

## КАМПИЛОБАКТЕРИИ В СТУЛЕ БОЛЬНЫХ С СИНДРОМОМ РАЗДРАЖЕННОГО КИШЕЧНИКА

Бурляева Е. А.<sup>1</sup>, Булахов А. В.<sup>2</sup>, Пилипенко В. И.<sup>1</sup>, Исаков В. А.<sup>1</sup>, Шевелева С. А.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Отделение гастроэнтерологии и гепатологии, НИИ питания РАМН

<sup>2</sup> Лаборатория санитарно-пищевой микробиологии и микрoэкологии, НИИ питания РАМН

Булахов Антон Валерьевич  
 109240, Москва, Устьинский проезд, д. 2/14  
 Тел.: 8 (495) 698 5383  
 E-mail: bulakhov@list.ru

### РЕЗЮМЕ

**Цель.** Согласно недавним исследованиям распространенность СРК среди пациентов, перенесших острые кишечные инфекции (ОКИ), достигает 30%, причем в 25% случаев в результате перенесенного кампилобактериоза. Мы изучили распространенность *Campylobacter* в экскрементах российских пациентов IBS. Мы оценили встречаемость кампилобактерий в кале у пациентов с СРК в России.

**Методы.** Проведены исследования образцов кала, полученных от 39 больных с различными формами СРК. Выявление кампилобактерий выполнялось тремя методами: путём классического культурального посева в селективные среды, посредством метода ПЦР в реальном времени с видоспецифичными для ДНК *C. jejuni* праймерами и методом ИФА.

**Результаты.** Только 7 пациентов из 39 сообщили о перенесенной ОКИ в прошлом. Присутствие *C. jejuni* в стуле было зафиксировано у 2 (5%) больных: у первого пациента — всеми тремя методами, у второго — только методом ПЦР. Кроме того, первый пациент указывал на перенесенную около 30 лет назад ОКИ. Через 2 недели кампилобактерии были обнаружены только у первого пациента, у второго — тесты были отрицательные.

**Выводы.** Таким образом, в нашем исследовании кампилобактерии в стуле были обнаружены у 5% больных СРК. Полученные нами результаты говорят о необходимости дальнейшего исследования микрофлоры кишки при СРК с привлечением надежных микробиологических и молекулярных методик для раскрытия роли бактерий в этиопатогенезе заболевания, верификации диагноза и, соответственно, обоснования терапевтических подходов.

**Ключевые слова:** кампилобактериоз; СРК, микроаэробная микрофлора; ПЦР-определение; определение методом бактериального посева.

### SUMMARY

**Aims.** According to recent studies prevalence of IBS among patients suffered from of acute enteric infection (AEI) reaches 30%, and 25% of them were accounted to *Campylobacter infection*. We studied the prevalence of *Campylobacter* in a feces of Russian IBS patients.

**Methods.** Fecal samples received from 39 patients with different types of IBS were studied. *Campylobacter* were detected by three different methods: culture, real time PCR with the *C. jejuni*-specific primers and ELISA.

**Results.** Only 7 patients from 39 reported about AEI in the past. *C. jejuni* in a stool was found in 2 (5%) patients: in the first patient by all three methods and in second one by PCR only. The first patient noted that she suffered from AEI 30 years ago. After two weeks confirmatory testing was positive only in the first patients, in the second one the tests were negative.

**Conclusions.** *C. jejuni* in a stool was detected in 5% of patients with IBS. Further studies of a microbiota of an intestine in IBS patients using the combination of reliable microbiological and molecular techniques are badly needed.

**Keywords:** campylobacteriosis; IBS, microaerobic microflora; PCR-detection; detection by culture.

## ВВЕДЕНИЕ

Синдром раздраженного кишечника (СРК) — наиболее распространенное функциональное заболевание ЖКТ. Несмотря на прогресс последних лет в изучении проблемы, этиология СРК остается нераскрытой. Среди возможных причин СРК рассматриваются такие факторы, как нарушения моторной функции ЖКТ, феномен висцеральной гиперчувствительности, влияние хронического стресса и длительных нарушений питания, наличие в кишечной стенке воспалительных изменений минимальной степени выраженности, а также последствия перенесенной острой кишечной инфекции (ОКИ) [3]. Такая форма болезни, как постинфекционный СРК, патогенетически наиболее зависимый от взаимодействия патогенных с кишечной экосистемой, в последние годы привлекает все большее внимание специалистов. По некоторым данным, среди осложнений ОКИ распространенность СРК достигает 30%, а наибольший риск его развития имеет место после перенесенного кампилобактериоза [13].

Известно, что 90% ОКИ кампилобактериозной природы обуславливается *Campylobacter jejuni* & *coli*, грамотрицательными микроаэрофильными термофильными бактериями, которые являются представителями микрофлоры ЖКТ у множества животных и птиц и характеризуются значительной фенотипической и генотипической изменчивостью [7; 16]. У человека колонизация *Campylobacter spp.* приводит к возникновению симптомов, варьирующих от неоформленного стула до тяжелой кровавой диареи, хотя и непродолжительной по времени (менее недели). Однако до 20% больных вскоре после ремиссии переносит рецидив заболевания, что указывает на наличие неполного иммунного ответа. Возможно, это связано с феноменом «иммунного уклонения» *C. jejuni*, обусловленного изменчивостью иммуногенного белка флагеллина, который кодируется двумя генами, способными к рекомбинации [16]. Установлено, что *C. jejuni* индуцирует продукцию колоноцитами провоспалительных цитокинов IL-8 и простагландина E2 [7]. В связи с неполной элиминацией сохраняющиеся колонии *C. jejuni* могут поддерживать активность иммунных механизмов и инфильтрацию воспалительными клетками кишечной стенки, что прямо воздействует на компоненты кишечной нервной системы, нарушая локальные моторные рефлексы и снижая порог болевой чувствительности.

Целью данного исследования была оценка встречаемости кампилобактерий в кале у людей с установленным диагнозом СРК.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Материал исследования составили образцы кала, полученные от 39 больных, госпитализированных в отделение гастроэнтерологии и гепатологии НИИ питания РАМН с жалобами, соответствовавшими

Римским критериям СРК III пересмотра [8]. Для исключения органической патологии больным при поступлении проводилась колоноскопия или ирригоскопия. В анамнезе отобранных пациентов отсутствовали указания на применение антибиотиков и пробиотиков в течение предшествующих исследованию 2 месяцев.

Соотношение мужчин и женщин составило 5: 34. Среди больных преобладали лица среднего возраста, возрастная медиана составила 46,3 (18–70) года. Продолжительность заболевания варьировалась от 3 месяцев до 50 лет при медиане продолжительности заболевания 6 лет. Из пациентов, участвовавших в исследовании, у 23 человек клинические проявления отвечали критериям СРК с запорами (СРКз), у 16 — СРК с диареей (СРКд).

Все больные подвергались опросу для получения информации о перенесенных ОКИ на протяжении и до начала настоящего заболевания.

В связи с тем что кампилобактерии являются труднокультивируемыми микроорганизмами, анализ кала для их выявления выполнялся тремя методами: путем классического культурального посева в селективные среды, посредством полимеразной цепной реакции (ПЦР-РТ) ДНК с видоспецифичными праймерами для ДНК *C. jejuni* и ИФА.

Образцы кала от больных помещали в контейнеры с регенерированной транспортной средой Керри — Блэр (*HiMedia*, Индия) для сохранения жизнеспособности кампилобактерий и доставляли в лабораторию в сумке-холодильнике. Образцы кала в количестве 0,1–0,5 г по массе засеивали в 10 мл селективного бульона Престона (*HiMedia*, Индия) с 7% бараньей крови (селективная добавка Престона IV, модифицированная с полимиксином В сульфатом, рифампицином, триметопримом лактатом, амфотерицином В (*HiMedia*, Индия)) и термостатировали 24–48 часов при температуре 42 °С в микроаэробных условиях. После этого производили пересев на поверхность агара Престона, также содержащего селективные добавки, с последующей инкубацией в течение 24–48 часов при тех же условиях. Выросшие колонии учитывали, при этом наряду с подозрительными на принадлежность к кампилобактериям микробами изучали все остальные типы колоний, принимая во внимание тот факт, что способность преодолевать жесткие условия культивирования (наличие антибиотиков, микроаэробная атмосфера) у бактерий кишечной группы зачастую связана с наличием факторов патогенности и может оканчиваться информативным.

Видовую идентификацию изолятов с помощью биохимических тест-систем *API Campy*, *API 10S*, *API 20E*, *API Staph*, *API Strep*, *API 20A* (*BioMerieux*, Франция) и также по ряду биохимических признаков, таких как каталазная, оксидазная активность, способность к гидролизу гиппурата.

Определение кампилобактерий ПЦР-методом производилось как в нативных фекалиях, так и после инкубации в селективном бульоне Престона. Фекалии предварительно ресуспендировали в фосфатном буфере с 0,9%-ным NaCl с рН  $7,1 \pm 0,1$  (ФБР) (1 : 10), перемешивали на вортексе до гомогенной суспензии, центрифугировали 5 минут при 13500 g, отбирали 0,1 мл верхней, светлой части осадка и переносили в 1 мл ФБР; далее снова центрифугировали, супернатант сливали, а осадок ресуспендировали в 0,3 мл ФБР. Из полученной суспензии экстрагировали ДНК набором реагентов «ДНК-сорб-В» (ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора). В экстракте определяли присутствие нуклеотидной последовательности, характерной для консервативных участков ДНК термофильных кампилобактерий с использованием тест-систем «АмплиСенс® *Campylobacter spp.*» (ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора).

Экстракция из бульона обогащения проводилась без предварительной обработки. Определение бактерий рода кампилобактерий методом ИФА в кале проводили после обогащения в бульоне Престона.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

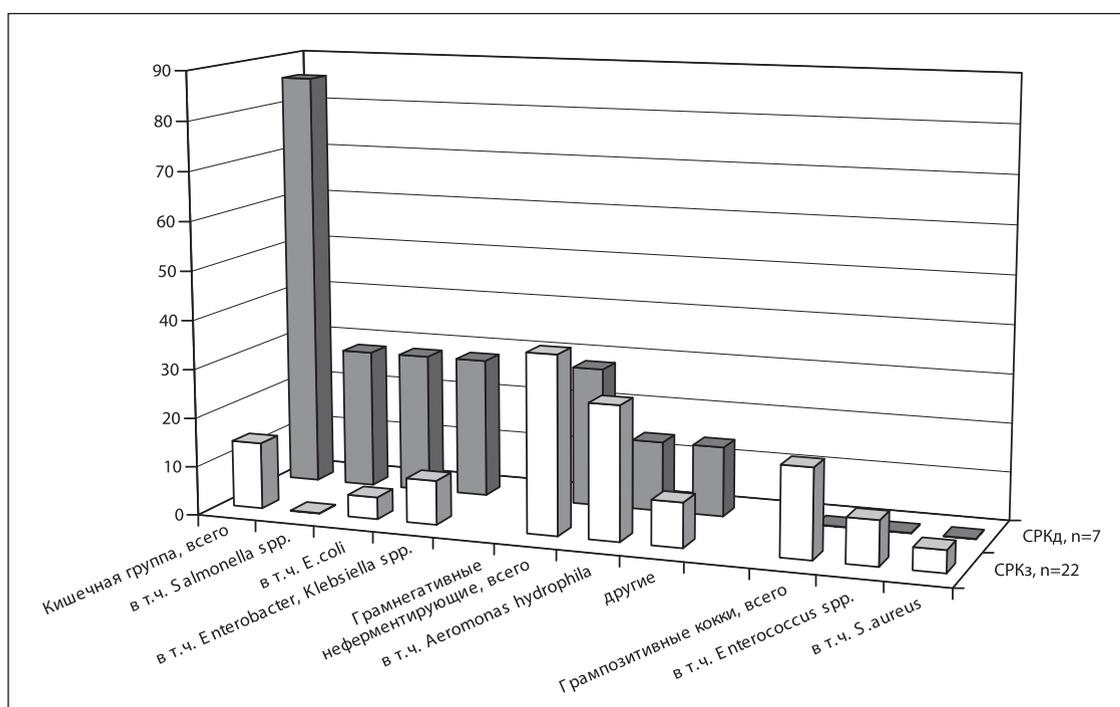
Результаты исследования представлены в таблице и на рисунке.

Как видно из таблицы, о перенесенной ОКИ в дебюте заболевания сообщили 7 пациентов из 39, причем все они входили в группу СРКд. У девяти больных с данной формой СРК наличие в анамнезе ОКИ не подтверждено, так же как и у всех 23 больных группы СРКз.

Присутствие кампилобактерий вида *S. jejuni* в стуле было зафиксировано в обеих группах пациентов с частотой 6,25% при СРКд (больная С.) и 4,3% при СРКз (больная З.). Однако у больной С. микроб был обнаружен всеми тремя методами — культуральный посев, ПЦР и ИФА, в то время как у больной З. — только методом ПЦР без выделения в культуре. Кроме того, у больной С. были указания на перенесенную около 30 лет назад

ДАННЫЕ О НАЛИЧИИ ОКИ В АНАМНЕЗЕ И РЕЗУЛЬТАТАХ ВЫЯВЛЕНИЯ *CAMPYLOBACTER SPP.* У БОЛЬНЫХ СРК

Диагноз	Число больных в группе	Число больных, у которых установлено наличие, абс. (%)		
		ОКИ в анамнезе	кампилобактерий в стуле	в том числе при повторном анализе
СРКд	16	7 (43,8)	1 (6,25)	1 (6,25)
СРКз	23	0 (0)	1 (4,3)	0 (0)
Всего	39	7 (17,9)	2 (5,1)	1 (2,6)



Частота обнаружения сопутствующей микроаэробной флоры в стуле пациентов при разных формах СРК

ОКИ, из-за выраженной тяжести которой она была госпитализирована в стационар; больная З. не подтверждала наличие ОКИ в анамнезе.

При обследовании через 2 недели кампилобактерии у больной С. были обнаружены снова, а у больной З. — нет, то есть в данном случае имело место транзиторное выделение. Однако у больной С. клинические проявления не имели существенных отличий от других пациентов группы СРКд. У нее также отсутствовали признаки, свидетельствующие об инфекционном процессе (температурная реакция, интоксикация, примесь крови в стуле, гематологические изменения) как на момент обследования, так и за 2 месяца до поступления в стационар (то есть за срок, в течение которого происходит элиминация возбудителя при кампилобактериозе [4]), а установленный уровень его содержания в фекалиях не был массивным и составлял не более 54,5 КОЕ/г.

Таким образом, в целом частота обнаружения кампилобактерий в стуле больных СРК, диагноз которого был установлен по комплексу клинических и инструментальных данных, в нашем исследовании составила 5%. Из опубликованных наблюдений на сегодняшний день известно, что связь СРК с перенесенным кампилобактериозом подтверждается приблизительно в 25% случаев и в большинстве из них авторам удавалось обнаружить *Campylobacter spp.* в фекалиях [10; 13]. Однако при таких оценках субъектами мониторинга являются лица, для каждого из которых изначально известно об имевшей место не менее 6 месяцев назад ОКИ, а не больные СРК как таковые. Поэтому низкая частота выявления *Campylobacter spp.* в нашем случае не отрицает возможной роли этих микробов как «пускового» фактора, и в первую очередь у больных СРКд.

Механизм такой связи является предметом самостоятельного изучения. Для верификации предположения о роли кампилобактерий как триггеров воспалительной реакции, самоподдерживающейся даже после элиминации возбудителя из организма [11], нами запланировано исследование, предусматривающее определение специфических противокампилобактериозных антител в крови в динамике. При этом включение в комплекс клинично-лабораторных методов диагностики СРК новых высокочувствительных методов анализа, позволяющих с высокой степенью специфичности выявлять и определять количество возбудителя в стуле, апробированных в данной работе, даст дополнительные критерии для дифференциации постинфекционного СРК от хронической кишечной инфекции кампилобактериозной природы, особенно в случаях с длительной историей заболевания.

Характеристика сопутствующей микрофлоры получена у 7 пациентов из группы СРКд и 22 — с СРКз. При этом в посевах образцов кала больных с СРКд микробы, устойчивые к микроаэробным термофильным условиям культивирования, обнаруживались во всех случаях, тогда как у лиц с СРКз — у 14 человек (63,4%).

Всего обнаружено и идентифицировано 29 штаммов, систематизация которых показала, что в целом они представлены тремя группами грамотрицательных бактерий (в том числе в 11 случаях они были представлены оксидазаположительными неферментирующими палочками, в восьми — бактериями семейства кишечных, в пяти — беспоровыми анаэробными палочками рода *Bacteroides*), а также грампозитивными кокками — в четырех случаях. В одном случае бактерии, давшие рост, идентифицировать не удалось.

Из рисунка видно, что у больных СРКд преобладали бактерии кишечной группы — они были найдены у 5 человек из 7 обследованных (71,4%). Причем в 2 случаях (28,6%) изоляты отнесены к патогенным *Salmonella spp.* (в том числе один — у больной с указанием на наличие ОКИ в дебюте заболевания), в двух — к *E. coli*, в одном — к *Citrobacter freundii*.

У больных СРКз по сравнению с группой СРКд кишечные бактерии встречались в посевах в пять раз реже, а патогенов обнаружено не было. Найденные штаммы относились к таксонам *E. coli*, *Klebsiella* и *Enterobacter spp.*, которые известны своей термотолерантностью и способностью к росту при температурах до +46 °С. Из числа изолированных от лиц с СРК кишечных бактерий к обладающим природной антибиотикоустойчивостью относят клебсиеллы и энтеробактеров [5]. Судя по всему, остальные штаммы от этих больных обладали приобретенной, причем множественной, резистентностью.

Настоящая ситуация не противоречит теории о роли в этиопатогенезе СРК персистирующих возбудителей ранее перенесенных ОКИ [15]. Однако для подтверждения их связи с диарейной формой СРК и исключения кишечной инфекции, как уже упомянуто выше, необходимы данные микробиологического и серологического анализа, полученные в динамике. В первую очередь это относится к представителям патогенной микрофлоры, способным формировать хроническое бактерионосительство у пациентов разного возраста, таким как сальмонеллы, шигеллы, иерсинии [4].

Среди неферментирующих бактерий, которые преобладали в составе микрофлоры, выделенной из стула наших пациентов (39,7% общего числа изолятов), присутствовали штаммы *Aeromonas hydrophila*, *Stenotrophomonas (Pseudomonas) maltophilia*, *Chryseobacterium (Flavobacterium) meningosepticum*. Указанные виды являются представителями так называемого «аэромонадно-псевдомонадного комплекса» гнилостных микробов, способных к продукции протеолитических и других энзимов, активных в широком диапазоне рН. Все они известны как оппортунистические возбудители ОКИ, но в последние годы все более широко встречаются как агенты внутрибольничных заболеваний в стационарах различного профиля, высеиваясь при этом из ликвора, крови, абдоминальной полости, желчных путей, кишечника [1; 6]. Важную роль в патогенезе этих заболеваний играет

множественная лекарственная устойчивость, присущая практически всем неферментирующим бактериям и создающая им селективные преимущества при использовании химиотерапевтических (антимикробных) препаратов широкого спектра. Скорее всего, данным свойством можно объяснить рост вышеуказанных штаммов в средах с антибиотиками в нашем исследовании, в то время как высокая частота их выделения из стула больных при близких значениях в разных группах (28,5% с СРКд и 31,8% с СРКз) обусловлена госпитальными условиями выборки пациентов.

Однако здесь обращал на себя внимание факт значимой двукратной разницы в частоте обнаружения *A. hydrophila* у больных группы СРКз по сравнению с СРКд (см. рис.). Можно предположить, что более частое присутствие в просвете кишечника гнилостных по своей природе штаммов *A. hydrophila* при СРК с запорами связано с различиями в составе химуса и наличием более благоприятных условий для вегетирования этих микробов, чем при СРКд. Длительная персистенция штаммов *A. hydrophila* при наличии у них вирулентности у лиц с СРКз может оказаться существенным фактором продолжительной активации иммунитета по типу описанной нами выше.

Возможно, при СРКз имеет место подобная аналогия при персистенции в кишечном содержимом условно патогенных грампозитивных кокков. Полученные нами данные о более высокой частоте обнаружения *S. aureus* и *Enterococcus spp.* у лиц с СРКз согласуются с публикацией [2], также отмечавшей повышенное содержание кокковой флоры у больных с запорами.

Что касается бактериоидов, являющихся представителями резидентной микробиоты кишечника, то, по-видимому, их присутствие в составе сопутствующей кампилобактериям фекальной флоры

у пациентов с СРК обусловлено анаэробными свойствами и природной антибиотикоустойчивостью популяций. Различия в частоте их выявления у лиц с СРКд и СРКз могут объясняться наличием дисбиотических отклонений на фоне основного заболевания.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

То, что у больных СРК и здоровых состав микрофлоры имеет достоверные различия, сегодня не оспаривается. Клинические испытания пробиотических и пребиотических препаратов у этих пациентов продемонстрировали довольно стойкий положительный эффект на выраженность симптомов и показатели стула, что также может указывать на значимость микробной составляющей в патогенезе СРК [9; 14]. В то же время известно, что данные, получаемые культуральными методами, не способны полностью отразить состав микрофлоры кишечника и более 50% ее анаэробных популяций не может быть выявлено с помощью традиционных техник посева [12]. Современные молекулярные методики лишены этих ограничений, но, как показала настоящая работа, интерпретация результатов, полученных с использованием ПЦР, должна опираться на данные комплексных микробиологических исследований, проведенных в динамике, и на тщательный анализ клинико-anamnestических данных.

Полученные нами результаты говорят о необходимости дальнейшего исследования микрофлоры кишки при СРК с привлечением надежных микробиологических и молекулярных методик для раскрытия роли бактерий в этиопатогенезе заболевания, верификации диагноза и соответственно обоснования терапевтических подходов.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Богдан В. В., Смирнов Л. П., Немова Н. Н. и др. Биохимическая характеристика разных по патогенности штаммов аэромонад // Прикл. биохим. и микробиол. — 2003. — Т. 39, № 6. — С. 670–675.
2. Кузнецова Г. Г. Об оценке состояния микробиоценоза толстой кишки // Мат. межд. научно-практич. конф. памяти Г. И. Гончаровой «Пробиотические микроорганизмы — современное состояние вопроса и перспективы использования». — М. 2002. — С. 30–31.
3. Маев И. В., Черемушкин С. В. Синдром раздраженного кишечника: Учебное пособие. — М., ГОУ ВУНМЦ МЗ РФ, 2004.
4. Черкасский Б. Л. Инфекционные и паразитарные болезни человека. — М.: Медицинская газета, 1994. — 617 с.
5. Шевелева С. А. Анализ микробиологического риска как основа совершенствования системы оценки безопасности и контроля пищевых продуктов: дис. ... докт. мед. наук. — М., 2007.
6. Bloch K. C., Nadarajah R., Jacobs R. *Chryseobacterium meningosepticum*: an emerging pathogen among immunocompromised adults. Report of 6 cases and literature review // *Medicine* (Baltimore). — 1997. — Vol. 76, № 1. — P. 30–41.
7. Dasti J. I., Tareena A. M., Lugerta R. et al. *Campylobacter jejuni*: A brief overview on pathogenicity-associated factors and disease-mediating mechanisms // *Int. J. Med. Microbiol.* — 2009; doi: 10.1016/j.ijmm.2009.07.002.
8. Drossman D. A. The functional gastrointestinal disorders and the Rome III process // *Gastroenterology*. — 2006. — Vol. 130, № 5. — P. 1377–1390.
9. Isolauri E. Probiotics in human disease // *Am. J. Clin. Nutr.* — 2001. — Vol. 73, № 6. — S. 1142–1146.
10. Neal K. R., Hedben J., Spiller R. Prevalence of gastrointestinal symptoms six months after bacterial gastroenteritis and risk factors for development of irritable bowel syndrome: postal survey of patients // *BMJ*. — 1997. — Vol. 314. — P. 779–782.
11. Pimentel M., Chatterjee S., Chang C. et al. A new rat model links two contemporary theories in irritable bowel syndrome // *Dig. Dis. Sci.* — 2008. — Vol. 53. — P. 982–989.
12. Rambaud J.-C., Buts J.-P., Corthier G. et al. Gut microflora. Digestive physiology and pathology. — Paris: John Libbey Eurotext, 2006.
13. Rodriguez L. A., Ruigomez A. Increased risk of irritable bowel syndrome after bacterial gastro-enteritis: cohort study // *BMJ*. — 1999. — Vol. 318. — P. 565–566.
14. Saavedra J. M. Clinical applications of probiotic agents // *Am. J. Clin. Nutr.* — 2001. — Vol. 73, № 6. — S. 1147–1151.
15. Spiller R. C. Role of infection in irritable bowel syndrome // *J. Gastroenterol.* — 2007. — Vol. 42. — P. 41–47.
16. Wassenaar T. M., Blaser M. J. Pathophysiology of *Campylobacter jejuni* infections of humans // *Microbes and Infections*. — 1999. — № 1. — P. 1023–1033.