

# МИКРОБИОЦЕНОЗ ПРИ РАЗЛИЧНЫХ СОСТОЯНИЯХ

## ИЗМЕНЕНИЯ МИКРОБИОМА ПРИ ХОЛОДОВОМ СТРЕССЕ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ПРЕОБЛАДАНИЯ ТХ1 ИЛИ ТХ2 ТИПА ИММУННОГО ОТВЕТА

С. О. Абдулаева, Т. И. Хомякова, Ю. Е. Козловский, Ю. Е. Хомяков

НИИ морфологии человека РАМН ([tatkhom@mail.ru](mailto:tatkhom@mail.ru)), Москва, Россия

Считается, что холодное воздействие в значительной мере подавляет иммунный ответ организма, что приводит к развитию целого ряда патологических состояний, трудно поддающихся терапии [1]. Однако в ряде работ показано, что роль холодного стресса в развитии адаптивных и дизадаптивных реакций в организме определяется генетически обусловленным преимущественным типом иммунного ответа. Показано, что продукция цитокинов после холодного стресса различной продолжительности также различается у экспериментальных животных с преобладанием Тх1 или Тх2 типа иммунного ответа [2]. Помимо типа и уровня иммунной защиты, вероятность развития инфекционного процесса у человека и животных после переохлаждения может зависеть от наличия возбудителя, персистирующего в организме, и его способности к транслокации. В настоящее время возрос интерес к транслокации бактерий из кишечника в другие органы с последующим развитием инфекционных процессов [3]. В процессе переохлаждения, вероятно, происходит нарушение барьерной функции кишечника и бактерии способны распространяться в различные органы с током крови.

В настоящей работе **целью исследования** было оценить уровень основных представителей нормофлоры кишечника, а также оценить влияние холодного воздействия на уровень обсемененности различных органов у мышей C57Bl/6 и Balb/c с преобладанием соответственно Тх1 и Тх2 типа иммунного ответа.

**Материалы и методы.** В работе использовались половозрелые самцы мышей Balb/c (массой тела 23-25 г, n=60) и C57Bl/6 (массой тела 23-25 г, n=60) в возрасте 9-10 недель. Контрольная группа была представлена интактными животными. Мыши опытной группы были подвергнуты ежедневному 2-х минутному холодному воздействию. С этой целью животные помещались в воду со льдом ( $t^{\circ}=+4^{\circ}\text{C}$ ). Выведение животных опытных и контрольных групп из эксперимента проводилось на 9-е, 21-е и 42-е сутки после многократного холодного воздействия под эфирным наркозом путем цервикальной дислокации через 1,5 часа после последнего охлаждения. Для исследования микробиологической обсемененности образцы органов стандартных размеров (3x3x3 мм) гомогенизировались в 0,4 мл физиологического раствора, после инкубирования 1 час при комнатной температуре производили посев 0,05 мл физиологического раствора на сердечно-мозговой агар (HiMedia, Индия). Оценка состояния микрофлоры кишечника оценивали высевом из свежеполученных фекалий, гомогенизированных в физиологическом растворе, после инкубирования в течение 40 мин по следующим параметрам (КОЕ/мг фекалий): уровень лактозоположительных и лактозоотрицательных энтеробактерий, уровень энтерококков (*E. faecalis et fecium*), уровень лактобактерий на соответствующих питательных средах (HiMedia, Индия). Кроме того, оценивалось общее количество бактерий, образующих колонии в аэробных условиях на агаре Лурия-Бертани (LA) при 37°C за 18 часов.

**Результаты исследований.** Результаты исследований показали, что при сравнении уровня основных представителей нормофлоры в просвете кишечника имеются различия в количестве лактобактерий, при этом количество энтерококков и энтеробактерий у мышей двух линий достоверно не различается (табл.). Было обнаружено, что холодовой стресс вызывает сдвиги в уровне основных показателей просветной микрофлоры толстой кишки, которые, в основном, являются временными и обратимыми. Холодовой стресс вызывает понижение уровня лактозо-положительных энтеробактерий на 1-2 порядка (**Balb/C**), а в ряде случаев на 3 (**C57Bl/6**) порядка. Холодовой стресс повышает количество бактерий в крови и обсемененность печени, мезентериальных лимфатических узлов, легких и селезенки на 9-21 сутки. Количество бактерий в крови и в печени повышается на 9-21 сутки значительно у мышей **C57Bl/6**. При этом бактериальная обсемененность органов иммунной системы более выражена у мышей линии **Balb/C**. Обнаруженные сдвиги в значении основных показателей микрофлоры, так же как и степень обсемененности органов, уменьшаются на 42 сутки.

Содержание основных представителей нормофлоры в кишечнике мышей Balb/c и C57Bl/6 с преобладанием Th1 или Th2 типа иммунного ответа

КОЕ/г	Энтеробактерии (lac+)	Энтеробактерии (lac-)	Энтерококки <i>E. faecalis</i>	Энтерококки <i>E. fecium</i>	Лактобактерии
Balb/C	$10^6-10^7$	$10^4-10^5$	$<10^4$	$10^7-10^8$	$10^8-10^9$
C57Bl/6	$10^5-10^7$	$10^4-10^5$	$<10^4$	$10^7-10^8$	$10^7-10^8$

Таким образом, можно сделать вывод о том, что холодное воздействие может приводить к повышению бактериальной обсемененности органов, которая, возможно, связана с транслокацией бактерий из кишечника. Однако, в зависимости от генетически обусловленного типа иммунного ответа, возможна элиминация бактерий за счет иммунной защиты организма. Кроме того, холодовой стресс может вызывать выраженные сдвиги в состоянии микрофлоры кишечника с последующим развитием дисбиоза либо нормализацией процесса.

*Ключевые слова:* микрофлора кишечника, холодный стресс, иммунный ответ.

#### Литература

1. Immune response in cold exposed and cold adapted men / L. Jansky [et al.] // *Physiol. Res.* – 1993. – Vol. 42, N 4. – P. 16-20.
2. Сравнительная характеристика продукции цитокинов активированными конканавалином А спленоцитами мышей Balb/c и C57Bl/6 при холодном воздействии / О.В. Макарова [и др.] // *Бюл. эксперимент. биол. и мед.* – 2005. – № 2. – С. 188-190.
3. Противоречивая микроэкология / И.В. Домарадский [и др.] // *Рос. хим. журн.* – 2002. – № 3. – С. 80-89.

### CHANGES OF MICROBIOSIS UNDER COLD STRESS IN DEPENDENCE ON THE PREDOMINANCE OF TH1 OR TH2 TYPE OF IMMUNE RESPONSE

S. O. Abdulaeva, T. I. Khomyakova, Yu. E. Kozlovky, Yu. E. Khomyakov

*Research Institute of Morphology, Russian Academy of Sciences (tatkhom@mail.ru), Moscow, Russia*

It is believed that cold exposure suppresses the immune response with following development of pathological state. The purpose of the study was to assess the level of the main intestine normal flora representatives, as well as evaluate the influence of cold exposure on the level of contamination of various organs in mice of different lines (Balb/C and C57Bl/6). It was found, that there was a difference in the level of lactobacteria in comparison with the control groups. The cold exposure induced some changes in the bacterial status of liver, spleen, lymphatic nodes and lungs as well as in the intestinal microbiosis.

*Key words:* intestinal microflora, cold stress, immune response.

## ИЗМЕНЕНИЯ МИКРОФЛОРЫ КИШЕЧНИКА В УСЛОВИЯХ ГИПО- И ГИПЕРАНДРОГЕНЕМИИ

Е.А. Андреева, Т.И. Хомякова, Д.И. Солдатов, А.Д. Магомедова

НИИ морфологии человека РАМН ([tatkhom@mail.ru](mailto:tatkhom@mail.ru)), Москва, Россия

В регуляции иммунного и воспалительного ответа значительная роль отводится гормонам, в том числе андрогенам [1]. Показано, что андрогены повышают уровень продукции ряда провоспалительных цитокинов и усиливают пролиферативную активность лимфоцитов. Известно, что тестостерон также регулирует уровень экспрессии TLR4, при том, что активация TLR4 бактериальным липополисахаридом является центральным звеном передачи сигнала при грамотрицательной инфекции [2]. Одним из последствий кастрации у человека является повышение массы тела, при этом подходы к коррекции этого эффекта в основном включают применение замещающей гормональной терапии. Вместе с тем показано, что в развитии метаболического синдрома значительная роль отводится нарушениям в структуре микрофлоры кишечника. Нормализация микрофлоры с применением пробиотических препаратов дает хороший клинический эффект в отношении массы тела. Участие нормальной микрофлоры кишечника в контроле и поддержании иммунной защиты организма на уровне слизистого барьера и в целом доказано, однако изменения микрофлоры при первичном повышении или понижении уровня андрогенов остается до конца не изучены.

**Целью** настоящего исследования было изучение изменений микрофлоры кишечника в условиях экспериментальной гипо- и гиперандрогенемии.

**Материалы и методы исследования.** В работе использовали крыс-самцов Вистар массой тела 220-240 г, полученных из питомника «Столбовая» Московской обл. При работе с экспериментальными животными руководствовались приказом Минздрава СССР № 755 от 12.08.1977. Животные содержались в клетках при естественном освещении, температуре 20-22°C и свободном доступе к воде и пище. 2 опытных и контрольная группы составляли по 10 животных. Орхиэктомию проводили под эфирным наркозом. Гиперандрогенемии вызывали однократным введением фармакологического препарата тестостерона («Омнадрен 250») в дозе 200 мг/кг веса. Контрольная группа была представлена интактными животными. Животных выводили из эксперимента на 7 и 21 сутки после операции и инъекции тестостерона. Оценку состояния микрофлоры кишечника оценивали высевом из свежеполученных фекалий, гомогенизированных в физиологическом растворе, после инкубирования в течение 40 мин по следующим параметрам (КОЕ/мг фекалий): уровень лактозо-положительных и лактозо-отрицательных энтеробактерий, уровень энтерококков (*E. faecalis et fecium*), уровень лактобактерий на соответствующих питательных средах (HiMedia, Индия). Кроме того, оценивалось общее количество бактерий, образующих колонии в аэробных условиях на агаре Лурия-Бертани (LA) при 37°C за 18 часов.

**Результаты исследований.** У самцов, подвергшихся орхиэктомии было отмечено прогрессирующее нарастание уровня лактозо-отрицательных энтеробактерий от  $10^2$  КОЕ/г в контроле до  $10^4$ - $10^5$  КОЕ/г на 14 сут. после кастрации и  $10^5$ - $10^7$  КОЕ/г на 21 сут. В 25% случаев наблюдений отмечалось также незначительное повышение уровня лактозо-положительных энтеробактерий. При этом выявлялось резкое падение уровня энтерококков от  $10^5$ - $10^7$  КОЕ/г в контроле до  $10^3$  КОЕ/г (в 50% случаев) и менее. Уровень лактобактерий колебался не так выражено, с большим разбросом показателей в результате индивидуальных различий у животных.

При гиперандрогенемии отмечалось резкое повышение уровня как лактозоположительных (до  $10^7$  против  $10^3$ - $10^4$  КОЕ/г в контроле) так и лактозо-отрицательных (до  $10^7$  против  $10^1$ - $10^2$  КОЕ/г в контроле) энтеробактерий. Постепенное снижение уровня тестостерона сопровождалось также нормализацией уровня энтеробактерий, так что на 21 сут. различий между контрольной и опытной группами практически не было. Отмечалось некоторое повышение уровня энтерококков от  $10^5$ - $10^7$  КОЕ/г в контроле до  $10^6$  КОЕ/г (в 50% случаев), при этом на 21 сут. этот показатель достоверно снижался по сравнению с контролем ( $10^3$  КОЕ/г, при этом более выраженным было уменьшение уровня *E.faecalis* практически до полного их исчезновения). Достоверных различий в уровне лактобактерий при гиперандрогенемии обнаружено не было.

Нарушение уровня половых гормонов, как при гипер- так и при гипоандрогенемии у крыс вызвало на 7 сут. резкое повышение в фекалиях количества бактерий, образующих колонии в аэробных условиях на агаре Лурия-Бертани (LA). Количество бактерий на LA после орхиэктомии составило  $10^6$ - $10^7$  КОЕ/г против  $10^3$ - $10^4$  КОЕ/г в контроле, при этом основными представителями флоры были *Staphylococcus intermedius*, *Citrobacter freundii* и *Enterobacter agglomerans*. Эти показатели не нормализовались на 21 сут.

Таким образом, можно заключить, что экспериментальное нарушение уровня андрогенов у крыс-самцов вызывает достоверные сдвиги в микрофлоре кишечника, более выраженное и стойкое в случае орхиэктомии. Нормализация уровня тестостерона способствует возвращению большинства показателей к норме.

Изменения в уровне показателей нормофлоры при орхиэктомии позволяют предположить, что пероральное применение бактерий-пробиотиков может способствовать меньшей выраженности развития метаболического синдрома у мужчин, подвергшихся аналогичной операции.

Повышение уровня условно-патогенных бактерий в кишечнике при гипо- и гиперандрогенемии может быть, наряду со снижением общего иммунитета, причиной развития хронических и острых инфекционных процессов у больных.

*Ключевые слова:* микрофлора кишечника, гипо- и гиперандрогенемия.

#### Литература

1. Snider, H. Sex hormones and modulation of immunity against leishmaniasis / H. Snider, C. Lezama-Davila, J. Alexander // *Neuroimmunomodulation*. – 2009. – Vol. 16, N 2. – P. 106–113.
2. Effect of gender and sex hormones on immune responses following shock / M.K. Angele [et al.] // *Shock*. – 2000. – Vol. 14, N 2. – P. 81-90.

### CHANGES OF INTESTINAL MICROFLORA IN CONDITIONS OF HYPO- AND HYPERANDROGENEMIA

E.A. Andreeva, T.I. Khomyakova, D.I. Soldatov, A.D. Magomedova

*Institute of Human Morphology (tatkhom@mail.ru), Moscow, Russia*

Hormones play the pivotal role in immune regulation and inflammation response. Testosterone regulates the expression of TLR4. There should be the link between the level of hormones and the quantity of the most important elements of the intestinal microflora. The data of the microflora changes at the conditions of hypo- and hyperandrogenemia were absent. In the paper the experimental changes in the level of testosterone induced valid changes in intestinal microflora in rats were presented. The changes were more stable and expressed at castration-induced hypoandrogenemia. The decreasing of the level of testosterone coupled with normalization of intestinal microflora. The implication of oral probiotics can be useful against the development of metabolic syndrome after men castration. The increasing of the level of intestinal opportunistic infections at the changes of the testosterone level may be the reason of progression of acute and chronic men infection.

*Key words:* intestinal microflora, hypo- and hyperandrogenemia.

## МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЙ СТАТУС СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКИ ПОЛОСТИ НОСА У ВИЧ-ИНФИЦИРОВАННЫХ ЛИЦ

П. А. Затолока, М. Л. Доценко

Белорусский государственный медицинский университет  
(p.zatoloka@mail.ru), Минск, Беларусь

Воспалительные заболевания носа и околоносовых пазух являются одними из наиболее распространенных в природно-экологических условиях Республики Беларусь. При иммунодефицитных состояниях инцидентность указанной патологии значительно возрастает. Литературные данные указывают, что при хронической иммунологической недостаточности, к которой относят и ВИЧ-инфекцию, происходит активизация условно-патогенной микрофлоры, определяющей развитие, так называемых, оппортунистических заболеваний. Некоторые исследования выявили значительную распространенность грибковой микрофлоры у ВИЧ-инфицированных пациентов на слизистой оболочке полости носа [1, 2]. В других публикациях ведущая роль в развитии ринологической патологии отводится *St. aureus* [3, 4]. Однако указанные исследования производились в иных природно-климатических и социальных условиях [5]. С точки зрения назначения этиотропного лечения значительный интерес представляет закономерность изменения микробиологической картины слизистой оболочки полости носа в отсутствии ринологической патологии и при наличии таковой. Таким образом, знание микробного пейзажа слизистой оболочки полости носа у инфицированных вирусом иммунодефицита человека является весьма актуальным, учитывая столь значительную распространенность этой патологии у иммунокомпрометированных лиц.

**Цель** исследования – определить динамику микробиологического состояния слизистой оболочки полости носа у ВИЧ-инфицированных пациентов при отсутствии клинических признаков ринологической патологии, а также при хронических ринитах и хронических риносинуситах.

**Материал и методы.** В исследовании приняло участие 105 взрослых пациентов (старше 18 лет), состоящих на учете в консультативно-диспансерном отделении по ВИЧ-инфекции Минской городской клинической инфекционной больницы. Все пациенты были разделены в соответствии с клинической классификацией ВИЧ-инфекции у взрослых, предложенной Всемирной организацией здравоохранения в 2004 г. 48 (45,7%) человек имели первую стадию заболевания, 21 (20%) – вторую, 27 (25,7%) – третью, 9 (8,6%) – четвертую (СПИД). Мужчин обследовано 66 (62,9%), женщин – 39 (37,1%). Средний возраст –  $25,6 \pm 4,8$  года, максимальный – 51 год, минимальный – 18.

Оториноларингологический осмотр и забор материала со слизистой оболочки полости носа (мазок) для бактериологического исследования производили при очередном контрольном посещении консультативно-диспансерного отделения. Исследования выполнены в 2009-2010 гг.

**Результаты и обсуждения.** Всего было произведено 105 бактериологических исследований состояния слизистой оболочки полости носа у ВИЧ-инфицированных лиц. В том числе у 23 (21,9%), не имеющих патологии носа и околоносовых пазух. 46 (43,8%) у больных хроническим ринитом и 36 (34,3%) у больных хроническим риносинуситом. Было выделено 120 микроорганизмов. Рост микрофлоры отсутствовал у 12 (11%) обследованных. Монофлора выявлена в 71 (68%) случае, полифлора – в 22 (21%) (у 17 обследованных – 2 микроорганизма, у 5 – 3). Результаты микробиологического исследования состояния слизистой оболочки полости носа у ВИЧ-инфицированных лиц представлены в таблице.

Микрофлора слизистой оболочки полости носа у ВИЧ-инфицированных без патологии и с хроническими заболеваниями носа и околоносовых пазух

Выделенный микроорганизм	Патология носа не выявлена, n=26		Хронический ринит, n=51		Хронический синусит, n=43	
	абс.	%	абс.	%	абс.	%
<i>St. aureus</i>	11	<b>42,3</b>	28	<b>54,9</b>	10	<b>23,3</b>
<i>Escherichie coli</i>	1	<b>3,8</b>	1	<b>2,0</b>	1	<b>2,3</b>
<i>St. epidermidis</i>	4	<b>15,4</b>	3	<b>5,9</b>	8	<b>18,6</b>
<i>Str. haemolyticus A</i>	1	<b>3,8</b>	2	<b>3,9</b>	2	<b>4,7</b>
<i>Candida non-alb</i>	-	-	1	<b>2,0</b>	4	<b>9,3</b>
<i>Candida alb</i>	-	-	2	<b>3,9</b>	5	<b>11,6</b>
Коагулазонегативный стафилококк	6	<b>23,1</b>	9	<b>17,6</b>	8	<b>18,6</b>
<i>St. hominis</i>	1	<b>3,8</b>	-	-	-	-
<i>Str. pneumoniae</i>	-	-	3	<b>5,9</b>	3	<b>7,0</b>
<i>Serratia marcescens</i>	-	-	-	-	1	<b>2,3</b>
<i>Cryptococcus laurentii</i>	-	-	1	<b>2,0</b>	-	-
<i>Str. pyogenes</i>	1	<b>3,8</b>	1	<b>2,0</b>	-	-
<i>Kl. pneumoniae</i>	-	-	-	-	1	<b>2,3</b>
<i>St. capitis</i>	1	<b>3,8</b>	-	-	-	-

Примечание: частота встречаемости (в %) рассчитана для каждой в отдельности группы пациентов.

У 23 (21,9%) обследованных пациентов при объективном осмотре оториноларинголога не имелось клинических признаков патологии носа и околоносовых пазух. Рост микрофлоры при бактериологическом исследовании со слизистой оболочки полости носа отсутствовал у 3 (13%) из них. У 16 (70%) ВИЧ-инфицированных выявлена монофлора, у 4 (17%) – полифлора (у 2 обследованных – 2 микроорганизма, у 2 – 3). Среди указанной группы лиц в 25 (96%) случаях выделена грамположительная флора (стрептококки, стафилококки). В 88,4% случаев были идентифицированы стафилококки. *St. aureus* выявлен у 11 (42,3%) пациентов, коагулазонегативный стафилококк – у 6 (23,1%), эпидермальный стафилококк – у 4 (15,4%); реже (3,8%) *St. hominis* и *St. capitis*. Стрептококки верифицированы в 2 (7,6%) случаях. Всего у этой группы пациентов выявлено 8 различных микроорганизмов.

У 46 ВИЧ-инфицированных больных хроническими ринитами микробиологический пейзаж слизистой оболочки полости носа несколько отличался. Полифлора выявлена у 7 (15%) пациентов (у 4 обследованных – 2 микроорганизма, у 3 – 3), монофлора – у 34 (74%), рост микрофлоры отсутствовал у 5 (11%). Всего идентифицировано 10 различных микроорганизмов. Стафилококки также оказались наиболее распространенными микроорганизмами (выделены в 78,4% случаев). *St. aureus* лидирует по частоте встречаемости, выделен более чем в половине случаев (28 наблюдений) – 54,9%. Другие стафилококки верифицированы значительно реже: коагулазонегативный – в 17,6% случаев, эпидермальный – в 5,9%. Стрептококки верифицированы в 11,8% случаев. Грибковый процесс выявлен у 4 (7,9%) больных.

У 36 ВИЧ-инфицированных пациентов, больных хроническими синуситами, обнаружено сочетание микроорганизмов на слизистой оболочке полости носа в 11 (31%) случаях (у 11 обследованных – по 2 микроорганизма), монофлора в 21 (58%). Рост микрофлоры отсутствовал у 4 (11%) пациентов. Всего выделено 10 различных микроорганизмов. В микробном пейзаже также преобладали стафилококки, однако частота их встречаемости меньше, чем в предыдущих случаях, выявлены в 60,5% случаев: *St. aureus* – 23,3%, *St. epidermidis* – 18,6%, коагулазонегативный стафилококк – 18,6%. Стрептококки верифицированы в 11,7% случаев. В единичных случаях выявлена атипичная микрофлора (*Kl. pneumoniae*, *Serratia marcescens*). При хронических синуситах в

20,9% случаях выявлена грибковая микрофлора (*Candida alb* – 11,6%, *Candida non-alb* – 9,3%).

Частота встречаемости стафилококков по мере распространения патологии прогрессивно снижается (при отсутствии патологии носа – 88,4%, при хроническом рините – 78,4%, при хроническом синусите – 60,5%). Вместе с тем, *St. aureus* является наиболее распространенным микроорганизмом во всех описанных группах пациентов (при отсутствии патологии носа – 42,3%, при хроническом рините – 54,9%, при хроническом синусите – 23,3%). При патологии носа и околоносовых пазух увеличивается разнообразие микрофлоры (в норме выделено 8 различных микроорганизмов, при патологии – 10). Частота выявления стрептококков на слизистой оболочке полости носа во всех группах пациентов достоверно не отличалась (патология носа отсутствует – 7,6%, хронический ринит – 11,8%, хронический синусит – 11,7%). При отсутствии патологии носа у лиц с вирусным иммунодефицитом грибки выявлены не были. При хронических ринитах микозы выявлены в 7,9% случаях, при хронических синуситах – в 20,9%. Полифлора у ВИЧ-инфицированных пациентов без патологии носа и околоносовых пазух выявлена в 4 (17%) случаях, у больных хроническими ринитами – в 7 (15%), у больных хроническими синуситами достоверно больше – в 11 (31%) случаях.

#### **Выводы:**

1. *St. aureus* является наиболее распространенным микроорганизмом во всех описанных группах пациентов (при отсутствии патологии носа – 42,3%, при хроническом рините – 54,9%, при хроническом синусите – 23,3%);

2. При отсутствии ринологической патологии грибковая микрофлора из полости носа не выделена у ВИЧ-инфицированных, при хронических ринитах микозы выявлены в 7,9% случаях, при хронических синуситах – в 20,9%.

3. Полифлора у ВИЧ-инфицированных больных хроническими синуситами выявляется достоверно больше – в 31% случаев.

*Ключевые слова:* микрофлора, слизистая оболочка полости носа человека, ВИЧ-инфекция.

#### **Литература**

1. Kingdom, T.T. Actinomycosis of the nasal septum in a patient infected with the human immunodeficiency virus / T.T. Kingdom, T.A. Tami // *Otolaryngol. Head Neck Surg.* – 1994. – Vol. 111. – P. 130-133.
2. Lee, L.R. Aspergillus sphenoid sinusitis-induced orbital apex syndrome in HIV infection / L.R. Lee, T.J. Sullivan // *Aust. N. Z. J. Ophthalmol.* – 1995. – Vol. 23. – P. 327-331.
3. Staphylococcus aureus nasal colonization in HIV outpatients: persistent or transient? / M.C. Padoveze [et al.] // *Am. J. Infect. Control.* – 2008. – Vol. 36. – P. 187-191.
4. Prevalence and risk factors of nasal colonization with Staphylococcus aureus – association with HIV infection in older patients / U. Seybold [et al.] // *Scand. J. Infect. Dis.* – 2009. – Vol. 41. – P. 63-66.
5. Prevalence of and risk factors for nasal colonization with Staphylococcus aureus among human immunodeficiency virus-positive outpatients in Singapore / J.S. Villacian [et al.] // *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* – 2004. – Vol. 25. – P. 438-440.

## **MICROBIOLOGICAL STATUS OF NASAL MUCOSA IN HIV-INFECTED PATIENTS**

**P. A. Zatoloka, M. L. Dotsenko**

*Belarusian State Medical University (p.zatoloka@mail.ru), Minsk, Belarus*

The microflora of human nasal mucosa in HIV-infection in the absence of pathology, also in cases of chronic sinusitis and chronic rhinitis patients had been investigated. Opportunistic gram-positive microflora on the nasal mucosa had been detected in the majority of HIV-infected patients. *St. aureus* is the most widespread microorganism in all groups of patients observed (in chronic rhinitis – 54,9% of cases, in chronic sinusitis – 23,3%, in the absence of pathology – 42,3%). Mycotic microflora on the nasal mucosa hadn't been observed in the absence of pathology. In chronic rhinitis fungal infection was detected in 7,9% of cases, and in chronic sinusitis – in 20,9%.

*Key words:* microflora, human nasal mucosa, HIV-infection.

## ШТАММ МОЛОЧНОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ, ПЕРСПЕКТИВНЫЙ ДЛЯ ВКЛЮЧЕНИЯ В СОСТАВ ПРОБИОТИЧЕСКОГО ПРЕПАРАТА

А. В. Ижик, Д. В. Рахуба, Г. И. Новик

Институт микробиологии НАН Беларуси (izhyk85@mail.ru), Минск, Беларусь

**Введение.** Бактерии рода *Lactobacillus* широко используются в качестве основы пробиотических препаратов и диетических продуктов питания, предназначенных для лечения и профилактики дисбиотических состояний желудочно-кишечного тракта, стимуляции иммунной системы и нормализации обмена веществ [1, 2]. Дисбиотические состояния широко распространены, имеют тяжелые последствия для здоровья, поэтому препараты для коррекции нарушенной микробиоты занимают одно из ведущих мест в комплексной терапии и профилактике заболеваний, при которых регистрируется дисбиоз [3]. Пробиотические микроорганизмы, кроме таких свойств, как способность оставаться жизнеспособными при прохождении через ЖКТ (устойчивость к действию желчных кислот, соляной кислоты и панкреатических ферментов), способность к адгезии с эпителием слизистой кишечника, синтез антимикробных веществ против патогенных микроорганизмов, возможность колонизации кишечника или соответствующего органа-мишени, безопасность применения у человека, клинически доказанная польза для здоровья, должны обладать такими признаками, как сохранение жизнеспособности при длительном хранении и устойчивость к антибиотикам, применяемым в клинической практике [4]. Результаты микробиологического исследования, в ходе которого проводилось изучение чувствительности пробиотиков, входящих в состав ряда молочных продуктов и лекарственных препаратов (34 штамма *Bifidobacterium spp.* и *Lactobacillus spp.*, и 21 штамм бактерий, используемых для ферментирования молочных продуктов (закваски), показали, что пробиотические микроорганизмы чувствительны к большинству групп антимикробных препаратов [5].

**Целью исследования** является получение нового штамма *Lactobacillus plantarum* БИМ В-495-Д (далее *Lb. pl.* БИМ В-495-Д), обладающего резистентностью к различным антибиотикам нового поколения, а также изучение ценных признаков штамма (фагоустойчивость, продукция биологически активных веществ).

**Методы.** Для получения штамма *Lb. pl.* БИМ В-495-Д была проведена селекция штамма *Lactobacillus sp.* Штамм были идентифицированы в лаборатории «Коллекция микроорганизмов» Института микробиологии как *Lactobacillus plantarum* на основании совокупности морфологических, культуральных и физиолого-биохимических признаков.

Селекция проводилась без использования химических и физических мутагенных факторов и генно-инженерных методов посредством длительной адаптации штамма к постепенно увеличивающимся концентрациям антибиотиков в среде культивирования. Как антимикробные агенты были взяты антибиотики нового поколения различной химической структуры:

1. Кларитромицин (макролиды) — блокирует биосинтез белков, связываясь с 50S-субъединицей рибосом.
2. Азитромицин (азалиды) — угнетает пептидтранслоказу.
3. Тримоксазол (сульфаниламиды) — блокирует синтез фолатов в клетке.
4. Ципрофлоксацин (хинолоны) — угнетает ДНК-гиразу, нарушая синтез ДНК.
5. Метронидазол (имидазолы) — ингибирует синтез нуклеиновых кислот.
6. Амоксициллин (пенициллины) — угнетает транспептидазу, вызывает лизис клетки.



Штамм культивировали глубинно на жидкой типовой питательной среде МРС с цистеином (рН 7,0) в течение 18–24 часов при температуре 37°C в микроаэрофильных условиях. Полученная культуральная жидкость является жидкой формой пробиотического препарата. Оптимум температуры 37°C, но штамм растёт в интервале температур от 28°C до 43°C. Характерно наличие роста при рН от 5,0 до 7,8. Возможно поверхностное культивирование штамма на агаризованной (2 % агара) типовой среде МРС.

Антибиотикорезистентность исходных штаммов определяли по уровню накопления биомассы при культивировании на среде МРС (табл.1). Далее производили постепенное увеличение концентрации антибиотиков в среде культивирования. В случае отсутствия или частичного ингибирования проводили постепенное увеличение концентрации препарата в среде культивирования от 2,5 до 10 мкг/мл. В случае полного ингибирования осуществляли ряд последовательных пересевов культуры (до 10) в среду с концентрацией препарата 2,5 мкг/мл с целью адаптации штамма к минимальной концентрации антибиотика, а затем начинали увеличивать концентрацию до 10 мкг/мл. Далее штаммы в течение длительного периода ежедневно пересевали в среды с максимальными концентрациями препаратов для закрепления признака антибиотикорезистентности.

Устойчивость к бактериофагам является значимым признаком для пробиотических микроорганизмов, так как в условиях производства возможна потеря жизнеспособности бактериальной культуры вследствие контаминации фагами молочнокислых бактерий.

Для проверки на фагоустойчивость бактерии культивировали при 37°C в среде МРС в течение ночи, а утром пересаживали в свежую среду МРС с добавлением  $\text{Ca}^{+2}$  в концентрации 5 мМ для получения подрощенной культуры. Далее в подрощенную культуру *Lb. pl.* БИМ В-495-Д вносили лизат фага (10:1) и инкубировали при 37 °С. Каждые 60 мин отбирали равные аликвоты культуральной жидкости и измеряли оптическую плотность, по изменению которой судили о наличии или отсутствии лизиса бактерий фагами. В качестве контроля служили 20 штаммов молочнокислых бактерий, которые заражались теми же штаммами бактериофагов.

В настоящее время актуальным является получение штаммов микроорганизмов, которые не только сами являются носителями пробиотических свойств, но и являются продуцентами биологически активных субстанций, способных стимулировать рост нормальной микрофлоры кишечника. Такими субстанциями являются липиды пробиотических бактерий.

Для выделения липидных компонентов *Lb. pl.* БИМ В-495-Д культивирование бактерий проводили в среде МРС в течение 24 часов при 37°C. Полученную биомассу трижды отмывали фосфатным буфером и один раз водой. Экстракцию липидов проводили двумя методами: с помощью органических растворителей, а также с использованием сверхкритического диоксида углерода ( $\text{scCO}_2$ ). При экстракции органическими растворителями к 1 г влажной биомассы добавляли 15 мл смеси растворителей хлороформ-метанол (2:1) и инкубировали на качалке в течение 24 часов при 37°C. Далее биомассу отделяли от растворителей центрифугированием и экстрагировали заново свежей порцией растворителей при тех же условиях. Экстрагированный материал растворяли в хлороформе и наносили на колонку с силикагелем. Колонку элюировали порциями хлороформа, ацетона и метанола для получения фракций нейтральных, глико- и фосфолипидов соответственно. Анализ полученных фракций проводили с помощью тонкослойной хроматографии.

Для выявления ростстимулирующей активности выделенных липидных компонентов изучали активность роста трёх штаммов пробиотических микроорганизмов (А — *Lb. pl.* БИМ В-495-Д, Б — *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* В-424-Д, В — *Bifidobacterium adolescentis* 94-БИМ) в присутствии гликолипидного (1) и фосфолипидного (2)

компонента *Lactobacillus plantarum* БИМ В-495-Д. Компоненты (1 мкг/50 мкл метанола) помещали в ячейки полистирольных планшетов «Greiner» и оставляли на 4 ч при 24°C для полного испарения метанола. В качестве посевного материала были использованы физиологически активные культуры 3-ей генерации. В каждую лунку было внесено по 200 мкл МРС и по 10 мкл инокулята (5 %). Планшет был помещён в термостат (37°C) на 24 ч, по истечении которых была измерена оптическая плотность культуральной жидкости. В качестве контроля была использована культура без внесения компонента.

**Результаты и обсуждение.** Характер роста бактерий в присутствии антибиотика может быть определен как ингибирование, частичное или полное подавление процесса пролиферации клеток препаратом.

Таблица 1

Резистентность исходного штамма *Lactobacillus* sp. к различным антимикробным агентам

Антибиотик	Концентрация, мкг/мл	Резистентность	
		24 ч	48 ч
Кларитромицин	2,5	–	–
	5,0	–	±
	7,5	±	+
	10,0	±	+
Азитромицин	2,5	±	±
	5,0	±	+
	7,5	+	+
	10,0	±	+
Тримоксазол	2,5	±	+
	5,0	+	+
	7,5	+	+
	10,0	+	+
Ципрофлоксацин	2,5	–	±
	5,0	±	±
	7,5	±	±
	10,0	±	+
Метронидазол	2,5	±	+
	5,0	±	+
	7,5	+	+
	10,0	±	+
Амоксициллин	2,5	±	±
	5,0	±	+
	7,5	+	+
	10,0	±	+

*Примечание:* – полное ингибирование роста культуры, ± частичное ингибирование, + отсутствие ингибирования

Очевидно, что исходные штаммы наиболее чувствительны к кларитромицину и ципрофлоксацину, только при добавлении этих препаратов в минимальной дозе в среду культивирования наблюдалось полное ингибирование роста микроорганизмов. Наименьшая чувствительность была выявлена к тримоксазолу и метронидазолу. Азитромицин и амоксициллин оказывали частичное ингибирующее действие на рост бактериальных культур. По мере увеличения концентрации препаратов чувствительность к ним уменьшалась, однако при увеличении концентрации до 10 мкг/мл снова наблюдалось частичное ингибирование роста через 24 часа культивирования.

После многократных последовательных пересевов наблюдалось отсутствие ингибирования через 20-24 часа культивирования, что говорит о полной адаптации бактерий к максимальной концентрации препаратов.

В таблице 2 представлены результаты, полученные при исследовании фагоустойчивости штамма *Lb. pl.* БИМ В-495-Д. Как видно из результатов, данный штамм проявляет устойчивость ко всем фагам, использованным в данном опыте. В течение 4 часов после добавления вирусов к культуре клеток наблюдался рост оптической плотности во всех вариантах опыта, что свидетельствует об активном развитии бактериальной популяции и отсутствии фаголизиса, в то время как при добавлении данных штаммов бактериофагов к культуре контрольных клеток (в таблице — *Lactococcus lactis*) наблюдался лизис в течение 1–4 часов.

Таблица 2

Фагоустойчивость *Lb. pl.* БИМ В-495-Д

Штамм бактериофага	Оптическая плотность ( $\lambda=590$ нм)				
	0 мин	60 мин	120 мин	180 мин	240 мин
<i>Lactobacillus plantarum</i> В-495-Д					
Е1	0,219	0,325	0,562	0,744	1,023
Е2	0,253	0,365	0,423	0,753	1,124
Е3	0,206	0,329	0,420	0,504	0,736
Е5	0,226	0,385	0,601	0,803	1,024
Е6	0,174	0,293	0,408	0,559	1,077
Е8	0,211	0,337	0,430	0,538	0,807
Е13	0,194	0,300	0,398	0,515	0,750
Е16	0,218	0,349	0,497	0,660	0,862
Е20	0,216	0,353	0,487	0,720	0,987
Е21	0,227	0,348	0,421	0,565	0,800
Е22	0,195	0,315	0,407	0,549	0,745
Е23	0,230	0,341	0,449	0,578	0,811
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> 501					
		0,039	-	-	-
Е2	0,355	0,053	-	-	-
Е3	0,236	0,553	0,877	0,053	-
Е5	0,324	0,042	-	-	-
Е6	0,158	0,005	-	-	-
Е8	0,300	0,819	0,903	0,903	0,063
Е13	0,340	0,682	0,536	0,119	0,058
Е16	0,387	0,848	0,363	0,028	-
Е20	0,476	0,004	-	-	-
Е21	0,305	0,867	0,968	1,023	0,120
Е22	0,337	0,815	0,830	0,615	0,066
Е23	0,148	0,232	0,317	0,078	-

На рис. 1 представлен анализ фракций, полученных при элюировании колонки хлороформом, ацетоном и метанолом. Фракции 1-4, которые были получены при элюировании колонки хлороформом, содержали большую часть нейтральных липидов из исходного экстракта. Ацетоновые фракции 5-8 характеризовались большим количест-

вом гликолипидов. Однако фракция 5 и в меньшей степени фракция 6 содержали также некоторое количество нейтральных липидов. Фракции 7 и 8 были в дальнейшем были использованы для анализа гликолипидных компонентов, поскольку в них не было обнаружено фосфолипидов, которые обнаруживались в больших количествах в метанольных фракциях 9–11, а содержание нейтральных липидов было незначительным.

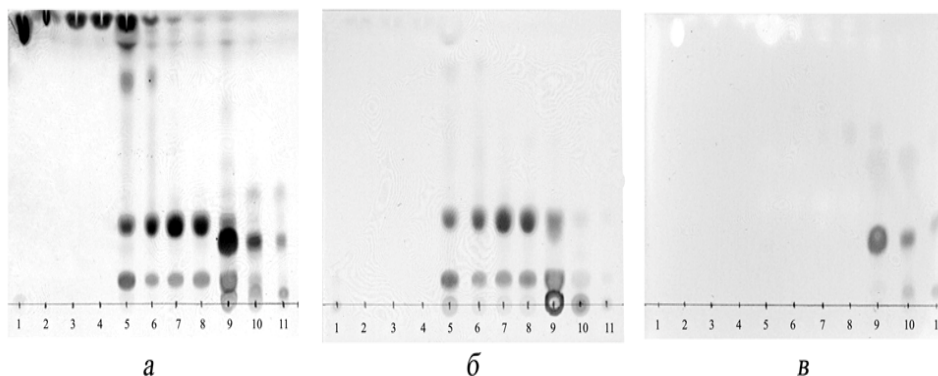


Рис. 1. ТСХ анализ липидных фракций *Lb. pl.* БИМ В-495-Д, полученных при колоночной хроматографии на силикагеле: 1, 2, 3, 4 — хлороформенные фракции; 5, 6, 7, 8 — ацетоновые фракции; 9, 10, 11 — метаноловые фракции; а) общие липиды (окраска ванилином); б) гликолипиды (окраска орцинолом); в) фосфолипиды (окраска молибденовым реагентом)

Показано, что максимальный ростстимулирующий эффект липидные компоненты оказывают на культуру *Lb. pl.* БИМ В-495-Д (рис. 2). В целом, гликолипидный компонент обладает более выраженной ростстимулирующей активностью по сравнению с фосфолипидным.

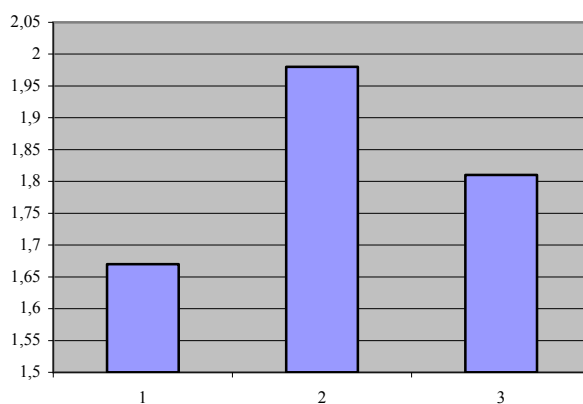


Рис. 2. Аутостимулирующая активность липидных компонентов *Lb. pl.* БИМ В-495-Д

**Заключение.** Получен антибиотикорезистентный штамм молочнокислых бактерий, способный к росту при высоких концентрациях антибиотиков различного действия в среде культивирования. Также штамм характеризуется фагоустойчивостью и продуцирует биологически активные липиды.

#### Литература

1. Шендеров, Б.А. Медицинская микробная экология и функциональное питание / Б.А. Шендеров. М.: Изд-во «ГРАНТЪ», 2001. – Т. III: Пробиотики и функциональное питание. – 288 с.
2. Coeuret, V. Numbers and strains of lactobacilli in some probiotic products / V. Coeuret, M. Gueguen, J.P. Vernoux // *Int. J. Food Microbiol.* – 2004. – Vol. 97. – P. 147-156.
3. History, present situation, and prospects of probiotic research conducted in the G.N. Gabrichevsky Institute for Epidemiology and Microbiology / V.A. Aleshkin [et al.] // *Microb. Ecol. Yealth Dis.* – 2008. – № 20. – P. 113-115.

4. Корниенко, Е.А. Современные принципы выбора пробиотиков / Е.А. Корниенко // Детские инфекции. – 2007. – № 3. – С. 64-69.

5. Андреева, И.В. Доказательное обоснование применения пробиотиков для лечения и профилактики заболеваний ЖКТ / И.В. Андреева // Мед. совет. – 2007. – № 3. – С. 25-32.

#### **ШТАММ МОЛОЧНОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ, ПЕРСПЕКТИВНЫЙ ДЛЯ ВКЛЮЧЕНИЯ В СОСТАВ ПРОБИОТИЧЕСКОГО ПРЕПАРАТА**

**А. В. Ижик, Д. В. Рахуба, Г. И. Новик**

*Институт микробиологии НАН Беларуси (izhyk85@mail.ru), Минск, Беларусь*

Получен антибиотикорезистентный штамм молочнокислых бактерий, способный к росту при высоких концентрациях антибиотиков различного действия в среде культивирования. Также штамм характеризуется фагоустойчивостью и продуцирует биологически активные липиды.

*Ключевые слова:* штамм молочнокислых бактерий, антибиотикорезистентность, фагоустойчивость.

#### **CULTURE OF LACTIC-ACID BACTERIUM PERSPECTIVE FOR INCLUSION IN COMPOSITION OF THE PROBIOTIC PREPARATION**

**A. V. Izhyk, D. V. Rakhuba, G. I. Novik**

*The Institute of Microbiology of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus*

Antibiotic resistant culture of the lactic-acid bacteria capable to growth at high concentration of antibiotics of various actions in the environment of cultivation was obtained. The culture obtained was also phage-resistant and produced biologically active lipids.

*Key words:* lactic-acid bacteria, culture, antibiotic resistance, phage resistance.

#### **ПОЛУЧЕНИЕ, ХАРАКТЕРИСТИКА И ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ПОЛИКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ КРОЛИКОВ К АНТИГЕНАМ БИФИДОБАКТЕРИЙ**

**Е. П. Киселева<sup>1</sup>, К. И. Михайлопуло<sup>1</sup>, О. В. Цыганова<sup>1</sup>,  
А. В. Ижик<sup>2</sup>, Г. И. Новик<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>*Институт биоорганической химии НАН Беларуси (epkiseleva@yandex.ru);*

<sup>2</sup>*Институт микробиологии НАН Беларуси (galina\_novik@inmi.by), Минск, Беларусь*

Микрофлора желудочно-кишечного тракта является одним из ведущих факторов внешней среды, оказывающих влияние на физиологический, биохимический и иммунный статус человека [1]. Особый интерес вызывают бифидобактерии, первыми заселяющие стерильный кишечник новорожденного и широко применяемые в качестве пробиотических микроорганизмов. Основой симбиоза является иммунологическая толерантность организма-хозяина по отношению к нормофлоре. Формирование иммунологической толерантности происходит у индивидуума в период его внутриутробного развития в результате «предъявления» лимфоцитам плода антигенов, циркулирующих в крови матери. Поскольку возможность индукции толерантности определяется массивностью антигенной дозы, дефицит кишечной индигенной микрофлоры в организме беременной женщины создает предрасположенность к развитию иммунного ответа на экзогенные пробиотические микроорганизмы у новорожденного ребенка [2]. Следствием этого является невозможность нормальной колонизации микроорганизмами кишечника младенца и его предрасположенность к дисбактериозу. Определение антител к симбионтной микрофлоре в сыворотке крови беременной женщины позволит своевременно

организовать профилактику дисбактериоза новорожденного путем максимального насыщения кишечника матери пробиотическими микроорганизмами до родов и в начальный период после родов [2].

**Цель работы** — получение и тестирование поликлональных антител животных к бифидобактериям с целью их использования в качестве компонентов тест-системы для количественного определения специфических антител в сыворотке крови человека методом иммуноферментного анализа (ИФА).

**Методы. Получение клеток бактерий для иммунизации и ИФА.** Использовали культуры третьей генерации *Bifidobacterium bifidum* 791, *Lactobacillus plantarum* В-01 и *Bacillus cereus* из научной коллекции типовых и промышленно-ценных непатогенных микроорганизмов Института микробиологии НАН Беларуси. Осаждали клетки центрифугированием при 5000 g в течение 20 мин и промывали трижды 0,02 М натрий-фосфатным буфером, рН 7,0, содержащим 0,2 М NaCl (буфер 1). Клетки суспендировали в H<sub>2</sub>O, переносили в ампулы (по 0,5 мл) и лиофилизовали в условиях, обеспечивающих потерю клетками жизнеспособности.

**Иммунизацию** шестимесячных самцов-кроликов осуществляли на 1, 14, 28, 60-й дни с начала процедуры. Содержимое каждой ампулы с лиофилизированными клетками *B. bifidum* 791 суспендировали в 1 мл стерильного 0,15 М NaCl. 0,1 мл суспензии смешивали с 2 мл полного адьюванта Фрейнда и вводили животным подкожно в область лопаток. Отбор крови осуществляли на 40, 72, 100-й день. Кровь инкубировали при 37°C в течение 30 мин и при 4°C в течение 4 часов, а затем центрифугировали при 1000 g в течение 15 мин. Сыворотку хранили при -70°C.

**Сравнение количества клеток в лиофилизированных препаратах бактерий.** Содержимое ампул с лиофилизированными клетками *B. bifidum* 791, *L. plantarum* В-01 и *B. cereus* суспендировали в 500 мкл H<sub>2</sub>O. Суспензии клеток каждого штамма вносили по 50, 100, 200 мкл в три пробирки, добавляли H<sub>2</sub>O до 200 мкл и 3 мл 30% серной кислоты. Каждую пробу на основе *B. bifidum* 791 разводили дополнительно 30% серной кислотой в 11 раз. Выдерживали 1 ч. Определяли оптическую плотность при длине волны 260 нм ( $D_{260}$ ). Строили графики зависимости значений  $D_{260}$  от содержания исходной суспензии в анализируемом образце. Для каждого штамма определяли содержание исходной суспензии в анализируемом образце, соответствующее значению  $D_{260}$ , равному 1. Рассчитывали соотношение указанных показателей для трех штаммов. В дальнейшем для уравнивания в ИФА содержимое ампул с лиофилизированными клетками трех штаммов суспендировали в равном объеме буфера, а затем отбирали количества суспензий, соответствующие рассчитанной пропорции, и доводили их тем же буферным раствором до равных объемов.

**ИФА.** Для определения рабочего титра ПАТ использовали планшеты Greiner bio-one (Germany) с иммобилизованными клетками *B. bifidum* 791. Содержимое одной ампулы суспендировали в 2 мл буфера 1, разводили тем же буфером в 250 раз и вносили по 100 мкл в лунки планшетов. Иммобилизацию проводили в течение ночи при 4°C. После промывки лунок буфером 1 инкубировали иммобилизованные клетки со специфическими сыворотками кроликов, предварительно разведенными в определенное число раз в диапазоне 1/2000 – 1/360000 2 ч при 18-25°C. Иммуноглобулины (Ig) на твердой фазе выявляли с использованием антител овцы против Ig кролика, меченых пероксидазой из корней хрена (ПХ).

**Результаты и обсуждение.** В результате иммунизации кроликов целыми клетками *B. bifidum* 791 (АГ 1) получены и охарактеризованы образцы сыворотки крови, содержащие поликлональные антитела (ПАТ) к антигенам указанного микроорганизма – ПАТ 1.1 и ПАТ 1.2. В номере каждого образца первая цифра обозначает номер антигена, а вторая – номер животного, иммунизированного этим антигеном.

Титр ПАТ определяли ИФА, используя планшеты с иммобилизованными клетками *B. bifidum* 791 и образцы сыворотки крови иммунизированных животных, предварительно разведенные в определенное число раз в диапазоне 1/2000 – 1/360000. Выявляли иммунные комплексы с использованием антител овцы против Ig кролика, меченых ферментом (рис. 1, табл.). Рабочим титром считали разведение ПАТ, обеспечивающее в ИФА значение  $D_{450}$ , равное 2,0 (рис. 1). Установлено, что ПАТ кроликов к антигенам *B. bifidum* 791 имеют высокий титр (рис. 1, табл.). Относительное снижение титра ПАТ 1.2 в ходе иммунизации свидетельствует в пользу возможности сокращения продолжительности этой процедуры.

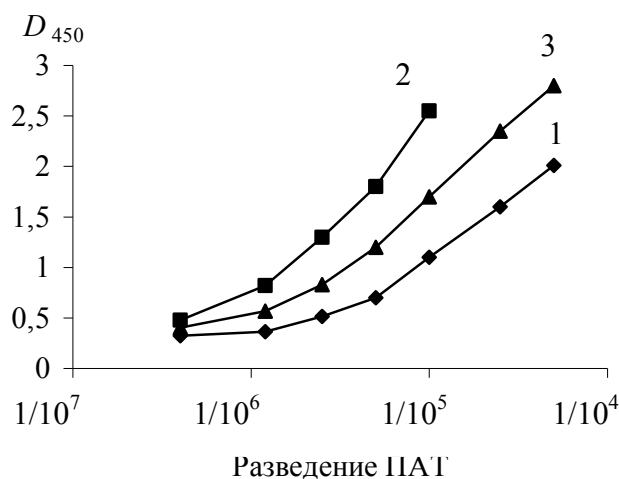


Рис. 1. Динамика титра ПАТ 1.2 в ходе иммунизации. (1-3) — номер процедуры отбора крови.

Рабочие титры ПАТ кроликов, иммунизированных клетками *B. bifidum* 791, по результатам ИФА

ПАТ	Титр сыворотки, полученной на соответствующей стадии иммунизации		
	1	2	3
1.1	1/20000	1/80000	1/80000
1.2	1/20000	1/180000	1/80000

Стандартный метод определения перекрестной реакции антител ИФА состоит в следующем. Используют две серии планшетов, в лунках которых иммобилизован антиген, специфичный к тестируемым антителам. В лунках планшетов первой серии находится раствор, содержащий одновременно антитела к иммобилизованному антигену и антиген, идентичный иммобилизованному на твердой фазе, в виде ряда концентраций ( $B_n$ ). Контрольная проба не содержит антигена в растворе ( $B_0$ ). В лунках планшетов второй серии в растворе находится другой антиген, потенциально способный к перекрестной реакции с тестируемыми антителами. Графически определяют концентрации специфического и перекрестно-реагирующего антигенов, соответствующие значениям  $B_n/B_0$ , равным 50%. Соотношение этих концентраций, рассчитанное в процентах, является показателем перекрестной реакции антител.

Мы модифицировали метод определения перекрестной реакции антител, адаптировав его для использования в качестве перекрестно-реагирующих антигенов целых клеток других грамм-положительных микроорганизмов — *L. plantarum* В-01 (АГ 2) и *B. cereus* (АГ 3).

Предварительно была отработана методика сравнения количества клеток в лиофилизованных препаратах АГ 1 – АГ 3, не требующая использования микроскопа. Ме-

тодика основана на растворении клеток в 30% серной кислоте и определении значения  $D_{260}$ , являющегося показателем концентрации нуклеиновых кислот. Мы исходили из того, что содержание нуклеиновых кислот в клетках родственных штаммов, культуры которых находятся в одной и той же фазе роста, можно считать равным. Установлено, что значения  $D_{260}$  соответствуют максимумам в спектрах поглощения растворов клеток используемых нами штаммов, записанных в диапазоне длин волн 220–320 нм, и линейно возрастают по мере увеличения концентрации клеток (рис. 2). На основании графиков для каждого штамма определяли содержание исходной суспензии клеток в анализируемой пробе, соответствующее значению  $D_{260}$ , равному 1. Значения этого показателя, определенные для *B. cereus*, *L. plantarum* В-01 и *B. bifidum* 791, соотносятся как 22:13:1 (рис. 2). На этом основании для уравнивания в ИФА лиофилизированных клеток трех штаммов бактерий суспендировали их в равном объеме буфера, а затем отбирали количества суспензий *B. cereus*, *L. plantarum* В-01 и *B. bifidum* 791, соответствующие указанной выше пропорции, и доводили их до объема, соответствующего отобранному объему *B. cereus*.

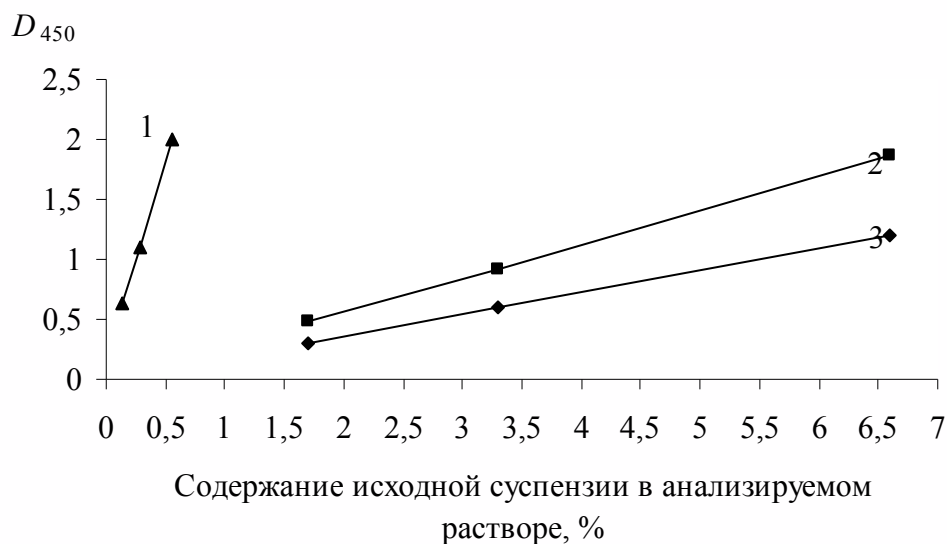


Рис. 2. Зависимость  $D_{260}$  от концентрации клеток бактерий. Концентрацию содержимого одной ампулы в 500 мкл  $H_2O$  считали равной 100 %.  
Примечание: *B. bifidum* 791 (1), *L. plantarum* В-01 (2), *B. cereus* (3).

В настоящем исследовании ПАТ к АГ 1 в предварительно выбранном рабочем титре параллельно инкубировали с суспензиями, содержащими равные количества клеток специфических (АГ 1) или потенциально перекрестно-реагирующих бактерий (АГ 2 и АГ 3). Затем отделяли клетки центрифугированием и вносили каждую пробу в соответствующие лунки планшетов с иммобилизованными клетками специфических бактерий. Рассчитывали показатель перекрестной реакции антител как указано выше.

Предварительно было установлено, что 50%-ое вытеснение антител из комплекса с иммобилизованным специфическим антигеном обеспечивает тот же антиген, находящийся в растворе в концентрации, примерно равной концентрации антигена в растворе для его иммобилизации на твердой фазе (А). С учетом этого перекрестно-реагирующие антигены использовали в диапазоне концентраций от  $0,5 \cdot A$  до  $100 \cdot A$  (рис. 3). Очевидно, что специфичные к *B. bifidum* 791 ПАТ проявляют перекрестную реакцию к *L. plantarum* В-01 и *B. cereus*, не превышающую 1% (рис. 3).



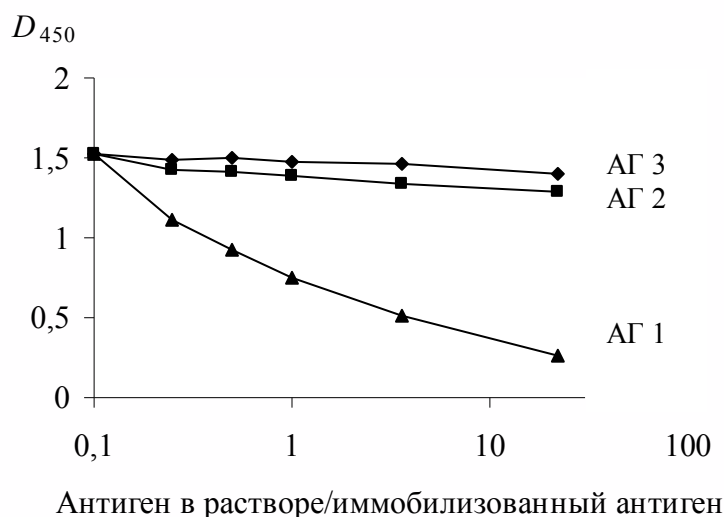


Рис. 3. Конкуренция АГ 1, иммобилизованного на твердой фазе, с растворенными антигенами (АГ 1 – АГ 3) за связывание с ПАТ 1.1

Полученные ПАТ могут найти применение в качестве компонента тест-системы для количественного определения антител к антигенам бактерий рода *Bifidobacterium* в сыворотке крови человека методом конкурентного ИФА. В такой тест-системе в ходе анализа происходит конкуренция очищенных ПАТ, меченых ферментом, и антител человека в составе анализируемых проб (или немеченых ПАТ в составе калибровочных проб) за образование иммунных комплексов с иммобилизованными антигенами *Bifidobacterium*. Количество меченых ПАТ, связавшихся с иммобилизованным антигеном, обратно пропорционально количеству антител человека в анализируемых пробах. Для использования в такой тест-системе ПАТ должны удовлетворять двум критериям: (1) в их составе должны доминировать Ig, выработанные к родоспецифичным антигенам бифидобактерий, (2) эпитопная специфичность ПАТ должна быть идентична эпитопной специфичности антител человека, выработанных в результате естественного иммунного ответа на бифидобактерии. Оказалось, что ПАТ примерно в равной степени взаимодействуют с клетками *B. bifidum* 791, *B. longum* B379M и *B. adolescentis* 94 B1M (данные не представлены). С целью проверки соответствия ПАТ второму критерию проводили ИФА с использованием планшетов с иммобилизованными клетками *B. bifidum* 791, в лунках которых на первой стадии анализа находились ПАТ в рабочем титре и разведенные в 25 раз образцы сыворотки крови человека. Использовали специально отобранные образцы сыворотки пациентов кафедры гастроэнтерологии и нутрициологии БелМАПО, содержащие антитела к бифидобактериям. Контрольные лунки содержали вместо сыворотки крови человека буферный раствор ( $V_0$ ). ПАТ, связавшиеся с иммобилизованными клетками, выявляли с использованием меченых ферментом антител овцы против Ig кролика. Для каждого образца сыворотки человека определяли показатель  $V_0/V_n$ , характеризующий способность антител к антигенам бифидобактерий, содержащихся в данной сыворотке, к конкуренции с ПАТ. Оказалось, что 10 %, 67 % и 22 % образцов из исследуемой выборки ( $n=30$ ) имеют значения  $V_0/V_n$ , находящиеся в диапазоне (50–60) %, (60–70) % и (70–80) %, соответственно. Полученные данные позволяют считать, что естественный иммунный ответ у человека и иммунный ответ у кроликов, иммунизированных целыми клетками бифидобактерий, приводит к выработке антител к сходным антигенным детерминантам.

**Заключение.** Получены поликлональные сыворотки (ПАТ) кроликов, иммунизированных целыми клетками *Bifidobacterium bifidum* 791. По результатам ИФА, ПАТ имеют высокий титр (1/8000 – 1/180000), не проявляют перекрестной реакции к антигенам других грамм-положительных бактерий и конкурируют с естественными сыворо-

точными антителами человека, специфичными к тем же микроорганизмам. По показателям сродства и специфичности ПАТ пригодны для использования в качестве компонента тест-системы для количественного определения антител к бифидобактериям в сыворотке крови человека методом конкурентного ИФА.

#### Литература

1. Evolution of mammals and their gut microbes / R.E. Ley [et. al.] // Science. – 2008. – Vol. 320, № 5883. – P. 1647-1651.

2. Дисбактериоз как следствие нарушения иммунологической толерантности к индигенной микрофлоре / С.М. Попкова [и др.] // Бюл. ВСНЦ СО РАМН. – 2007. – № 3 (55), прилож. – С. 57-62.

### ПОЛУЧЕНИЕ, ХАРАКТЕРИСТИКА И ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ПОЛИКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ КРОЛИКОВ К АНТИГЕНАМ БИФИДОБАКТЕРИЙ

Е. П. Киселева<sup>1</sup>, К. И. Михайлопуло<sup>1</sup>, О. В. Цыганова<sup>1</sup>, А. В. Ижик<sup>2</sup>, Г. И. Новик<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Институт биоорганической химии НАН Беларуси (epkiseleva@yandex.ru);

<sup>2</sup>Институт микробиологии НАН Беларуси (galina\_novik@inmi.by), Минск, Беларусь

Получены поликлональные сыворотки (ПАТ) кроликов, иммунизированных целыми клетками *Bifidobacterium bifidum* 791. По результатам ИФА, ПАТ имеют высокий титр (1/8000 – 1/180000), не проявляют перекрестной реакции к антигенам других грамм-положительных бактерий и конкурируют с естественными сывороточными антителами человека, специфичными к тем же микроорганизмам. По показателям сродства и специфичности ПАТ пригодны для использования в качестве компонента тест-системы для количественного определения антител к бифидобактериям в сыворотке крови человека методом конкурентного ИФА.

*Ключевые слова:* поликлональные антитела кроликов, *Bifidobacterium bifidum* 791, ИФА.

### POLYCLONAL RABBIT ANTIBODIES TO ANTIGENS OF *BIFIDOBACTERIUM*: PRODUCTION, FEATURES, AND PROSPECTS FOR USING

E. P. Kiseleva<sup>1</sup>, K. I. Mikhailopulo<sup>1</sup>, O. V. Tsyganova<sup>1</sup>, A. V. Izhik<sup>2</sup>, G. I. Novik<sup>2</sup>

<sup>1</sup>The Institute of Bioorganic chemistry NAS of Belarus, Minsk, Republic of Belarus;

<sup>2</sup>The Institute of Microbiology NAS of Belarus, Minsk, Republic of Belarus

Rabbit polyclonal antibodies (PAb) were obtained by immunization with the whole cells of *Bifidobacterium bifidum* 791. The PAb have a high titre (1/8000 - 1/180000) in ELISA, show no cross-reaction to the antigens of other gram-positive bacteria, interact with genus-specific antigens of bifidobacteria and compete with the natural human serum antibodies against bifidobacteria. In terms of affinity and specificity the PAb are suitable for use in the competitive ELISA test kit for determination of antibodies to bifidobacteria in human serum.

*Key words:* rabbit polyclonal antibodies, *Bifidobacterium bifidum* 791, ELISA.

### ИЗУЧЕНИЕ СОСТОЯНИЯ КИШЕЧНОГО МИКРОБИОЦЕНОЗА У ПОДРОСТКОВ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ФОНОВОЙ ПАТОЛОГИИ

К. К. Куандыкова, А. К. Куандыкова

Центр санэпидэкспертизы, Международный Казахско-Турецкий университет им. Ясави, г. Туркестан, Казахстан

Нарушения микроэкологии кишечника, именуемые терминами «дисбактериоз» или «дисбиоз», обуславливаются, прежде всего, дефицитом молочнокислых бактерий и беспрепятственным размножением условно-патогенных микроорганизмов, что сопровождается нарушением многих звеньев обмена веществ и снижением резистентности организма. Нормофлора весьма лабильна, меняясь в количественном и качественном аспектах под воздействием многих факторов, таких как климатические условия, загряз-

нение окружающей среды, образ жизни и, конечно, при инфекционной патологии кишечника.

**Цель.** Изучить длительность восстановления нормальной микрофлоры кишечника у подростков при острых кишечных инфекциях, вызванных условно-патогенными бактериями.

**Материалы и методы.** Анализ микробиоценоза 49 подростков проводился бактериологическим методом. Исследование микробного пейзажа содержимого толстого кишечника включало выявление общего микробного числа анаэробов, бифидобактерий и лактобактерий. Выделенные микроорганизмы идентифицировались согласно общепринятым методам. Оценка степени дисбактериоза кишечника у обследуемых проводилась согласно классификации, разработанной Казахской академией питания (Багрянцева О.В. с соавт.).

**Результаты исследований.** Проведенные нами исследования показали, что после перенесенной острой кишечной инфекции период восстановления у подростков был различным. Формирование нормальной микрофлоры у подростков идет сложно, ступенчато, зависит от множества факторов: погрешности в диете, нарушение режима питания и прочее могут еще более осложнить этот процесс. Содержание бифидобактерий превышало уровень от Lg5,0 до Lg7,0 у свыше 97 % подростков лишь к концу третьей недели после выписки. Количество лактобактерий стал превышать уровень от Lg5,0 до Lg7,0 к концу третьей недели после выписки лишь у 83,2 % обследованных подростков.

Частота выявления и количественное содержание бифидобактерий и лактобактерий у подростков в период реконвалесценции после перенесенной ОКИ, вызванной условно-патогенной микрофлорой (%)

Период реконвалесценции	Бифидобактерии			Лактобактерии		
	от Lg7,0 до Lg9,0	от Lg5,0 до Lg7,0	Lg5,0 и ниже	от Lg7,0 до Lg9,0	от Lg5,0 до Lg7,0	Lg5,0 и ниже
1 неделя после выписки	25,5	31,8	42,7	20,6	22,2	57,2
2 неделя после выписки	60,0	20,0	20,0	38,4	21,3	40,3
3 неделя после выписки	45,0	52,3	2,7	50,0	23,2	26,8

#### STUDY OF INTESTINAL MICROBIOCENOSIS IN ADOLESCENTS IN RELATION TO BACKGROUND PATHOLOGY

**К. К. Kuandykova, A. K. Kuandykova**

*Center for Sanitary Expertise, Yasavi International Kazakh-Turkish University, Turkistan, Kazakhstan*

Role of different groups of microorganisms and their associations in the formation of intestinal dysbacteriosis in dependence of age was studied in the work.

*Key words:* intestinal microbiocenosis, pathology, adolescents.

#### ГЕНДЕРНЫЕ РАЗЛИЧИЯ СОСТАВА МИКРОФЛОРЫ КИШЕЧНИКА В УСЛОВИЯХ НИЗКОГО УРОВНЯ ПОЛОВЫХ СТЕРОИДОВ

**А. М. Косырева, Т. И. Хомякова, Ю. Е. Козловский**

*НИИ морфологии человека РАМН (babushka84@list.ru), Москва, Россия*

Несмотря на большое количество данных, доказывающих значительные различия в протекании адаптационных процессов и заболеваний как инфекционной, так и неинфекционной природы у мужчин и женщин, лабораторные исследования обычно проводятся на животных-самцах, а доклинические исследования на группах, состоящих из

мужчин [1]. При лечении различных инфекционно-воспалительных и аутоиммунных заболеваний половые различия, как правило, не учитываются, что снижает эффективность терапевтических мероприятий и вызывает ряд побочных эффектов у больных женщин.

Ряд международных программ вводят требования к проведению экспериментальных работ с учетом возраста и пола животных, при этом оптимальным предполагается равное количество самцов и самок [2], однако для реализации этих требований необходимо выяснить, как гендерные различия влияют на протекание основных адаптационных и патологических процессов. Предрасположенность или устойчивость самок и женщин как к инфекционно-воспалительным, так и к аутоиммунным заболеваниям определяется уровнем эстрогенов и прогестиннов, содержание которых в сыворотке крови изменяется в зависимости от периода постнатального развития, а в половозрелом возрасте – в зависимости от фазы эстрального/менструального цикла [3, 4]. Влияние половых гормонов на восприимчивость и течение бактериальных инфекций изучается на моделях орхи- и овариэктомии, при которых достигается резкое снижение уровня половых гормонов в сыворотке крови. Показано, что овариэктомия мышей приводит к снижению выраженности активации иммунного ответа и повышению уровня смертности самок от бактериальных инфекций и сепсиса [5]. Однако работы, посвященные исследованию гендерных различий состава микрофлоры кишечника как в норме, так и в условиях низкого уровня половых стероидов, немногочисленные и фрагментарны.

**Целью исследования** было изучение гендерных различий состава микрофлоры кишечника в условиях низкого уровня половых стероидов, вызванной экспериментальной орхи- и овариэктомией.

**Материалы и методы исследования.** Исследования проведены на половозрелых крысах Вистар обоего пола, массой тела 220-270 г (питомник «Столбовая»). При работе с экспериментальными животными руководствовались приказом Минздрава СССР № 755 от 12.08.1977. Животные содержались в клетках при естественном освещении, температуре 20-22°C и свободном доступе к воде и пище. Опытная и контрольная группы самцов составляли по 5 животных, опытная и контрольная группы самок составляли по 5 и 10 животных, соответственно. Орхи- и овариэктомию у самцов и самок опытных групп проводили под эфирным наркозом.

Во влагалищных мазках самок контрольной группы (n=10), окрашенных по Романовскому-Гимза, оценивали клеточный состав на различных стадиях полового цикла самок и по кольпоцитогамме определяли фазу эстрального цикла. В эксперименте исследовали состав микрофлоры кишечника у самок в фазу эструса (n=5) и в фазу диэструса (n=5).

Крысы Вистар контрольной (самцы: n=5; самки: n=10) и опытных групп выводились из эксперимента на 14-е и 21-е сут после орхиэктомии и на 52-е после овариэктомии передозировкой общего анестетика золетила (внутрибрюшинно, 10 мг/кг). Кровь забирали из яремной вены, центрифугировали при 200g в течение 20 мин, отбирали сыворотку, замораживали ее при температуре -70°C и хранили в течение 2 мес. Методом твердофазного ИФА оценивали содержание эстрадиола и прогестерона (Adaltis, Италия) в сыворотке крови самок, и общего тестостерона (Adaltis, Италия). Уровень эндотоксина определяли с помощью хромогенного LAL-теста в сыворотке крови крыс Вистар обоего пола (НВТ, США).

Состояние микрофлоры кишечника оценивали высевом из свежеполученных фекалий, гомогенизированных в физиологическом растворе, после инкубирования в течение 40 мин по следующим параметрам (КОЕ/мг фекалий): уровень лактозоположительных и лактозо-отрицательных энтеробактерий, уровень энтерококков (*E.faecalis et fecium*), уровень лактобактерий на соответствующих питательных средах (HiMedia, Индия). Кроме того, оценивалось общее количество бактерий, образующих колонии в аэробных условиях на агаре Лурия-Бертани (LA) при 37°C за 18 часов.

**Результаты исследования.** Уровень женских половых стероидов в сыворотке крови у самок колеблется в соответствии с фазами эстрального цикла. В фазу эструса содержание эстрадиола в сыворотке крови составляло  $49,60 \pm 4,55$  пг/мл, а прогестерона –  $11,48 \pm 1,38$  нг/мл, а в фазу диэструса уровень женских стероидов изменялся до  $23,12 \pm 0,90$  пг/мл и  $18,40 \pm 2,04$  нг/мл, соответственно. В зависимости от фазы эстрального цикла наблюдались колебания количественного состава микрофлоры кишечника. Так, число лактозо-отрицательных энтеробактерий у самок в фазу эструса было на 2 порядка выше, чем в фазу диэструса. При этом уровень лактобактерий и энтерококков у самок в стадии эструса на порядок снижался. Однако различий по уровню эндотоксина у самок в разные фазы эстрального цикла выявлено не было. Возможно, физиологические колебания женских половых гормонов оказывают модулирующее действие на функционирование иммунной системы кишечника, что приводит к нарастанию условно-патогенной флоры.

Исследование просветной микрофлоры самок и самцов выявило половые различия в количественном составе микробиома. У самок уровень условно-патогенных энтеробактерий был выше, чем у самцов, что отражалось как в общем количестве колониеобразующих единиц на LA (до  $10^6$  в стадии диэструса против  $10^3$ - $10^5$  у самцов) так и в количестве лактозо-отрицательных энтеробактерий, число которых возрастало на порядок у самок в стадии диэструса и на 3 порядка у самок в стадии эструса. Содержание эндогенного эндотоксина в сыворотке крови самок и самцов крыс Вистар различалось. По сравнению с самцами у самок этот показатель был в 6 раз выше и составил  $3,84 \pm 0,43$  еU/мл. Половые различия уровня эндотоксина в сыворотке крови, по-видимому, обусловлены более высокой заселенностью условно-патогенной микрофлорой кишечника и более активным метаболизмом эндотоксина у самок по сравнению с самцами.

Орхи- и овариэктомия привела к снижению половых стероидов в сыворотке крови. У самок уровень эстрадиола и прогестерона уменьшился до  $10,35 \pm 0,45$  пг/мл и  $2,69 \pm 0,78$  нг/мл соответственно. В составе просветной микрофлоры самок достоверно на порядок уменьшилось количество лактозоположительных энтеробактерий и энтерококков, на два порядка повысилось количество условно-патогенных бактерий, среди которых наиболее часто идентифицировались *Enterobacter agglomerans*, *Staphylococcus aureus*, а также бактерии рода *Alcaligenes*.

У самцов уровень общего тестостерона снизился от  $2,64 \pm 0,95$  нг/мл в сыворотке крови крыс контрольной группы до  $0,009 \pm 0,004$  нг/мл у крыс через 21 сут после орхиэктомии. Изменения просветной микрофлоры у кастрированных самцов были более выражены по сравнению с оперированными самками. Наиболее значительным было прогрессирующее нарастание уровня лактозо-отрицательных энтеробактерий от  $10^2$  КОЕ/г в контроле до  $10^4$ - $10^5$  КОЕ/г на 14 сутки после кастрации и  $10^5$ - $10^7$  КОЕ/г на 21 сутки. При этом отмечалось резкое падение уровня энтерококков от  $10^5$ - $10^7$  КОЕ/г в контроле до  $10^3$  КОЕ/г (в 50% случаев) и менее. Уровень лактобактерий колебался не так выражено, с большим разбросом показателей в результате индивидуальных различий у животных. Количество бактерий на LA составило  $10^7$  КОЕ/г против  $10^3$ - $10^4$  КОЕ/г в контроле, при этом основными представителями флоры были *Staphylococcus intermedius*, *Citrobacter freundii* и *Enterobacter agglomerans*.

Как орхи-, так и овариэктомия привела к снижению уровня эндотоксина у самцов и самок ( $2,84 \pm 0,05$  еU/мл;  $0,05 \pm 0,01$  еU/мл, соответственно)

**Закключение.** Таким образом, выявлены гендерные различия качественного и количественного состава микрофлоры кишечника самцов и самок крыс Вистар в норме, которые, по-видимому, обусловлены эффектом половых стероидов. Половые различия в составе микробиома кишечника, вероятно, определяют более высокий уровень эндотоксина в сыворотке крови самок.

Как половые различия состава микробиома, так и изменения микрофлоры кишечника в зависимости от фазы эстрального цикла необходимо учитывать при назначении иммуномодулирующих препаратов, противoinфекционной терапии и профилактических мероприятиях инфекционно-воспалительных заболеваний.

В условиях низкого уровня половых стероидов изменяется как качественный, так и количественный состав микрофлоры кишечника, что указывает на непосредственную роль половых стероидов в регуляции микробиома.

*Ключевые слова:* микрофлора кишечника, гендерные различия, половые стероиды.

#### **Литература**

1. Sex bias in trials and treatment must end / A.M. Kim [et al.] // Nature. – 2010. – Vol. 465. – P. 689-690.
2. Zucker, I. Males still dominate animal studies / I. Zucker, A. Beery // Nature. – 2010. – Vol. 465. – P. 690.
3. Different immune responses to abdominal surgery in men and women / M.W. Wichmann [et al.] // Langenbecks Arch. Surg. – 2003. – Vol. 387. – P. 397-401.
4. Angele, M.K. Gender and sex hormones influence the response to trauma and sepsis: potential therapeutic approaches / M.K. Angele, M.C. Frantz, I.H. Chaudry // Clinics. – 2006. – Vol. 61, N. 5. – P. 479-488.
5. Do female sex steroids adversely or beneficially affect the depressed immune responses in males after trauma-hemorrhage? / M.W. Knöferl [et al.] // Arch. Surg. – 2000. – Vol. 135 – P. 425-433.

### **GENDER DIFFERENCES IN THE COMPOSITION OF INTESTINAL MICROFLORA IN A LOW LEVEL OF SEX STEROIDS**

**A. M. Kosyreva, T. I. Khomyakova, J. E. Kozlovsky**

*Institute of Human Morphology (babushka84@list.ru), Moscow, Russia*

At present time male mice and rats outnumber females ones in laboratory studies. Despite all that is known about sex differences in diseases too few women are recruited to clinic trials. To correct the sex bias in animal researches it is necessary to find out if there are difference not only at the level of cell and tissue response of the body to different signal and pathological process, but also in the response of intestinal microflora in male and female. In this work we demonstrate that at the condition of the experimental low level of sex hormones there is expressed gender difference in of intestinal microflora of healthy rats. More than it, there are the changes of the level of some bacteria in intestinal during the estrogen cycle in female. It is shown that the level of the endotoxin is higher in blood of female too. So it is possible to think that sex hormones influence at the level of some important bacteria of intestinal microflora.

*Key words:* intestinal microflora, gender differences, sex steroids.

### **ИЗМЕНЕНИЯ КИШЕЧНОЙ МИКРОФЛОРЫ И РЕЗЕРВОВ СВОБОДНЫХ АМИНОКИСЛОТ СЫВОРОТКИ КРОВИ У БОЛЬНЫХ С ЦИРРОЗОМ ПЕЧЕНИ**

**Е. С. Сирчак**

*Медицинский факультет Ужгородского национального университета  
(szircsak\_heni@bigmir.net), Ужгород, Украина*

За последние 10-15 лет в Украине наблюдается существенное увеличение заболеваемости как хроническими гепатитами, так и циррозами печени. Только за период с 1995-1999 гг. смертность от цирроза печени (ЦП) в Украине выросла на 55% [1]. Наиболее тяжелым признаком декомпенсации цирротического процесса в печени является портальная гипертензия (ПГ). Примерно у 1/3 пациентов с ПГ возникают пищеводно-желудочные кровотечения, летальность при которых составляет 40-50%. Еще более пессимистическим является прогноз у пациентов, которые перенесли кровотечения в прошлом. Частота развития рецидивов геморрагий у них составляет 50-90%. Кровотечения, в частности, являются причиной смерти практически у половины больных цир-

розом печени [2]. Не менее грозным осложнением ЦП является печеночная энцефалопатия (ПЭ) [3].

Длительное протекание ПГ также приводит не только к количественным и качественным нарушениям микробиоценоза кишечника, но и к повреждению постэпителиального барьера сетки кровеносных капилляров с возможной транслокацией бактерий за пределы стенки кишечника. Изменения микрофлоры приводят к усилению процессов брожения и гниения, что, в свою очередь, усиливает проявления ПЭ. При нарушении функции печени и развитии коллатеральных шунтов между системой воротной вены и общей системой кровообращения, эндотоксины попадают в кровь, обходя печень и/или не обезвреживаясь в ней. При этом содержание аммиака в системе кровообращения увеличивается до токсического уровня (более 45 мкмоль/л) [4].

Также есть сообщение о том, что эндотоксины грамотрицательных бактерий вызывают изменения в эндотелии сосудов, в том числе – варикозно расширенных вен (ВРВ) пищевода и желудка, что приводит к росту частоты их разрывов и кровотечений [5]. Следовательно, изменения микробиоценоза кишечника, в свою очередь приводят к усугублению протекания заболеваний печени, появлению осложнений и неудовлетворительных результатов лечения.

**Цель исследования:** оценить степень дисбактериотических нарушений кишечника и изменения пула свободных аминокислот (САК) сыворотки крови у больных с ЦП в зависимости от тяжести заболевания по Child-Pugh.

**Материалы и методы.** Под нашим наблюдением находилось 60 больных с ЦП, которые лечились в хирургическом гастроэнтерологическом и реанимационном отделениях Закарпатской областной клинической больницы им. А. Новака. Среди обследованных пациентов преобладали мужчины – 44 (73%), возрастом  $54,3 \pm 4,2$  лет, женщин было 16 (27%), возрастом  $48,6 \pm 6,4$  лет.

Контрольную группу составили 20 фактически здоровых лиц в возрасте от 19 до 56 лет, средний возраст которых составлял  $38,2 \pm 1,8$  лет. Среди них мужчин было 11 (55%), женщин – 9 (45%).

Диагноз ЦП выставляли с учетом жалоб, анамнеза, лабораторных (биохимический анализ крови, определение маркеров вирусов гепатитов В, С) и инструментальных (УЗО органов брюшной полости, ФЭГДС, радиоизотопный и ангиографический) методов исследования.

Для выявления дисбиоза проводили количественный учет микроорганизмов, которые выросли на питательной среде агара, Сабуро, Эндо и 5% кровяном агаре с пересчетом на 1 г фекалии, учитывая при этом дозу засеянного материала и степень его разведения. Кроме того, на чашке с 5% кровяным агаром отмечали наличие гемолитических форм как кишечной, так и кокковой микрофлоры, процент их от общего количества выросших колоний, соотношения кишечной и кокковой микрофлоры. Наличие бифидобактерий определяли по характеру роста на среде Блаурокка и микроскопии мазков, окрашенных по Грамму. Количество бифидобактерий и лактобацилл в одном грамме фекалий определяли по предельному разведению, при котором наблюдался их рост.

Количественное определение САК в сыворотке крови проводили по методу одномерной нисходящей хроматографии на бумаге (И.М. Хайс, К. Мацек, 1962; Т.С. Пасхина, 1964) и на автоматическом анализаторе ААА-339 (Чехия) по И. Муру в модификации М.А. Хазан и соавторов (1982). Для качественного анализа и идентификации аминокислот хроматограммы проявляли раствором изатина. При количественном определении аминокислот хроматограммы проявляли нингидрином по методу Н. Гири (Г.Н. Зайнека, И.И. Тюленева, 1958).

**Результаты исследования.** Клинически у всех больных обнаружили признаки астеновегетативного синдрома. Диспептический синдром проявлялся изжогой, отрыжкой кислым, тошнотой и рвотой. Также наблюдали у обследованных больных боли и тяжесть в правом подреберье и в эпигастральной области разной степени выраженности.

У всех больных выявили лабораторные признаки холестатического, цитолитического и мезенхимно-воспалительного синдромов.

При эндоскопическом обследовании у всех больных наблюдали варикозные изменения вен пищевода преимущественно II и III степени, воспалительные изменения верхних отделов пищеварительного канала и признаки рефлюксной болезни.

После проведения клинико-лабораторных обследований больных с ЦП распределили по классам тяжести по Child-Pugh, учитывая уровень билирубина, альбумина, протромбинового индекса и наличие или отсутствие асцита и печеночной энцефалопатии. Все больные были отнесены к классам B и C по Child-Pugh (стадия субкомпенсации и декомпенсации ЦП). В класс B по Child-Pugh вошло – 36 (60%) больных, они составили I группу пациентов, в класс C – 24 (40%) больных, они составили II группу пациентов.

Изменения микробиоценоза толстого кишечника у больных с ЦП и в контрольной группе представлены в табл. 1. Изменения аэробной флоры у больных с ЦП характеризовались снижением общего количества *E. coli* – у 23 (96%) больных II группы, и у 21 (58%) – во I группе. Слабоферментативные *E. coli* высеяли у 21 (88%) больных II и у 17 (47%) больных I группы. Гемолитическую кишечную палочку в 6 раз чаще высеяли у больных II группы. Условно-патогенные энтеробактерии (преимущественно *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacea*, *Citrobacter freundii*) высеяли у 17 (71%) больных II группы, и только у 10 (28%) больных I группы. Изменения анаэробной флоры характеризовались снижением уровня бифидобактерий и лактобактерий у обеих групп больных с ЦП. Грибы рода *Candida* высеяли у 8 (33%) больных II и у 3 (8%) больных I группы. У 5 (21%) больных II группы обнаружили *Staphylococcus aureus* в титре больше, чем  $10^3$ .

Таблица 1

Изменения микрофлоры толстого кишечника у больных с ЦП в зависимости от тяжести заболевания по Child-Pugh

Показатели	Контрольная группа (n=20)	I группа (класс B по Child-Pugh) (n=36)	II группа (класс C по Child-Pugh) (n=24)
Бифидобактерии < $10^7$	2 (10%)	36 (100%)	24 (100%)
Лактобактерии < $10^6$	2 (10%)	36 (100%)	24 (100%)
Сниженное общее количество <i>E. coli</i>	2 (10%)	21 (58%)	23 (96%)
Слабоферментативные <i>E. coli</i>	1 (5%)	17 (47%)	21 (88%)
Гемолитическая кишечная палочка	0	5 (14%)	20 (83%)
Условно-патогенные энтеробактерии	0	10 (28%)	17 (71%)
Грибы рода <i>Candida</i>	0	3 (8%)	8 (33%)
Количество патогенного стафилококка	0	0	5 (21%)

Сравнивая показатели микробиологического исследования кала в двух группах, видим, что изменения микрофлоры толстого кишечника диагностировали у больных обеих групп, но чаще имеют место во II группе, то есть у больных с ЦП класса C по Child-Pugh. Именно у этих пациентов диагностировали чаще такие осложнения цирроза, как кровотечение из ВРВ пищевода и желудка, проявления печеночной энцефалопатии, наличие резистентного асцита и гепатаренального синдрома II типа.



Степень дисбиоза оценивали по И.Б. Куваевой и К.С. Ладодо (1991). У больных II группы чаще диагностировали глубокие дисбиотические изменения III – 13 (54%) и IV – 7 (29%) степеней, тогда как у больных I группы чаще обнаруживали дисбиоз I и II степени (у 15 (42%) и 17 (47%) больных соответственно). Следует отметить, что у больных с ЦП в стадии декомпенсации (класс С по Child-Pugh) не диагностировали дисбиоз I степени, а у больных I группы (класс С по Child-Pugh) – IV степени.

Таблица 2

Распределение больных с ЦП по степеням тяжести дисбиоза кишечника

Степень дисбиоза:	I группа больных (класс В по Child-Pugh) (n=36)	II группа больных (класс С по Child-Pugh) (n=24)
I степень	15 (42%)	-
II степень	17 (47%)	4 (17%)
III степень	4 (11%)	13 (54%)
IV степень	-	7 (29%)

В табл. 2 четко можем проследить, что с ухудшением гемодинамики в верхних отделах желудочно-кишечного тракта увеличивается частота дисбиоза III и IV ст.

При исследовании резервов САК сыворотки крови у больных с ЦП обнаружили их разбалансирование, что представлено в табл. 3.

Таблица 3

Резервы свободных аминокислот сыворотки крови у больных с ЦП

Аминокислоты (мг %)	Контрольная группа (n=20)	I группа (n=36)	II группа (n=24)
	M ± m	M ± m	M ± m
Цистеин	1,26 ± 0,03**	1,31 ± 0,03*	1,44 ± 0,01
Орнитин	0,46 ± 0,03**	0,42 ± 0,02*	0,33 ± 0,05
Лизин	0,51 ± 0,01**	1,47 ± 0,05*	1,48 ± 0,09
Гистидин	0,88 ± 0,04**	1,00 ± 0,08*	1,15 ± 0,05
Аргинин	0,72 ± 0,04**	1,42 ± 0,03*	1,33 ± 0,06
Аспарагин	1,67 ± 0,08**	1,52 ± 0,04*	1,58 ± 0,06
Серин	1,05 ± 0,05**	0,98 ± 0,08*	1,02 ± 0,04
Глицин	0,84 ± 0,15**	0,65 ± 0,04*	0,78 ± 0,04
Глютамин	0,71 ± 0,02**	1,42 ± 0,03*	1,49 ± 0,05
Треонин	0,64 ± 0,03**	1,21 ± 0,08*	1,35 ± 0,05
Аланин	0,89 ± 0,05**	0,88 ± 0,02*	0,87 ± 0,05
Пролин	0,97 ± 0,02**	0,77 ± 0,05*	0,78 ± 0,03
Тирозин	0,42 ± 0,02**	0,81 ± 0,03*	0,96 ± 0,02
Триптофан	1,33 ± 0,06**	2,53 ± 0,06*	2,78 ± 0,05
Метионин	0,85 ± 0,05**	1,27 ± 0,03*	1,14 ± 0,06
Валин	0,56 ± 0,04**	0,78 ± 0,04*	0,75 ± 0,07
Фенилаланин	1,03 ± 0,04**	1,01 ± 0,06*	1,14 ± 0,04
Лейцин + изолейцин	0,71 ± 0,03**	0,79 ± 0,04*	0,83 ± 0,03

Примечание: \* -  $p > 0,05$  - статистически достоверной разницы между показателями у больных I и II групп не обнаружено;

\*\* -  $p < 0,05$  - показатели у больных I и II групп статистически достоверно отличаются от показателей контрольной группы.

При исследовании аминокислотного пула у больных с ЦП обеих групп обнаружили разбалансирование САК резервов с подавляющим накоплением лизина, гистидина, аргинина, глютамина, треонина, тирозина, триптофана, метионина, валина, фенилаланина, что объясняется выраженным снижением индивидуальной деградации аминокислот, включением их в биосинтез белка в тканях, особенно в синтез альбуминов в тканях печени. Снижение уровня САК (орнитина, серина, аспарагина, глицина, алани-

на, пролина) в сыворотке крови, достоверно связано с уменьшением роли аргинина в мочевинообразовании, о чем свидетельствует снижение уровня мочевины в сыворотке крови (до  $3,88 \pm 0,24$  ммоль/л у больных I и до  $3,92 \pm 0,25$  ммоль/л у больных II группы).

Снижение детоксикационной функции микрофлоры желудочно-кишечного тракта ведет к тому, что кровь, содержащая токсины, из кишечника только частично поступает по воротной вене в печень, увеличивая нагрузку на ее ферментные системы, что приводит к метаболическим и структурным повреждениям гепатоцитов. Большая же часть крови по порто-кавальным шунтам, минуя печень, попадает в большой круг кровообращения. В свою очередь, изменения микрофлоры толстого кишечника у больных с ЦП поддерживают нарушение САК состава крови, степень которого зависит от степени дисбактериоза кишечника.

Наши исследования позволяют сделать заключение о том, что дисбиоз кишечника протекает параллельно с дисбалансом САК сыворотки крови и, в первую очередь, их ароматических представителей. Нарушение детоксикационной функции толстого кишечника способствует увеличению азотосодержащих аминокислот в организме, которые минуя портальную систему, непосредственно попадают в клетки головного мозга и способствуют прогрессированию печеночной энцефалопатии. По этому, нормализация микробного состава кишечника имеет важное значение при лечении больных с циррозом печени для профилактики признаков печеночной энцефалопатии.

#### **Выводы:**

1. У больных с циррозом печени наблюдаются выраженные изменения микрофлоры толстого кишечника. Дисбиоз кишечника протекает параллельно с нарушением равновесия в спектре свободных аминокислот сыворотки крови, с преимущественным накоплением его азотосодержащих представителей.

2. У больных с циррозом печени существует прямая зависимость между степенью глубоких дисбиотических нарушений и возникновением осложнений цирротического процесса, таких как кровотечения из варикозно расширенных вен пищевода и желудка, прогрессирования признаков печеночной энцефалопатии, развития гепаторенального синдрома и резистентного асцита.

#### **Литература**

1. Кондратюк, В.А. Выполнение миниинвазивных эндоваскулярных вмешательств у больных с осложненной портальной гипертензией // *Клінічна хірургія*. – 2001. – № 10. – С. 45-46.
2. Pioglitazone prevents early-phase hepatic fibrogenesis caused by carbon tetrachloride / K. Kon [et al.] // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2002. – Vol. 291. – P. 55-61.
3. Русин, В.І. Декомпенсований цирроз печінки / В.І. Русин [та ін.]. – Ужгород, 2006. – 229 с.
4. Мехтиев, С.Н. Дисбактериоз кишечника: вопросы и ответы / С.Н. Мехтиев, В.Б. Гриневич, С.М. Захаренко. – М.: ГОУ ВУНМЦ МзиСР РФ, 2006. – 64 с.
5. Ткаченко, Е.И. Питание, микробиоценоз и интеллект человека / Е.И. Ткаченко, Ю.П. Успенский. – СПб.: СпецЛит, 2006. – 590 с.

### **ИЗМЕНЕНИЯ КИШЕЧНОЙ МИКРОФЛОРЫ И РЕЗЕРВОВ СВОБОДНЫХ АМИНОКИСЛОТ СЫВОРОТКИ КРОВИ У БОЛЬНЫХ С ЦИРРОЗОМ ПЕЧЕНИ**

**Е. С. Сирчак**

*Медицинский факультет Ужгородского национального университета  
(szircsak\_heni@bigmir.net), Ужгород, Украина*

В статье представлены результаты обследований 60 пациентов с циррозом печени. Результаты проведенного бактериологического исследования микрофлоры толстого кишечника выявили выраженные дисбиотические нарушения, оцененные в основном, как III и IV степеней класса C по Child-Pugh. У пациентов с циррозом печени дисбиоз кишечника протекает параллельно с нарушением равновесия в спектре свободных аминокислот сыворотки крови.

*Ключевые слова:* дисбактериотические нарушения кишечника, пул свободных аминокислот, сыворотка крови, цирроз печени.

## CHANGES IN INTESTINAL MICROFLORA AND FREE AMINO ACIDS RESERVES OF BLOOD SERUM IN PATIENTS WITH LIVER CIRRHOSIS

E. S. Sirchak

Medical Department of Uzhgorod National University (*szircsak\_heni@bigmir.net*), Uzhgorod, Ukraine

In the article results obtained of inspection of 60 patients with liver cirrhosis have been submitted. Bacteriological investigation of colon microflora revealed serious dysbacteriosis changes, mainly the III and IV degrees of classes C by Child-Pugh. In patients with liver cirrhoses parallel with these disbalances in free amino acids pool of blood serum has been revealed.

*Key words:* dysbacteriosis, intestinal disorders, free amino acids pool, blood serum, liver cirrhosis.

## КАРБАПЕНЕМРЕЗИСТЕНТНЫЕ ШТАММЫ СИНЕГНОЙНОЙ ПАЛОЧКИ – ПРОДУЦЕНТЫ МЕТАЛО-БЕТА-ЛАКТАМАЗ: РАСПРОСТРАНЕНИЕ В РАЗЛИЧНЫХ РЕГИОНАХ БЕЛАРУСИ

Д. В. Тапальский<sup>1</sup>, В. А. Осипов<sup>1</sup>, Н. Н. Левшина<sup>2</sup>, А. А. Славинская<sup>2</sup>, В. К. Окулич<sup>3</sup>, А. Н. Копычко<sup>4</sup>, Л. Н. Ребеко<sup>4</sup>, О. Е. Кузнецов<sup>5</sup>, А. В. Дысько<sup>5</sup>, Е. Ю. Склеенова<sup>6</sup>, А. В. Романов<sup>6</sup>, М. В. Эйдельштейн<sup>6</sup>

<sup>1</sup>Гомельский государственный медицинский университет (*tapalskiy@gmail.com*), Гомель; <sup>2</sup>Минский городской центр гигиены и эпидемиологии, Минск; <sup>3</sup>Витебский государственный медицинский университет, Витебск; <sup>4</sup>Могилевский областной центр гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья, Могилев; <sup>5</sup>Гродненская областная клиническая больница, Гродно, Беларусь; <sup>6</sup>НИИ антимикробной химиотерапии, Смоленск, Россия

Широкое распространение устойчивости *Pseudomonas aeruginosa* к антибактериальным препаратам представляет серьезную проблему для здравоохранения. Проблемы выбора адекватного стартового режима антибактериальной терапии в наибольшей степени связаны с тем, что нозокомиальные штаммы *P. aeruginosa* обычно характеризуются устойчивостью ко многим потенциально эффективным антибиотикам, в частности антипсевдомонадным пенициллинам и цефалоспорином, карбапенемам, аминогликозидам, фторхинолонам. Большинство штаммов *P. aeruginosa*, выделяемых у больных, находящихся в отделениях реанимации и интенсивной терапии (ОРИТ), являются полирезистентными, т.е. проявляющими устойчивость к трем и более потенциально эффективным антибиотикам. Панрезистентные (устойчивые ко всем противосинегнойным препаратам) штаммы *P. aeruginosa* в настоящее время уже не являются экзотическими находками.

Антибиотики группы карбапенемов обладают чрезвычайно широким спектром активности и высокой стабильностью к расщеплению большинством известных β-лактамаз. Вследствие этого, карбапенемы рассматриваются как одни из наиболее эффективных препаратов для лечения тяжелых инфекций. Вместе с тем, приобретенная устойчивость к антибиотикам данной группы становится в настоящее время все более распространенной среди грамотрицательных неферментирующих бактерий.

Формирование резистентности к карбапенемам у *P. aeruginosa* может быть связано с различными механизмами. Наибольшее клиническое и эпидемиологическое значение имеет продукция приобретенных металло-β-лактамаз (МБЛ). Опасность ферментов

данного класса обусловлена целым рядом причин, обуславливающим высокую эпидемиологическую значимость данного механизма антибиотикорезистентности:

- высокая каталитическая активность;
- широкий спектр субстратной специфичности, включающий практически все  $\beta$ -лактамы антибиотики;
- сцепление генов МБЛ с другими детерминантами резистентности и как следствие множественная лекарственная устойчивость или панрезистентность штаммов-продуцентов МБЛ;
- локализация генов, кодирующих продукцию МБЛ, в составе высоко мобильных интегронов, способных быстро распространяться между микроорганизмами с помощью плазмид и транспозонов;
- формирование отдельных эпидемиологически значимых клонов полиантибиотикорезистентных МБЛ-продуцентов, способных быстро распространяться на обширных географических территориях и вызывать серьезные инфекции, трудно поддающиеся терапии.

За последнее десятилетие описано 9 генетических групп приобретенных МБЛ: IMP, VIM, SPM, GIM, SIM, AIM, KHM, NDM, TMB. Наиболее широкое распространение и клиническое значение получили ферменты VIM и IMP типов. Данные зарубежных эпидемиологических исследований свидетельствуют о распространенности МБЛ в Японии, странах Юго-Восточной Азии (в Гонконге, Сингапуре, Тайване, Таиланде, Корее), Европы (в Италии, Испании, Греции, Франции, Португалии, Англии, Польше, Хорватии и Германии) и Латинской Америки (в Бразилии). Отдельные случаи обнаружения МБЛ описаны в США, Канаде и многих других странах.

В России, по данным многоцентровых исследований «РЕЗОРТ» и «Металл», в период с 2002 по 2007 гг. МБЛ-продуцирующие штаммы *P. aeruginosa* выявлены в 23 стационарах 9 городов (Воронеж, Краснодар, Липецк, Москва, Нижний Новгород, Новосибирск, Омск, Смоленск и Тюмень).

Создание систем наблюдения за появлением и распространением устойчивых к антибактериальным препаратам микроорганизмов является основой для сдерживания антибиотикорезистентности. Системы наблюдения особенно необходимы для раннего обнаружения карбапенемрезистентных МБЛ-положительных бактерий на территориях, на которых они ранее не встречались.

Микробиологический мониторинг должен включать не только фенотипические и генотипические методы детекции МБЛ, но и молекулярные методы субвидового типирования, позволяющие оценивать родственность отдельных изолятов и изучать популяционную структуру карбапенемрезистентных микроорганизмов. Молекулярные методы эпидемиологического маркирования микроорганизмов, такие как пульс-электрофорез (PFGE), мультилокусное секвенирование-типирование (MLST), анализ множественных tandemных повторов (MLVA) могут использоваться для выявления в популяционной структуре бактерий эпидемиологически значимых клонов, способных быстро распространяться и вызывать серьезные инфекции, трудно поддающиеся терапии.

Своевременное выявление МБЛ-продуцирующих полирезистентных штаммов *P. aeruginosa* позволит предотвратить их широкое распространение как в отдельных стационарах, так и в целом по Беларуси.

**Цель исследования:** определение распространения металло- $\beta$ -лактамаз среди клинических изолятов *P. aeruginosa* в различных регионах Беларуси.

**Материалы и методы.** Собрана коллекция из 107 полиантибиотикорезистентных карбапенемрезистентных клинических изолятов *P. aeruginosa*, выделенных из клинического материала госпитализированных больных в 2007-2009 гг. в 16 стационарах четы-

рех областных центров Беларуси и г. Минска. Выполнена реидентификация штаммов и определена чувствительность к 15 антибактериальным препаратам методом пограничных концентраций с использованием автоматического бактериологического анализатора АТВ Expression (bioMérieux, Франция). Для всех карбапенемрезистентных штаммов выполнен фенотипический скрининг продукции металло-бета-лактамаз (МБЛ) методом двойных дисков с ЭДТА. Для обнаружения генов МБЛ VIM и IMP типов использована мультиплексная полимеразная цепная реакция в режиме реального времени (Шевченко и соавт., 2007 г.). Для тестирования отобраны 19 МБЛ-позитивных изолятов и 11 карбапенемрезистентных изолятов *P. aeruginosa*, для которых фенотипический скрининговый тест с ЭДТА выявил отрицательный или сомнительный результат. Идентификация амплификационных фрагментов *bla*<sub>VIM</sub> и *bla*<sub>IMP</sub> генов проводилась путем определения температур их плавления (~80°C для *bla*<sub>IMP</sub> и ~85°C для *bla*<sub>VIM</sub>) в присутствии интеркалирующего флуоресцентного красителя SYBR Green I. Дополнительно сравнивались кривые плавления опытных образцов с кривыми плавления позитивных контрольных штаммов.

Для оценки структуры интегронов, несущих гены МБЛ, использован метод ПЦР-рестрикционного картирования (O. Shevchenko и соав, 2008 г.). Вариабельные участки интегронов I класса амплифицированы с помощью праймеров к 5' (*intI1*) и 3' (*qacEΔ1* или *tniC/Tn5090*) консервативным последовательностям интегронов в парах с внутренними праймерами к генам *bla*<sub>VIM</sub> и подвергнуты рестрикции эндонуклеазой *TaqI*. Полученные рестрикционные профили ПЦР фрагментов сопоставлены с соответствующими профилями известных МБЛ-кодирующих интегронов, использованных в качестве контролей.

Выполнено эпидемиологическое маркирование карбапенемрезистентных изолятов *P. aeruginosa* с использованием мультилокусного анализа тандемных повторов (multiple-locus variable number tandem repeat analysis, MLVA) согласно схеме L. Onteniente и соавт. Проведена оценка количества тандемных повторов в шести VNTR-локусах (VNTR – Variable Number Tandem Repeat, тандемные повторы с переменным числом звеньев). Амплификация шести VNTR-локусов выполнена с помощью мультиплексной ПЦР (по 2 отдельные реакции для каждого изолята). Анализ размеров продуктов амплификации шести VNTR-локусов выполнен методом капиллярного электрофореза с флуоресцентной детекцией (фрагментный анализ) на автоматическом секвенаторе ABI-310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Кластерный анализ MLVA профилей проведен с помощью программного пакета Bionumerics v.6.01 (Applied Maths) с использованием категориальных значений длин VNTR локусов и алгоритма построения дендрограмм минимальных дистанций (Minimum Spanning Tree).

**Результаты и обсуждение.** Для всех штаммов подтверждена устойчивость к карбапенемам, сочетающаяся с устойчивостью к большинству исследованных антибактериальных препаратов, за исключением колистина.

С помощью метода «двойных дисков с ЭДТА» продукция МБЛ выявлена у 19 из 107 карбапенемрезистентных штаммов *P. aeruginosa* из 6 лечебных учреждений 3 городов. Проанализирована ассоциированная устойчивость МБЛ-продуцирующих карбапенемрезистентных штаммов. Все они имели общий фенотип резистентности (устойчивость к тикарциллину, тикарциллин/клавуланату, пиперациллину, пиперациллин-тазобактаму, цефтазидиму, цефепиму, имипенему, меропенему, амикацину, гентамицину, тобрамицину, ципрофлоксацину, котримоксазолу; чувствительность к колистину).

У всех 19 изолятов по данным ПЦР анализа подтверждено наличие МБЛ VIM-типа. Методом ПЦР-рестрикционного картирования установлена идентичность структуры интегронов, несущих ген МБЛ, у данных изолятов и VIM-2-кодирующего интегрона с набором генетических кассет: *aacA7-bla*<sub>VIM-2</sub>-*dhfrB5-aacC-A5* (GenBank Acc. No.

DQ52233), ранее описанного у штаммов *P. aeruginosa* из США (К. Lolans и соавт., 2005 г.), России (О. Shevchenko и соавт., 2008 г.) и Норвегии (О. Samuelsen и соавт., 2010 г.).

По результатам MLVA-типирования показана принадлежность 18 из 19 МБЛ-положительных штаммов к единому клональному комплексу, о чем свидетельствует соответствие количества tandemных повторов по 5-6 анализируемым VNTR-локусам (таблица). Отдельного внимания заслуживает штамм №2950 (г. Могилев), имеющий отличия по четырем VNTR-локусам (ms061, ms127, ms142 и ms010) от преобладающего MLVA-паттерна. Представленный изолят не являлся частью единого клонального комплекса, в который входили все другие выделенные на территории Беларуси МБЛ-продуцирующие штаммы *P. aeruginosa*.

MLVA-паттерны МБЛ-продуцирующих *P. aeruginosa*, выделенных в лечебных учреждениях Беларуси

Город Центр (число изолятов)	MLVA паттерн (ms061-ms127-ms077-ms172-ms142- ms010)	Тип интегрона / МБЛ
Минск		
Центр 1 (n=1)	109-225-392-826-180-191	DQ52233 / VIM-2
Центр 2 (n=7)	109-225-392-826-180-191	DQ52233 / VIM-2
Центр 2 (n=1)	115-225-392-826-180-191	DQ52233 / VIM-2
Центр 2 (n=2)	109-225-392-826-180-197	DQ52233 / VIM-2
Центр 2 (n=1)	109-225-392-826-180-203	DQ52233 / VIM-2
Центр 3 (n=2)	109-225-392-826-180-191	DQ52233 / VIM-2
Гомель		
Центр 1 (n=1)	109-225-392-826-180-185	DQ52233 / VIM-2
Центр 2 (n=1)	109-225-392-826-180-185	DQ52233 / VIM-2
Могилев		
Центр 1 (n=1)	115-225-392-826-180-185	DQ52233 / VIM-2
Центр 2 (n=1)	109-225-392-826-180-185	DQ52233 / VIM-2
Центр 2 (n=1)	139-210-392-826-961-233	DQ52233 / VIM-2

**Заключение.** В результате исследования обнаружено 19 МБЛ-продуцирующих изолятов, выделенных в шести лечебных учреждениях трех регионов республики и определено наличие у них *bla*<sub>VIM</sub>-генов. Показано преимущественно клональное распространение МБЛ-продуцирующих штаммов синегнойной палочки на территории республики. Вместе с тем, совпадение структуры МБЛ-кодирующего интегрона у всех изолятов, включая генетически отличный штамм, указывает на возможность как вертикального, так и горизонтального распространения МБЛ среди клинических штаммов. Выявлена возможность горизонтального переноса *bla*<sub>VIM</sub>-генов от представителей эпидемического клона локальным эндемичным штаммам *P. aeruginosa* в составе интегрона I класса. Данный факт требует дальнейшего изучения в связи с опасностью формирования локальных популяций карбапенемрезистентных *P. aeruginosa*, максимально адаптированных к условиям госпитальной среды.

Для ограничения циркуляции МБЛ-продуцирующих изолятов *P. aeruginosa* в лечебных учреждениях необходимо создание системы микробиологического мониторинга, направленного на выявление колонизированных пациентов. Для своевременного выявления эпидемически значимых клонов и разработки мероприятий инфекционного контроля необходимо проведение многоцентровых исследований, включающих определение механизмов карбапенемрезистентности и эпидемиологическое маркирование карбапенемрезистентных изолятов.

*Исследование выполнено при финансовой поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (грант № Б08М-129).*

## КАРБАПЕНЕМРЕЗИСТЕНТНЫЕ ШТАММЫ СИНЕГНОЙНОЙ ПАЛОЧКИ – ПРОДУЦЕНТЫ МЕТАЛО-БЕТА-ЛАКТАМАЗ: РАСПРОСТРАНЕНИЕ В РАЗЛИЧНЫХ РЕГИОНАХ БЕЛАРУСИ

Д. В. Тапальский<sup>1</sup>, В. А. Осипов<sup>1</sup>, Н. Н. Левшина<sup>2</sup>, А. А. Славинская<sup>2</sup>, В. К. Окулич<sup>3</sup>,  
А. Н. Копычко<sup>4</sup>, Л. Н. Ребеко<sup>4</sup>, О. Е. Кузнецов<sup>5</sup>, А. В. Дысько<sup>5</sup>,  
Е. Ю. Скленова<sup>6</sup>, А. В. Романов<sup>6</sup>, М. В. Эйдельштейн<sup>6</sup>

<sup>1</sup>Гомельский государственный медицинский университет (*tapalskiy@gmail.com*), Гомель;

<sup>2</sup>Минский городской центр гигиены и эпидемиологии, Минск; <sup>3</sup>Витебский государственный медицинский университет, Витебск; <sup>4</sup>Могилевский областной центр гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья, Могилев; <sup>5</sup>Гродненская областная клиническая больница, Гродно, Беларусь;

<sup>6</sup>НИИ антимикробной химиотерапии, Смоленск, Россия

Проведенное исследование выявлено преимущественно клональное распространение штаммов синегнойной палочки, продуцирующих метало-бета-лактамазу (МБЛ) на территории республики и определено наличие у них *bla*<sub>VIM</sub>-генов. Опасность ферментов данного класса обусловлена целым рядом причин, обуславливающим высокую эпидемиологическую значимость данного механизма антибиотикорезистентности. Данный факт требует дальнейшего изучения в связи с опасностью формирования локальных популяций карбапенемрезистентных *P. aeruginosa*, максимально адаптированных к условиям госпитальной среды. Для ограничения циркуляции МБЛ-продуцирующих изолятов *P. aeruginosa* в лечебных учреждениях необходимо создание системы микробиологического мониторинга, направленного на выявление колонизированных пациентов.

*Ключевые слова:* *Pseudomonas aeruginosa*, карбапенемрезистентность, метало-бета-лактамаза.

## PREVALENCE OF RESISTANT TO CARBAPENEMS METALLO-BETA-LACTAMASES PRODUCING STRAINS IN BACTERIAL POPULATION OF *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* IN THE TERRITORY OF BELARUS

D. V. Tapalskiy<sup>1</sup>, V. A. Osipov<sup>1</sup>, N. N. Levshina<sup>2</sup>, A. A. Slavinskaya<sup>2</sup>, V. K. Okulich<sup>3</sup>, A. N. Kopychko<sup>4</sup>,  
L. N. Rebeiko<sup>4</sup>, O. E. Kuznetsov<sup>5</sup>, A. V. Dys'ko<sup>5</sup>,  
E. Yu. Sklenova<sup>6</sup>, A. V. Romanov<sup>6</sup>, M. V. Eidel'shtein<sup>6</sup>

<sup>1</sup>Gomel State Medical University (*tapalskiy@gmail.com*), Gomel; <sup>2</sup>Minsk Municipal Center for Hygiene & Epidemiology, Minsk; <sup>3</sup>Vitebsk State Medical University, Vitebsk; <sup>4</sup>Mogilev Regional Center for Hygiene, Epidemiology & Public Health, Mogilev; <sup>5</sup>Grodno Regional Clinic Hospital, Grodno, Belarus;

<sup>6</sup>Research Institute for Antimicrobial Chemotherapy, Smolensk, Russia

Prevalence of metallo-beta-lactamases (MBL) producing strains in bacterial population of *P. aeruginosa* is estimated. The belonging MBL to genetic group VIM was defined. The clonal distribution of MBL-producing strains was confirmed with using of epidemiological marking methods. The increase of resistance to carbapenems in *P. aeruginosa* bacterial population is connected with epidemic distribution of separate clonal groups of metallo-beta-lactamase producers in extensive geographical territories. Necessity of microbiological monitoring for restriction of distribution MBL-producing strains was shown.

*Key words:* *Pseudomonas aeruginosa*, resistance to carbapenems, metallo-beta-lactamase.

## АНАЛИЗ ПРОСВЕТНОЙ МИКРОФЛОРЫ ТОЛСТОГО КИШЕЧНИКА У ДЕТЕЙ РАННЕГО ВОЗРАСТА С ПРОЯВЛЕНИЯМИ АЛЛЕРГИЧЕСКОГО ДЕРМАТИТА

Н.А. Фролова, А.И. Клыкков

Смоленская государственная медицинская академия (*natalfrol@mail.ru*),  
Смоленск, Россия

В последние годы все большее внимание уделяется изучению нормальной микрофлоры человека. Это в значительной мере объясняется значением симбиотных отношений организма человека и микробов в регуляции жизненно важных функций организма человека, а также актуальностью для практического здравоохранения патологических состояний и заболеваний, в развитии которых принимают участие многие представители нормальной и резидентной микрофлоры [1, 2].

Нами был изучен количественный и качественный состав фекальной микрофлоры у 55 детей раннего возраста (до 3 лет) с явлениями аллергического дерматита и без него [3].

Все дети были распределены на две группы: 1 – составляли здоровые дети (27), без признаков аллергического дерматита, 2 – дети с различной степенью выраженности аллергического дерматита (28).

При анализе анамнеза были выявлены данные за возможные изменения микрофлоры кишечника лишь у  $17,8 \pm 2,2\%$ , причем изменение этого показателя как в 1 группе детей, так и во 2 колебалось незначительно:  $16,0 \pm 3,2\%$  и  $19,6 \pm 3,3\%$  соответственно.

В 1 группе здоровых детей мы обнаружили изменения микрофлоры, причем изменения I степени преобладали над более выраженными микробиологическими изменениями. У  $63,9 \pm 5,4\%$  детей в этой группе отмечалось снижение содержания бифидобактерий до  $10^8$  КОЕ/г, лактобактерий до  $10^5$ - $10^6$  КОЕ/г, типичных эшерихий до  $10^6$  КОЕ/г, и лишь у  $12,9\%$  детей этой группы были обнаружены грибы рода *Candida* в концентрации  $10^3$ - $10^4$  КОЕ/г.

В  $36,1 \pm 5,4\%$  случаев у детей первой группы изменений микрофлоры кишечника выявлено не было.

При лабораторном исследовании у детей 2 группы изменения со стороны просветной микрофлоры толстого кишечника присутствовали в  $95,0 \pm 3,1\%$  случаев. Лишь у  $5,0 \pm 3,0\%$  детей микрофлора кишечника оставалась без изменений.

В группе этих детей с легким течением аллергического дерматита ( $53,0 \pm 7,0\%$ ) изменения микрофлоры были слабо выраженными. Более глубокие изменения кишечной микрофлоры наблюдались у детей, с выраженным аллергическим дерматитом, что составило  $47,0 \pm 7,0\%$ .

У детей наряду со снижением содержания бифидобактерий до  $10^6$ - $10^7$  КОЕ/г, лактобактерий до  $10^4$  КОЕ/г отмечалось обнаружение ассоциаций условно патогенных микроорганизмов в концентрации  $10^6$ - $10^7$  КОЕ/г, в том числе грибы рода *Candida* были обнаружены у  $42,3\%$  детей в количестве  $10^5$ - $10^6$  КОЕ/г, (как известно, содержание дрожжеподобных грибов в толстой кишке у здоровых детей не должны превышать  $10^2$ - $10^3$  КОЕ/г фекалий).

Таким образом у детей с аллергическим дерматитом одновременно выявлялось снижение числа анаэробных представителей облигатной микрофлоры, обладающих высокой антагонистической активностью, и увеличение числа грибов рода *Candida*, которые были обнаружены в различных концентрациях у  $79,2\%$  всех обследованных детей.

Основываясь на результатах нашего исследования можно предположить, что при нарушении микрoэкологического баланса в толстой кишке создаются благоприятные условия для размножения условно патогенных микроорганизмов, в том числе грибов рода *Candida* которые в свою очередь, могут способствовать развитию кандидоза и быть дополнительным источником эндогенной сенсibilизации организма [4, 5].

*Ключевые слова:* микрофлора толстого кишечника, дети раннего возраста, аллергический дерматит.

## Литература

1. Конюхова, Н.А. Дисбиозы. Современные представления, методы коррекции / Н.А. Конюхова // Основные направления коррекции метаболизма в современных экологических условиях: материалы межрегион. науч.-практ. конф., посвящ. 80-летию КГМА. – Краснодар, 2000. – С. 222-225.
2. Пинегин, Б.В. Дисбактериозы кишечника / Б.В. Пинегин, В.Н. Мальцев, В.М. Коршунов. – М.: Медицина, 1984. – 144 с.
3. Протокол ведения больных. Дисбактериоз кишечника: приказ М-ва здравоохран. Рос. Федерации об утв. отрасл. стандарта 09.06.2003 № 231.



4. Федосов, Е.А. Особенности формирования здоровья ребенка в современных условиях / Е.А. Федосов, Т.Г. Авдеева, Н.А. Фролова // Актуальные вопросы обеспечения санитарно-эпидемиологического благополучия и охраны здоровья населения Центрального региона России: материалы регион. науч.-практ. конф. – Смоленск, 2002. – С. 82.

5. Шендеров, Б.А. Микробная медицинская экология и функциональное питание / Б.А. Шендеров. – М.: Грант, 1998. – Т. 1: Микрофлора человека и животных и ее функции. – 288 с.

## ANALYSIS OF THE LUMEN LARGE INTESTINAL MICROFLORA IN INFANTS WITH ALLERGIC DERMATITIS

N.A. Frolova, A.I. Klykov

*Smolensk State Medical Academy (natalfrol@mail.ru), Smolensk, Russia*

Based on the results obtained it was suggested that in violation of microecological balance in the colon favorable conditions for reproduction of opportunistic microorganisms, including fungi of the genus *Candida*, have been created. This may contribute to the development of candidiasis and be an additional source of endogenous sensitization of the organism.

*Key words:* intestinal microflora, allergic dermatitis, infants.

## ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ СПЛЕНЭКТОМИИ НА СОСТОЯНИЕ ПРОСВЕТНОЙ МИКРОФЛОРЫ КИШЕЧНИКА И ОБСЕМЕНЕННОСТЬ ВНУТРЕННЕЙ СРЕДЫ ОРГАНИЗМА У МЫШЕЙ ЛИНИЙ BALB/C И C57BL/6

Т. И. Хомякова, В. В. Нечай, Ю. Н. Хомяков, Ю. Е. Козловский

*НИИ морфологии человека РАМН, ФГУЗ, Противочумный центр Роспотребнадзора  
(tatkhom@mail.ru), Москва, Россия*

Спленэктомия — хирургическое удаление селезенки, которое выполняется при травмах селезенки, цитопенических состояниях и синдроме гиперспленизма, ходжкинских лимфомах, лейкозах и др. заболеваниях. Считается, что после спленэктомии развивается *вторичное иммунодефицитное состояние* [1], обусловленное нарушением *антигензависимой* дифференцировки В- и Т-лимфоцитов в селезенке, которое является основой большей подверженности инфекционным заболеванием с более тяжелой формой протекания и хронизацией процесса [2]. Течение вторичного иммунодефицитного состояния во многом зависит от врожденных особенностей иммунитета. Вероятно, этим объясняется противоречивость данных, касающихся исследования основных показателей Т- и В- иммунитета после спленэктомии [3].

Вместе с тем, многочисленные данные последних лет убедительно доказали роль микрофлоры кишечника в развитии и функционировании как местного, так и общего иммунитета [4, 5]. Кроме того, показано роль транслокации бактерий из кишечника в развитии инфекционных заболеваний на фоне иммунодефицита.

В связи с вышесказанным, **целью исследования** было изучение реакции просветной микрофлоры толстой кишки и обсемененность внутренней среды организма при вторичном иммунодефиците, вызванном спленэктомией у мышей линий Balb/c и C57Black/6 в различные сроки. Для этого были поставлены следующие **задачи**:

- Изучить контрольные показатели просветной микрофлоры у мышей линий C57/Bl6 и Balb/C.

- Изучить показатели просветной микрофлоры у мышей линий C57/Bl6 и Balb/C на 10, 30 и 60 сутки после спленэктомии.

- Изучить уровень обсемененности крови, легких, печени, мезентериальных лимфоузлов в контроле и на 10, 30, 60 сутки после спленэктомии у мышей линий C57/Bl6 и Balb/C.

**Материалы и методы:** мыши линий Balb/C и C57Bl/6 с массой тела 18–20 г (самцы) в количестве 110 шт., получены из питомника «Столбовая», содержание и выведение из эксперимента проводилось с соблюдением «Правил обращения с лабораторными животными». Мыши каждой линии были разделены на группы:

1. Контрольная группа — 10 мышей
2. Опытная группа №1 — 15 мышей, забой через 10 сут. после спленэктомии
3. Опытная группа №2 — 15 мышей, забой через 30 сут. после спленэктомии
4. Опытная группа №3 — 15 мышей, забой через 60 сут. после спленэктомии

Спленэктомия выполнялась с соблюдением асептики под эфирным наркозом через косой разрез в левом подреберье. На сосуды селезенки накладывалась лигатура, после чего орган удаляли. Брюшную стенку ушивали послойно кетгутом. В течение первых трех суток рана обрабатывалась спиртовым раствором бриллиантовой зелени. Терапия антибиотиками не проводилась. Оценку состояния микрофлоры кишечника оценивали бактериологическим методом, — высевом из свежеполученных фекалий, гомогенизированных в физиологическом растворе, после инкубирования в течение 40 мин. по следующим параметрам (КОЕ/мг фекалий): уровень лактозо-положительных и лактозоотрицательных энтеробактерий, уровень энтерококков (*E. faecalis et fecium*), уровень лактобактерий на соответствующих питательных средах (HiMedia, Индия). Кроме того, оценивалось общее количество бактерий, образующих колонии в аэробных условиях на агаре Лурия-Бертани (LA) при 37°C за 18 часов.

Оценку уровня обсемененности органов проводили на основе посева на плотный сердечно-мозговой агар (HiMedia<Индия) 0,5 мл гомогената образца органа объемом 3x3x3 мм или целого лимфатического узла в физиологическом растворе после инкубирования в течение 40 мин при комнатной температуре.

**Результаты исследований.** Было обнаружено, что, несмотря на значительные индивидуальные колебания, в норме у здоровых животных уровень основных представителей просветной микрофлоры (энтеробактерий, энтерококков и лактобактерий) кишечника является постоянным. У мышей линий Balb/C и C57Bl/6 в норме имеются различия в количестве лактобактерий в просветной микрофлоре. В связи с этим можно предположить, что при экспериментальной работе с мышами определение уровня основных представителей просветной микрофлоры перед началом проведения эксперимента может быть использовано как быстрый и относительно дешевый тест. Показатели, выходящие за пределы нормы, могут расцениваться как признаки неблагополучия и животные, имеющие признаки дисбиоза, должны быть выведены как из эксперимента.

При оценке усредненного показателя заселенности кишечника условно-патогенной микрофлорой посевом на агаре Лурия-Бертани было обнаружено, что в норме у мышей обеих этот показатель составляет  $10^8$ - $10^9$  КОЕ/г. Повышение этого показателя у животных перед началом эксперимента может быть интерпретировано как отклонение от нормы.

Количество колониеобразующих единиц, высеваемых из органов здоровых мышей на богатой плотной питательной среде, не превышает 200 КОЕ/на образец размерами 3x3x3 мм. Содержание бактерий в крови здоровых животных не превышает  $1 \times 10^4$  КОЕ/мл. Превышение этих показателей также может быть интерпретировано как отклонение от нормы.

При спленэктомии происходит достоверное изменение уровня основных представителей просветной микрофлоры у мышей обеих исследованных линий. При этом у мышей линии Balb/C происходит прогрессирующее падение уровня лактозо-

положительных энтеробактерий и лактобактерий вплоть до 60 дня эксперимента. На 10 сутки после спленэктомии отмечается также снижение уровня *E. fecium*, которое сохраняется до 60 сут., повышение уровня лактозо-отрицательных энтеробактерий и энтерококков *E. faecalis*.

У мышей линии C57Bl6 на 10 сут после спленэктомии имеет место повышение уровня энтеробактерий, энтерококков и лактобактерий в просветной микрофлоре, на 30 сутки уровень лактозо-положительных энтеробактерий, лактобактерий и *E. faecalis* продолжает повышаться, количество *E. fecium* и лактозо-отрицательных энтеробактерий достоверно снижается. У мышей линии BalbC спленэктомия у 50 % мышей приводит к активному заселению органов бактериями с резким повышением количества КОЕ на образец. У мышей линии C57Bl6 на 30 сут. 30 % животных был отмечен высокий уровень обсемененности органов.

Таким образом, спленэктомия приводит к развитию достоверных изменений бактериального статуса, как кишечника, так и организма в целом, при этом имеют место как индивидуальные, так и линейные различия в выраженности этих изменений.

*Ключевые слова:* спленэктомия, микрофлора кишечника, мыши.

### **Литература**

1. Шапкин, Ю. Г. Иммунный статус в отдаленном периоде у пациентов, оперированных по поводу повреждений селезенки / Ю. Г. Шапкин // Хирургия. Журн. им. Н.И. Пирогова. – 2006. – № 2. – С. 14-17.
2. Infections in splenectomized patient / H. Coignard-Biehler [et al.] // Rev. Prat. – 2008. – Vol. 58, N 20. – P. 2209-2214.
3. Immunologic function after splenic embolization, is there a difference? / G.T. Tominaga [et al.] // J. Trauma. – 2009. – Vol. 67, N 2. – P. 289-295.
4. Commensal-induced regulatory T cells mediate protection against pathogen-stimulated NF-kappaB activation / C. O'Mahony [et al.] // PLoS Pathog. – 2008. – Vol. 4, N 8. – e1000112.
5. van Wijk, F. Intestinal T cells: Facing the mucosal immune dilemma with synergy and diversity / F. van Wijk, H. Cheroutre // Semin Immunol. – 2009. – Vol. 21, N 3. – P. 130-138.

## **INVESTIGATION OF SPLENECTOMY INFLUENCE ON INTESTINAL MICROFLORA IN MICE BALB/C AND C57BL/6**

**Т. И. Хомякова, В. В. Нечай, Ю. Н. Хомяков, Ю. Е. Козловский**

*НИИ морфологии человека РАМН, ФГУЗ, Противочумный центр Роспотребнадзора  
(tatkhom@mail.ru), Москва, Россия*

Usually splenectomy causes the development of the secondary immune deficiency because of antigen-dependent differentiation of immune cells. But in some papers information with no any significant difference in main immunological indexes after a splenectomy were presented. The reason could be in individual or specific differences. Except of it at present days everybody knows that intestinal microflora plays an important role in development of inner and adoptive immunity, but nobody searched how splenectomy works upon bacterial state of preliminary healthy experimental animals. The aim of the present work was to investigate the influence of splenectomy on bacteria state of mice Balb/C and C57Bl/6. It was found a number of signs of real difference in reaction of intestine and body microbiological state in mice of different lines. It was shown that splenectomy leads to the development of valid changes in bacterial state of intestine and whole body. The differences were individual and specific.

*Key words:* splenectomy, intestinal microflora, mice.

## ОЦЕНКА НАРУШЕНИЙ МИКРОБИОЦЕНОЗА ВЛАГАЛИЩА У ЖЕНЩИН, ПЛАНИРУЮЩИХ БЕРЕМЕННОСТЬ

Ю.В. Ширева, Т.И. Карпунина

Пермская государственная медицинская академия им. акад. Е.А. Вагнера  
(yuxux@yandex.ru), Пермь Россия

По данным эпидемиологических исследований в настоящее время в структуре инфекционно-воспалительных заболеваний женской репродуктивной сферы преобладают процессы, этиологическим фактором которых выступают условно-патогенные бактерии и грибы, являющиеся составной частью нормальной микрофлоры. Эти заболевания встречаются преимущественно у женщин детородного возраста, что обуславливает экономическую и социальную значимость проблемы. В структуре вульвовагинальных инфекций частота бактериальных вагинозов составляет от 30 до 87%, на долю неспецифических вагинитов приходится не менее одной трети всех инфекций влагалища [1]. Отсутствие специфической картины воспаления, торпидное, а зачастую бессимптомное течение осложняют своевременную диагностику этих заболеваний, что способствует хронизации процесса, неблагоприятно влияет на репродуктивную функцию, снижает качество жизни.

Неспецифический вагинит относится к заболеваниям, которые сами по себе не представляют прямой угрозы здоровью женщины. Однако при этом в нижних отделах полового тракта накапливаются и постоянно сохраняются микроорганизмы, которые являются потенциальными возбудителями гнойно-воспалительных заболеваний органов малого таза. Представители *Staphylococcus spp.*, *Streptococcus spp.*, колиформные бактерии – самые частые возбудители хориоамнионита, интраамниальной инфекции, послеродового эндометрита, послеоперационных воспалительных осложнений. Фосфолипазы условно-патогенных микроорганизмов аналогичны тканевым фосфолипазам амниального эпителия, которые являются биохимическими триггерами родовой деятельности. Это приводит к развитию родовой деятельности при любом сроке беременности (самопроизвольные выкидыши, преждевременные роды) [2, 3].

**Цель исследования:** установить особенности изменения ряда показателей, характеризующих микробиоценоз влагалища женщин, страдающих неспецифическим аэробным вагинитом и бактериальным вагинозом на этапе прегравидарной подготовки.

**Материалы и методы.** Выполнено клинико-лабораторное обследование 128 женщин репродуктивного возраста, планирующих беременность. На основании клинико-лабораторных данных, из них были сформированы 3 группы, критерием отбора в которые было отсутствие инфекций, передающихся половым путем (ИППП). I группа – контрольная (30 человек) – включала условно-здоровых женщин. II группа – с диагнозом «неспецифический аэробный вагинит» (30 человек). Заболевание диагностировали на основании жалоб на дискомфорт во влагалище и патологические выделения; при осмотре на зеркалах – наличие очаговой гиперемии слизистой оболочки влагалища, а также микроскопического и бактериологического исследования (признаки воспаления, расширение спектра и увеличение количества аэробных условно-патогенных бактерий). III группа – с диагнозом «бактериальный вагиноз» (30 человек). Диагностика основывалась на характерных жалобах, наличии критериев Amsel и бактериологическом исследовании (присутствие аэробно-анаэробных ассоциаций условно-патогенных микроорганизмов, численность которых превышала  $10^4$  КОЕ/мл). Всем пациенткам было проведено обследование, включающее гинекологический осмотр, рН-метрию влагалищного секрета, постановку аминотеста с 10% р-ром КОН, ПЦР-диагностика ИППП

(*C. trachomatis*, *M. genitalium*, ВПЧ, ВПГ, *Neisseria gonorrhoeae*), бактериоскопическое и бактериологическое исследование вагинального отделяемого, проводимое по общепринятым методикам. Активность лизоцима исследовали фотонейфометрическим методом с учетом рекомендаций Каграмановой (1974). Материалами для исследования служили образцы крови из кубитальной вены и вагинальный секрет. При микроскопическом исследовании вагинальных мазков обращали внимание на выраженность лейкоцитарной реакции, состояние вагинального эпителия, количественный и качественный состав микрофлоры. Забор материала для бактериологического исследования производился из заднего свода влагалища до проведения ручного обследования. Посев проводили с использованием набора стандартных питательных сред для выявления аэробов, микроаэрофилов и облигатных анаэробов. Условно-патогенных возбудителей идентифицировали по общепринятым методам с обязательным подсчетом количества колониеобразующих единиц. Статистическая обработка осуществлялась с использованием пакета программ STATISTICA 6,0 для Windows.

**Результаты и обсуждение.** Пациентки в исследуемых группах были сопоставимы по возрасту, характеру менструальной функции, возрасту сексуального дебюта, количеству половых партнеров, количеству родов и аборт. Сопоставление данных анамнеза показало, что у женщин с изучаемой патологией выше число неблагоприятных исходов беременности (самопроизвольные выкидыши) и перенесенных гинекологических заболеваний ( $p < 0,05$ ). Неспецифический аэробный вагинит, как и бактериальный вагиноз, нередко сочетался с хроническими воспалительными заболеваниями дыхательной, пищеварительной и мочевыделительной систем, что подтверждает мнение исследователей о связи дисбиотических процессов с нарушениями гомеостаза и иммунологической реактивности на организменном уровне.

При бактериологическом исследовании установлено, что в группе здоровых женщин отмечалось явное преобладание лактобацилл над другими микроорганизмами (табл.). У них же наблюдалось меньшее число сопутствующих видов бактерий, как правило, условно-патогенных. Известно, что в норме на лактофлору приходится 95-98% от всей микрофлоры влагалища, и именно она, в большей степени, обеспечивает состояние колонизационной резистентности. Индигенные штаммы лактобактерий, обладающие высокой адгезивной активностью и тесно взаимодействующие со слизистой оболочкой влагалища, имеют селективные преимущества как перед условно-патогенными микроорганизмами, так и перед экзогенными лактобактериями. Прикрепляясь к эпителиоцитам, автохонные штаммы покрывают стенку влагалища сплошным слоем и препятствует адгезии к рецепторам эпителиоцитов других микробов [4]. При неспецифическом аэробном вагините отмечалось уменьшение количества лактобацилл до  $3,3 \pm 0,03$  lg КОЕ/мл. На этом фоне расширился спектр, и увеличилась численность условно-патогенных микроорганизмов. Так *E.coli* численностью  $4,14 \pm 0,35$  lg КОЕ/мл встречалась у 17 (56,7%) женщин; *S. epidermidis* –  $4,26 \pm 0,17$  lg КОЕ/мл у 13 (43,3%); *Staphylococcus haemolyticus* –  $4,53 \pm 0,21$  lg КОЕ/мл у 12 (40%); *Corynebacterium spp.* –  $4,54 \pm 0,09$  lg КОЕ/мл у 9 (30%). Во всех случаях высевали ассоциации микроорганизмов, представленные 2-5 видами. При бактериальном вагинозе молочно-кислые бактерии высевали у 28 (93,3%) пациенток в концентрации  $3,0 \pm 0,28$  lg КОЕ/мл, что ниже аналогичного показателя у здоровых женщин более чем в 2 раза. По сравнению с неспецифическим вагинитом количество лактобацилл также было несколько ниже, но эта разница статистически не достоверна. Среди других условно-патогенных микроорганизмов преобладали *Bacteroides spp.* –  $3,24 \pm 0,11$  lg КОЕ/мл у 14 (46,7%); *Peptococcus spp.* –  $3,75 \pm 0,21$  lg КОЕ/мл у 11 (36,7%); *Peptostreptococcus spp.* –  $3,57 \pm 0,19$  lg КОЕ/мл у 13 (43,3%), стафилококки с гемолитическими свойствами –  $3,28 \pm 0,43$  lg КОЕ/мл у 18

пациенток; *Streptococcus (haem +)* –  $3,34 \pm 0,87$  lg КОЕ/мл у 10 (33,3%); *Streptococcus (haem -)* –  $6,05 \pm 0,98$  lg КОЕ/мл у 12 (40%).

Сравнительная характеристика микрофлоры влагалища условно-здоровых женщин, при аэробном вагините и бактериальном вагинозе

Показатели	I группа (n=30)		II группа (n=30)		III группа (n=30)	
	Ig КОЕ/мл	Абс./%	Ig КОЕ/мл	Абс./%	Ig КОЕ/мл	Абс./%
<i>Lactobacillus spp.</i>	$6,2 \pm 0,09$	30 (100%)	$3,3 \pm 0,03^*$	30 (100%)	$3,0 \pm 0,28^{**}$	28 (93,3%)
<i>E.coli</i>	$3,8 \pm 0,42$	4 (13,3%)	$4,1 \pm 0,35^*$	17 (56,7%)	$1,4 \pm 0,77^{**}$	8 (26,7%)
<i>Enterobacteriaceae (прочие)</i>	$3,0 \pm 0,35$	3 (10%)	$4,5 \pm 0,11^*$	10 (33,3)	$2,7 \pm 0,96$	5 (16,7%)
<i>Staphylococcus aureus</i>	$3,2 \pm 0,14$	4 (13,3%)	$5,0 \pm 0,28$	5 (16,7%)	$3,6 \pm 0,87$	3 (10%)
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	$3,2 \pm 0,11$	5 (16,7%)	$4,3 \pm 0,17^*$	13 (43,3%)	$1,2 \pm 0,96$	7 (23,3%)
<i>Staphylococcus (haem+)</i>	0	0	$4,5 \pm 0,21^*$	12 (40%)	$3,3 \pm 0,43^{**}$	18 (60%)
<i>Streptococcus acidophilus</i>	$3,3 \pm 0,53$	4 (13,3%)	$5,0 \pm 0$	1 (3,3%)	0	0
<i>Streptococcus (haem +)</i>	0	0	$5,0 \pm 0,19^*$	9 (30%)	$3,3 \pm 0,87^{**}$	10 (33,3%)
<i>Streptococcus (haem -)</i>	0	0	$5,1 \pm 0,26^*$	7 (23,3%)	$6,1 \pm 0,98^{**}$	12 (40%)
<i>Corynebacterium spp.</i>	$3,5 \pm 0,11$	5 (16,7%)	$4,5 \pm 0,09$	9 (30%)	$3,6 \pm 0,63^{**}$	13 (43,3%)
<i>Candida spp.</i>	$2,2 \pm 0,41$	2 (6,7%)	$5,0 \pm 0^*$	1 (3,3%)	$1,7 \pm 0$	1 (3,3%)
<i>Bacteroides spp.</i>	0	0	0	0	$3,2 \pm 0,11^{**}$	14 (46,7%)
<i>Peptococcus spp.</i>	0	0	0	0	$3,7 \pm 0,21^{**}$	11 (36,7%)

\* - различия между I и II группами ( $p < 0,05$ );

\*\* - различия между I и III группами ( $p < 0,05$ ).

Из биоцидных белков, обладающих прямым литическим действием на микробные клетки и способных влиять на антимикробную активность фагоцитов, был изучен лизоцим крови и влагалищной жидкости. Наши исследования показали, что активность лизоцима крови в группе здоровых женщин составила  $71,2 \pm 3,12\%$ ; влагалищного отделяемого –  $74,4 \pm 4,73\%$ . Активность лизоцима крови при неспецифическом аэробном вагините составила  $50,7\% \pm 4,82\%$ , при бактериальном вагинозе –  $56,6 \pm 5,4\%$ ; во влагалищной жидкости при неспецифическом аэробном вагините –  $50,2 \pm 5,02\%$ , при бактериальном вагинозе –  $47,4 \pm 5,08\%$ . Снижение активности лизоцима при неспецифическом аэробном вагините и бактериальном вагинозе может быть обусловлено антигенной перегрузкой, что ведет к истощению лизоцима и ослабляет его влияние на фагоцитарную активность нейтрофилов. Следовательно, неспецифический аэробный вагинит, как и бактериальный вагиноз, возникают на фоне снижения активности локальных факторов неспецифической резистентности, а нарушения микробной экологии могут усугублять инфекционный процесс за счет воздействия на местные механизмы защиты, что создает угрозу репродуктивному здоровью женщины. Изменение показателей наблюдаются и в крови, и в вагинальном отделяемом. Причем, изменения в вагинальном отделяемом более выражены и, как следствие, наиболее информативны при определении колонизационной резистентности влагалищного биотопа.

**Выводы.** Дисбиотические состояния во влагалище сопровождаются расширением спектра микроорганизмов, преимущественно аэробов, способных выступать в роли

этиологического фактора при воспалительных процессах. Подробное бактериологическое исследование при неспецифических инфекционных заболеваниях влагалища является наиболее информативным и должно быть рекомендовано в период подготовки к беременности, как основа снижения риска материнских и перинатальных инфекционных осложнений.

#### **Литература**

1. Анкирская, А.С. Бактериальный вагиноз / А.С. Анкирская // Акушерство и гинекология. – 2005. – № 3. – С. 10-13.
2. Кира, Е.Ф. Муслимова С.З. Неспецифический вагинит и его влияние на репродуктивное здоровье женщины / Е.Ф. Кира, С.З. Муслимова. – Пробл. репродукции. – 2008. – № 5. – С. 8-14.
3. Серов, В.Л. Особенности инфекции в акушерстве, гинекологии и перинатологии / В.Л. Серов. – Рус. мед. журн. – 2006. Т.1, № 14. – С. 2-5.
4. Ассоциативный симбиоз / О.В. Бухарин [и др.]. – Екатеринбург, 2007. – 263 с.

### **ОЦЕНКА НАРУШЕНИЙ МИКРОБИОЦЕНОЗА ВЛАГАЛИЩА У ЖЕНЩИН, ПЛАНИРУЮЩИХ БЕРЕМЕННОСТЬ**

**Ю.В. Ширева, Т.И. Карпунина**

*Пермская государственная медицинская академия им. академика Е.А. Вагнера  
(yuxyx@yandex.ru), Пермь Россия*

Проведена оценка нарушений микроценоза влагалища у женщин планирующих беременность. На основании клинико-лабораторных данных, пациентки были разделены на 3 группы: I группа – контрольная (30 человек) – включала условно-здоровых женщин; II группа – с диагнозом «неспецифический аэробный вагинит» (30 человек); III группа – с диагнозом «бактериальный вагиноз» (30 человек). Установлено, что неспецифический аэробный вагинит, как и бактериальный вагиноз, возникают на фоне снижения активности локальных факторов неспецифической резистентности, а нарушения микробной экологии могут усугублять инфекционный процесс за счет воздействия на местные механизмы защиты. Показано, что подробное бактериологическое исследование при неспецифических инфекционных заболеваниях влагалища является наиболее информативным и должно быть рекомендовано в период подготовки к беременности.

*Ключевые слова:* микробиocenоз влагалища, беременность, бактериологическое исследование.

### **EVALUATION OF VAGINA MICROBIOCENOSIS ABNORMALITIES IN WOMEN PLANNING PREGNANCY**

**Yu. V. Shireva, T. I. Karpunina**

*Academician E.A. Vagner Perm State Medical Academy (yuxyx@yandex.ru), Perm, Russia*

The estimation of the vagina microbiocenosis abnormalities in women planning pregnancy was carried out. According to the clinical and laboratory tests, patients were divided into 3 groups: the first group included 30 practically healthy women; the second group – 30 women with “non-specific aerobic vaginitis”; the third group – 30 women with “bacterial vaginosis”. It was established that non-specific aerobic vaginitis as well as bacterial vaginosis appeared after reduction of the activity of local non-specific resistance factors, and abnormalities of the microbial ecology could redouble the infectious process due to the influence on the local protective mechanisms. It was shown that a detailed bacteriological study in women with the non-specific vaginal infections was the most informative and should be recommended in the period leading up to pregnancy.

*Key words:* vaginal microbiocenosis, pregnancy, bacteriological investigation.