

УДК:001.8[616.34:578.81-053.8(571.620-25)

ДИНАМИЧЕСКИЕ НАБЛЮДЕНИЯ ЗА УСЛОВНО-ПАТОГЕННЫМИ БАКТЕРИЯМИ ПРИ НАРУШЕНИЯХ КИШЕЧНОЙ МИКРОБИОТЫ У ВЗРОСЛОГО НАСЕЛЕНИЯ Г.ХАБАРОВСКА

Е.Ф.Завгородняя, Л.А.Сташкевич

ФБУН Хабаровский НИИ эпидемиологии и микробиологии Роспотребнадзора, г. Хабаровск

Изложены результаты многолетних исследований кишечной микробиоты, пейзажа и распространенности условно-патогенных бактерий (УПБ) и грибов рода *Candida* у взрослого населения г. Хабаровска, крупного промышленного центра Дальнего востока. Установлена значительная частота распространенности дисбиотических нарушений у взрослого населения и выраженная сезонная динамика с увеличением распространенности весной и осенью. Показаны изменения в характере нарушений кишечной микрофлоры, выявлены основные виды УПБ, регулярно циркулирующие у взрослых. В структуре микробиоценозов кишечника взрослых лидирующими были *K. pneumoniae*, удельный вес которых составлял 23,6%. Показан также значительный рост выделения грибов рода *Candida*, лидировавших в биоценозах в летний период. Установлено наличие более глубоких изменений микробиоты при выделении многокомпонентных микробных и/или микробно-грибковых ассоциаций. Выявлен высокий уровень (46,2%) фагорезистентных УПБ и их преимущественная изоляция из ассоциаций.

Ключевые слова: взрослые; микробиота кишечника; дисбиотические нарушения кишечника; УПБ; фагорезистентность УПБ.

DYNAMIC OBSERVATIONS OF THE OPPORTUNISTIC PATHOGENIC BACTERIA AMONG ADULT POPULATION WITH IMBALANCED GUT MICROBIOTA IN THE CITY OF Khabarovsk

E.F. Zavgorodnyaya, L.A. Stashkevich

Federal State Institution of Science State Khabarovsk research institute of epidemiology and microbiology of Federal service for surveillance on customer rights protection and human wellbeing (Rospotrebnadzor), Khabarovsk, Russia

The findings of the long-term research of the resident gut microbiota, microflora and prevalence of opportunistic pathogenic bacteria, as well as yeasts - *Candida* among the adult population of the city of Khabarovsk, a large industrial center of the Russian Far East, were stated. It is found that considerable prevalence rate of disbiotic disorders among adult population and expressed seasonal dynamics with increase in spring and autumn. The changes were shown in the nature of gut microflora imbalance. The major types of opportunistic pathogenic bacteria were found among adults on a regular basis. *K. pneumoniae* was most abundant in the structure of microbiocenosis, its weight was 23.6%. The considerable growth of *Candida* was displayed mostly in the summer time period. The existence of much deeper changes in microbiota during discharge of multicomponent microbial and/or microbial-fungal associations was identified. Was determined a high level (46.2%) of phago-resistant opportunistic pathogenic bacteria and their primary isolation from associations.

Key words: adults, gut microbiota, disbiotic bowel disorders, opportunistic pathogenic bacteria, phagoresistant opportunistic pathogenic bacteria.

В настоящее время активно развиваются новые направления в исследовании молекулярных основ здоровья человека. В соответствии с современными представлениями одной из главных причин как риска возникновения, так и роста различных инфекционных и хронических метаболических

заболеваний таких, как гипертоническая болезнь, атеросклероз, диабет 2-ого типа, онкологическая патология и др. является взаимоотношение между организмом человека и его микрофлорой [6,17,18], особенно кишечной как самой многочисленной. Показано, что в таких сложных биологических системах как организм человека, различные представители микробиоты участвуют в метаболических процессах в отдельных клетках, а также в органах и тканях всего организма хозяина.

Установлено, что в микробиоме (совокупности всех генов микробиоты человека) число генов на несколько порядков больше, чем количество генов генома хозяина [6]. На важность и необходимость расширения и углубления исследований кишечной микробиоты указывали многие исследователи как ранее [2,4,5,9], так и в последние годы [1,3,8].

Все это требует с одной стороны дальнейшего и более глубокого изучения роли микробиоты в функционировании организма хозяина, а с другой – более детального исследования ее структуры .

В связи с вышеизложенным изучение структуры кишечной микробиоты, особенно у лиц, проживающих в неблагоприятных условиях среды обитания, а также распространенности среди изолированных от них условно-патогенных микроорганизмов (УПМ) продолжает оставаться актуальной проблемой.

Цель исследования

Продолжение многолетнего изучения частоты распространенности дисбиотических нарушений кишечной микробиоты, ее сезонной структуры, а также чувствительности УПМ к отечественным бактериофагам у взрослого населения г. Хабаровска.

Материалы и методы

Объектом исследования служили взрослые лица, обращавшиеся в ФБУН Хабаровский НИИЭМ для бактериологической диагностики дисбактериоза кишечника, а также изолированные от них штаммы УПМ. В течение 2011- 2015 годов проводились сезонные исследования кишечной микрофлоры взрослых лиц, проживающих в г. Хабаровске. Всего обследовано 1336 человек, в том числе в зимний период – 322 человека, 327 – весной, 337 – летом и 350 – осенью, а также идентифицировано 1895 изолированных от них штаммов УПМ. Исследования кишечной микрофлоры и оценка результатов проводились по стандартной методике [16], идентификация микроорганизмов – классическим микробиологическим методом, отдельных штаммов - с помощью баканализатора Vitek-2 Compact 30 фирмы «Biomerieux» (Франция), а также хромогенных сред «Hi Media» (Индия). Изучена литическая активность бактериофагов по отношению к 1197 штаммам УПБ, изолированным от взрослых с дисбиотическими нарушениями кишечника, в том числе 338 штаммов *S.aureus*, 276 – *Klebsiella pneumoniae*, 141 – *Klebsiella oxytoca*, 33 – *Proteus vulgaris*, 37 – *Proteus mirabilis*, 131 – гемолитических *E.coli* (*E.coli* гем +), 197 – *E.coli* лактозонегативных (*E.coli* лак -). Литическая активность специфических бактериофагов в отношении изолированных УПБ определялась методом «стерильных пятен» с использованием монофагов «Стафилококковый» и «Клебсиелл пневмонии» предприятия «Микроген» (г.Пермь), а также поливалентного «Коли-протейного бактериофага» предприятия «Микроген» (г. Нижний Новгород). Статистический анализ проводился по стандартным методикам с использованием t- критерия Стьюдента; достоверным считали различия, при которых вероятность ошибки была $p < 0,005$ [14].

Результаты и обсуждение

В результате проведенного исследования установлено, что дисбиотические нарушения у взрослого населения регистрировались в течение всего наблюдаемого периода ежегодно и ежесезонно. (табл.1)

Таблица 1

Распространенность дисбиотических нарушений кишечника у взрослых жителей г. Хабаровска по сезонам года (суммарные данные 2011 – 2015 гг.)

Годы	Сезоны			
	Зима % ± m	Весна % ± m	Лето % ± m	Осень % ± m
2011	n =53 69,8± 6,3	n=64 89,1± 3,9	n= 68 79,4± 4,9	n =57 82,5± 5,0
2012	n = 98 43,9±5,0	n = 86 93,1± 2,6	n = 75 89,3± 3,6	n = 98 90,8±2,0
2013	n=34 67,6±8,0	n=49 87,8±4,7	n=53 47,2± 4,6	n=78 69,2±5,2
2014	n=62 88,3±4,3	n=52 84,6±5,0	n=71 81,7±4,6	n=48 79,2±5,9
2015	n=75 65,3±5,5	n=76 82,9±4,3	n=70 67,1± 5,6	n=69 89,9±3,6
Всего	n=322 63,1±3,3	n=327 87,8±2,6	n=337 74,5± 2,4	n=350 82,9±2,0

Наиболее выраженные статистически значимые показатели зарегистрированы у этой группы обследуемых в весенний и осенний периоды 2012 года ($p < 0,001$ – зима - весна и зима - осень); в остальные годы также прослеживается аналогичная тенденция, выраженная и в суммарных данных за пятилетие.

У лиц с дисбиотическими нарушениями кишечника отмечается значительный рост в составе микробиоты УПБ и грибов рода *Candida*, регистрируемый как по отдельным сезонам, так и суммарно за пятилетие. Распространенность дисбактериоза, обусловленного этими микроорганизмами, составила суммарно $68,5\% \pm 1,7$ со следующим распределением по сезонам: зима – $66,5\% \pm 4,0$, весна – $68,9\% \pm 0,2$, лето – $60,2\% \pm 3,0$ и осень – $76,2\% \pm 2,9$. Наибольшая распространенность характерна для осеннего и, в меньшей степени, весеннего сезонов ($p < 0,001$).

В структуре микроорганизмов, изолированных от взрослых лиц, лидирующими были *K.pneumoniae*, составившие $23,6\% \pm 2,0$, за которыми в убывающем порядке следовали грибы рода *Candida*, *S.aureus*, и *K.oxytoca* (рис.1).

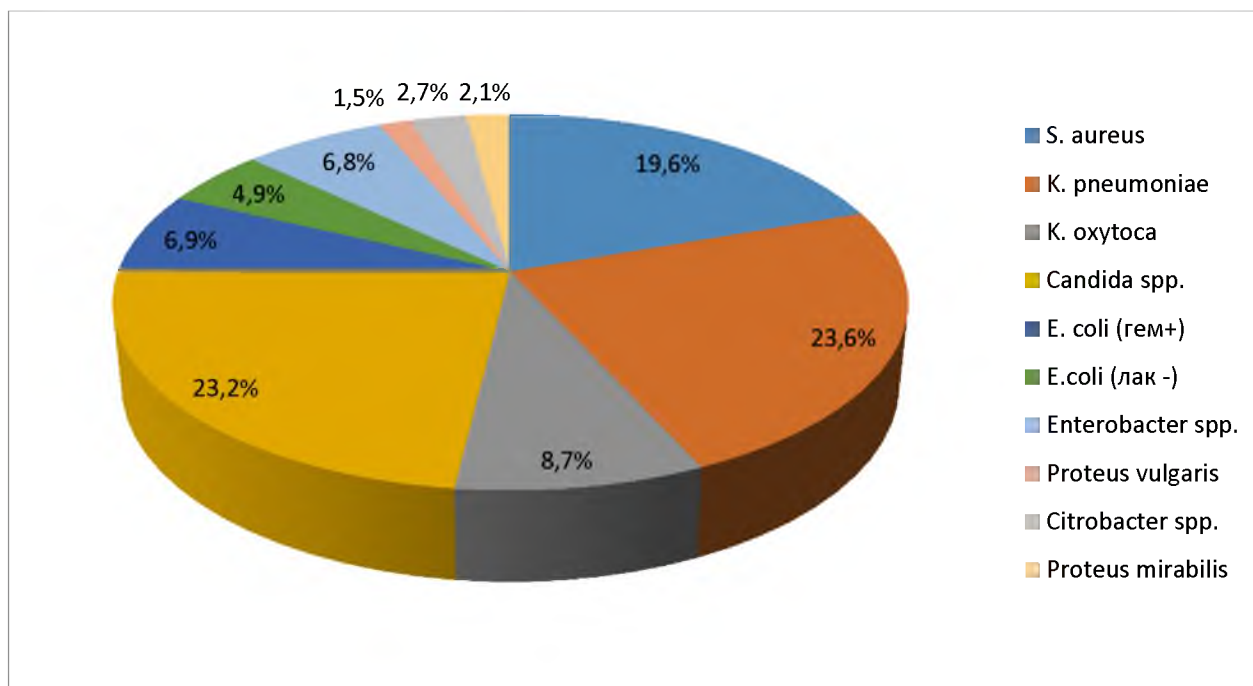


Рис.1 Структура ОПМ в кишечной микробиоте взрослых с дисбиотическими нарушениями (суммарные данные 2011 - 2015 годов)

Следует отметить, что подобное распределение по частоте встречаемости преобладающих групп ОПМ регистрировалось ежегодно в течение всех лет и сезонов наблюдения. Характерным для биоценозов взрослых было также увеличение изоляции *E.coli* (hem+) и бактерий, относящихся к роду *Enterobacter*, выявленных в период 2014-2015 годов. Кроме того, для этой группы обследуемых характерна смена лидирующих микроорганизмов, когда на 1-е место выдвинулись *K.pneumoniae*, а *S.aureus* переместились лишь на 3-е.

Анализ сезонности изоляции наиболее часто встречаемых ОПМ в кишечной микробиоте взрослых позволил установить преобладание *K.pneumoniae* в зимний и осенний периоды (удельный вес 23,4 и 26,1 % в составе биоценоза), *S.aureus* - весной и грибов рода *Candida* – летом (22,0 и 28,8% соответственно) – рис.2, что отличается от параметров микрофлоры детей [11].

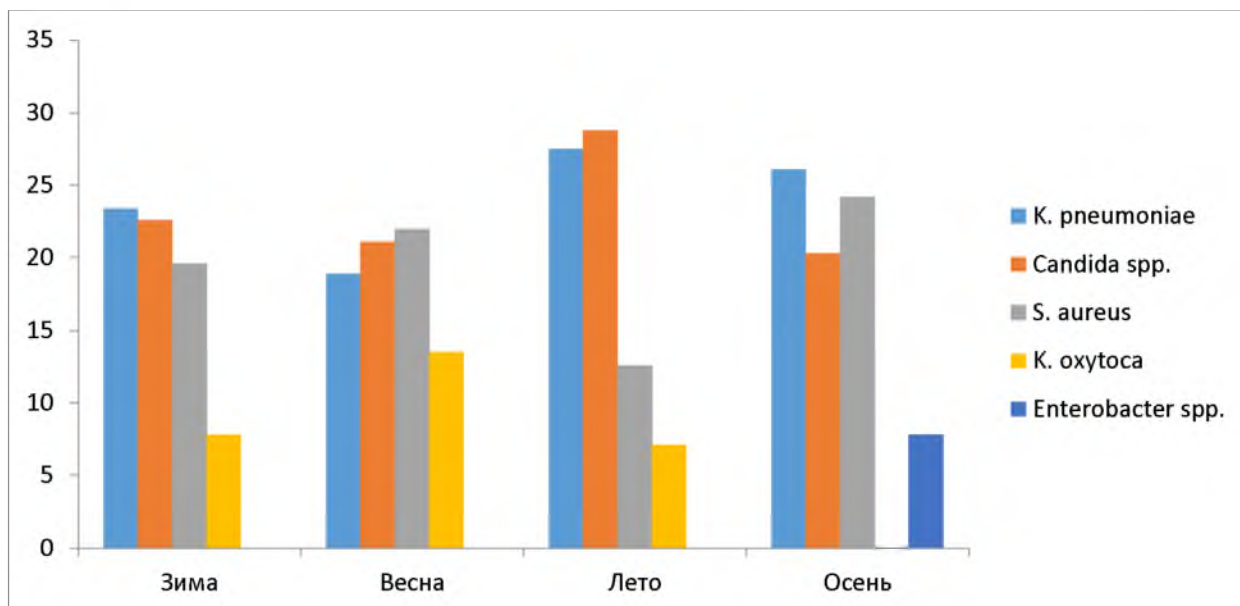


Рис. 2 Сравнительная динамика наиболее часто встречаемых УПМ в кишечной микробиоте взрослых в различные сезоны года (суммарные данные 2011 – 2015 годов)

Характеризуя сезонную динамику УПМ в структуре кишечной микробиоты в целом, следует подчеркнуть значительное увеличение изоляции грибов рода *Candida*, которые в зимний и весенний периоды вышли на 2-е место в составе биоценозов после *K.pneumoniae* и только в осенний период – на 3-е место. В 70% случаев грибы рода *Candida* изолировались от лиц старше 60-ти лет и, как правило, из многокомпонентных грибково-микробных ассоциаций. Преобладающими видами грибов рода *Candida*, обнаруживаемых в количестве, превышающим возрастную норму, были виды *albicans* (44,1%) и *glabrata* (39,0%), далее следовали *krusei* (10,9%) и *tropicalis* (6,0%).

Дальнейшие исследования позволили установить увеличение в течение последних лет числа дисбактериозов, обусловленных микробными и грибково-микробными ассоциациями. Так, если в 2011 г. ассоциации были выявлены у 8,3% взрослых, в 2013 г. – у 10,8%, то в 2014 и 2015 годах соответственно у 12,9 и 12,1%. В 2011 и 2012 годах в этой группе лиц преобладали 2-х компонентные ассоциации; с 2013 года начинается рост 3-х и 4-х компонентных, а в 2015 году число лиц с 4-х компонентными ассоциациями составляет 14,5% от числа всех лиц, имеющих ассоциативный дисбактериоз кишечника. Наиболее часто встречались ассоциации *K.pneumoniae* + *S.aureus*, *K.pneumoniae* + *S.aureus* + *E.coli* (гем+). Частым ассоциантом в биоценозах этой группы обследуемых стали грибы рода *Candida*, которые часто встречались в многокомпонентных ассоциациях. Наибольшее количество таких ассоциаций регистрировалось в летний и осенний периоды.

При изучении чувствительности изолированных штаммов УПБ к отечественным бактериофагам выявлен высокий уровень (46,2%) фагореизистентных. Наиболее высокий процент фагореизистентных изолирован у следующих штаммов: *Proteus mirabilis*, *Klebsiella oxytoca*, *Proteus vulgaris* и *Klebsiella pneumoniae* (89,2, 78,0, 72,7 и 69,2 соответственно); в 2015 году по сравнению с 2014 годом значительно увеличилось число фагореизистентных штаммов среди *E.coli* (гем +) и *E.coli* (лак -) - 46,7 и 37,6 % соответственно и уменьшилось до 17,0% - среди *S.aureus*. Изоляция фагореизистентных штаммов УПБ чаще происходит из микробных или грибково-микробных ассоциаций. Это особенно характерно для штаммов *S.aureus* и *E.coli* (гем +), у которых из ассоциаций изолировалось соответственно в 4 и 2 раза больше фагореизистентных штаммов, чем из монокультур ($p < 0,01$), а также штаммов *Klebsiella* spp. Следует отметить, что длительная циркуляция фагореизистентных штаммов в микробиоте, очевидно, поддерживает продолжительность дисбиотического нарушения у конкретного индивидуума.

Одной из возможных причин высокого уровня фагореизистентных штаммов *Klebsiella pneumoniae*, которые стали регистрироваться в нашем регионе с 2014 года, является смена доминировавшего штамма (клона). Кроме того, другой причиной, возможно, служит малое представительство или даже полное отсутствие штаммов УПБ, изолированных от лиц нашего региона, в процессе изготовления бактериофагов. Этот вопрос требует должной проработки и активной деятельности по включению дальневосточных штаммов в производство бактериофагов.

Наши данные по изучению фагореизистентности отдельных видов УПБ значительно превышают показатели, приведенные в работах отечественных исследователей [10,15], а результаты по *S.aureus* – в исследованиях [13]. Наиболее близки наши показатели к данным И.А.Бочкова с соавт. [7].

Результаты по резистентности родов Клебсиелла, Протей, E.coli (гем+) и (лак -) во многом совпадают с данными, представленными в работе [12]. Следует также подчеркнуть, что как в наших более ранних работах [11], так и в настоящем исследовании установлено наличие наибольшего числа S.aureus и бактерий рода Klebsiella, изолированных из микробных ассоциаций, чем из монокультур.

Заключение

Результаты проведенных исследований свидетельствуют о продолжающейся тенденции к росту частоты распространенности дисбиотических нарушений у взрослых жителей г.Хабаровска, выявленной в исследуемый период у 77,2% лиц. Наиболее значительные показатели распространенности этого состояния регистрируются ежегодно в весенний и осенний периоды. Дисбиотические нарушения кишечника, обусловленные наличием УПБ и грибов рода Candida (суммарно за 2011-2015 годы), выявлены в 68,5% случаев. По данным пятилетнего исследования кишечной микробиоты взрослых, в структуре микроорганизмов, лидирующими в зимний и осенний периоды, были K.pneumoniae, весной - S.aureus, летом – грибы рода Candida со сменяющимся сезонным преобладанием того или иного вида УПБ. Прослеживается также существенный рост выделения УПБ в ассоциациях между собой и/или с грибами рода Candida. Наиболее часто встречающимися являются ассоциации K.pneumoniae+S.aureus, K.pneumoniae + S.aureus+E.coli (гем+), а также ассоциации Candida spp. с одним или несколькими представителями УПБ. При дисбиотических нарушениях отчетливо проявляется тенденция к увеличению многокомпонентных (3-х и 4-х) микробных или грибково-микробных ассоциаций. Отмечен выраженный рост числа фагорезистентных УПБ, а также статистически достоверно большая их изоляция из ассоциаций.

Полученные результаты могут быть использованы в лабораторной практике, где необходимо постоянно контролировать чувствительность УПБ к соответствующим бактериофагам для решения вопроса о целесообразности фаготерапии как одного из первых этапов коррекции микрофлоры кишечника, а также лечения выраженного патологического процесса кишечной или внекишечной локализации. Кроме того, данные по изучению спектра УПБ, ежегодно циркулирующих у населения, могут и должны послужить направлением деятельности соответствующих организаций в разработке и изготовлении новых бактериофагов.

В связи со значительным ростом в последние годы частоты выявления при дисбактериозах многокомпонентных ассоциаций, возможно, стоит несколько изменить или дополнить установленное ОСТом [16] разделение нарушений кишечной микробиоты на три степени выраженности дисбиотических нарушений, увеличив их число до четырех при наличии у конкретного индивидуума 3-х, 4-х или более ассоциаций УПБ и грибов рода Candida.

Учитывая высокую фагорезистентность штаммов УПБ, изолированных от жителей г.Хабаровска, считаем важным обратить внимание фаговых производств на необходимость при производстве бактериофагов обязательно использовать штаммы дальневосточного региона или материалы, их содержащие.

В связи с наиболее неблагоприятным состоянием кишечной микробиоты в весенний и осенний периоды считаем необходимым рекомендовать проведение сезонной профилактики дисбиотических нарушений пробиотическими препаратами или продуктами на их основе не только детям, но и взрослым жителям г.Хабаровска в течении одного месяца весной и осенью. Это послужит важным фактором нормализации микрофлоры кишечника, укреплению иммунитета и, как следствие – снижению общей и инфекционной заболеваемости.

Литература

1. Алексанина Н.В., Твердохлебова Т.И. Динамика параметров микробиоценоза кишечника детей на протяжении первого года жизни в зависимости от характера вскармливания // Педиатрия. – 2016. – Т. 95, № 1. - С.156-158.
2. Белокрысенко С.С. Дисбактериоз кишечника с точки зрения микробиолога //Клинич. лаб. диагностика. – 2010. - №7. – С.47-49.
3. Бисенева Н.М., Абжалимов А.Б., Митус Н.М. и др. Динамика выделения условно-патогенных энтеробактерий при дисбактериозе кишечника // Национальные приоритеты России. - 2009. - № 2. - С. 235-236.
4. Бондаренко В.М., Грачева Н.М., Мацулевич Т.В. Дисбактериоз кишечника у взрослых.-М.: КМК Scientific Press, 2003. -224 с.
5. Бондаренко В.М., Мцулевич Т.В. Дисбактериоз кишечника как клиничко-лабораторный синдром: современное состояние проблемы- М., ГОЭТАР-Медиа, 2007. - 333 с.
6. Бондаренко В.М., Рыбальченко О.В. Анализ профилактического и лечебного действия пробиотических препаратов с позиции новых научных технологий //Журн. микробиол. -2015. - №2. – С.90-104.
7. Бочков И.А., Лавренова Э.С., Юрко Л.П. Влияние лечебных бактериофагов на условно-патогенную и симбиотическую микрофлору толстой кишки // Эпидемиология и инфекционные болезни. – 2009. - №.9. - С.48-51.

8. Булатова Е.М., Богданова Н.М., Лобанова Е.А. и др. Кишечная микробиота: современные представления. // Педиатрия . – 2009. – Т. 87, № 3. - С. 104-110.
9. Дисбиоз кишечника. Руководство по диагностике и лечению. / Под редакцией Е.И.Ткаченко и А.Н.Суворова -2 изд. – С.Петербург: ИнформМед, 2009. – 276 с.
10. Дроздова О.М. Бруси́на Е.Б. Применение бактериофагов в эпидемиологической практике; взгляд через столетие // Эпидемиология и инфекционные болезни - 2010.- № 5. - С.20-24.
11. Завгородняя Е.Ф., Сташкевич Л.А., Битус Е.А. Характеристика кишечных биоценозов у детей с дисбиотическими нарушениями //Дальневосточный журнал инфекционной патологии. – 2010 . - № 17. - С.148-152.
12. Катаева Л.В., Вакарина А.А., Нижегородцева Н.Ф. Оценка литической активности некоторых бактериофагов //Материалы междунар. науч.-практич.конф. «Бактериофаги: теоретические и практические аспекты применения в медицине, ветеринарии и пищевой промышленности». - Ульяновск, 2013. - С.17-22.
13. Лавренова Э.С., Юрко Л.П., Славнов Н.Н. и др. Влияние лечебных бактериофагов на микрофлору толстой кишки // Инфекционные болезни.- 2012. –Т. 10, № 2. - С.56-60.
14. Мерков А.М и др. Санитарная статистика: пособие для врачей/ А.М.Мерков, Л.Е.Поляков , Л.: «Медицина», 1974. 384с.
15. Оришак Е.А., Бойцов А.Г. Нилова Л.Ю. Антибиотикорезистентность и фагорезистентность условно-патогенной микрофлоры при дисбактериозе толстого кишечника //Эпидемиология, микробиология, инфекционные и паразитарные болезни. – 2008.- №4 (29). - С.167-170.
16. Отраслевой стандарт «Протокол ведения больных. Дисбактериоз кишечника» (ОСТ 91500.11.0004. 2003). Приказ МЗ РФ № 231 от 9 июля 2003г. «Об утверждении отраслевого стандарта «Протокол ведения больных. Дисбактериоз кишечника». – М., 2003. – 173с.
17. Шендеров Б.А. «ОМИК» технологии и их значение в современной профилактической и восстановительной медицине //Вестник восстановительной медицины. -2012.- №3.-С.70-78
18. Шендеров Б.А. Роль питания и кишечной микрофлоры в программировании и реализации эпигенома здоровых и больных людей //Вестник восстановительной медицины. – январь 2013, специальный выпуск. – С. 102-107.

Сведения об авторах:

Завгородняя Елена Федоровна – кандидат медицинских наук, ведущий научный сотрудник лаборатории паразитологии ФБУН Хабаровский НИИ эпидемиологии и микробиологии Роспотребнадзора, 680610, г. Хабаровск, ул. Шевченко 2, тел. 8 (4212) 32-88-93 E-mail: adm@hniiem.ru