

УДК 57.083.3

**ИЗУЧЕНИЕ ЛОКАЛЬНОГО ИММУНИТЕТА  
ПО УРОВНЮ НОРМАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ К ИНТЕСТИНАЛЬНОЙ  
МИКРОФЛОРЕ (БИФИДОБАКТЕРИЯМ) С ПОМОЩЬЮ  
ЭРИТРОЦИТАРНЫХ ТЕСТ-СИСТЕМ**

**Сердюк Л.В., Попкова С.М., Лещук С.И., Немченко У.М., Кичигина Е.Л.**

*ФГБУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека»  
Сибирского отделения РАМН, Иркутск, e-mail: radugarose@yandex.ru*

Разработанный способ исследования копрологических проб на наличие антител к бифидофлоре с использованием оригинальных эритроцитарных тест-систем для реакции непрямой гемагглютинации (РНГА) позволяет оценивать иммунореактивность макроорганизма к симбионтной микрофлоре, не прибегая к инвазивным методам отбора диагностического материала. Популяционный уровень антител в копропробах отражает состояние системного иммунитета (по уровню антител в сыворотках крови) и согласуется с архитектурой видов бифидобактерий в исследуемой популяции. Выявление антител к бифидобактериям, в комплексе с бактериологическим исследованием копрологического материала позволяет дать более полную оценку микробиологического статуса организма. Коррекция дисбиотических нарушений у детей должна проводиться на основании результатов бактериологического обследования, дающего информацию о количественном и качественном состоянии микробиоты, с учётом функционального состояния локального иммунитета, в норме толерантного к симбионтной кишечной бифидофлоре.

**Ключевые слова:** копрофильрат, локальный иммунитет, бифидобактерии, иммунодиагностикум

**STUDY OF LOCAL IMMUNITY LEVEL OF ANTIBODIES  
TO NORMAL INTESTINAL MICROFLORA (BIFIDOBACTERIA)  
WITH ERYTHROCYTE TEST SYSTEMS**

**Serdjuk L.V., Popkova S.M., Leshhuk S.I., Nemchenko U.M., Kichigina E.L.**

*FBSE of Russia Academy of Medical Sciences «The Scientific Center of Family Health and Human Reproduction Problems» of Siberian Branch of RAMS, Irkutsk, e-mail: radugarose@yandex.ru*

The developed method research of feces for antibodies to bifidoflora using the original erythrocyte test systems for the indirect hemagglutination assay (IHA) allows to evaluate the immunoreactivity to the host's symbiotic microflora, without resorting to invasive methods for the selection of diagnostic material. Population levels of antibodies in the feces reflects the state of systemic immunity (at the level of antibodies in blood serum) and is consistent with the species architectonics of the bifidobacteria in the study population. Detection of antibodies to bifidobacteria, in conjunction with the bacteriological examination feces can give a more complete assessment microecological status of the organism. Correction dysbiotic disorders in children should be based on the results of bacteriological examination, which gives information on the quantitative and qualitative state of the microbiota, and in view of the functional state of local immunity in the norm of tolerance to the symbiotic intestinal Bifidoflora.

**Keywords:** coprofiltrates, local immunity, bifidoflora, immunodiagnostic

Слизистые оболочки пищеварительно-го, дыхательного и мочеполового трактов являются естественными путями проникновения и колонизации для многих патогенных микроорганизмов. Защита этих оболочек обеспечивается иммунокомпетентными клетками, организованными в специальные лимфоидные ткани. Эта, так называемая, *мукозная иммунная система* является первым барьером на пути инфекций в отличие от *системной иммунной системы*, обеспечивающей защиту внутренних органов организма. [13]. Филогенетически иммунная система кишечника наиболее древняя, и, как предполагают, ее развитие, предшествовало большинству других лимфоидных структур, в том числе тимуса [16]. Около 70% всех лимфоцитов организма сосредоточены в слизистой оболочке кишечника, вырабатывая IgA. Кишечный иммунитет сбалансирован между способностью к за-

щитной иммунной реакции по отношению к патогенным микроорганизмам и способностью оставаться толерантным по отношению к огромной нагрузке антигенов, представляемых комменсальными кишечными микроорганизмами [15].

Нормальная микрофлора кишечника играет важную роль в жизнедеятельности организма. Доказано её благотворное воздействие на физиологию кишечника и организм в целом, что обусловлено защитными, структурными и метаболическими эффектами. Взаимодействие между энтероцитами и микроорганизмами индигенной микрофлоры приводят к формированию на поверхности кишечных слизистых оболочек защитного биослоя, препятствующего колонизации, адгезии, инвазии и пене-трации патогенных и условно-патогенных микроорганизмов [3]. Одновременно с этим кишечная микрофлора оказывает постоян-

ное стимулирующее воздействие низкой степени на иммунную систему кишечника, что крайне важно для нормального функционирования иммунитета и формирования иммунной толерантности к антигенам индигенной микрофлоры [9, 2]. Желудочно-кишечный тракт (ЖКТ) макроорганизма – это открытая биологическая система, которая находится в постоянном контакте с микромиром. Основным принципом действия протективных механизмов, осуществляющих контроль за колонизацией ЖКТ, состоит в способности отличать непатогенные элементы (бактерии-симбионты, пища) от энтеропатогенов. Качественные (видовые) и количественные соотношения между разными группами микроорганизмов характеризуются определенной стабильностью, что важно для реализации разнообразных функций нормальной микрофлоры, таких как поддержание колонизационной резистентности, участие в процессах пищеварения, синтеза витаминов и бактериоцинов. В лимфоидной ткани, принимающей участие в формировании периферической толерантности к интестинальной микрофлоре, происходит синтез иммуноглобулинов, проявление клеточной цитотоксичности Т-киллерами, продукция цитокинов Т-лимфоцитами, макрофагами и НК-клетками (естественными киллерами) [12]. Утрата «оральной» толерантности к симбионтной микрофлоре, может привести к выработке специфических иммуноглобулинов, выделение и идентификация которых возможны как из сывороток крови, так и копрологических проб.

**Цель работы:** показать возможность оценки уровня иммунореактивности организма к индигенной микрофлоре по наличию антител, выявляемых с помощью оригинальных тест-систем методом РНГА в копрофильтратах человека; провести сравнение результатов исследования копрофильтратов с исследованиями сывороток крови.

#### Материалы и методы исследования

Объектами исследования являлись копрологические пробы пациентов гастроэнтерологического центра при Научном центре проблем здоровья семьи и репродукции человека СО РАМН (ФГБУ «НЦ ПЗСРЧ СО РАМН») с функциональными нарушениями желудочно-кишечного тракта, проживающих в г. Иркутске. Образцы сывороток крови взяты у аналогичного контингента пациентов. Всего исследовано около 200 копрологических проб и столько же сывороток. Постановка реакции непрямой (пассивной) гемагглютинации для определения специфических антител производилась с помощью оригинальных тест-систем, изготовленных на основе фракций клеточных

стенок трех видов бифидобактерий (*Bifidobacterium bifidum*, *B. longum* и *B. adolescentis*) [4, 6]. Для контроля тест-систем использовали специфическую иммунную кроличью сыворотку с титром антител к бифидобактериям не менее 1:64. При обработке материала учитывали условно низкие титры антител, определяемые в разведениях от 1:2 до 1:32, и условно высокие титры – от 1:64 и выше.

Статистическую обработку данных проводили с использованием программ «Excel» и «Statgraphics». Различия считали достоверными при  $P \leq 0,05$ .

#### Результаты исследования и их обсуждение

На основе описанных в литературе способов подготовки копрофильтратов для исследования методом ИФА [1, 13] нами был адаптирован свой метод получения копрофильтратов для исследования в РНГА на наличие антител к бифидофлоре (наиболее многочисленной в составе микробиоценоза кишечника). С этой целью отбирали свежие копропробы. Навески исследуемого материала производили на электронных весах, помещая в пластиковые пробирки не более 1 г, приливали к нему 0,9% физиологический раствор в соотношении 1:2, тщательно растирали стеклянной палочкой и центрифугировали при 7000 об/мин. в течение 15 минут. Надосадочную жидкость (копрофильтрат) при помощи пипетки перемещали в чистые пробирки. На поверхность копрофильтрата наслаивали взвесь отмытых формализированных эритроцитов и оставляли при комнатной температуре до полного их осаждения, после этого копрофильтрат центрифугировали при 2500–3000 об/мин в течение 10 минут. Надосадочную жидкость титровали в иммунологических планшетах в 8 и более лунках, добавляли в каждую лунку по 25 мкл специфического антигенного диагностикума. Через 20–24 часа визуально определяли титры антител по наличию агглютинации: выпадение эритроцитов в виде точки свидетельствовало об отсутствии агглютинации, при положительной реакции (наличии антител) эритроциты выпадали на дне лунки равным слоем, т.е. в виде зонтика. Все манипуляции осуществлялись при комнатной температуре.

После отработки методики и проведения РНГА на наличие антител к бифидобактериям в копрофильтратах с помощью оригинальных тест-систем было установлено:

- 1) тест-системы качественно улавливали наличие антител в образцах;
- 2) результаты сочетались с нашими предыдущими исследованиями по определению антител в крови и данными по рас-

пространенности разных видов бифидобактерий среди детского населения региона, выполненными с помощью молекулярно-генетических исследований (ПЦР) [7, 8].

Проведенные ранее исследования по изучению популяционной иммунореактивности к бифидофлоре у здоровых лиц г. Иркутска (образцы сывороток крови) показали, что основная часть выборки (> 80%) не имела антител к бифидобактериям или имела их

в очень низкой концентрации. Лишь у 10% лиц определялись антитела к бифидобактериям в высоких титрах. Такой профиль распределения показателей концентрации антител практически соответствует нормальному эволюционно закрепленному вариационному ряду – распределению Пуассона. Следовательно, отсутствие антител и (или) наличие их в *низкой концентрации* для данной популяции можно считать нормой (рис. 1).

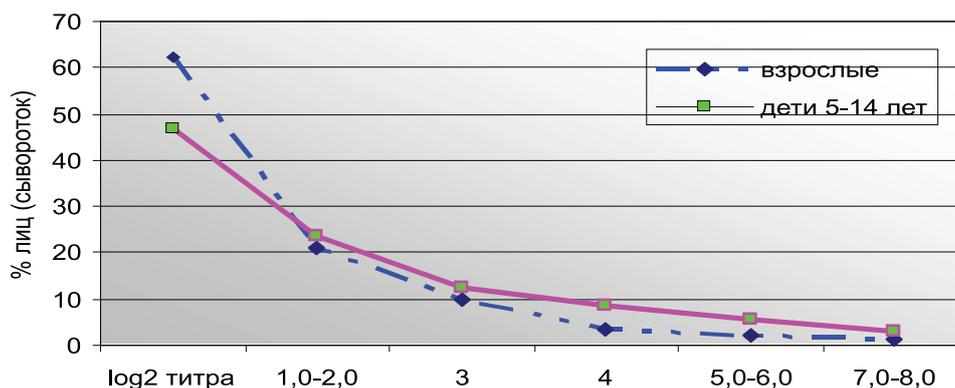


Рис. 1. Популяционная иммунореактивность к бифидофлоре (взрослые – 400 сыв., дети – 200 сыв.) г. Иркутск

Результаты исследования копрофильтратов и образцов сывороток пациентов гастроэнтерологического отделения, что наименьший процент выявления высо-

ких титров мукозных и сывороточных антител в выборке (200 обр.) по г. Иркутску был к виду *B. longum*, а наибольший – к *B. bifidum* (рис. 2).

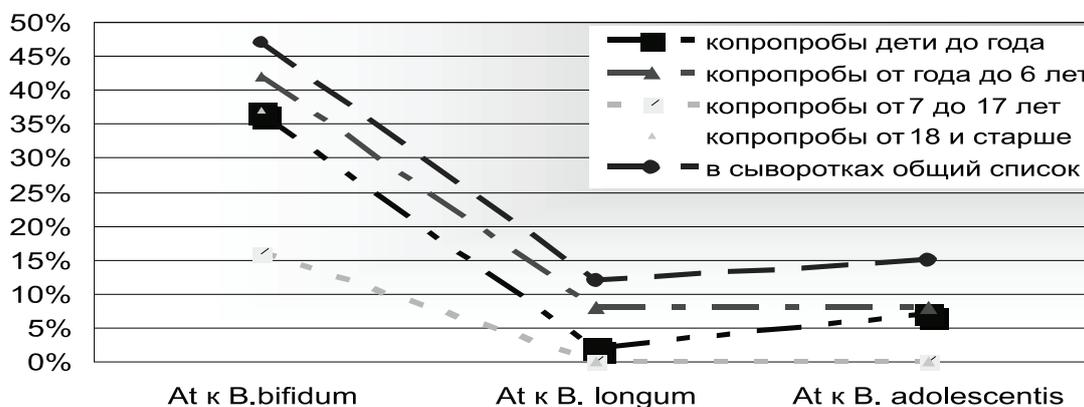


Рис. 2. Частота встречаемости высоких титров мукозных и сывороточных антител к разным видам бифидобактерий у населения г. Иркутска (n = 200)

Однако в среднем титры сывороточных антител незначительно выше, чем мукозных. Полагаем, что это можно объяснить бóльшим суммарным количеством агглютинирующих иммуноглобулинов, циркулирующих в крови (в основном классов G и M) по сравнению с ЖКТ, где преобладают иммуноглобулины класса А.

При исследовании копрофильтратов частота выявления высоких титров му-

козных антител среди детей до года составила: к *B. bifidum* – 15%, *B. longum* – 1% и к *B. adolescentis* – 3%. У детей от 1 года до 6 лет частота выявления высоких титров мукозных антител к *B. bifidum* составила 21%, *B. longum* – 4% и к *B. adolescentis* – 4%. У детей от 7 до 17 лет по тем же показателям к *B. bifidum* – 2%, *B. longum* и *B. adolescentis* – 0%. У лиц старше 18 лет наличие высоких титров мукозных антител к *B. bifidum* опре-

делялось у 10%, к *B. longum* и *B. adolescentis* антитела не регистрировались.

Таким образом, у детей от 1 года до 6 лет при исследовании копрофильтратов в РНГА определена наибольшая реактивность к бифидофлоре, в остальных возрастных группах уровень иммунореактивности либо в норме, либо близок к ней.

### Заключение

Анализ копрологических проб с целью выявления антител к: энтеробактериям, HbsAg и ВИЧ проводился ранее другими исследователями с помощью достаточно дорогих тест-систем методом ИФА [1, 13]. Нами разработан способ анализа копрофильтратов на содержание антител к бифидобактериям методом РНГА, с использованием оригинальных и недорогих в изготовлении эритроцитарных диагностических тест-систем. Предлагаемый нами способ позволяет определять как наличие, так и концентрацию противобактериальных антител в копрофильтратах человека. Особо следует отметить неинвазивность способа получения материала для исследования. Наибольшая реактивность интестинального иммунитета к бифидофлоре отмечена у детей от года до 6 лет, в остальных возрастных группах иммунореактивность проявлялась редко. Эти факты требуют дальнейших исследований и осмысления. Возможно, повышенная реактивность к антигенам бифидобактерий у детей раннего возраста может быть в какой-то степени обусловлена активной в последние годы практикой внедрения в организм эндогенных штаммов пробиотических микроорганизмов, используемых в препаратах и продуктах функционального питания (Бифидумбактерин, Бифидок и пр.) для коррекции дисбиозов. Видовая идентификация антител к бифидобактериям позволит получать объективную информацию о степени микробиологического дисбаланса и, следовательно, определять более адекватные методы коррекции дисбиозов, способствующие формированию нормальной микрофлоры.

### Список литературы

1. Патент № 2338197 РФ. Способ диагностики выраженности дисбактериоза кишечника / Алешукина А.В.; опубл. 2006.
2. Ипатова М.Г., Шумилов П.В., Мухина Ю.Г. и др. Дисрегуляция иммунного ответа на индигенную микрофлору у детей и подростков с воспалительными заболеваниями кишечника // Педиатрия. – 2010. – Т.89, №2. – С. 45-49.
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.
4. Патент № 2202801 РФ. Способ получения эритроцитарного антигенного диагностикума / С.И. Лещук, С.М. Попкова, Л.В. Сердюк и др.; опубл. 2007.
5. Патент № 2142807 РФ. Способ приготовления эритроцитарного иммунодиагностикума и способ оценки иммунорезистентности организма / С.И. Лещук, С.М. Попкова, Л.В. Сердюк [и др]; опубл. 1999.
6. Попкова С.М., Лещук С.И., Анненков В.В. и др. Сравнительная характеристика эритроцитарных иммунодиагностикумов по определению нормальных бактериальных антител // Бюллетень ВСНЦ СО РАМН. – 2007. – №3. – С. 43-48.
7. Попкова С.М., Шмелёва Е.А., Злобин В.И. Популяционный уровень иммунореактивности макроорганизма к антигенам микрофлоры человека (на примере взаимоотношений с антигенами *S.diphtheriae* и *Bifidobacterium*) // Бюллетень ВСНЦ СО РАМН. – 2003. – №1. – С. 164-169.
8. Ракова Е.Б., Попкова С.М., Джиоев Ю.П. и др. Видовая архитектура и плазмидный профиль бифидобактерий кишечной микрофлоры у населения Иркутской области // Вестник Российской военно-медицинской Академии. – 2008. – №2 (22), Ч.II. – С. 660-661.
9. Хавкин А.И. Микробиоценоз кишечника и иммунитет // Русский медицинский журнал. – 2003. – №11 (3). – С. 122-125.
10. Хаитов Р.М. Физиология иммунной системы. – М.: ВИНТИ РАН, 2001. – С. 223.
11. Хаитов Р.М., Пинегин Б.В. Иммунная система ЖКТ: особенности строения и функционирования в норме и патологии // Иммунология. – 1997. – №5. – С. 4-7.
12. Хромова С.С., Ефимов, Б.А., Тарабрина Н.П. и др. Иммунорегуляция в системе микрофлора – интестинальный тракт // Аллергология и иммунология. – 2004. – Т.5, №2. – С. 265-271.
13. Щелкунов С.Н., Салаяев Р.К., Рекославская Н.И. и др. Изучение иммуногенных свойств кандидатной съедобной вакцины против вирусов гепатита В и иммунодефицита человека на основе плодов трансгенных растений томата // Доклады Академии наук. – 2005. – Т. 401, №5. – С. 709-711.
14. Mayer L. Oral tolerance: new approaches, new problems // Clin. Immunol. – 2000. – №94. – P.1-8.
15. Mueller C., Macpherson A.J. Layers of mutualism with commensal bacteria protect us from intestinal inflammation // Gut. – 2006;55:276-284. doi: 10.1136/gut.2004.054098.
16. Pasquier Du.L., Flajnik M. Origin and evolution of the immune system // In: Paul WE, eds. Fundamental immunology, 4th edn. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1999:605-99.