

УДК 616-035.1

Л.В. Сердюк ¹, С.М. Попкова ¹, Е.Б. Ракова ¹, У.М. Немченко ¹, М.В. Савелькаева ¹, С.И. Лещук ¹,
Е.Л. Кичигина ¹, Г.А. Юринова ²

О СПОСОБЕ ДИАГНОСТИКИ И КОРРЕКЦИИ ДИСБИОЗА НА ОСНОВАНИИ КОМПЛЕКСНОГО ИММУНО-МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОГО АНАЛИЗА

¹ ФГБУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека» СО РАМН (Иркутск)

² ФГБОУ ВПО «Иркутский государственный университет» (Иркутск)

В статье дано теоретическое обоснование способа коррекции дисбиоза кишечника на основании комплексного иммуно-микробиологического обследования, сочетающего исследование количественного и качественного состава кишечной микрофлоры с изучением иммунореактивности организма к бифидобактериям (доминанте нормальной микрофлоры кишечника). В рамках задачи проведены бактериологический и серологический анализы 314 образцов копрофильтратов детей от 1 года до 14 лет, проживающих в городе Иркутске. На основании изученных материалов предложен алгоритм комплексного исследования с обоснованием возможных путей коррекции дисбиотических нарушений.

Ключевые слова: копрофильтрат, дисбиоз, бифидобактерии, иммунодиагностикум

CONCERNING THE WAY OF DIAGNOSTICS AND CORRECTION OF DYSBIOSIS BASED ON COMPLEX IMMUNO-MICROBIOLOGICAL ANALYSIS

L.V. Serdyuk ¹, S.M. Popkova ¹, E.B. Rakova ¹, U.M. Nemchenko ¹, M.V. Savelkaeva ¹,
S.I. Leshchuk ¹, E.L. Kichigina ¹, G.V. Yurina ²

¹ Scientific Center of Family Health and Human Reproduction Problems SB RAMS, Irkutsk

² Irkutsk State University, Irkutsk

The article presents theoretical ground of the method of correction of intestinal dysbiosis based on a complex immuno-microbiological examination combining research of quantitative and qualitative composition of intestinal microbiota with study of immune reactivity of an organism to bifidus bacteria. As a part of the task we performed bacteriological and serological analysis of 314 coprofiltrate samples of 1–14 years old children living in Irkutsk. On the basis of the studied materials we presented the algorithm of complex study with the ground of possible ways of correction of dysbiotic disorders.

Key words: coprofiltrates, dysbiosis, bifidus bacteria, immunodiagnosticum

В настоящее время ни у кого не вызывает сомнения огромная роль нормальной микрофлоры организма человека в регулировании биохимических и иммунных процессов, поддержании колонизационной резистентности кишечника. Состав микробиоценоза кишечника каждого человека, несомненно, обладает индивидуальностью, что очень важно не только в диагностике дисбиоза, но и в выборе препаратов и способов его профилактики и коррекции.

Каловый микробиоценоз является сложным и динамичным. Несмотря на введение в микробиологическую практику новых усовершенствованных методов исследования, до сих пор четкой границы между микробиоценозом кишечного биотопа здоровых и больных лиц так и не выявлено [2].

Внедрение в микробиом с целью коррекции дисбиозов пребиотиков и пробиотических микроорганизмов в составе препаратов либо продуктов функционального питания часто приводит к положительным результатам [3]. Однако случаи отсутствия положительных эффектов данных способов коррекции дисбалансов наталкивают на мысль об отторжении внесённых эндогенных микроорганизмов-пробиотиков интестинальной иммунной системой, что может усугубить микробиологический дисбаланс и вызвать усиление аллергизации организма [7].

Цель данного исследования – показать целесообразность комплексной оценки состояния кишечной микрофлоры, заключающейся в сочетании микро-

биологического исследования с оценкой иммунореактивности организма к индигенной микрофлоре (бифидобактериям) по наличию антител против бифидобактерий, выявляемых в копрофильтратах человека, с помощью эритроцитарных тест-систем методом РНГА.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объекты исследования

Были обследованы дети от 1 года до 14 лет, проживающие в городе Иркутске. При выполнении работы все исследования проводились с соблюдением принципов добровольности и конфиденциальности в соответствии с «Основами законодательства РФ об охране здоровья граждан» (Указ Президента РФ от 24.12.1993 № 2288).

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Микробиологические методы

Бактериологический анализ копрологического материала на дисбиоз и определение степени дисбиоза по результатам анализа проводились в соответствии с Отраслевым стандартом 91500.11.0004–2003 и методическими рекомендациями МЗ СССР № 10-11/4-М (1991 г.) [8]. Всего исследовано 314 копрологических проб.

Серологические методы

На наличие антител к бифидобактериям проанализировано 314 образцов копрофильтратов. Для ана-

лиза использовали образцы копрофильтратов, приготовленных из копрологического материала детей с клиническими проявлениями кишечного дисбиоза, проходивших обследование в Центре диагностики и профилактики дисбактериозов ФГБУ «НЦ ПЗСРЧ» СО РАМН. Копрофильтрат анализировали в реакции непрямой гемагглютинации (РНГА) с использованием оригинального эритроцитарного иммунодиагностикума на основе антигенов клеточных стенок *Bifidum bifidum* (коммерческий штамм *Bifidum bifidum* № 1 (Ланафарм, г. Москва)) [6, 12, 13, 14]. Диагностикум приготовлен с использованием стандартных формализированных эритроцитов барана, стабилизированных по методу R. Weinbach [15].

Получение антигена

В процессе приготовления иммунодиагностикума использовали фракцию клеточных стенок (ФКС) бифидобактерий, получаемую путём дезинтеграции микробных клеток на ультразвуковом дезинтеграторе (SONOPULS HD 2200, Германия). Для дезинтеграции готовили взвесь микробных клеток, выращенных на тиогликолевой среде, в концентрации не менее 10 млрд. клеток в 1 мл. Схема дезинтеграции состояла из 3 идентичных этапов по 4 мин с максимальной амплитудой ультразвука 100 %. После 3-го этапа контрольный мазок показал практически стопроцентное разрушение клеток. Дезинтегрированную микробную массу суспендировали в 10 мл фосфатного буфера (рН = 7,2) и центрифугировали в течение 10 мин при 2000 об./мин (центрифуга К 70D, ГДР) для осаждения возможных неразрушенных микробных клеток. Супернатант повторно центрифугировали в течение 10 мин при 8000 об./мин на лабораторной медицинской центрифуге ОПн-8 (Россия). Полученный осадок представлял собой фракцию клеточных стенок (ФКС), используемую для иммунизации животных и при изготовлении тест-системы.

Иммунизация животных

Для контроля иммунодиагностикума использовали сыворотки, полученные от иммунизированных беспородных лабораторных мышей (30 штук массой около 25 г). Эксперименты с мышами проводили на базе вивария НИИ биофизики (ГБОУ ВПО «Ангарская государственная техническая академия», ветеринарное удостоверение 238 № 0018304 от 07.09.2009). Эксперименты на животных проводились в соответствии с правилами, принятыми Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей (Правила проведения работ с использованием лабораторных животных, Страсбург, 1986). Для иммунизации из ФКС готовили взвесь клеточных стенок бифидобактерий, соответствующую концентрации 10 млрд. клеток в мл. Взвесь вводили по 0,5 мл внутривенно один раз в неделю в течение 3 недель. Забор крови производили из сердца через неделю после последней иммунизации, предварительно усыпив животных эфиром.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Ценность количественного бактериологического анализа фекалий повышается, если он в зависимости

от показаний дополняется определением других параметров [1]. В нашем случае это выявление антител к индигенной микрофлоре (бифидобактериям), колонизирующих кишечник. Эволюционно закрепленное динамическое состояние иммунологической толерантности к антигенам симбионтной микробиоты играет одну из ключевых ролей в нормальном функционировании макроорганизма. Утрата иммунологической толерантности к комменсалам нормальной микрофлоры под воздействием эндогенных и экзогенных факторов, приводит к выработке специфических антител, поступающих не только в кровь, но и в просвет желудочно-кишечного тракта [9, 11]. Наличие в крови высоких титров антител против бифидобактерий может привести к длительной дестабилизации саморегулирующейся кишечной экосистемы и свидетельствует о срыве иммунологической толерантности к (симбионтной микрофлоре) [4, 7]. Поэтому коррекция дисбиотических нарушений у детей должна проводиться не только на основании результатов бактериологического обследования, дающего информацию о количественном и качественном состоянии микробиоты, но и с учётом характера иммунного ответа организма [8].

Проведенные исследования показали, что практически у всех обследованных детей выявлялись отклонения в составе микроорганизмов кишечной микробиоты относительно общепатологических нормативов [5]. Частота встречаемости дисбиотических нарушений составила 84,3 %. При этом у всех детей независимо от возраста в 59,03 % случаев преобладал дисбактериоз I степени, практически у каждого четвертого ребенка (24,0 %) был зарегистрирован дисбактериоз II степени. Дисбактериоз III степени отмечался в младшей возрастной группе у 1,2 % детей, т.е. наиболее значимые изменения в составе нормальной микрофлоры кишечника наблюдались у детей от 1 до 2 лет (рис. 1).

Во всех возрастных группах наблюдалось статистически значимое (на 1–2 порядка от физиологической нормы) угнетение индигенной флоры (бифидобактерии, лактобациллы, кишечная палочка с нормальной ферментативной активностью). У детей первых двух лет жизни с высокой частотой обнаруживались потенциально патогенные микроорганизмы семейства *Enterobacteriaceae* (*Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp. и др.) [10].

Иммунологические исследования копрофильтратов выявили антитела к *B. bifidum* у 73,7 % лиц в титрах от 1 : 4 до 1 : 256. При этом степень дисбактериоза не имела прямой зависимости от величины титров антител, что свидетельствует об индивидуальной реакции организма на изменения в составе микрофлоры и, таким образом, обосновывает необходимость индивидуального подхода к коррекции с учётом особенностей иммунореактивности макроорганизма.

На основании полученных результатов нами предлагается методологическая концепция объективной оценки микробиологического статуса кишечного биотопа при исследовании копрологической пробы, опирающаяся на количественную оценку доминанты кишечного биотопа – бифидобактерий – и степени

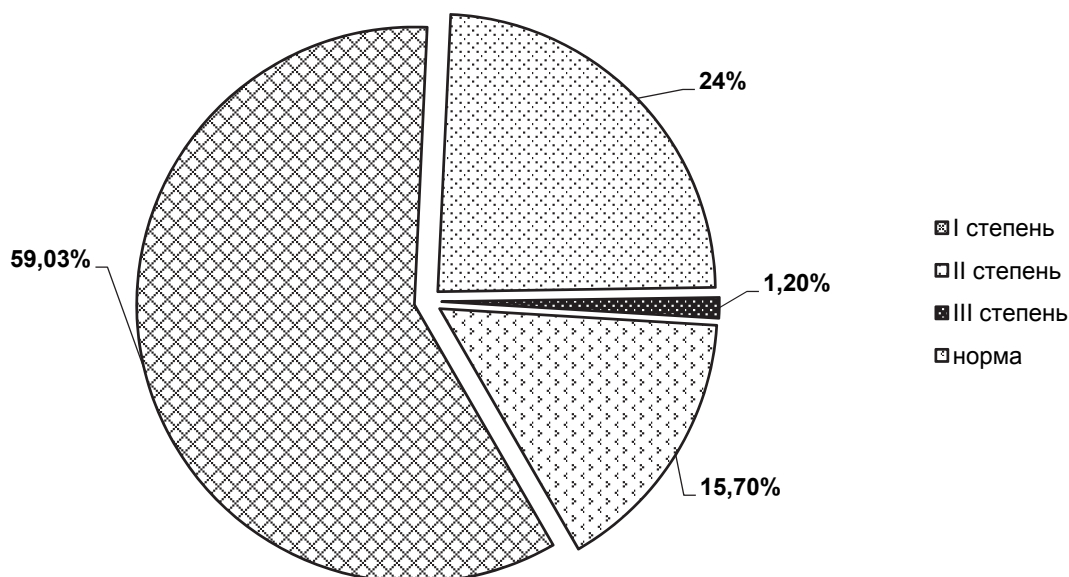


Рис. 1. Структура кишечного дисбиоза у детей г. Иркутска.

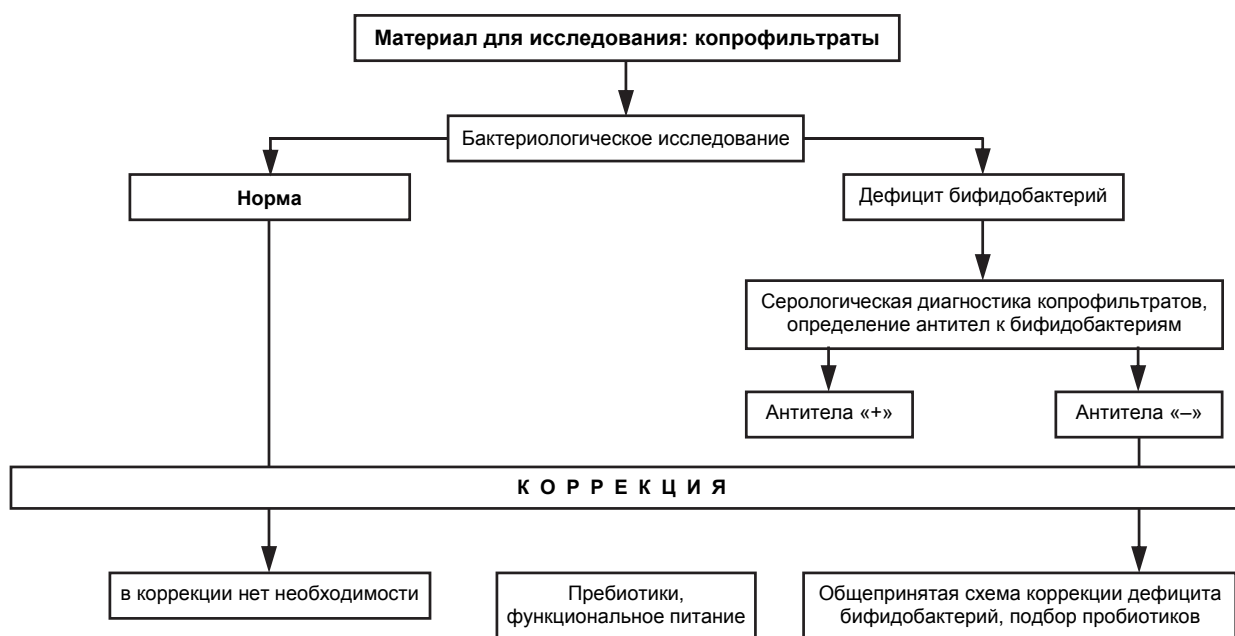


Рис. 2. Алгоритм проведения комплексного иммуно-микробиологического обследования пациента и возможных путей коррекции дисбиоза.

иммунореактивности организма по отношению к ним. Согласно концепции, возможны разные варианты коррекции дисбиоза, выявленного при бактериологическом обследовании и обусловленного дефицитом бифидобактерий. Данные исследования помогут подобрать более адекватную пробиотическую терапию.

В зависимости от результата показана соответствующая тактика коррекции дисбиоза (рис. 2).

1. При отсутствии антител к бифидобактериям в копрофильтратах и регистрации дисбиотических реакций коррекция микробиологических нарушений осуществляется традиционными методами: элиминация патогенов и условных патогенов, введение пробиотических и пребиотических препаратов, диетотерапия, функциональное питание.

2. При выявлении высокого уровня антител к бифидобактериям, свидетельствующем о «срыве» иммунологической толерантности, прогноз восстановления микробиоценоза менее благоприятен и требует специальных подходов:

- показаны препараты-пребиотики, которые не вызывают усиления иммунореактивности к бифидофлоре, но способствуют росту индигенной микрофлоры;
- при определении доминирующего в кишечнике пациента вида собственной бифидофлоры (ПЦР) необходим адекватный подбор пробиотика с соответствующим организму видом.

Таким образом, выявление антител к бифидобактериям в комплексе с бактериологическим исследо-

ванием копрологического материала и определением в нём штаммов доминирующих видов симбионтных микроорганизмов позволит дать более полную оценку микробиоценоза пациентов и, следовательно, выбрать наиболее адекватные способы восстановления нормальной микрофлоры кишечника. При этом, по нашему мнению, несмотря на унифицированность данного алгоритма, сохраняется индивидуальный подход к каждому пациенту.

**ЛИТЕРАТУРА
REFERENCE**

1. Алешукина А.В. Комплексный способ диагностики степени выраженности дисбактериоза кишечника // Клиническая лабораторная диагностика. – 2010. – № 11. – С. 48–51.

Aleshukina A.V. Complex method for diagnostics of degree of intestinal dysbiosis severity // Clinical Laboratory Diagnostics. – 2010. – N 11. – P. 48–51. (in Russian)

2. Булатов В.П., Камалова А.А., Удачина Э.И., Зинкевич О.Д. и др. Современные методы диагностики дисбактериоза кишечника [Электронный ресурс] // Практическая медицина. – 2010. – Режим доступа: <http://mfvt.ru/sovremennye-metody-diagnostiki-disbakterioza-kishechnika> (дата обращения 15.04.2011).

Bulatov V.P., Kamalova A.A., Udachina E.I., Zinkevich O.D. et al. Modern methods of diagnosis of intestinal dysbiosis [In non-legible form] // Practical Source. – 2010. – Access mode: <http://mfvt.ru/sovremennye-metody-diagnostiki-disbakterioza-kishechnika> (requested 15.04.2011). (in Russian)

3. Копанев Ю.А. Значение кишечной микрофлоры для здоровья человека. Роль пробиотиков и пребиотиков для коррекции и профилактики нарушений микробиоценоза // Трудный пациент. – 2008. – № 11. – С. 39–43.

Kopanev Yu.A. Significance of gut microflora for human health. Role of probiotics and prebiotics for the correction and prevention of microbiocenosis disorders // Serious Patient. – 2008. – N 11. – P. 39–43. (in Russian)

4. Новик Г.И., Астапович Н.И., Пасцяк М., Гамьян А. Биологическая активность полярных липидов бифидобактерий // Микробиология. – 2005. – Т. 74, № 6. – С. 781–787.

Novik G.I., Astapovich N.I., Pastyak M., Gamjan A. Biological activity of polar lipids of bifidobacteria // Microbiology. – 2005. – Vol. 74, N 6. – P. 781–787. (in Russian)

5. Отраслевой стандарт «Протокол ведения больных. Дисбактериоз кишечника». – ОСТ 91500.11.0004-2003. – Приказ МЗ РФ № 231; 09.06.2003.

Industry standard “Report of management of patient. Intestinal dysbiosis”. – OST 91500.11.0004-2003. – Order of Public Health Ministry № 231; 09.06.2003. (in Russian)

6. Попкова С.М. Микробная экология человека в условиях техногенного прессинга промышленных городов Восточной Сибири: дис. ... докт. биол. наук. – Иркутск, 2004. – 306 с.

Popkova S.M. Microbial ecology of human beings in conditions of anthropogenic pressure of industrial cities

of Eastern Siberia: doctoral thesis in biology. – Irkutsk, 2004. – 306 p. (in Russian)

7. Попкова С.М., Лещук С.И., Анненков В.В., Даниловцева Е.Н. и др. Современные подходы к конструированию препаратов в иммунотехнологии // Бюл. ВСНЦ СО РАМН. – 2004. – № 9. – С. 50–54.

Popkova S.M., Leshchuk S.I., Annenkov V.V., Danilovtseva E.N. et al. Modern approaches to the design of drugs in immune technology // Bull. ESSC SB RAMS. – 2004. – N 9. – P. 50–54. (in Russian)

8. Попкова С.М., Сердюк Л.В., Лещук С.И., Ракова Е.Б. и др. Новые возможности использования реакции непрямой агглютинации в изучении локального иммунитета // Матер. XVI междунар. науч. конф. «Здоровье семьи – XXI век»; под ред. А.Я. Перевалова. – Пермь: ИПК «ОТ и ДО», 2012. – С. 82–83.

Popkova S.M., Serdyuk L.V., Leshchuk S.I., Rakova E.B. et al. New possibilities of use of indirect agglutination reaction in the study of local immunity // Proceedings of the XVI International Scientific Conference “Family Health – XXI century”; ed. by A.Ya. Perevalov. – Perm: IPK «OT i DO», 2012. – P. 82–83. (in Russian)

9. Попкова С.М., Шмелева Е.А., Лещук С.И., Сердюк Л.В. и др. Дисбактериоз как следствие нарушения иммунологической толерантности к индигенной микрофлоре // Бюл. ВСНЦ СО РАМН. – 2007. – № 3S. – С. 57–62.

Popkova S.M., Shmeleva E.A., Leshchuk S.I., Serdyuk L.V. et al. Disbacteriosis as the consequence of immunological tolerance to the indigenous microbial flora // Bull. ESSC SB RAMS. – 2007. – № 3S. – P. 57–62. (in Russian)

10. Ракова Е.Б., Попкова С.М., Немченко У.М., Ефимова Н.В. и др. Особенности микробиоценозов у детей, проживающих в условиях техногенного прессинга // Гигиена и санитария. – 2011. – № 4. – С. 22–26.

Rakova E.B., Popkova S.M., Nemchenko U.M., Efimova N.V. et al. Features of microbiocenoses in children living in conditions of anthropogenic pressure // Hygiene and Sanitary. – 2011. – N 4. – P. 22–26. (in Russian)

11. Сердюк Л.В., Попкова С.М., Лещук С.И., Немченко У.М. и др. Изучение локального иммунитета по уровню нормальных антител к интестинальной микрофлоре (бифидобактериям) с помощью эритроцитарных тест-систем // Успехи современного естествознания. – 2012. – № 8. – С. 21–24.

Serdyuk L.V., Popkova S.M., Leshchuk S.I., Nemchenko U.M. et al. Study of local immunity by the level of normal antibodies to the intestinal microflora (bifidobacteria) using the erythrocytic test systems // Success of Modern Natural Science. – 2012. – N 8. – P. 21–24. (in Russian)

12. Способ определения специфических антител в копрофильтратах: пат. № 2423709 Рос. Федерация, МПК G01N33/556 / Лещук С.И., Попкова С.М., Сердюк Л.В.; заявитель и патентообладатель УРАМН Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека СО РАМН. – № 2009144839/15, заявл. 18.03.2010; опубл. 10.07.2011. – 2 с.

Method of determining specific antibodies in coprofiltrates: Patent RU 2423709, Int. Cl. G01N33/556 / Leshchuk S.I., Popkova S.M., Serdyuk L.V.; proprietor Scientific Center of Family Health and Human Reproduction

Problems SB RAMS. – № 2009144839/15, date of filing 18.03.2010; date of publication 10.07.2011. – 2 p. (in Russian)

13. Способ получения эритроцитарного антигенного диагностикума: пат. 2429483 Рос. Федерация МПК G01N33/531, G01N33/556 / Лещук С.И., Даниловцева Е.Н., Сердюк Л.В., Попкова С.М., Анненков В.В.; заявитель и патентообладатель УРАМН Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека СО РАМН, Лимнологический институт СО РАН. – № 2009126306/15, заявл. 08.07.2009; опубл. 20.09.2011. – 2 с.

Method of producing erythrocytic allergenic diagnosticum: Patent RU 2429483, Int. Cl. G01N33/531, G01N33/556 / Leshchuk S.I., Danilovtseva E.N., Serdyuk L.V., Popkova S.M., Annenkov V.V.; proprietor Scientific Center of Family Health and Human Reproduction Problems SB RAMS, Limnological Institute SB RAS. – № 2009126306/15, date of filing 08.07.2009; date of publication 20.09.2011. – 2 p. (in Russian)

14. Способ приготовления эритроцитарного иммунодиагностикума и способ оценки иммунорезистентности организма: пат. 2142807 Рос. Федерация, МПК 6 А61К35/18, G01N33/53 / Лещук С.И., Попкова С.М., Шмельёва Е.А.; заявитель и патентообладатель Институт эпидемиологии и микробиологии ВСНЦ СО РАМН. – № 96114922/14, заявл. 23.07.1996; опубл. 20.12.1999. – 2 с., ил.

Method of preparing erythrocyte immune diagnosticum and method of estimation of immune resistance of an organism: Patent RU 2142807, Int. Cl. 6 A61K35/18, G01N33/53 / Leshchuk S.I., Popkova S.M., Shmelyova E.A.; proprietor Institute of Epidemiology and Microbiology ESSC SB RAMS. – № 96114922/14, date of filing 23.07.1996; date of publication 20.12.1999. – 2 p., illustr. (in Russian)

15. Weinbach R. Die Verwendbarkeit formol behandelte Erythrocyten als Antigen-Träger in der indirekten Hämagglutination. Schweiz // Z. Allerg. Path. – 1959. – Vol. 22. – P. 1–8.

Сведения об авторах

Сердюк Людмила Викторовна – кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории микроэкологии ФГБУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека» СО РАМН (664025, г. Иркутск, ул. Тимирязева, 16; e-mail: radugarose@yandex.ru)

Попкова София Марковна – доктор биологических наук, заведующая лабораторией микроэкологии ФГБУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека» СО РАМН (e-mail: smpopkova@gmail.com)

Ракова Елена Борисовна – кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории микроэкологии ФГБУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека» СО РАМН

Немченко Ульяна Михайловна – младший научный сотрудник лаборатории микроэкологии ФГБУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека» СО РАМН

Савелькаева Марина Владимировна – врач-гастроэнтеролог высшей категории клиники ФГБУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека» СО РАМН

Лещук Светлана Ивановна – доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории микроэкологии ФГБУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека» СО РАМН

Кичигина Елена Леонидовна – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории микроэкологии ФГБУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека» СО РАМН

Юринова Галина Валерьевна – кандидат биологических наук, доцент кафедры физико-химической биологии ФГБОУ ВПО «Иркутский государственный университет»

Information about the authors

Serdyuk Lyudmila Viktorovna – candidate of biological science, scientific research officer of the laboratory of microecology of Scientific Center of Family Health and Human Reproduction Problems SB RAMS (Timiryazev str., 16, Irkutsk, 664025; e-mail: radugarose@yandex.ru)

Popkova Sofia Markovna – M.D. in biology, head of the laboratory of microecology of Scientific Center of Family Health and Human Reproduction Problems SB RAMS (e-mail: smpopkova@gmail.com)

Rakova Elena Borisovna – candidate of biological science, scientific research officer of the laboratory of microecology of Scientific Center of Family Health and Human Reproduction Problems SB RAMS

Nemchenko Ulyana Mikhailovna – junior research officer of the laboratory of microecology of Scientific Center of Family Health and Human Reproduction Problems SB RAMS

Savelkaeva Marina Vladimirovna – gastroenterologist, doctor of higher category of the clinics of Scientific Center of Family Health and Human Reproduction Problems SB RAMS

Leshchuk Svetlana Ivanovna – M.D. in biology, leading research officer of Scientific Center of the laboratory of microecology of Scientific Center of Family Health and Human Reproduction Problems SB RAMS

Kichigina Elena Leonidovna – candidate of biological science, senior research officer of the laboratory of microecology of Scientific Center of Family Health and Human Reproduction Problems SB RAMS

Yurinova Galina Valerjevna – candidate of biological science, associate professor of the department of physical and chemical biology of Irkutsk State University