

10. Сергиев В.П., Ганушкина Л.А., Филатов Н.Н. Новые и возвращающиеся переносчики вирусных лихорадок — угроза эпидемических осложнений на юге Европы и России. Журн. микробиол. 2011, 4: 97-100.
11. Смелянский В.П., Алексеев В.В., Липницкий А.В. и др. Особенности клиники и эпидемиологии лихорадки Западного Нила в сезон 2010 г. в Волгоградской области. Инфекционные болезни. 2011, 9 (4): 75-78.

Поступила 16.10.15

Контактная информация: Жукова Лариса Ивановна, д.м.н., проф.,
350015, Краснодар, ул. Седина, 4, р.т. (861) 255-26-40

© М.Н.ГАПОН, Л.Н.ТЕРНОВСКАЯ, 2016

М.Н.Гапон, Л.Н.Терновская

ВЫЯВЛЕНИЕ СТЕПЕНИ МИКРОЭКОЛОГИЧЕСКИХ НАРУШЕНИЙ КИШЕЧНИКА НА ОСНОВЕ РАСЧЕТА ЛОКАЛЬНОГО АНТИОКСИДАНТНОГО ИНДЕКСА

Ростовский НИИ микробиологии и паразитологии, Ростов-на-Дону

Цель. Оценка дисбиотического состояния кишечника на основе определения локального антиоксидантного индекса (ЛАИ). *Материалы и методы.* Обследованы 155 пациентов с бактериологически подтвержденным дисбактериозом кишечника. Контролем служили 20 человек с нормобиоценозом кишечника. Для биохимического исследования использовали разведение фекалий 10^{-2} . Активность каталазы, супероксиддисмутазы и уровень малонового диальдегида оценивали фотометрически по величине оптической плотности образцов. Микробный пейзаж фекалий исследовали бактериологическим методом с параллельным определением в образцах копрофильтратов активности указанных ферментов и содержания малонового диальдегида. Оценку нарушенной микроэкологии кишечника осуществляли биохимическим методом путем расчета локального антиоксидантного индекса в сопоставлении с данными микробных карт. *Результаты.* В копрофильтратах людей с нормобиоценозом кишечника показатель ЛАИ был значительно выше 20. У пациентов с выявленным дисбактериозом кишечника, в зависимости от его степени, регистрировали изменение показателя ЛАИ в диапазоне от отрицательного до 20. У части больных дисбактериоз носил пролонгированный характер, ЛАИ был ниже 14, что отражало наличие персистирующего воспаления. При назначении пробиотического препарата наблюдали тенденцию к нормализации микробной экологии и росту ЛАИ. *Заключение.* Предложен скрининговый критерий, дифференцирующий степень тяжести дисбактериоза кишечника на основе расчета локального антиоксидантного индекса.

Журн. микробиол., 2016, № 2, С. 80—84

Ключевые слова: дисбактериоз кишечника, локальный антиоксидантный индекс

M.N.Gapon, L.N.Ternovskaya

DETECTION OF DEGREE OF MICROECOLOGICAL DISTURBANCE OF INTESTINE BASED ON CALCULATION OF LOCAL ANTIOXIDANT INDEX

Rostov Research Institute of Microbiology and Parasitology, Rostov-on-Don, Russia

Aim. Evaluation of dysbiotic condition of intestine based on determination of local antioxidant index (LAI). *Materials and methods.* 155 patients with bacteriologically confirmed intestine dysbacteriosis were examined. 20 individuals with normobiocenosis of the intestine served as control. Feces dilution 10^{-2} was used for biochemical study. Catalase, superoxide dismutase activity and level of malonic dialdehyde was evaluated photometrically by the value of optical density of the samples. Microbial landscape of feces was studied by a bacteriologic method with parallel determination in samples of coprofiltrates of activity of the indicated enzymes and content of malonic

dialdehyde. Evaluation of disturbances of microecology of the intestine was carried out by a biochemical method by calculating local antioxidant index in juxtaposition with microbial map data. *Results.* LAI parameter was significantly higher than 20 in coprofiltrates of people with intestine normobiocenosis. In patients with detected intestine dysbacteriosis, depending on its degree, LAI parameter changes were registered in the range from negative to 20. Dysbacteriosis in a part of patients had a prolonged character, LAI was lower than 14, that reflected the presence of a persistent inflammation. A tendency of normalization of microbial ecology and growth of LAI was observed during administration of a probiotic preparation. *Conclusion.* A screening criteria is proposed, that differentiates the degree of severity of intestine dysbacteriosis based on calculation of local antioxidant index.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2016, No. 2, P. 80—84

Key words: intestine dysbacteriosis, local antioxidant index

Учитывая глобальное распространение дисбактериоза кишечника (ДК) человека в РФ был разработан ОСТ «Протокол ведения больных. Дисбактериоз кишечника» [7]. Согласно ему дисбактериоз кишечника подразделен на три степени. ДК I степени (латентная, компенсированная форма) характеризуется незначительными изменениями в аэробной части микробиоценоза, которые выражаются уменьшением или увеличением количества кишечной палочки с нормальной ферментативной активностью, изменением удельного веса кокковой флоры и некоторым снижением общего количества анаэробной флоры до нижних значений нормы. Кишечные дисфункции, как правило, не регистрируются. Если такая форма дисбактериоза отмечается после применения пробиотиков, то это свидетельствует об их нормализующем эффекте. ДК II степени (субкомпенсированная форма) сопровождается снижением концентрации основных представителей анаэробной флоры и количественными и качественными изменениями колибактериальной флоры, включая повышение численности условно патогенных микроорганизмов. Эта форма дисбактериоза характеризует пограничное состояние, поэтому обследуемого можно отнести к группе риска. Если указанные изменения микрофлоры выявлены на фоне лечения бактериальными препаратами, то можно думать о начавшемся восстановлении микробиоценоза кишечника. Целесообразно продолжить лечение пробиотическими препаратами до восстановления нормальной флоры даже в случае отсутствия явных клинических проявлений и дисфункций кишечника. ДК III степени характеризуется значительным снижением количества или практически полным отсутствием облигатных анаэробов, резким качественным и количественным изменением кишечной палочки и соотношений в составе аэробной микрофлоры, численным превосходством условно патогенных энтеробактерий, псевдомонад, кандид, стафилококков и их ассоциаций, что, как правило, сопровождается кишечными дисфункциями и деструктивными изменениями кишечной стенки. При таких состояниях необходимым является незамедлительное назначение пробиотиков и других средств для восстановления нормальной микрофлоры.

В настоящее время установлено, что ДК, характеризующийся изменением нормального состава микробиоценоза, является патогенетической основой липидного дистресс-синдрома, сахарного диабета 2 типа, ожирения и атеросклероза [1 — 3]. Диагностика ДК осуществляется, как правило, классическим бактериологическим методом длительным по времени. При этом важное значение имеет раннее выявление дисбактериоза с целью своевременного назначения пробиотической терапии [2]. Показана связь нарушения колонизационной резистентности толстой кишки с существенными изменениями в локальной антиоксидантной системе, приводящей к увеличению содержания в копрофильтратах токсических продуктов перекисного окисления липидов [4]. Известно, что окислительный стресс и нарушение в системе детоксикации лежат в основе всех патологических процессов, сопровождающихся

воспалительной реакцией. Поэтому очень важным является оценка антиоксидантного статуса организма. Для этого чаще всего определяют биохимические показатели в образцах сыворотки крови, мочи или слюны. Однако нами установлено, что для оценки локального антиоксидантного статуса при дисбактериозе кишечника более информативными являются данные, полученные при исследовании копрофильтратов.

Целью нашей работы явилась разработка способа определения тяжести дисбиотического состояния кишечного биотопа на основе расчета локального антиоксидантного индекса путем определения соотношения показателей активности супероксиддисмутазы и каталазы к содержанию малонового диальдегида в копрофильтратах.

Обследованы 155 пациентов с бактериологически подтвержденным дисбактериозом кишечника. Контрольную группу составили 20 добровольцев с относительным нормомикробиоценозом кишечника (в пределах I степени ДК) [7]. Для биохимического исследования использовали супернатанты фекалий пациентов в разведении 10^{-2} . Активность каталазы, супероксиддисмутазы (СОД), а также концентрацию малонового диальдегида (МДА) оценивали фотометрически по величине оптической плотности. Супернатанты фекалий получали путем центрифугирования при 3000 об/мин в течение 30 минут. Активность каталазы в копрофильтратах определяли по методу [5], выражая в мкат/г. Активность СОД определяли по методу [8], выражая данные в у.е./мл. Интенсивность ПОЛ оценивали по уровню вторичного продукта — малонового диальдегида, содержание которого определяли по методу [9], выражая количественное содержание МДА в копрофильтратах в нмоль/мл.

Оценку тяжести дисбиотического состояния биотопа осуществляли на основе расчета локального антиоксидантного индекса путем определения показателей активности ферментов СОД, каталазы и их соотношения с уровнем содержания МДА в образцах биоматериала. Расчет локального антиоксидантного индекса проводили по формуле: $ЛАИ = (\text{акт. СОД} \times \text{акт. каталазы}) : \text{кол-во МДА}$.

Состав полостной микрофлоры кишечника изучали в соответствии с [6]. Выделение и идентификацию чистых культур проводили по морфологическим, тинкториальным, культуральным, биохимическим признакам с помощью энтеро-, стафило-, нефермент- и анаэротестов (Lachema, Чехия). Степень дисбактериоза устанавливали согласно [7].

ЛАИ супернатантов фекалий практически здоровых добровольцев составлял от 20 и выше. При этом у лиц с нормальным показателем ЛАИ в кишечном биоценозе не происходили качественные и количественные изменения в популяции эшерихий, не встречались гемолитические энтерококки и золотистые стафилококки. Анализ микробных карт позволил выявить ДК I, II и III степени у 155 пациентов. Среди которых 7,3 % составляли лица с I степенью дисбактериоза и показателем ЛАИ в диапазоне от 14 до 20. Остальные 92,7 % обследованных имели II и III степень дисбактериоза. Важно отметить, что при изменениях микробного пейзажа соответствующие II субкомпенсированной степени значения ЛАИ могли также достигать 20. Лица с III и со II декомпенсированной степенью ДК имели значения ЛАИ от отрицательного до 14.

Таким образом, биохимические исследования показали, что рассчитываемый ЛАИ характеризуется дифференцирующей способностью в отношении определения тяжести дисбактериоза кишечника, позволяет оценить антиоксидантный статус контролируемого биотопа.

Среди 155 обследованных людей показатель ЛАИ находился в диапазоне от отрицательного до 20 у 97,3%, что свидетельствовало о нарушениях в локальной антиоксидантной защите организма и наличии персистирующего воспаления. При этом, в содержимом толстого кишечника отмечались однотипные изменения нормобиоценоза. Выявлялась условно патогенная микрофлора (УПМ) в ассоциациях на фоне снижения количества одного или нескольких эубионтов (бифидобактерий, лактоба-

цилл, типичных эшерхий). Наблюдалось высокое содержание эшерихий, наличие гемолитических энтерококков, повышенная относительно нормы численность кандид, кластридий. Обнаруживался золотистый стафилококк или высокое количество коагулазоотрицательных стафилококков. Напротив, при величине ЛАИ более 20 состояние локальной антиоксидантной защиты являлось стабильным и риск развития воспалительного процесса отсутствовал. В составе кишечного биоценоза могла присутствовать в незначительном количестве ($<lg4$) транзитная микрофлора (кластридии, лактозонегативные энтеробактерии и эшерихии), а численность одного из зубионтов располагаться на границе нормы. Количество типичных эшерихий находилось в пределах возрастных значений. Отсутствовали гемолитические энтерококки и золотистый стафилококк.

Высокая (от 83,2 до 100%) частота выявления микроорганизмов в количестве, не соответствующем норме, свидетельствует о достоверности показателя ЛАИ.

При исследовании супернатантов фекалий 55 пациентов с дисбактериозом, обусловленным разными причинами, которые наряду со специфическим лечением принимали кисломолочный продукт (КМП) «Наринэ», показатель ЛАИ возрастал, приближаясь к норме.

Больной Б., 20 лет. Дисбактериоз обусловлен приемом антибактериальных препаратов по поводу острого тонзиллита. При первичном исследовании ЛАИ отрицательный, что указывает на существование риска развития персистирующего воспаления. Состояние кишечной микрофлоры соответствовало II степени ДК и характеризовалось низкой численностью бифидобактерий (lg8), умеренно сниженным количеством лактобацилл (lg7), сниженным содержанием типичных эшерихий (lg6) при значительно высокой концентрации УПМ, среди которой присутствовали лактозонегативные энтеробактерии (lg6), золотистый стафилококк (lg4), грибы рода *Candida* (lg5). После трехмесячного приема КМП ЛАИ увеличился до 40,1. Состав микробиоценоза толстой кишки полностью восстановился: нормализовалась численность бифидобактерий, лактобацилл (lg9 и lg8 соответственно) и количество кишечной палочки (lg8), исчезли УПК.

Больная К., 55 лет. Дисбактериоз II степени обусловлен курсом лечебных доз облучения. При первичном обращении ЛАИ был равен 1,9. Состояние кишечной микрофлоры характеризовалось сниженным количеством бифидобактерий (lg8), избыточным содержанием типичных эшерихий (lg9), высокой численностью УПМ: грибов рода *Candida* (lg6), кластридий (lg6). После месячной коррекции дисбактериоза содержание типичных эшерихий осталось повышенным на фоне низкого количества бифидобактерий, исчезли грибы рода *Candida*, но численность кластридий сохранилась высокой. Показатель ЛАИ увеличился до 4,55, что не соответствовало норме и указывало на развитие воспалительного процесса.

Больной Б., 22 года. Дисбактериоз II степени обусловлен наличием инструментально подтвержденного диагноза ДЖВП по гиперкинетическому типу. При первичном исследовании ЛАИ имел нулевое значение — существовала угроза развития персистирующего воспаления. Состояние кишечного микробиоценоза характеризовалось сниженным содержанием бифидобактерий и лактобацилл (lg8 и lg6 соответственно), присутствием атипичных гемолитических эшерихий (lg7), высокой численностью УПМ (*Pseudomonas*, lg8) и грибов рода *Candida* (lg5). Спустя месяц после комплексного лечения ЛАИ увеличился до 14. В составе кишечной микрофлоры произошли значительные изменения: на порядок увеличилась численность бифидобактерий и лактобацилл (lg9 и lg7 соответственно). Исчезли гемолитические эшерихии и УПМ: грибы рода *Candida* и псевдомонады. Однако общее количество кишечной палочки уменьшилось до lg6, что соответствует I степени ДК.

Из выше перечисленного видно, что определение ЛАИ может способствовать не только получению объективной оценки местного антиоксидантного статуса у людей и возможного развития воспалительного процесса, но и характеристике, дифферен-

цирующей состояние кишечного микробиоценоза при использовании корректирующих дисбактериоз средств.

Известно, что изменение состава микробиоценозов открытых полостей организма человека наступают значительно раньше выраженного проявления того или иного патологического процесса и происходит на фоне иммунодефицитного состояния. Как показали проведенные исследования, определение ЛАИ супернатантов фекалий достаточно информативно для оценки местного антиоксидантного статуса, свидетельствующего о степени повреждения локальной неспецифической защиты организма при дисбиотических нарушениях. Таким образом, показатель локальной антиоксидантной защиты организма может быть использован в качестве скринингового теста, свидетельствующего о выраженности воспалительного процесса при дисбактериозе кишечника. Предлагаемый способ широко доступен для медицинской практики. Определение ЛАИ может способствовать не только получению объективной оценки степени повреждения кишечника условно патогенной микрофлорой, но и оценить клинический эффект пробиотической коррекции. Преимущество предлагаемого метода заключается в простоте забора материала, доступности химических реактивов, экономичности и информативности, позволяющей в короткие сроки (1 — 2 дня) получить сведения о состоянии локальной антиоксидантной защиты организма, отражающей изменения колонизационной резистентности.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бондаренко В.М. Роль условно-патогенных бактерий при хронических воспалительных процессах различной локализации. Тверь, Триада, 2011.
2. Бондаренко В.М., Мацулевич Т.В. Дисбактериоз кишечника как клиничко-лабораторный синдром: современное состояние проблемы. М., ГЭОТАР-медиа, 2007.
3. Гапон М.Н., Терновская Л.Н. Показатели местной неспецифической резистентности при дисбактериозе толстой кишки. Журн. микробиол. 2010, 5: 53-57.
4. Журавлева Т.Д. и др. Возрастные особенности свободно-радикального окисления липидов и антиоксидантной защиты в эритроцитах здоровых людей. Клин. лаб. дагн. 2002, 8: 17.
5. Королюк М.А., Иванова Л.И. Метод определения активности каталазы. Лаб. дело. 1988, 1: 16-19.
6. Микробиологическая диагностика дисбактериоза кишечника. Методические рекомендации. М., 2007.
7. Отраслевой стандарт «Протокол ведения больных. Дисбактериоз кишечника». ОСТ 91500.11.0004-2003. Приказ МЗ РФ № 231 от 09.06.03.
8. Сирота Т.В. Новый подход в исследовании процесса аутоокисления адреналина и использования его для измерения активности супероксиддисмутазы. Вопр. мед. химии. 1999, 3: 14-15.
9. Стальная И.Д., Гаришвили Т.Г. Метод определения малонового диальдегида с помощью тиобарбитуровой кислоты. Современные методы в биохимии. М., Медицина, 1977.

Поступила 20.10.15

Контактная информация: Гапон Марина Николаевна, к.б.н.,
344000, Ростов-на-Дону, Газетный пер., 119, р.т. (863)234-91-83

ВОЗМОЖНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ MALDI-TOF МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ УГЛЕВОД-СПЕЦИФИЧЕСКИХ РЕЦЕПТОРОВ ДИАГНОСТИЧЕСКОГО БАКТЕРИОФАГА ЭЛЬТОР

¹Ростовский государственный медицинский университет, Ростов-на-Дону; ²Ростовский-на-Дону противочумный институт

Цель. Изучение механизмов взаимодействия диагностического бактериофага эльтор с чувствительным к нему штаммом *Vibrio cholerae* El Tor 18507 с помощью прямого белкового профилирования, идентификация константных и переменных белков, участвующих во взаимодействии фага и клетки, а также углеводов-специфических рецепторов фага. *Материалы и методы.* Использовали коммерческий препарат холерного диагностического бактериофага эльтор, штамм *V.cholerae* El Tor 18507. Влияние углеводов на активность бактериофага определяли путем постановки пробы с фагом классическим и модифицированным нами методом. Белковые профили исследуемых объектов изучали с помощью метода MSP-анализа. *Результаты.* Показано, что сахароза ингибирует литическую активность бактериофага. Были изучены протеомные профили бактериофага эльтор и чувствительного индикаторного штамма, проведена идентификация константных и переменных белков исследуемых объектов посредством программы MSP Peak-List. *Заключение.* Анализ изменения профилей фага и микробной клетки при взаимодействии с сахарозой дал основание предположить, что сахароза в смеси культура — фаг вступает во взаимодействие именно с белковыми рецепторами фага, блокируя специфические к холерному вибриону рецепторы, что в дальнейшем проявляется в резком снижении активности фага по отношению к чувствительному штамму.

Журн. микробиол., 2016, № 2, С. 85—90

Ключевые слова: MALDI масс-спектрометрическое профилирование, протеомный профиль, Виотyper, MSP Peak-List, *Vibrio cholerae* El Tor, бактериофаг диагностический холерный эльтор

N.R.Telesmanich¹, E.V.Goncharenko², S.O.Chaika², I.A.Chaika², V.O.Telicheva²

POSSIBILITIES OF APPLICATION OF MALDI-TOF MASS-SPECTROMETRY FOR STUDY OF CARBOHYDRATE-SPECIFIC RECEPTORS FOR DIAGNOSTIC BACTERIOPHAGE EL TOR

¹Rostov State Medical University, Rostov-on-Don; ²Rostov-on-Don Institute for Plague Control, Russia

Aim. Study mechanisms of interaction of diagnostic bacteriophage El Tor with sensitive strain *Vibrio cholerae* El Tor 18507 using direct protein profiling, identification of constant and variable proteins, taking part in interaction of the phage and cell, as well as carbohydrate-specific phage receptors. *Materials and methods.* A commercial preparation of cholera diagnostic bacteriophage El Tor, strain *V.cholerae* El Tor 18507 were used. Effect of carbohydrates on bacteriophage activity was determined in experiments with phage by a classic and modified by us method. Protein profiles of the studied objects were studied using MSP-analysis method. *Results.* Sucrose was shown to inhibit lytic activity of bacteriophage. Proteome profiles of El Tor bacteriophage and sensitive indicator strains were studied, identification of constant and variable proteins of the studied objects by MSP Peak-list program was carried out. *Conclusion.* Analysis of changes of profiles of phage and microbial cell during interaction with sucrose gave a basis for assuming, that sucrose in the mixture of culture-phage enters interaction namely with phage protein receptors, blocking receptors specific for cholera vibrio, that subsequently manifests in a sharp decrease of phage activity against the sensitive strain.