

Ф.С. Флуер, В.Я. Прохоров, Н.С. Бродинова, О.Г. Логинова

МОНИТОРИНГ ЭНТЕРОТОКСИГЕННОСТИ *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* ПРИ ДИАГНОСТИКЕ ДИСБАКТЕРИОЗОВ КИШЕЧНИКА У ДЕТЕЙ

ГУ НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи РАМН, Москва

Исследована частота встречаемости энтеротоксигенных штаммов стафилококков у 58 детей в возрасте от 3 нед до 7 лет, выделенных при дисбактериозе кишечника иммуноферментным методом и реакцией непрямой гемагглютинации. Установлено, что продуцентами SEA были 39,6% штаммов; SEC продуцировали 22,4% штаммов; SEA+SEC – 10,3% штаммов. Установлено, что количество энтеротоксигенных штаммов *S. aureus* у детей при дисбактериозе кишечника зависит от возраста: чем меньше возраст ребенка, тем чаще выделяются энтеротоксигенные штаммы, продуцирующие SEA и SEC. Обнаружено, что у 32,7% детей, обследованных при дисбактериозе кишечника, было сниженное содержание *Lactobacillus* (ниже 10^4 КОЕ/г). Полученные данные указывают на целесообразность определения энтеротоксигенности *S. aureus*, выделенных при дисбактериозах кишечника у детей, для оценки степени их опасности и принятия адекватных способов их элиминации.

Authors investigated frequency of enterotoxigenous *Staphylococcus* strains isolated from intestinal microflora of 58 children aged 3 weeks–7 years with intestinal dysbiosis with usage of immunoassay method and reaction of indirect hemoagglutination. The study showed that 39% of strains produced staphylococcal enterotoxin (SE) A (SEA); 22,4% of strains produced SEC and 10,3% of strains produced SEA+SEC. Authors showed that number of enterotoxigenous strains in children with intestinal dysbiosis depended on patient's age: the smaller patients age – the more number of enterotoxigenous strains produced SEA and SEC. The study showed 32,7% of children examined because of intestinal dysbiosis had low number of *Lactobacillus* ($<10^4$ CFU/g). These data proves expediency of enterotoxigenous *Staphylococcus* strains determination in cases of pediatric intestinal dysbiosis for determination of danger level and for search of adequate measures of their elimination.

Диагностика и коррекция дисбактериозов кишечника у детей является важной проблемой педиатрии. Среди путей ее решения актуальным является выявление факторов, способствующих колонизации кишечника условно-патогенными микроорганизмами (УПМ), поддерживающих

дисбаланс нормальной микрофлоры. В последние годы серьезное внимание в этом аспекте уделяется токсигенным бактериям и в первую очередь *S. aureus*, поскольку вырабатываемые ими стафилококковые энтеротоксины (СЭ), а также токсин токсического шока (TSST-1), являясь суперанти-

генными белками, играют важную роль в установлении и персистенции инфекций [1]. СЭ обычно продуцируют инвазивные метициллин-устойчивые штаммы (MRSA), ответственные за воспалительные поражения кишечника. Способностью вырабатывать СЭ обладают также коагулазоположительные штаммы *S. intermedius*, *S. hyicus* и коагулазоотрицательные штаммы *S. epidermidis*, *S. cohnii*, *S. xylosum*, *S. haemolyticus* [2]. Сегодня известно 17 иммунологически различных типов СЭ – от А до R [1], из которых наиболее важное значение для практики имеют 5 (SEA, SEB, SEC, SED, SEE). Указанные СЭ обуславливают 95% всех пищевых стафилококкозов. Кроме того, СЭ могут вносить вклад в развитие различных видов заболеваний с внекишечной локализацией, таких как раневая инфекция, артриты, атопический дерматит (АтД), аллергические риниты, а TSST-1 может быть причиной угрожающего жизни синдрома токсического шока и внезапной младенческой смертности у детей [3, 4]. В работах [5] показано, что при дисбактериозе кишечника у детей преобладали штаммы стафилококков, продуцирующие SEA (40,3%), SEB (20,9%), а у взрослых SEA встречался в 31,8% случаев [6]. Недостаточно изучен вклад представителей энтеротоксигенных стафилококков, продуцирующих другие типы СЭ, например SEC при дисбактериозе кишечника.

Цель данной работы – определение частоты встречаемости энтеротоксигенных штаммов стафилококков у детей с дисбактериозом кишечника.

Материалы и методы исследования

Проводили оценку энтеротоксигенности культур *S. aureus*, выделенных из фекалий у 58 детей (возраст от 3 нед до 7 лет) при исследовании микробиоценоза кишечника.

Видовую идентификацию изолятов проводили по общепринятой методике. Все исследованные культуры стафилококков образовывали лецитиназу и коагулазу, а также ферментировали лактозу. Выращивание культур стафилококков проводили на жидкой питательной среде Casman E.P. (1958) в нашей модификации с использованием ферментативного гидролизата казеина [7] в больших пробирках объемом 40–50 мл, в которые наливали по 8 мл питательной среды. Культивирование проводили на шуттель-аппарате при непрерывном встряхивании при 210 об/мин в течение 24 ч при 370 °С. После окончания культивирования удаление микробных клеток проводили центрифугированием при 10 тыс об/мин в течение 15 мин. Определение СЭ в надосадочной жидкости осуществляли методом иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием иммуноферментной тест-системы для индикации SEC [8], определение SEA проводили реакцией непрямой гемагглютинации с использованием эритроцитарных диагностикумов [5]. Состояние микробиоценоза толстой кишки оценивали по результатам посева фекалий, разведенных фосфатногликолевым буфером, на дифференциально-диагностические и селективные среды.

Результаты и их обсуждение

При исследовании микрофлоры у 58 детей при дисбактериозе кишечника установлено, что у 19 детей (32,7%) содержание *Lactobacillus* было ниже 10^4 КОЕ/г, содержание *Lactobacillus* 10^6 – 10^7 КОЕ/г было только у 29 детей (50%).

Количество микробных клеток *S. aureus* в фекальном содержимом детей варьировало от 10^4 КОЕ/г до 10^6 КОЕ/г. Содержание стафилококков 10^5 КОЕ/г было у 23 (39,6%) детей, у 31 (53,4%) – 10^6 КОЕ/г (см. таблицу). Отмечено, что корреляция между количеством стафилококков (КОЕ/г) в фекальных массах и способностью штаммов стафи-

Таблица

Частота встречаемости энтеротоксигенных штаммов *S. aureus* в фекалиях при дисбактериозах кишечника у обследованных детей

Содержание <i>S. aureus</i> , КОЕ/г фекалий	Количество штаммов	Количество штаммов, образующих SEA	Количество штаммов, образующих SEC	Количество штаммов, образующих SEA и SEC
Дети от 3 нед до 12 мес				
<i>S. aureus</i> 10^4	3	1	1	1
<i>S. aureus</i> 10^5	17	12	6	3
<i>S. aureus</i> 10^6	21	6	4	2
Всего штаммов	41	19 (46,3%)	11 (26,8%)	6 (10,3%)
Дети от 1 года до 7 лет				
<i>S. aureus</i> 10^4	1	0	0	0
<i>S. aureus</i> 10^5	6	2	1	0
<i>S. aureus</i> 10^6	10	2	1	0
Всего штаммов	17	4 (23,5%)	2 (11,7%)	0 (0%)
Итого штаммов	58	23 (39,6%)	13 (22,4%)	6 (10,3%)

лококков продуцировать СЭ отсутствовала. Было выявлено, что частота встречаемости штаммов *S. aureus*, продуцирующих SEA и SEC, в фекальных массах имела обратную корреляцию с возрастом детей, а именно частота обнаружения энтеротоксигенных штаммов стафилококков, продуцирующих SEA и SEC увеличивалась с уменьшением возраста детей. Согласно ранее полученным данным, такая же корреляция была выявлена в отношении продукции SEA и SEB при дисбактериозе кишечника у детей [5]. Больше всего энтеротоксигенных штаммов *S. aureus* нами обнаружено у детей в возрасте от 3 нед до 1 года. При исследовании продукции SEA и SEC штаммов стафилококков 58 детей методом ИФА было выявлено, что SEA продуцируют 23 (39,6%) штамма; SEC продуцируют 13 штаммов (22,4%). Было показано, что 6 штаммов (10,3%) стафилококков одновременно продуцировали два энтеротоксина (SEA и SEC) и все изоляты были выделены из фекалий детей до 1 года. Из 17 изолятов стафилококков, выделенных из фекалий детей от 1 года до 7 лет, штаммов, продуцирующих SEA и SEC, нами обнаружено не было.

Бактериальные энтеротоксины – одна из основных причин возникновения острых диарейных заболеваний, основным доказательством чего является их непосредственное обнаружение в контаминированной пище или фекальном содержимом или у выделенных штаммов стафилококков. Согласно литературным и полученным нами в ходе данной работы данным, частота встречаемости штаммов *S. aureus*, продуцирующих SEA (39,6%) и SEC (22,4%), выделяемых при дисбактериозе кишечника в детском возрасте, является высокой, что косвенно указывает на их возможную роль в патогенезе и данного состояния, что может быть обусловлено несколькими факторами: 1) непосредственное повреждающее воздействие *S. aureus*, особенно способных к продукции СЭ, на мукозальный барьер слизистой оболочки кишечника и создание условий, способствующих развитию и поддержанию дисбаланса микрофлоры в кишечном тракте, колонизации кишечника условно-патогенными микроорганизмами; 2) иммунопатогенные свойства энтеротоксинов; 3) суперантигенные свойства энтеротоксинов.

Патогенез развития дисбактериоза в детском возрасте в настоящее время изучен недостаточно полно. Отмечено, что большую роль в формировании микрофлоры ребенка (в том числе и условно-патогенной) играет микрофлора матери, а также характер вскармливания. В кишечнике существует особая форма иммунной защиты организма, представленной мукозальным барьером поверхности слизистой оболочки кишечника, одним из основных защитных факторов которой является IgA. Известно, что иммунологический барьер сохраняется за счет нормального функционирования мукозальной иммунной системы, представляю-

щей важный элемент в общей иммунологической компетенции хозяина. У маленьких детей продуцирование IgA находится в прямой зависимости от кишечной антигенной стимуляции. Снижение антигенной стимуляции, возможно, связанное с уменьшением содержания *Lactobacillus* и временной более высокой кишечной проницаемостью у детей по сравнению со взрослыми, приводит к снижению продуцирования IgA и в результате создает условия для адгезии энтеротоксигенных штаммов стафилококков и другой патогенной флоры. Колонизация энтеротоксигенными штаммами стафилококков может произойти при употреблении содержащимися в молочных продуктах (материнском молоке) *S. aureus*, но возможна и при употреблении других пищевых продуктов. Надо отметить, что колонизация штаммами стафилококков обусловлена не только возрастной неполноценностью мукозальной иммунной системы, но и неспособностью выработки необходимого количества IgA. В настоящий момент не известно, что является первичной причиной столь значительно снижения *Lactobacillus* у детей (в нашей работе у 32,7% детей содержание *Lactobacillus* было ниже 10^4 КОЕ/г), при этом не исключено и отрицательное влияние на концентрацию *Lactobacillus* содержания большого количества стафилококков. Необходимо отметить, что в 100% случаев дисбиотических изменений у детей выявляется снижение иммунитета. Патологические изменения в иммунной системе у детей во многом могут быть связаны с отрицательным влиянием СЭ, в том числе наличием у них суперантигенных свойств. Так, СЭ, как суперантигены, играют важную роль в развитии и поддержании инфекционного процесса, аллергических реакций. СЭ являются мощными активаторами Т-клеток, они могут вызвать изменение до 30% Т-лимфоцитов [9] при концентрации 10^{-13} – 10^{-16} моль/мл и способны стимулировать быстрое увеличение лимфоцитов и производство избыточных количеств цитокинов (IL1, IL2, IL4, IL6, IL10, IL12) и факторов некроза опухоли (TNF α , TNF γ). СЭ могут вызывать митогенную активацию иммунных клеток. Однако показано, что СЭ могут вызывать и апоптоз клеток иммунной системы, что приводит к анергии и иммуносупрессии и выражается в изменении реактивности аутоиммунитета [1]. СЭ обладают способностью увеличивать токсичность эндотоксинов в 100 тыс раз [1]. Показана отрицательная роль СЭ в патогенезе atopических заболеваний (например, АД, часто сопутствующего дисбиотическим изменениям в желудочно-кишечном тракте у детей), связанная с их воздействием на интерферонаобразующую функцию лейкоцитов. СЭ приводят к угнетению синтеза интерферона γ , играющего существенную роль в подавлении синтеза IgE, и таким образом способствуют гиперпродукции IgE, а также напрямую стимулируют выброс гистамина тучными клетками.

В проведенной нами работе штаммы стафилококков, продуцировавшие SEC, давали положительную реакцию в ИФА при разведении культуральной жидкости 1:50, что соответствовало содержанию СЭ от несколько нг/мл до 5–10 мкг/мл. Данное количество СЭ может существенно влиять на иммунную систему детей, даже если синтез SEC *in vivo* будет в 100 раз меньше, чем выявлено *in vitro*, так как известно, что СЭ в дозе 0,1 мкг обладают способностью вызывать рвоту, в концентрации от 1 пкг до 1 мкг СЭ проявляют суперантигенные свойства [9], а для развития синдрома токсического шока достаточно 3–5 μ г суперантигенного токсина.

Особую опасность представляют штаммы *S. aureus*, продуцирующие одновременно два и более типов СЭ, а также штаммы, продуцирующие одновременно СЭ и TSST-1, так как известно, что СЭ способны значительно усиливать влияние других токсинов, в том числе и других типов СЭ (необходимо отметить показанный ранее патогенетический вклад СЭ в развитии эндокардитов, пневмонии, сепсиса [9]). Также значительную опасность представляет попадание TSST-1 в организм человека. TSST-1 способен вызывать шок, часто обнаруживается в биопсиях тканей при артритах, при аутопсиях в ткани почек детей, погибших от синдрома внезапной младенческой смертности. В нашей работе 10,3% исследованных штаммов продуцировали одновременно два энтеротоксина – SEA и SEC. Из литературных данных [1] известно, что одновременное продуцирование TSST-1 и SEC наблюдается у 15% штаммов стафилококков, у 75% штаммов наблюдается продуцирование одновременно TSST-1 и SEA. Установлено, что большинство MRSA штаммов стафилококков в США продуцируют SEC и SEB в очень высоких концентрациях [10], тогда как в Японии большинство MRSA штаммов стафилококков одновременно продуцируют значительные количества SEC и TSST-1.

Таким образом, не вызывает сомнений необходимость определения СЭ у штаммов *S. aureus* у детей при дисбактериозе кишечника. Эти данные поддерживаются также невозможностью в настоящее время получения анатоксина к СЭ, в связи с чем основное внимание должно быть обращено на профилактические меры по попаданию в организм человека энтеротоксигенных штаммов стафилококков и СЭ. А именно для профилактики дисбиотических изменений у детей в раннем возрасте может быть рекомендовано исследование микрофлоры беременных женщин еще до рождения ребенка и в случае необходимости проведение санации с целью элиминации энтеротоксигенных штаммов условно-патогенных бактерий [7]. Для коррекции микрофлоры кишечника у более взрослых детей и в зрелом возрасте можно рекомендовать использование кисломолочных продуктов со свекловичным пектином, который способствует элиминации из кишечника энтеротоксигенных штаммов

стафилококков [11]. Для этой цели также могут быть использованы пищевые волокна (пектины, лигнины, целлюлоза, гемицеллюлоза), обладающие способностью снижать уровень эндогенного гистамина и других биологических аминов, которые реализуют аллергические проявления при болезнях пищеварительной системы. Для коррекции микрофлоры кишечника детей рекомендовано использование различных пробиотических и пребиотических препаратов, так как они стимулируют неспецифическую резистентность хозяина к микробным патогенам и посредством этого содействуют их иммунной элиминации. Показано, что при употреблении пробиотиков у людей увеличивается количество циркулирующих лимфоцитов, возрастает как пролиферация лимфоцитов, так и специфический антителый ответ и секреция цитокинов, а также происходит стимулирование фагоцитоза [12]. Известно, что некоторые пробиотики могут модифицировать токсины и их рецепторы. В качестве пробиотиков используют *Lactobacillus*, обладающие способностью ингибировать адгезию как грамположительных, так и грамотрицательных микроорганизмов, в том числе и стафилококков [13]. Для коррекции микрофлоры у детей рекомендовано использование аутоштаммов *Bifidobacterium* и *Lactobacillus* в связи с их большей эффективностью по сравнению с коммерческими бактериальными препаратами, характеризующимися слабой приживаемостью в кишечнике больного.

Заключение

Таким образом, в связи с тем, что роль СЭ при дисбактериозах кишечника у детей в настоящее время изучена слабо, исследование частоты встречаемости энтеротоксигенных штаммов стафилококков, продуцирующих СЭ, является актуальным. Мониторинг энтеротоксигенности штаммов *S. aureus* у 58 детей в возрасте от 3 нед до 7 лет, выделенных при дисбактериозе кишечника иммуноферментным методом, показал, что 39,6% штаммов продуцировали SEA; 22,4% штаммов продуцировали SEC; 10,3% штаммов – SEA+SEC. Установлено, что частота встречаемости энтеротоксигенных штаммов стафилококков у детей зависит от возраста: чем меньше возраст ребенка, тем чаще выделялись энтеротоксигенные штаммы. Обнаружено, что у 32,7% обследованных детей содержание *Lactobacillus* было снижено более 10^4 КОЕ/г. Показана необходимость определения энтеротоксигенности штаммов *S. aureus* при диагностике дисбактериозов кишечника у детей для проведения научно-обоснованной коррекции дисбактериоза и предотвращения возникновения широкого круга аллергических заболеваний, опасности токсического шока, эндокардитов, артритов, пневмонии, сепсиса и других заболеваний, вызываемых стафилококками, в поддержании которых энтеротоксины участвуют как факторы патогенности.

ЛИТЕРАТУРА

1. Dinges MM, Orwin PM, Schlievert PM. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. Clin. Microbiol. Rev. 2000; 13: 16–34.
2. Bautista L, Gaya H, Medina M, Nunez MA. Quantitative study of enterotoxin production by sheep milk *staphylococci*. Appl. Environ. Microbiol. 1988; 54: 566–569.
3. Newbould MJ, Malam J, McClurary JM et al. Immunological localization of staphylococcal toxic syndrome (TSST-1) antigen in sudden infant death syndrome. J. Clin. Patol. 1989; 42: 935–939.
4. Hogeveck H, Soderquist B, Tung HS et al. Virulence factors of *Staphylococcus aureus* strains causing infective endocarditis comparison with strains from skin infections. Ampis. 1998; 106 (9): 901–908.
5. Флуер Ф.С., Бродина Н.С., Прохоров В.Я. и др. Частота встречаемости энтеротоксигенных *Staphylococcus aureus* при дисбактериозе кишечника у детей. Ж. микробиол., 2006; 6: 3–6.
6. Шевелева С.А., Куваева И.Б., Флуер Ф.С., Кузнецова Г.Г. Энтеротоксинообразование представителей условно-патогенной микрофлоры кишечника как диагностический тест при дисбактериозах кишечника. Вопр. питания. 2002; 3: 23–27.
7. Флуер Ф.С., Шевелева А.Ф., Текутьев С.И. Распространение энтеротоксигенных штаммов *Staphylococcus aureus*, выделенных при патологии беременных женщин. Ж. микробиол., 2000; 6: 13–15.
8. Флуер Ф.С., Прохоров В.Я., Веснина А.Ф., Акатов А.К. Иммуноферментная тест-система для определения стафилококковых энтеротоксинов типа С. Ж. микробиол., 2002; 6: 65–68.
9. Yokomizo Y, Mori Y, Shimoji Y et al. Proliferative response and cytokine production of bovine peripheral blood mononuclear cells induced by the superantigens staphylococcal enterotoxins and toxic shock syndrome toxin-1. Vet. Med. Sci. 1995; 57(2): 299–305.
10. Schlievert PM. Use of intravenous immunoglobulin in the treatment of staphylococcal and streptococcal toxic shock syndromes and related illnesses. J. Allergy Clin. Immunol. 2001; 108: 107–110.
11. Флуер Ф.С., Кузнецова Г.Г., Батищева С.Ю. и др. Влияние нового пищевого продукта, обогащенного пектином, на свойства потенциально патогенных представителей микрофлоры кишечника человека. Вопр. питания 2006; 75(4): 46–49.
12. Aattour N, Bouras M, Tome D et al. Oral ingestion of lactic-acid bacteria by rat increases lymphocyte proliferation and interferon-gamma production. B. J. Nutr. 2002; 87: 367–373.
13. Silva M, Jacobus NV, Deneke C et al. Antimicrobial substance from a human *Lactobacillus* strain. Antimicrob. Agents Chemother. 1987; 31: 1231–1233.

РЕФЕРАТЫ

ИЗМЕНЕНИЯ ЗОНАЛЬНОЙ И ВОЛЮМЕТРИЧЕСКОЙ МИНЕРАЛЬНОЙ ПЛОТНОСТИ КОСТЕЙ У ДЕТЕЙ ПОСЛЕ ТРАНСПЛАНТАЦИИ ПОЧКИ: ОПЫТ ПРОДОЛЬНОГО ИССЛЕДОВАНИЯ

Воздействие трансплантации почки на зональную минеральную плотность костей (зМПК) у детей неоднократно исследовалось ранее. Однако в большинстве ранее проведенных исследований не проводили определения волюметрической минеральной плотности костей (вМПК) и не анализировали данные исследования пациента в динамике. Кроме того, недавно были опубликованы обновленные нормативы зМПК у детей. Данное ретроспективное исследование описывает изменение в динамике показателей зМПК и вМПК после трансплантации почки у 40 детей. Зональная минеральная плотность поясничных позвонков определялась методом двойной рентгеновской абсорбциометрии перед трансплантацией почки и в течение года после трансплантации. Показатели волюметрической плотности и z-шкалы определяли по методу, описанному неоднократно в большинстве опубликованных работ. В течение года после трансплантации наблюдалось достоверное снижение средних показателей зМПК и z-шкал вМПК, и эти показатели не восстановились за время наблюдения. Отрицательное воздей-

ствие трансплантации на вМПК сглаживалось и z-шкалы вМПК были сравнимы с зМПК. Анализ по модели линейных смешанных эффектов показал, что зМПК поясничных позвонков и их z-шкалы вМПК имели обратную зависимость от полученной за год дозы преднизона, но его воздействие уменьшалось, если повышалась скорость клубочковой фильтрации. В данной когорте больных детей трансплантация почек отрицательно влияла на минеральную плотность костей. Как нам представляется, оценка вМПК подходит для интерпретации изменений МПК у детей после трансплантации почки. Обратная зависимость между z-шкалами МПК и полученной за год дозой преднизона позволяет сделать вывод, что негативное воздействие трансплантации почек на МПК в данной когорте было следствием непрерывной кортикостероидной терапии после трансплантации.

Hamiwka LA, Hanna M, Midgley JP, Wade AW, Grisaru S. *Transplant Proc.* 2008; 40(5): 1404–1406.