

Оценка микробиоценоза кишечника в дифференциальной диагностике колитов у детей

А.С. Тертычный, А.В. Свидзинский, А.И. Андреев

Assessment of intestinal microbiocenosis in the differential diagnosis of colitis in children

A.S. Tertychnyy, A.V. Swidsinski, A.I. Andreev

Московский НИИ педиатрии и детской хирургии; Университетская клиника Шарите, Берлин, Германия; Центр планирования семьи и репродукции, Москва

Колоноскопия с прицельной биопсией на сегодняшний день является основным методом диагностики воспалительных заболеваний кишечника у детей. Установление морфологического диагноза и проведение разграничения среди различных групп колитов не всегда возможны, а дифференциальная диагностика в детском возрасте только по результатам изучения биоптатов — сложная задача. Использование дополнительных методов диагностики, включая оценку микробиоценоза кишечника с помощью молекулярно-микробиологического метода флуоресцентной *in situ* гибридизации, является важным и перспективным. Изменения в микробной флоре кишечника позволяют уточнить характер обнаруженных морфологических изменений и расширяют диагностическую ценность изучения биоптатов толстой кишки у детей.

Ключевые слова: дети, колиты, неспецифический язвенный колит, болезнь Крона, морфологический анализ биоптатов.

Today colonoscopy with target biopsy is the main method for diagnosing inflammatory bowel disease in children. It is not always possible to make a morphological diagnosis of colitis and a distinction among its different groups; to establish a differential diagnosis in childhood only from the results of studying biopsy specimens is a difficult task. The application of additional diagnostic methods, including the intestinal microbiocenosis assessment using the molecular microbiological method fluorescence *in situ* hybridization, is important and promising. Changes in the intestinal microbial flora can clarify the nature of the observed morphological changes and enhance the diagnostic value of colonic biopsy specimen examination in children.

Key words: children, colitis, nonspecific ulcerative colitis, Crohn's disease, morphological analysis of biopsy specimens.

Кишечная микрофлора оказывает влияние на состояние макроорганизма, но ее точная оценка и интерпретация полученных результатов крайне затруднительны. Прогресс в изучении бактерий в последнее время связан с возможностью их идентификации на основании генетического анализа рибосомальных РНК. Проведенные в последние годы исследования привели к созданию проб и разработке метода флуоресцентной *in situ* гибридизации, который позволил выявлять в биоптатах и определять характеристику отдельных групп бактерий. Использование специфических проб позволило охарактеризовать состав и пространственное расположение бак-

терий у больных с воспалительными заболеваниями кишечника [1–4].

Традиционно к воспалительным заболеваниям кишечника относят неспецифический язвенный колит, болезнь Крона и недифференцированный колит. Считается, что воспалительные заболевания кишечника развиваются в результате неадекватного иммунного ответа, направленного против собственной бактериальной микрофлоры кишки, что приводит к воспалительному повреждению собственных тканей кишечника. Многие экспериментальные и клинические данные свидетельствуют о вовлечении бактерий в патогенез указанных заболеваний [5]. Однако, несмотря на интенсивные поиски, ни механизмы, посредством которых бактерии приводят к развитию воспалительных заболеваний кишечника, ни специфические изменения в составе микрофлоры не были четко определены [5, 6].

Колоноскопия с прицельной биопсией на сегодняшний день является основным методом диагностики этих заболеваний у детей. При использовании культивирования бактерий с последующей их верификацией с помощью количественной полимеразной цепной реакции, клонирования и секвенирования было показа-

© Коллектив авторов, 2010

Ros Vestn Perinatol Pediat 2010; 4:50–53

Адрес для корреспонденции: Тертычный Александр Семенович — д.м.н., гл.н.с. научно-исследовательской лаб. общей патологии Московского НИИ педиатрии и детской хирургии

125412 Москва, ул. Талдомская, д. 2

Свидзинский Александр Владимирович — рук. лаб. молекулярной генетики, полимикробных инфекций и бактериальных биопленок Университетской клиники Шарите, ССМ, Берлин, Германия

Андреев Андрей Иванович — зав. отделением патогистологии Центра планирования семьи и репродукции

117209 Москва, Севастопольский пр-т, д. 24А

но, что биоптаты толстой кишки от лиц, не имеющих воспалительных изменений в биоптатах, практически свободны от бактерий [7]. При этом в биоптатах от больных с воспалительными заболеваниями даже после освобождения кишки от кишечного содержимого определялись бактерии в высоких концентрациях. Количество бактерий, которые были адгезированы к поверхности эпителиальных клеток, прогрессивно возрастало от случаев с инфекционными колитами к случаям неспецифического язвенного колита и болезни Крона, превышая значения адгезии в несколько раз по сравнению со случаями без воспалительных изменений. Все бактерии относились к кишечной группе, и различий в составе бактериальной микрофлоры у обследованных пациентов отмечено не было [7].

Термин «биопленка» был предложен для обозначения структурной организации бактерий в синтезируемом ими матриксе и располагающихся на поверхности слизистой оболочки [8]. Поэтому термин «кишечная биопленка» может быть применен для обозначения бактерий, обнаруживаемых у больных с воспалительными заболеваниями кишечника. Биопленки в настоящее время описаны для многих бактериальных инфекций и во многом помогают объяснить их антибиотикорезистентность и недостаточную эффективность иммунного ответа макроорганизма. Примеры подобных инфекционных заболеваний включают болезни пародонта, эндокардиты, хронические обструктивные болезни легких и инфекции, связанные с наличием инородных тел [8, 9]. Влияние биопленок на патогенез воспалительных заболеваний кишечника до настоящего времени подробно не изучалось. Предшествующие работы в основном касались сравнительного исследования получаемых бактериальных культур. Если принять во внимание, что кишечная микрофлора структурно организована [6], то изучение получаемых культур бактерий не позволяет сделать заключение об их поведении и взаимодействии с клетками эпителия в кишечнике.

Флюоресцентная *in situ* гибридизация сочетает в себе непосредственное обнаружение тех или иных бактерий и определение их взаимоотношения со слизистой оболочкой кишки. Тем самым этот метод имеет преимущества по сравнению с культивированием, полимеразной цепной реакцией или гистологическими методами, взятыми каждый в отдельности. В настоящем исследовании мы попытались сравнить состав и пространственную организацию бактерий кишечника у детей с воспалительными заболеваниями кишечника и другими формами колитов.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Биоптаты у 22 детей с хроническими колитами были получены во время выполнения колоноскопического исследования. Для проведения флюорес-

центной *in situ* гибридизации были взяты последовательно 125 биоптатов из всех отделов кишечника начиная с подвздошной и заканчивая прямой кишкой. Материал фиксировали в безводном фиксаторе Карнуа в течение как минимум 2 ч, а затем обрабатывали и заливали в парафин по стандартной методике, исключая контакт биоптатов с водными растворами. Одновременно с этих же блоков готовили препараты для гистологического исследования.

Для флюоресцентной *in situ* гибридизации использовали широкий спектр меченых проб рибосомальных РНК, имеющих групповую специфичность: Bac303 (*Bacteroides*), Bif164 (*Bifidobacteriaceae*), Ebac1790 (*Enterobacteriaceae*), Eub338 (*Eubacteria*; все группы бактерий), Fprau (*Faecalibacterium prausnitzii*), Fnes (*Fusobacterium necrophorum*), Fnuc (*Fusobacterium nucleatum*), Rbro (*Ruminococcus bromii*). Выбор проб был обусловлен ранее проведенными исследованиями [10], в которых были определены группы бактерий, наиболее часто обнаруживаемых у больных с воспалительными заболеваниями кишечника. Дополнительно использованные пробы к *Fusobacterium necrophorum* (Fnes) и *Fusobacterium nucleatum* (Fnuc) были выбраны в связи с их обнаружением у больных с острым аппендицитом [11].

Оценка результатов гибридизации проводилась на флюоресцентном микроскопе e600 (фирма «Nikon», Токио, Япония).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Результаты гистологического исследования позволили диагностировать воспалительные заболевания кишечника в 11 случаях (5 случаев неспецифического язвенного колита, 2 случая болезни Крона и 4 случая недифференцированного колита). В оставшихся 11 случаях морфологические изменения не являлись диагностическими и не позволяли сделать заключение о характере поражения слизистой оболочки. При проведении флюоресцентной *in situ* гибридизации во всех исследованных биоптатах было получено позитивное свечение бактерий с использованием универсальной пробы ко всем бактериям *Eubacteria* (Eub338). Отмечалось высокое содержание бактерий в покрывающем слизистую оболочку слое слизи, причем в подавляющем большинстве случаев наблюдалось повреждение защитного слизистого барьера и непосредственный контакт бактерий с поверхностью эпителиальных клеток. Только в одном случае количество бактерий было минимальным, и слизистый слой оказался интактным. С учетом результатов морфологического исследования этот случай был расценен как случай с минимальными изменениями, которые не следует рассматривать как патологические.

Соотношение бактерий, имеющих диагностическое значение. *Bacteroides* (Bac303) и *Enterobacteriaceae*

(Ebac1790) являлись преобладающим компонентом биопленок у больных с воспалительными заболеваниями кишечника, их высокое содержание отмечалось в 8 из 11 случаев. В группе с другими формами колитов такое повышение было отмечено только в одном наблюдении.

Значительным компонентом биопленки в нашем исследовании явились бактерии группы *Faecalibacterium prausnitzii* (Ffrau): в высоких концентрациях они обнаруживались у 8 из 11 больных с воспалительными заболеваниями кишечника и у 10 из 11 больных с другими формами колитов. Следует отметить, что бактерии этой группы не были обнаружены при болезни Крона и в 1 случае недифференцированного колита.

Бактерии из группы *Bifidobacteriaceae* (Bif164) были выявлены приблизительно у половины больных в обеих группах: в 6 из 11 случаев воспалительных заболеваний кишечника и в 5 из 11 случаев других форм колитов.

Бактерии *Ruminococcus bromii* (Rbro) обычно относятся к минорным компонентам бактериальной микрофлоры кишки. Однако в нашем исследовании отмечалось повышение их относительного содержания в 1 случае недифференцированного колита и в 4 случаях других вариантов колитов. При оценке содержания бактерий данной группы и бактерий группы *Faecalibacterium prausnitzii* (Ffrau) одновременное повышение их относительного содержания наблюдалось только в случаях, не имевших морфологических признаков воспалительных заболеваний кишечника.

Пространственное расположение бактериальной микрофлоры. Бактерии с признаками адгезии к поверхности эпителиальных клеток. В норме для предотвращения иммунного ответа и негативного воздействия бактерий на организм поверхность слизистой оболочки покрыта слоем слизи с определенными физико-химическими характеристиками. Этот слой имеет постоянную для каждого отдела желудочно-кишечного тракта толщину, не содержит бактерий и препятствует их контакту с эпителиальными клетками. В нашем исследовании в большинстве случаев происходило нарушение слизистого барьера. В результате слой слизи содержал микрофлору и отмечался контакт бактерий с поверхностью эпителиальных клеток. Были обнаружены два типа адгезии: в виде непрерывного слоя и в виде очаговых скоплений (рис. 1 и 2). Вариант адгезии бактерий в виде непрерывного слоя отмечался в большинстве случаев воспалительных заболеваний кишечника и не был выявлен при других формах колитов.

Внутриклеточные бактерии. Внутриклеточно расположенные бактерии были обнаружены в отдельных эпителиальных клетках, а также в цитоплазме клеток собственной пластинки слизистой оболочки у 4 больных с воспалительными заболеваниями кишечника (в 3 случаях активного неспецифического

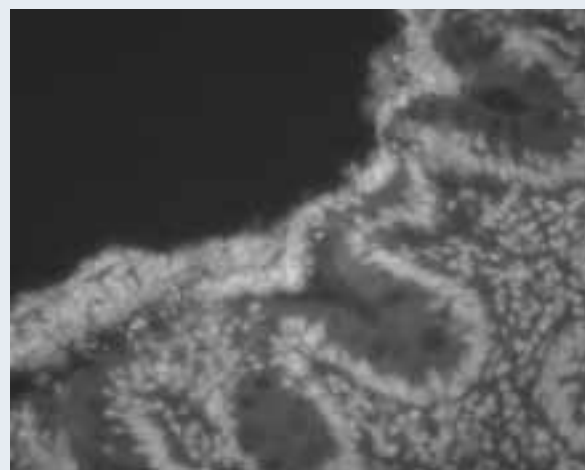


Рис. 1. Микрофотография среза колонобиоптата ребенка с болезнью Крона.

Гибридизация РНК *in situ*. Метод FISH. Проба Bac303 к группе бактерий *Bacteroides*. x400. Определяется нарушение слизистого барьера и адгезия в виде непрерывного слоя.

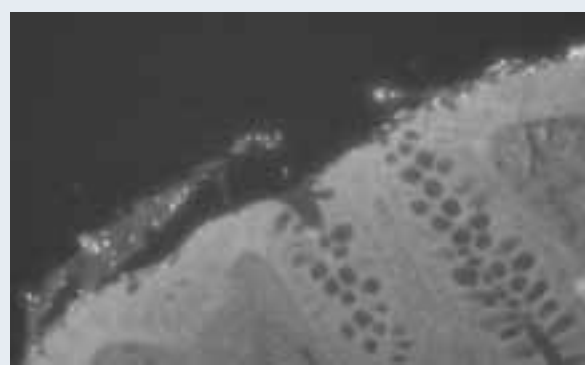


Рис. 2. Микрофотография среза колонобиоптата ребенка с неспецифическим язвенным колитом.

Гибридизация РНК *in situ*. Метод FISH. Проба Ebac1790 к группе бактерий *Enterobacteriaceae*. x600. Определяется нарушение слизистого барьера и адгезия в виде непрерывного слоя и очаговых скоплений.

язвенного колита и у 1 больного с недифференцированным колитом) и у 6 больных с минимальными колитами неустановленной этиологии. Наиболее часто бактерии обнаруживались в покровном эпителии и были представлены бактериями из группы *Bacteroides*. Максимальное количество клеток, содержащих бактерии в цитоплазме, не превышало 2–3 на один биоптат.

Результаты гибридизации с пробами к *Fusobacterium necrophorum* (Fnec) и *Fusobacterium nucleatum* (Fnuc) во всех исследованных биоптатах были отрицательными.

ОБСУЖДЕНИЕ

При сравнительном анализе данных морфологического исследования и результатов оценки микро-

биоценоза, полученных с помощью метода флюоресцентной *in situ* гибридизации, мы смогли обнаружить характерные для воспалительных заболеваний кишечника изменения в составе и пространственном расположении бактерий. У 8 из 11 больных с морфологически подтвержденным диагнозом отмечалось высокое содержание бактерий в покрывающем эпителий слое слизи, повреждение защитного слизистого барьера и непосредственный контакт бактерий с поверхностью эпителиальных клеток в виде непрерывного слоя. Бактерии групп *Bacteroides* и *Enterobacteriaceae* являлись преобладающим компонентом биопленок у больных с воспалительными заболеваниями кишечника.

Полученные результаты показывают перспективность и высокую диагностическую ценность одновременного использования морфологического метода и метода флюоресцентной *in situ* гибридизации. Следует подчеркнуть, что одним из условий проведения флюоресцентной *in situ* гибридизации и получения достоверных диагностических изменений микрофлоры кишечника является фиксация материала в безводном растворе (жидкость Карнуа), который препятствует растворению слизистого барьера. Общеизвестно, что использование антибиотиков приводит к резкому изменению состава микрофлоры, а иногда полному исчезновению бактерий, определяемых с помощью метода флюоресцентной *in situ* гибридизации. Поэтому перспективное использование методов морфологического и молекулярно-генетического анализа биоптатов требует обязательного соблюдения всех технологических условий, предусмотренных для проведения флюоресцентной *in situ* гибридизации.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На сегодняшний день точная морфологическая диагностика воспалительных заболеваний кишечника на материале эндоскопических биопсий связана с серьезными трудностями. Использование дополнительных сведений, в частности данных о составе и пространственном расположении кишечных бактерий, представляет перспективный метод диагностики. При изучении колонобиоптатов у детей морфолог часто сталкивается с проблемой установления окончательного диагноза. Постановка диагноза колита и разграничение различных групп колитов не всегда возможны, а дифференциальная диагностика между кишечными инфекциями, неспецифическим язвенным колитом и болезнью Крона в детском возрасте только по результатам изучения биоптатов бывает задачей практически неразрешимой. Изменения в микробной флоре кишечника позволяют уточнить характер обнаруженных морфологических изменений и расширяют диагностическую ценность изучения биоптатов толстой кишки у детей. В последнее время в литературе появляется все больше публикаций [12], показывающих положительный клинический эффект коррекции дисбиотических изменений при неспецифическом язвенном колите и болезни Крона. Использование пробиотиков в схемах лечения воспалительных заболеваний кишечника открывает новые перспективные направления терапии. Обоснованность назначения пробиотиков и оценка их эффективности могут контролироваться с помощью молекулярно-микробиологического метода флюоресцентной *in situ* гибридизации.

ЛИТЕРАТУРА

1. Amann R.I., Ludwig W., Schleifer K.-H. Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation // Microbiol. Rev. 1995. Vol. 59. P. 143–169.
2. Bohnert J., Hubner B., Botzenhart K. Rapid identification of Enterobacteriaceae using a novel 23S rRNA-targeted oligonucleotide probe // Int. J. Hyg. Environ. Health. 2002. Vol. 203. P. 77–82.
3. Franks A.H., Harmsen H.J., Raangs G.C. et al. Variations of bacterial populations in human feces measured by fluorescent *in situ* hybridization with group-specific 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes // Appl. Environ. Microbiol. 1998. Vol. 64. P. 3336–3345.
4. Harmsen H.J., Elfferich P., Schut F., Welling G.W. A 16S rRNA-targeted probe for detection of lactobacilli and enterococci in fecal samples by fluorescent *in situ* hybridization // Microbiol. Ecol. Health Dis. 1999. Vol. 11. P. 3–12.
5. Fiocchi C. Inflammatory bowel disease; etiology and pathogenesis // Gastroenterology. 1998. Vol. 115. P. 182–205.
6. Podolsky D.K. Inflammatory bowel disease // N. Engl. J. Med. 2002. Vol. 347. P. 417–429.
7. Swidsinski A., Ladhoff A., Pernthaler A. et al. Mucosal flora in inflammatory bowel disease // Gastroenterology. 2002. Vol. 122. P. 44–54.
8. Costerton J.W., Stewart P.S., Greenberg E.P. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections // Science. 1999. Vol. 284. P. 1318–1322.
9. Costerton J.W., Veeh R., Shirtliff M. et al. The application of biofilm science to the study and control of chronic bacterial infections // J. Clin. Investig. 2003. Vol. 112. P. 1466–1477.
10. Swidsinski A., Weber J., Loening-Baucke V. et al. Spatial organization and composition of the mucosal flora in patients with inflammatory bowel disease // J. Clin. Microbiol. 2005. Vol. 43, № 7. P. 3380–3389.
11. Swidsinski A., Doerffel Y., Loening-Baucke V. et al. Acute appendicitis is characterized by local invasion with *Fusobacterium nucleatum/necrophorum* // Gut. 2010. [Epub ahead of print].
12. Wallace B. Clinical use of probiotics in the pediatric population // Nutr. Clin. Pract. 2009. Vol. 24, № 1. P. 50–59.

Поступила 26.04.10