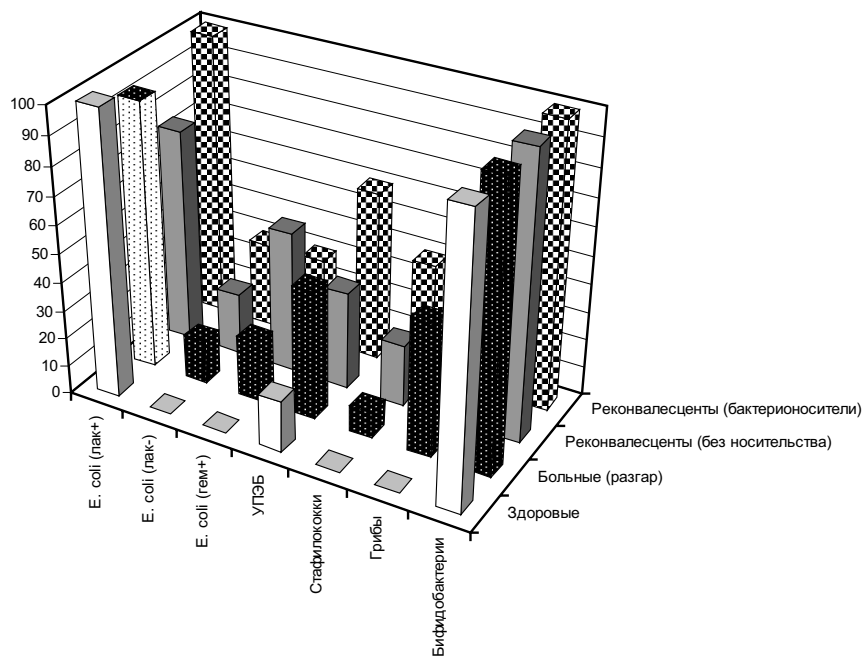
нии. В разгар инфекции в слюне больных сальмонеллезом отмечался 64-кратный рост титра антител к О-АГ сальмонелл, 3-кратный рост SC, 2-кратный – ЛФ, sIgA, IgG. В отличие от показателей, определяемых в копрофильтратах, в слюне увеличение IgG происходило в разгар инфекции преимущественно за счет IgG3 и IgG4. Существенных изменений уровня IgE, C3 компонента комплемента как в копрофильтратах, так и в слюне в разгар инфекции не происходило.

При ретроспективном анализе показателей в разгар инфекции у больных, у которых в периоде реконвалесценции сформировалось бактерионосительство, по сравнению с больными без последующего развития бактерионосительства выявлено в копрофильтратах 9-кратное снижение SC, 5-кратное – титра антител к О-АГ сальмонелл, 3-4-кратное уменьшение количества sIgA, IgA и ЛФ. В слюне обследуемых этой группы также определялось 6-кратное снижение специфических антител, 2-3-кратное – свободного секреторного компонента, иммуноглобулина А, включая и его секреторную форму (рис. 2Б, табл.).

В период реконвалесценции у больных сальмонеллезом в копрофильтратах сохранялся высокий уровень IgM (как и в разгар инфекции). Уровни антител к О-антигену сальмонелл, ЛФ, sIgA, SC снижались в период реконвалесценции по сравнению с разгаром болезни но оставались повышенными по отношению к здоровым в 3-6 раз. В слюне у реконвалесцентов по сравнению со здоровыми отмечался 35-кратный рост специфических антител в РПГА, 2-кратный – SC и IgG (преимущественно за счет IgG4 и IgG3).

Исследование копрофильтратов у бактерионосителей в период реконвалесценции показало, что по сравнению с реконвалесцентами без бактериовыделения у них сохранялись более низкие значения таких показателей, как sIgA, SC, титр антител к О-АГ сальмонелл, лактоферрин (табл., рис. 2А), и, напротив, повышенный уровень IgG (в 9 раз), преимущественно за счет IgG1. В слюне у реконвалесцентных бактерионосителей в период реконвалесценции изменения были менее выраженные, чем в разгар инфекции. У обследуемых этой группы отмечалось лишь 3-кратное снижение IgA, специфических антител и, напротив, 2-кратное увеличение количества IgE (рис. 2Б).

Изучение концентрации альбумина в биологических жидкостях показало, что у 70% обследуемых здоровых людей в слюне и копрофильтратах определялся альбумин в концентрации $4,1 \pm 0,25$ и $4,3 \pm 0,05$ г/л соответственно. В разгар болезни концентрация альбумина в копрофильтратах существенно не изменялась, что может свидетельствовать о сохранении проницаемости ГГБ кишечника [7]. Поэтому увеличение концентрации иммуноглобулинов в копрофильтратах может быть связано как с усилением локального синтеза, так и за счет их диффузии из периферической крови. В то же время в разгар сальмонеллеза снижалась проницаемость ГГБ полости рта, о



По оси абсцисс – группы микроорганизмов:

- E. coli (лак+) – лактозопозитивная кишечная палочка;
- E. coli (лак-) – лактозонегативная кишечная палочка;
- E. coli (гем+) – гемолитическая кишечная палочка;
- УПЭБ – условнопатогенные энтеробактерии (за исключением E. coli);
- грибы – дрожжеподобные грибы рода Candida

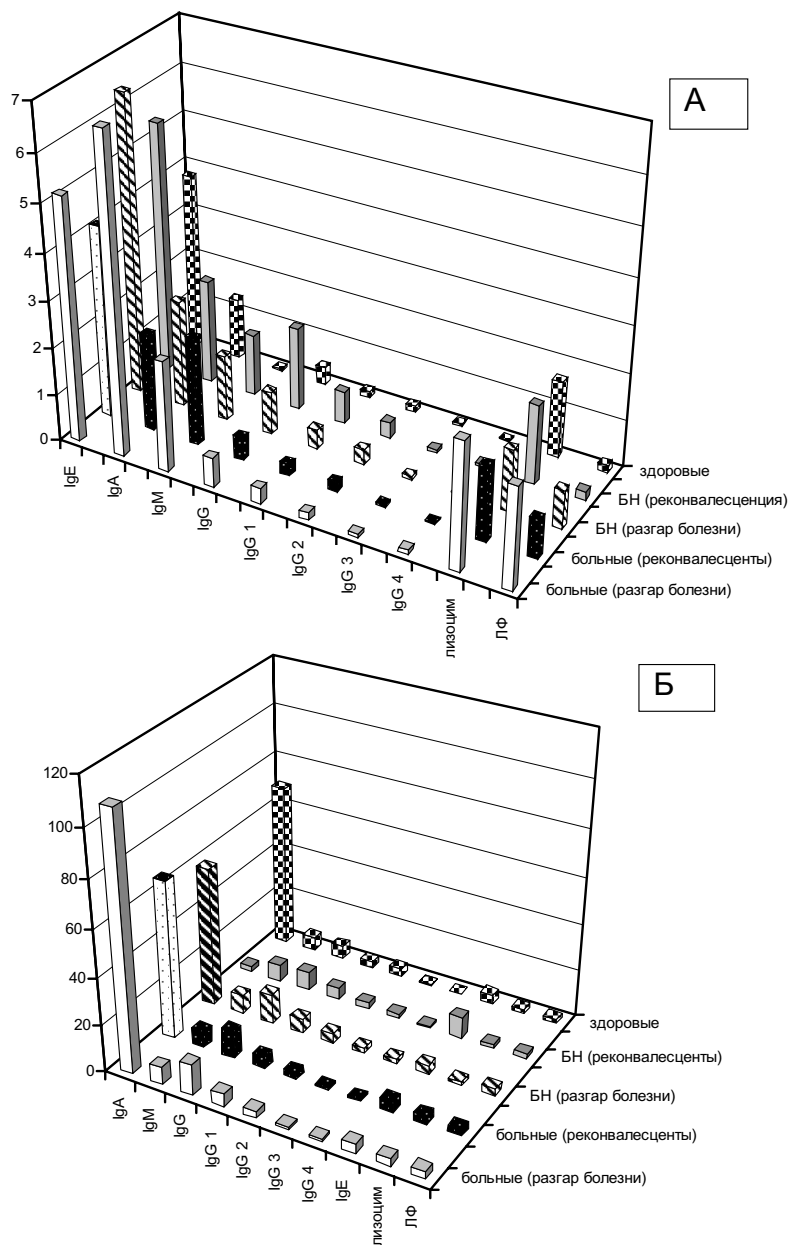
Рисунок 1. Частота выделения (%) микроорганизмов из фекалий людей обследованных групп

чем свидетельствовали достоверно низкие концентрации альбумина в слюне ($1,88 \pm 0,38$ г/л) и Q (Alb), ($p < 0,05$), а также уменьшение частоты выявления альбумина в слюне (только у 38,5% больных) по сравнению со здоровыми (у 70%). Вероятно, изменение концентрации иммуноглобулинов в слюне больных сальмонеллезом в разгар инфекции может быть связано преимущественно с усилением или ослаблением их местного синтеза.

В период реконвалесценции альбумин в копрофильтратах больных определялся у 60% обследуемых и составлял $5,36 \pm 0,11$ г/л, а в слюне он сохранялся на уровне, характерном для разгара болезни. Следует отметить, что у всех бактерионосителей в разгар заболевания альбумин не определялся, а в слюне – только у 25% носителей выявлялись низкие значения альбумина ($1,8 \pm 0,02$ г/л) и Q (Alb), ($p < 0,05$). У 70% бактерионосителей в период реконвалесценции в копрофильтратах определялись высокие концентрации альбумина ($6,2 \pm 1,1$ г/л), что, вероятно, связано с повышением проницаемости ГГБ. В то же время в слюне обследуемых этой группы альбумин не определялся, поэтому некоторое повышение уровня IgG в копрофильтратах у бактерионосителей, по сравнению с реконвалесцентами без бактериовыделения, может быть связано не только с усилением местного синтеза IgG, но и с поступлением иммуноглобулинов данного класса из сосудистого русла. В то же время сохраняющийся низкий уровень IgA в копрофильтратах и слюне у бактерионосителей в период реконвалесценции, по-видимому, определяется нарушением местного синтеза секреторного IgA, поскольку этот вид иммуноглобулинов синтезируется лимфоцитами, располагающимися в слизистых оболочках [10, 13].

Таким образом, острая сальмонеллезная инфекция сопровождается развитием в разгар болезни и в период реконвалесценции

дисбиотических нарушений в толстом кишечнике (дефицитом бифидофлоры, увеличением частоты встречаемости грибов рода *Candida*, гемолитических штаммов условно патогенных бактерий) и характеризуется значительными изменениями в копрофильтратах таких показателей, как IgM, sIgA, SC, ЛФ, и титра антител к О-АГ сальмонелл. Сходные изменения параметров местного иммунитета, но менее



Обозначения: БН – бактерионосители; ЛФ – лактоферрин

Единицы измерения: IgA – мг/л; IgM – мг/л; IgG – мг/л; IgG1-IgG4 – мг/л; IgE – МЕ/мл; лизоцим – мкг/мл; ЛФ - мкг/мл

Рисунок 2. Показатели местного иммунитета в копрофильтратах (А) и слюне (Б) людей обследуемых групп

Таблица. Содержание секреторного иммуноглобулина А, секреторного компонента, С3 компонента комплемента и антител к О-антигену сальмонелл у людей обследуемых групп ($M \pm m$)

Исследуемые группы	sIgA, мкг/мл		SC, мкг/мл		Титр антител к О-антигену сальмонелл, Ig		С3 компонент комплемента, мкг/мл	
	фекалии	слюна	фекалии	слюна	фекалии	слюна	фекалии	слюна
Здоровые	17,0±1,89	226±31	4,79±0,54	103±10	0,13±0,02	0,03±0,01	2,86±0,36	3,28±0,08
Больные в разгар болезни	127±14*	303±43	65,5±17,2*	302±35*	0,94±0,14*	1,92±0,13*	3,15±0,54	3,62±0,03*
Больные в период реконвалесценции	63,2±18,5*	300±52	17,8±3,4*	227±30*	0,7±0,16*	1,05±0,17*	2,64±0,31	3,25±0,46
Бактерионосители в разгар болезни	34,11±4,86* •	155±18•	7,72±0,72 • *	103±24•	0,21±0,05•	0,3±0,06* •	3,0±0,24	2,7±0,25
Бактерионосители в период реконвалесценции	2,87±3,63* •	200±31	10,4±1,21* •	101±39•	0,3±0,03* •	0,42±0,06* •	4,5±0,58*	4,42±0,53

Примечание: * достоверность отличий со здоровыми лицами ($p < 0,05$)
 • достоверность отличий между 2 и 4, 3 и 5 группами ($p < 0,05$)

выраженные в количественных значениях выявлялись и в слюне больных сальмонеллезом. Исключением является более высокий уровень противосальмонеллезных антител, определяемый в слюне, по сравнению с копрофильтра-тами. Формирование реконвалесцентного бактерионосительства происходит при более выраженных, по сравнению с больными без последующего бактериовыделения, нарушениях микроэкологического состояния кишечника, проявляющихся значительным снижением количества бифидобактерий (до 10^7 КОЕ/г и ниже), увеличением содержания грибов рода *Candida*, золотистого стафилококка, изменением ферментативной активности *E. coli* (увеличением доли лактозонегативной кишечной

палочки) и нарастанием уровня условно патогенных энтеробактерий. Выявленные дисбиотические изменения кишечника у бактерионосителей сопровождались снижением как в копрофильтра-тах, так и в слюне таких важнейших факторов антимикробной защиты слизистых, как sIgA, SC, ЛФ, и титра антител к О-АГ сальмонелл и увеличением уровня IgG за счет IgG3, IgG4. В заключение следует отметить, что полученные данные позволяют использовать копрофильтра-ты и слюну больных сальмонеллезом в качестве биологического материала для выявления нарушений колонизационной резистентности при данной инфекции и оценки эффективности проводимой терапии (иммуномодуляторы, пробиотики и др.).

Список использованной литературы:

1. Бухарин О.В., Волков А.Н., Скачков М.В., Филаткина Л.А. Применение сигнального способа диагностики острой дизентерии по определению количества лизоцима в копрофильтра-тах: Методические рекомендации. – Оренбург, 1979. – 7 с.
2. Грачева Н.М., Гончарова Г.И., Аваков А.А. и др. Применение бактериальных биологических препаратов в практике лечения больных кишечными инфекциями. Диагностика и лечение дисбактериоза кишечника: Методические рекомендации.– М., 1986. – 23 с.
3. Гублер Е.В., Генкин А.А. Применение непараметрических критериев статистики в медико-биологических исследованиях. – Ленинград.: Медицина. – 1973.
4. Дажо Р. Основы экологии. – М., 1975.
5. Колесникова Е.Н., Геннадьева Т.Я., Хазенсон Л.Б. Выявление противошигеллезных антител в слюне в целях расшифровки острых кишечных заболеваний неустановленной природы и диагностики дизентерии у детей старше 3-х лет и взрослых: Метод. рекомендации. – Л., 1983. – 23 с.
6. Лакин Г.Ф. Биометрия. – М.: Высшая шк. – 1990.
7. Справочник по микробиологическим и вирусологическим методам исследования / Под ред. М.О. Биргера.– 3-е изд., перераб. и доп.– М.: Медицина, 1982.
8. Тотолян А.А. Современные подходы к диагностике иммунопатологических состояний // Медицинская иммунология. – 1999. – том I. – №1-2. – С.75-108.
9. Хазенсон Л.Б., Чайка Н.А. Иммунологические основы диагностики и эпидемиологического анализа кишечных инфекций. Л., 1987.
10. Хаитов Р.М., Пинегин Б.В. Иммунная система желудочно-кишечного тракта: особенности строения и функционирования в норме и при патологии // Иммунология. – 1997. – №5. – С. 4-7.
11. Шендеров Б.А. Медицинская микробная экология и функциональное питание. – М., 1998. – том 1.
12. Li A., Cam P.D., Islam D. et al. Immune responses in Vietnamese children after a single dose of the auxotrophic, live *Shigella flexneri* Y Vaccine strain SFL124 // Journal of Infection. – 1994. – Vol.28. – P.11-23.
13. Mayer L. Review article: Local and systemic regulation of mucosal immunity // Aliment Pharmacol Ther. – 1997. – Vol.11. – P.81-88.