

Характеристика специфического иммунитета и уровня назофарингиального бактерионосительства *H. influenzae* у детей

Боронина Л.Г.
ГОУ ВПО УГМА Росздрава
ОДКБ № 1, г. Екатеринбург

Резюме. Впервые на Среднем Урале проведено изучение частоты назофарингеального бактерионосительства и выявления распространённости капсульных и бескапсульных штаммов *H. influenzae* у 730 детей в возрасте от 6 мес. до 14 лет, а так же уровня специфического иммунитета к *H. influenzae* у 508 детей. Бактериологическим методом исследовали материал со слизистой задней стенки носоглотки у детей, проживающих на территории Свердловской области и посещающих детские дошкольные учреждения и школы. В среднем уровень назофарингиального носительства *H. influenzae* у здоровых составил 10,4%, на некоторых территориях до 23%. Из выделенных штаммов в 87,8% преобладали нетипируемые (бескапсульные) изоляты *H. influenzae*. Капсульные варианты выделены не более, чем у 1,5% обследованных. При сравнении уровня специфических антител к *H. influenzae* в сыворотке у детей разных возрастных групп обнаружены меньшие уровни в возрасте до года и до двух лет, с нарастанием значений к пяти годам; у более старших детей не установлено существенных различий в уровне специфических антител в зависимости от возраста.

Ключевые слова: бактерионосительство, *H. influenzae*, иммунитет

H. influenzae - возбудитель многих инфекционных заболеваний у детей и взрослых. В развитии патологии имеют значение как капсульные, так и бескапсульные (нетипируемые) формы *H. influenzae*, являющиеся ведущей причиной острых бактериальных инфекций в раннем возрасте, важным агентом хронической легочной инфекции и гнойно-септических заболеваний у детей и взрослых. *H. influenzae* типа "b" вызывает сепсис, менингит, пневмонию, эпиглотит, септический артрит, остеомиелит, бактериальный конъюнктивит, средний отит, гайморит [1, 2, 8, 9]. Среди *H. influenzae* наиболее часто менингиты вызывает серовариант "b" первого биотипа [2, 3, 10, 11, 13, 17].

По результатам наших исследований в г. Екатеринбург и Свердловской области среди первичных возбудителей бактериальных

менингитов *H. influenzae* "b" встречались у детей от 3 месяцев до 5 лет в 3,5-10% наблюдений [2, 3, 11]. Острые пневмонии, вызванные *H. influenzae*, диагностированы у 11,5% детей до 5 лет и в ассоциации с *M. pneumoniae* в 10,9% случаев [7, 12]. При хронических заболеваниях лёгких у детей, находящихся на лечении в отделении пульмонологии и торокальной хирургии ОДКБ №1, выделялись нетипируемые (бескапсульные) штаммы *H. influenzae* (25,4%) [4]. Острые отиты гемофильной этиологии в г. Екатеринбурге встречались в 4-8%; синуситы - в 17-19% наблюдений [7].

Приведенные данные свидетельствуют о значительной роли *H. influenzae* в этиологии различных инфекционных заболеваний на Среднем Урале, а также о гетерогенности штаммов *H. influenzae*.

По данным зарубежных авторов, частота назофарингиального носительства как типичных (капсульных), так и нетипируемых (бескапсульных) штаммов *H. influenzae* у детей в возрастном аспекте различна и составляет от 5 до 75% [14, 15, 16, 18]. Анализ частоты носительства этого возбудителя среди воспитанников детского дома, проведенный в

Боронина Любовь Григорьевна - канд. мед. наук, доцент кафедры клинической лабораторной и бактериологической диагностики ФПК и ПП ГОУ ВПО УГМА Росздрава, главный внештатный бактериолог МЗ СО

1994-1997 гг. в г. Москве, не выявил *H. influenzae* серотипа "b", но в другом детском доме в 2002г. установлено бактерионосительство *H. influenzae* сероварианта "b" на слизистой носоглотки у 18% детей до двух лет [9].

В доступной литературе нами не обнаружены результаты исследований о распространенности назофарингиального носительства и состоянии специфического гуморального иммунитета к *H. influenzae* среди детей разных возрастных групп в Свердловской области.

Цель исследования заключалась в анализе частоты назофарингеального носительства и гетерогенности штаммов *H. influenzae* у детей, посещающих детские дошкольные учреждения и школы г. Екатеринбурга и Свердловской области, а так же исследовании показателей специфического иммунитета к *H. influenzae* в популяции детей, не иммунизированных против *H. influenzae* "b".

Материалы и методы

Проведено исследование уровня антител к *H. influenzae* в сыворотке крови у 508 не вакцинированных против *H. influenzae* "b" детей в возрасте от 1 месяца до 14 лет с различными заболеваниями, проживающих на территории Свердловской области. Для определения антител к антигенным комплексам нетипируемых изолятов *H. influenzae* использовали тест системы ИФА, разработанный в НИИВС им. И.И. Мечникова. Сыворотки исследовали в двухкратных разведениях от 1:50 до 1:800 по предложенной производителем методике. Все дети были разделены по возрастным группам: первая группа - до года, вторая - от года до двух лет, третья - от 2 до 3 лет, четвертая - от 3 до 4 лет, пятая - от 4 до 5 лет, шестая - от 5 до 7 лет и седьмая - от 10 до 14 лет. В каждой группе было исследовано не менее 40 сывороток крови.

Бактериологическим методом у 730 детей в возрасте от 1 до 14 лет, проживающих на территории Свердловской области, однократно исследовали отделяемое со слизистой задней стенки носоглотки. Исследование проведено в июне-октябре 2003 и 2004 гг в детских дошкольных учреждениях и школах в нескольких городах: г. Екатеринбурге (n=188), Каменск-Уральском (n=99), Дегтярске (n=88), Красноуральске (n=38), Двуречинске (n=99), Бисерти (n=88), Кировграде (n=99) и Берёзовском (n=31).

Выделение и культивирование *H. influenzae* проводили на питательной среде "шоколадный" агар и на средах, приготовленных в нашей модификации [5, 6, 19]. Посевы инкубировали при 37°C в атмосфере 7% CO₂. Чашки с

питательной средой после инкубации просматривали при помощи стереомикроскопа МБС-1: М-формы - слизистые, круглые, прозрачные, ирризирующие в косопроходящем свете; S-формы - круглые, гладкие, полупрозрачные, ирризирующие; R-формы - очень мелкие, не прозрачные, не ирризирующие с неровным краем. Чашки, на которых был обнаружен рост *H. influenzae* имели специфический запах.

Морфологию изучали при иммерсионной микроскопии ("БИОЛАМ" Р1) мазков, окрашенных по Грамму и методу Бурри-Гинса. Потребность в X-, V- факторах определяли на простом агаре и агаре с кровью вместе с золотистым стафилококком (метод "кормушек") или на простом агаре с использованием дисков, содержащих X- или V- факторы. Для определения полной характеристики выделенных штаммов проводили изучение биохимических тестов: определяли ферменты каталазу с 3% перекисью водорода, уреазу - на жидкой среде с мочевиной по методу Закса, бета-галактозидазу - по гидролизу O-нитрофенил-бета-D-галактопирозиды ONPG на бульоне с факторами роста X и V, образование индола обнаруживали при помощи роста на "шоколадном" бульоне и индикаторных бумажек с параметиламидобензолъдегидом (реактив Эрлиха). С помощью реактива тетраметилпарафенилендиамин определяли оксидазу штаммов *H. influenzae*. Все штаммы были оксидазоположительными. Некоторые штаммы *H. influenzae* при определении оксидазы реактивом диметилпарафенилендиамин были оксидазоотрицательными, поэтому рекомендовано применять тетраметилпарафенилендиамин [5, 18]. Орнитин-декарбоксилазу определяли по прописи для дифференциации энтеробактерий с L-орнитином и добавлении факторов роста V и X, а так же использовали системы индикаторных бумажек для биохимической дифференциации. Биоварианты *H. influenzae* идентифицировали по стандартным методикам [8, 18].

Статистическую обработку полученных титров, выраженных в log₂, и других показателей, проводили в Excel, Statistica 6.

Результаты и обсуждение

При бактериологическом исследовании материала с задней стенки носоглотки от 730 детей выделено 74 штамма *H. influenzae*. На рисунке 1 показана частота выделения *H. influenzae* из носоглотки у детей проживающих на разных территориях Свердловской области. Назофарингиальное носительство обнаружено в среднем у 10,4% обследованных; до года - у 23%; от 1 года до 5 лет - у 11-13%; от 7 до 10

лет - у 13% детей (Рис. 2). Среди *H. influenzae* капсульные варианты обнаружены у 12,8% выделенных штаммов, в остальных случаях обнаружены бескапсульные нетипируемые штаммы (Рис. 3). Среди всех штаммов *H. influenzae* капсульный серовар "b" выявлен в 5,4% случаев, серовар "c" - в 1,35%, серовар "d" - в 4,05%, серовар "e" - в 1,35%, серовар "f" - в 2,7% наблюдений.

Обращает на себя внимание (Рис. 1) большая частота носительства в детском комбинате г. Дегтярска. У этих детей выделены в основном нетипируемые (бескапсульные) штаммы *H. influenzae*, являющиеся нормальной микрофлорой, колонизирующей на слизистой носоглотки. Возможно, это связано с перенесенной накануне исследования респираторной инфекцией, которая явилась причиной дисбиоза слизистой носоглотки у некоторых детей и привела к транзитному носительству. В промышленных центрах, таких как Екатеринбург, Каменск-Уральский, Красноуральский, Кировград уровень носительства выше, чем в сельской местности (Двуреченск, Бисерт). Несмотря на то, что в Каменск-Уральском уровне носоглоточного носительства не выше, чем на многих территориях, но при исследовании материала из носоглотки в детском доме и доме ребенка обнаружено носительство в младшей возрастной группе: из 12 детей в возрасте до года у 4 были выделены *H. influenzae*. В то же время, из всех выделенных штаммов, только один был капсульным, типировать который не удалось, остальные отнесены к разным биотипам, не связанным с серотипом "b".

При изучении носительства *H. influenzae*, важен не сам факт обнаружения возбудителя в носоглотке, а наличие капсульных вариантов и некоторых биовариантов, которые имеют значение в патологии у детей.

Исследование биотипов *H. influenzae* выявило присутствие всех известных биовариантов, кроме *H. influenzae V. aegyptius*, который не встречается на слизистой носоглотки здоровых детей и в нашей стране не описан. Со слизистой носоглотки преимущественно выделялись I, II, III, VII, VIII биотипы (Рис. 4). Биотипы IV, V, VI на слизистой носоглотки детей выявлялись в меньшей степени. Среди штаммов *H. influenzae* I биотип составил 14%, но это были преимущественно бескапсульные штаммы, которые имеют значение в патологии при определенных условиях, например, часто обнаруживаются в мокроте при бронхоэктатической болезни. Наиболее значимые капсульные штаммы серотипа "b", вызывающие менингит, относятся к I и II биотипам и в нашем исследовании выявлены только у 4 из 730 детей.

Необходимо отметить, что обнаружение в носоглотке бескапсульных штаммов *H. influenzae* идентичного биотипа у детей одного учреждения и даже одной группы, свидетельствует о циркуляции этого микроорганизма в связи с его распространением воздушно-капельным путём. В то же время, ни в одном детском учреждении не выделялись *H. influenzae* только одного серотипа или биотипа, что свидетельствует об определённой динамике в формировании носоглоточного носительства и отсутствии в каждом коллективе только одного из биотипов или серотипов *H. influenzae*, вытеснившего другие.

В результате изучения уровня антител к *H. influenzae* обнаружено, что существуют достоверные отличия среднего уровня антител у детей до года по сравнению с другими возрастными группами ($p < 0,05$) (Рис. 5). Средний уровень антител в первой возрастной группе составил 4,2 у.е. и оказался существенно ниже, чем в других возрастных группах. Уровень антител во второй возрастной группе (возраст от 1 до 2 лет) был выше, чем в первой группе и ниже, чем в других группах, кроме третьей (возраст от 2 до 3 лет) ($p > 0,01$).

Исходя из полученных результатов, можно сделать вывод, что во второй и третьей группах средние уровни антител к *H. influenzae* существенно не отличались друг от друга. Несмотря на некоторое снижение средних значений показателей в шестой группе (возраст от 5 до 7 лет) по сравнению с четвёртой (возраст от 3 до 4 лет) и пятой (возраст от 4 до 5 лет) группами, существенных различий статистически не обнаружено из-за меньшего количества наблюдений в шестой группе. В старших возрастных группах (группы 7 и 8) средний уровень антител существенно не отличается от среднего уровня антител в возрастных группах 4 (возраст от 3 до 4 лет) и 5 (возраст от 4 до 5 лет). Обращает на себя внимание более высокий уровень антител у детей старше 5-7 лет, что отражает, на наш взгляд, общие закономерности формирования антибактериального иммунитета к возбудителям инфекций, передающихся воздушно-капельным путём.

У детей до года специфические антитела к *H. influenzae* (Рис. 5) обнаружены на достаточно высоком уровне по сравнению с другими возрастными группами, что обусловлено трансплацентарной передачей IgG и сохранением материнских антител в первые месяцы жизни. Также, у детей до года, в формировании иммунитета имеет значение назофарингиальное носительство *H. influenzae* (Рис. 2). Кроме этого известно, что *H. influenzae* имеет общие антигены с некоторыми бакте-

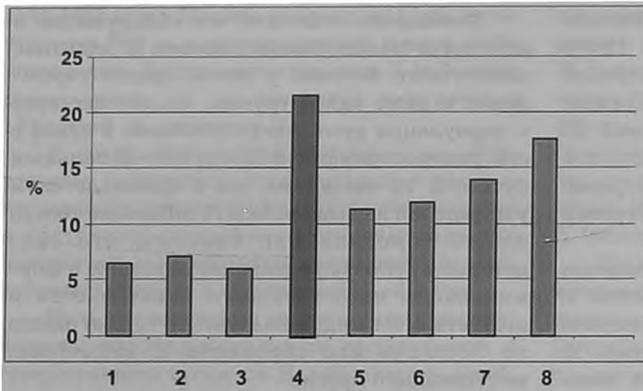


Рисунок 1. Назофарингеальное носительство *H. influenzae* у детей в детских учреждениях

1 - Березовский; 2 - Бисерть; 3 - Двуреченск; 4 - Дегтярск; 5 - Екатеринбург; 6 - Каменск-Уральский; 7 - Кировград; 8 - Красноуральск

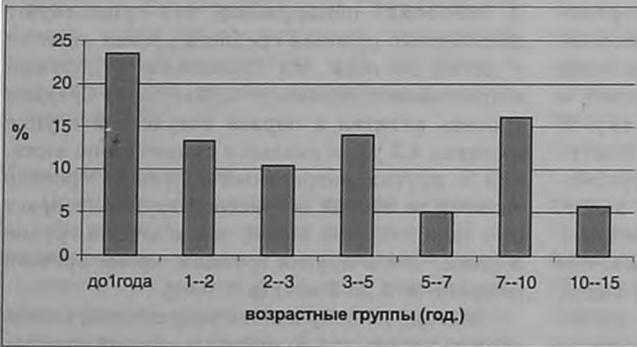


Рисунок 2. Назофарингеальное носительство *H. influenzae* у детей в зависимости от возраста

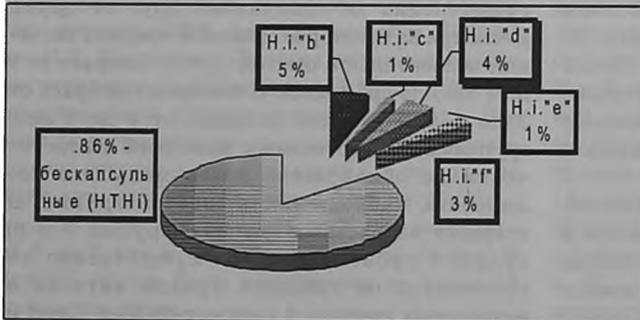


Рисунок 3. Серотипирование штаммов *H. influenzae*, колонизирующих носоглотку популяции детей (n=74)

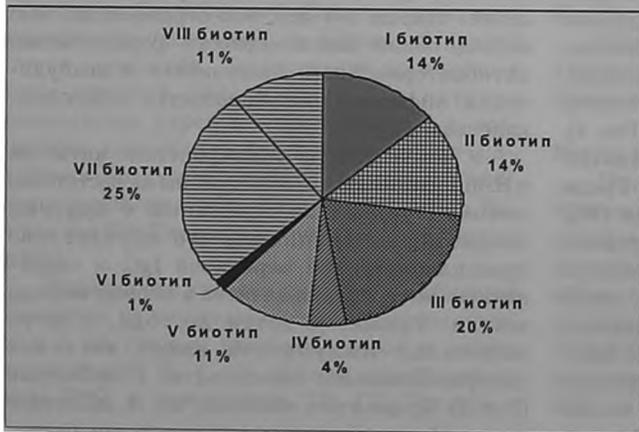


Рисунок 4. Назофарингеальная колонизация биотипами *H. influenzae*, в популяции



Рисунок 5. Иммунитет к *H. influenzae*, в популяции детей Свердловской области

риями, такими, как *E. coli* K-100, *S. pneumoniae* тип 6, некоторыми видами лактобактерий, стрептококков, стафилококков, перекрестно реагирующих с антигенами *H. influenzae* [15].

В нашем исследовании представлен анализ популяционного иммунитета к антигенам бескапсульных штаммов *H. influenzae*, но для более полной характеристики популяционного иммунитета необходимо определить уровень иммунитета к капсульному сероварианту *H. influenzae* "b", что является предметом наших последующих исследований.

Как показало исследование, назофарингеальное носительство *H. influenzae* серотипа "b" распространено значительно меньше, чем можно было предполагать. Возможно, это связано со временем года и отсутствием респираторной инфекции и обусловлено эпидемическими особенностями конкретного детского коллектива.

В детском доме и в доме ребёнка (г. Каменск-Уральский) в носоглотке детей не было обнаружено значительного, отличного от других учреждений, уровня бактерионосительства *H. influenzae* серотипа "b", вызывающего системные инфекции у детей. В носоглотке детей этих учреждений обнаружены *H. influenzae* разных серотипов и биотипов, что свидетельствует о гетерогенности популяции *H. influenzae*. Представленные данные трудно сравнивать с частотой назофарингеального носительства *H. influenzae* в других регионах. Сведений о распространении назофарингеального носительства других капсульных вариантов *H. influenzae*, кроме серовара "b", недостаточно для того, чтобы оценить их распространённость в России.

Заключение

Уровень носоглоточного носительства нетипизируемых и капсульных серовариантов *H. influenzae* отличается на различных территориях и зависит от возраста детей. Об этом свидетельствуют результаты, опубликованные

Таточенко В.К. (1998г.), Катосовой Л.К. (1986г) и другими авторами [8, 9, 14]. Известно, что защита от капсульных и бескапсульных штаммов *H. influenzae* зависит от многих факторов: содержания сывороточных и секреторных антител у матери в период лактации; бактерицидной активности сыворотки крови к белку наружной мембраны Р 6, после перенесённой инфекции; антител, выработавшихся при встрече с *E. coli* K-100, *S. pneumoniae* тип 6, некоторыми видами лактобактерий, стрептококками, стафилококками, перекрестно реагирующими с антигенами *H. influenzae*.

Ведущее место в формировании иммунитета отводится циркуляции *H. influenzae* при транзитном носительстве и после перенесённых инфекций, вызванных *H. influenzae*. Наблюдение, проведённое за контактными детьми в детском учреждении не выявило ни одного случая инвазивного заболевания, что, по мнению Таточенко В.К с соавт. (1998г), свидетельствовало о низком уровне восприимчивости маленьких детей к этой инфекции и высоком уровне иммунитета к *H. influenzae* [13].

Проведённые исследования установили частоту назофарингеального носительства *H. influenzae* у 10,4% обследованных детей Свердловской области, посещающих детские учреждения. Среди всех выделенных штаммов капсульные варианты составили 14,9%, что соответствует 1,6% обследованных детей. Серовариант "b" обнаружен менее, чем у 1% обследованных детей. Выделялись преимущественно бескапсульные штаммы VII и VIII биотипов, являющиеся представителями нормальной микрофлоры носоглотки и капсульные штаммы I, II, III биотипов других, но не "b" серотипов *H. influenzae*.

Уровень антибактериальных антител к *H. influenzae* зависел от возраста детей, уровня назофарингеального носительства *H. influenzae* и, можно предположить, перенесённых заболеваний, вызванных *H. influenzae*.

Для изучения популяционного специфического иммунного ответа к *H. influenzae* и определения тактики вакцинации детей в Свердловской области, необходимо исследовать

уровень антител в сыворотке крови к капсульному полисахариду *H. influenzae* серотипа "b", вызывающему наиболее тяжелые инфекции.

Литература

1. Боронина Л.Г. Гнойно-септические и раневые инфекции. Гемофильная палочка. Руководство по военной микробиологии / под ред. В.Б. Сбойчакова, К.К. Раевского, В.М. Добрынина. М.: Военное издательство, 2005. 512 с.
2. Боронина Л.Г. Этиологическая диагностика гнойных бактериальных менингитов на среднем Урале у детей. Эпидемиология и инфекционные болезни. 2005; 3: 18-23.
3. Боронина Л.Г. Характеристика возбудителей нейроринфекций у детей Свердловской области. Уральский медицинский журнал. 2006; 1(20): 12-9.
4. Боронина Л.Г., Крутова К.В., Блинова С.М. Возбудители инфекций бронхо-легочной системы у детей в Екатеринбурге и Свердловской области и их антибиотикорезистентность. Материалы VI Российского съезда врачей инфекционистов. СПб, 29-31 октября, 2003 г. 463 с.
5. Воронина Л.Г., Богданович Т.М., Кречикова О.И., Фаустова М.Е. Выделение, идентификация и определение чувствительности к антибиотикам *Haemophilus influenzae*. Клиническая микробиология и антибактериальная химиотерапия. 2003; 3: 34-62.
6. Страчунский Л.С. Выделение, идентификация и определение чувствительности к антибиотикам *Haemophilus influenzae*. Современные методы клинической микробиологии. Смоленск, 2003; 1: 256 с.
7. Боронина Л.Г., Козлова Л.Я., Рухтаева Г.Д. Инфекции, вызванные *H. influenzae*, у детей Екатеринбурга и Свердловской области. Актуальные проблемы эпидемиологии, профилактики инфекционных болезней. 2002; 5: 4-9.
8. Катосова Л.К., Наймушина Н.Б., Сатаров Г.Н. Сравнительная характеристика штаммов *H. influenzae*, выделенных от здоровых детей и больных острыми и хроническими бронхо-легочными заболеваниями. Журнал микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 1986; 1: 14-8.
9. Таточенко В.К., Катосова Л.К., Зейрарик М.В., Богомилский М.Р., Кузнецова Т.А., Нурманов Ш.Н. К вопросу о частоте инфекций, вызванной *Haemophilus influenzae* типа b. Актуальные вопросы эпидемиологии, клиники, диагностики и профилактики инфекций, вызываемой *H. influenzae* тип b: сб. тр. научно-практической конференции АМН. М., 1998: 45-9.
10. Воронина Л.Г., Коточикова Л.Д., Мамаев И.Л., Кукушкина М.П. Микробиологический мониторинг за бактериальными менингитами у детей. Клин. лаборат. диагност. 1999; 11: 17-8.
11. Демина А.А., Боронина Л.Г., Спирихина Л.В., Крючкова Г.В., Сорокина М.В., Волкова М.О., Гордиенко Т.А., Веселова Т.М. Эпидемиологические особенности менингитов, вызванных *H. influenzae* типа "b". Эпидемиология и инфекционные болезни. 1998; 4: 36-40.
13. Боронина Л.Г., Кукушкина М.П., Блинова С.М., Мотус Т.М. Этиология внебольничных пневмоний у детей в г. Качканар Свердловской области в 2001 году. Медицинская микробиология - XXI век: Материалы Всероссийской научно-практической конференции. Саратов, 2004: 248.
14. Костюкова Н.Н., Коржуева Н.А., Деркач С.А., Багирова Л.Ш., Мерзенюк З.М., Гульман Л.А., Ниякая В.Н., Волкова М.О. Этиологическая структура бактериальных менингитов в различных регионах. Журн. микробиол. 1992; 7-8: 14-7.
15. Albritton W.L. *Haemophilus influenzae*: comparison of respiratory tract isolates with genitourinary tract isolates. J. Clin. Microbiol. 1982; 16(5):826-831.
16. Grondahli B. Characterisation of invasive and non-invasive *Haemophilus influenzae* - isolates in a highly vaccinated population. Abstract of the 15th European Congress of Clin. Microbiol. and Infectious Diseases. - Copenhagen April 2-5. 2005: 1353.
17. Derman S.J. Nasopharyngeal carriage of antibiotic resistant *Haemophilus influenzae* in healthy children. *Pediatr* 1979; 64(3): 287-291.
18. Gentile A. Acute bacterial meningitis: epidemiological pattern in a paediatric hospital. Abstracts of the 15th European Congress of Clin. Microbiol. and Infectious Diseases. Copenhagen April 2-5. 2005: 1668.
19. Faden H. Relationship between nasopharyngeal colonization and the development of otitis media in children. J of Infection Disease; 175(6).
20. Murray P.R., Baron E.J., Tenover F.C., Tenover F.C. Manual of Clinical Microbiology. 7th ed. Washington, 1999: 1773