

УДК 616-035.1

## АЛГОРИТМ ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЙ ДИАГНОСТИКИ И КОРРЕКЦИИ КИШЕЧНЫХ ДИСБИОЗОВ

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

<sup>1</sup>ФГБУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека»

Сибирского отделения РАМН, Иркутск, e-mail: radugarose@yandex.ru;

<sup>2</sup>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 микробиоты с изучением иммунореактивности организма к бифидобактериям (доминанте нормальной микрофлоры кишечника). Иммунологические исследования проводили с помощью эритроцитарного диагностикума, изготовленного по оригинальной запатентованной технологии, выявляющего в реакции непрямой гемагглютинации титры антител к антигенам бифидобактерий. В рамках задачи проведены бактериологические и серологические анализы 314 образцов копрофильтратов детей от 1 года до 14 лет. Определена структура дисбиозов и уровня иммунореактивности к индигенной микрофлоре. На основании изученных материалов предложен алгоритм комплексного исследования и обоснование возможных путей коррекции дисбиотических нарушений.

**Ключевые слова:** копрофильтрат, дисбиоз, бифидобактерии, иммунодиагностикум

## ALGORITHM OF DIFFERENTIAL DIAGNOSIS AND CORRECTION OF INTESTINAL DYSBIOSIS

<sup>1</sup>Serdjuk L.V., <sup>1</sup>Popkova S.M., <sup>1</sup>Rakova E.B., <sup>1</sup>Nemchenko U.M., <sup>1</sup>Savel'kaeva M.V.,  
<sup>1</sup>Leshhuk S.I., <sup>1</sup>Kichigina E.L., <sup>2</sup>Jurina G.V.

<sup>1</sup>The Scientific Center of Family Health and Human Reproduction Problems of Siberian Branch of RAMS,

Irkutsk, e-mail: radugarose@yandex.ru;

<sup>2</sup>Irkutsk State University, Irkutsk

We gave a theoretical justification of the method of intestinal dysbiosis correction, which based on a comprehensive immuno – microbiological examination combining with quantitative and qualitative composition study of intestinal microbiota as soon as with a study of immune reactivity of the organism to bifidobacteria. Immunological studies were performed using erythrocyte diagnosticum made by the original patented technology, tapping in the indirect hemagglutination titers of antibodies to antigens of bifidobacteria. In the framework of the task we performed bacteriological and serological tests of 314 samples coprofiltrates of children from 1 year to 14 years. Determined the structure and level of dysbiosis immunoreactivity to the indigenous microflora. Based on the results we presented the algorithm of comprehensive study with a justification of possible ways of correcting disbiotic changes.

**Keywords:** coprofiltrates, dysbiosis, bifidobacteria, immunodiagnosticum

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. Каловый микробиоценоз является сложным и динамичным [2], состав его индивидуален для каждого человека, что важно учитывать не только в диагностике дисбиоза, но и в выборе препаратов и способов его профилактики и коррекции.

Внедрение в микробиом кишечника пробиотических микроорганизмов и применение пребиотиков с целью коррекции дисбиозов часто имеет хороший результат [3]. Однако случаи отсутствия положительных эффектов данных способов коррекции наталкивают на мысль об отторжении внесённых эндогенных микроорганизмов-пробио-

тиков интестинальной иммунной системой, что может усугубить микроэкологический дисбаланс и вызвать усиление аллергизации организма [7].

Цель данного исследования – показать целесообразность комплексного изучения кишечной микробиоты, заключающегося в сочетании микробиологического исследования с оценкой уровня иммунореактивности организма к индигенной микрофлоре (бифидобактериям) по наличию антител против бифидобактерий, выявляемых в копрофильтратах человека с помощью эритроцитарных диагностикумов методом РНГА.

### Материалы и методы исследования

Объекты исследования. Были обследованы дети от 1 года до 14 лет, проживающие в городе Иркутске. При выполнении работы все исследования прово-

дильсь с соблюдением принципов добровольности и конфиденциальности в соответствии с «Основами законодательства РФ об охране здоровья граждан» (Указ Президента РФ от 24.12.1993 №2288).

**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. от 1991[6]. Исследовано 314 копрологических образцов.

**Серологические методы.** На наличие антител к бифидобактериям проанализировано 314 образцов 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 не прямой гемагглютинации (РНГА) с использованием оригинального эритроцитарного иммунодиагностикума на основе антигенов клеточных стенок *Bifidum bifidum* (коммерческий штамм *Bifidum bifidum* №1, «Ланафарм», г. Москва) [4; 5; 8].

**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 взвеси микробных клеток, выращенных на тиогликолевой среде, по стандарту мутности в концентрации не менее 10 млрд. клеток в 1 мл. Схема дезинтеграции состояла из 3-х идентичных этапов – по 4 мин с максимальной амплитудой ультразвука 100%. После 3 этапа контрольный мазок показал стопроцентное разрушение клеток. Дезинтегрированную микробную массу суспендировали в 10мл фосфатного буфера (рН 7,2) и центрифугировали в течение 10 мин при 2 000 об/мин (центрифуга К 70D, ГДР) для осаждения возможных не разрушенных 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 фракцией клеточных стенок бифидобактерий беспородных лабораторных мышей (30 штук, массой около 25 г.). Эксперименты с мышьями проводили на базе вивария НИИ Биофизики (ГОУ 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 внутрибрюшинно один раз в неделю в течение 3-х недель. Забор крови производили из сердца через неделю после последней иммунизации, предварительно усыпив животных эфиром.

### Результаты исследования и их 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), в норме колонизирующей 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 толстой кишки [10]. Наличие в крови высоких титров антител против бифидобактерий может привести к длительной дестабилизации саморегулирующейся кишечной экосистемы, что свидетельствует о срыве иммунологической толерантности к симбионтной микрофлоре [7]. Поэтому коррекция дисбиотических нарушений у детей должна проводиться не только на основании результатов бактериологического обследования, дающего информацию о количественном и качественном изменении в составе микробиоты, но и с учётом иммунной реакции организма на эти изменения.

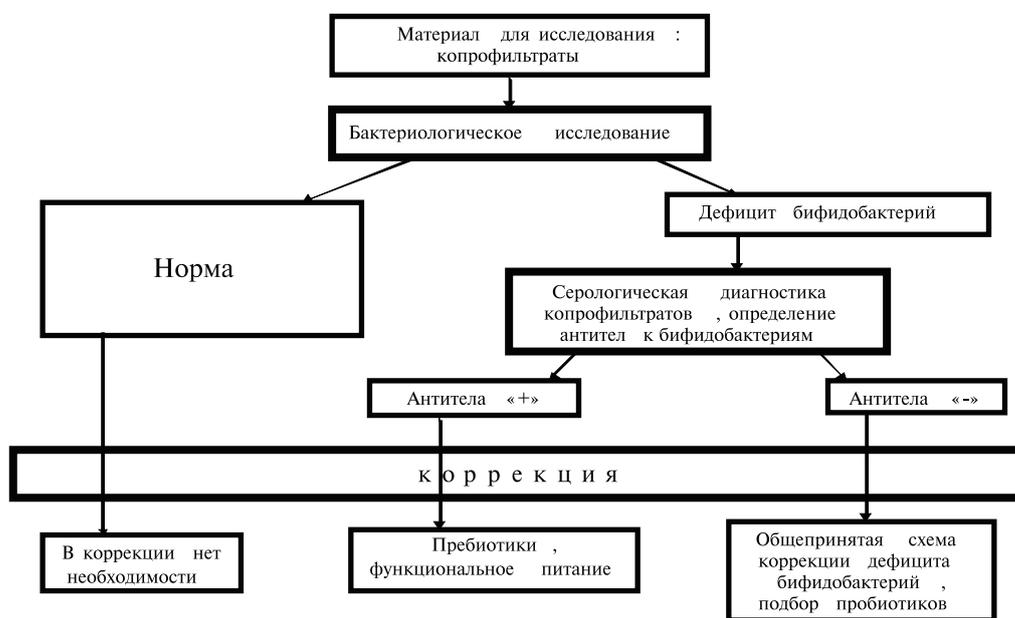
Проведенные исследования показали, что практически у всех обследованных детей выявлялись отклонения в составе микроорганизмов кишечной микробиоты относительно общезыбиологических нормативов [6]. Частота встречаемости дисбиотических нарушений составила 84,3%. При этом у всех детей, независимо от возраста, в 59,03% 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 года до 2-х лет.

Во всех возрастных группах наблюдалось угнетение индигенной флоры (бифидобактерии, лактобациллы, кишечная палочка с нормальной ферментативной активностью) на 1-2 порядка от физиологической нормы. У детей первых двух лет жизни с высокой частотой обнаруживались потен-

циально патогенные микроорганизмы семейства Enterobacteriaceae (Klebsiella spp., Enterobacter spp. и др.) [9].

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 микроэкологического статуса кишечного биотопа, опирающаяся на количественную оценку доминанты кишечного биотопа – бифидобактерий и степени иммунореактивности организма по отношению к ним. Согласно концепции возможны разные варианты коррекции дисбиоза, обусловленного дефицитом бифидобактерий. Данные исследования помогут подобрать более адекватную пробиотическую терапию. В зависимости от результата обследования показана соответствующая тактика коррекции дисбиоза (рисунок).



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

При отсутствии антител к бифидобактериям в копрофильтратах и наличии дисбиоза коррекция микроэкологических нарушений осуществляется традиционными методами: элиминация патогенов и условных патогенов, введение пробиотических и пребиотических препаратов, диетотерапия, функциональное питание.

При выявлении высокого уровня антител к бифидобактериям, свидетельствующем о «срыве» иммунологической толерантности, прогноз восстановления микробиоценоза менее благоприятен и требует специ-

ального подхода. При дисбиозах на фоне иммунореактивности к бифидофлоре показаны препараты–пребиотики, которые не вызывают усиления иммунореактивности, но способствуют росту индигенной микрофлоры пациента. При определении видового состава собственной бифидофлоры пациента молекулярно-генетическим методом (ПЦР) возможно применение пробиотиков с соответствующими организму видами.

Таким образом, выявление антител к бифидобактериям, в комплексе с бактериологическим и молекулярно-генетическим

исследованиями копрологического материала позволит дать более полную оценку микробиоценоза пациентов и, следовательно, выбрать наиболее адекватные способы восстановления нормальной микрофлоры кишечника. При этом, несмотря на унифицированность данного алгоритма, подход к каждому проявлению дисбиоза индивидуален.

#### Список литературы

1. Алешукина А.В. Комплексный способ диагностики степени выраженности дисбактериоза кишечника // Клиническая лабораторная диагностика. 2010. № 11. С.48-51.
2. Булатов В.П., Камалова А.А., Удачина Э.И., Зинкевич О.Д., Сафина Н.А., Шакирова А.Р. Современные методы диагностики дисбактериоза кишечника // Практическая медицина. Дата размещения: ноябрь 2010. Available at: <http://mfvt.ru/sovremennye-metody-diagnostiki-disbakterioza-kishechnika/> (дата обращения: 15.04.2011).
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. Лещук С.И., Даниловцева Е.Н., Сердюк Л.В., Попкова С.М., Анненков В.В. Способ получения эритроцитарного антигенного диагностикума. Патент РФ, № 2429483. 2009.
5. Лещук С.И., Попкова С.М., Сердюк Л.В. Способ определения специфических антител в копрофильтратах. Патент РФ, №2423709. 2010.
6. Отраслевой Стандарт: «Протокол ведения больных. Дисбактериоз кишечника». ОСТ 91500.11.0004-2003. Приказ МЗ РФ № 231; 09.06.2003.
7. Попкова С.М. Микробная экология человека в условиях техногенного прессинга промышленных городов Восточной Сибири: Дисс. ... докт. биол. наук. Иркутск, 2004.
8. Попкова С.М., Лещук С.И., Анненков В.В., Даниловцева Е.Н., Юринова Г.В., Сердюк Л.В. Современные подходы к конструированию препаратов в иммунотехнологии // Бюллетень Восточно-Сибирского научного центра СО РАМН. 2004. № 9. С. 50-54.
9. Ракова Е.Б., Попкова С.М., Немченко У.М., Ефимова Н.В., Мыльникова И.В., Тараненко Н.А. и др. Особенности микробиоценозов у детей, проживающих в условиях техногенного прессинга // Гигиена и санитария. 2011. №4. С.22-26.
10. Сердюк Л.В., Попкова С.М., Лещук С.И., Немченко У.М., Кичигина Е.Л. Изучение локального иммунитета по уровню нормальных антител к интестинальной микрофлоре (бифидобактериям) с помощью эритроцитарных тест-систем // Успехи современного естествознания. 2012. № 8. С. 21-24.