

ОБОСНОВАНИЕ РАСШИРЕНИЯ СПЕКТРА ВЫЯВЛЯЕМЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ ПРИ ИССЛЕДОВАНИИ НА ДИСБИОЗ КИШЕЧНИКА

¹Оришак Е.А. (доцент кафедры)*, ¹Бойцов А.Г. (профессор кафедры), ²Щеглов В.С. (зав. отд.)

¹Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова (кафедра медицинской микробиологии); ²ЗАО «Ситилаб», Санкт-Петербург, Россия

© Коллектив авторов, 2013

Обоснована необходимость расширения спектра выявляемых микроорганизмов при диагностике дисбиоза кишечника. С введением полимеразной цепной реакции как элемента рутинного исследования на дисбиоз частота регистрации возбудителей кишечных инфекций, включая вирусы и кампилобактеры, выросла с 2,4% до 23,3%. При этом возбудителей кишечных инфекций бактериальной этиологии в разных возрастных группах выявляли в 4,4-14,0% случаев, вирусной этиологии – у 8-20% лиц, обследованных на дисбиоз кишечника. Рассмотрены изменения микробиоценоза в случаях выявления возбудителей кишечных инфекций.

Ключевые слова: астровирусы, дисбиоз кишечника, кампилобактериоз, кишечные инфекции, норовирусы, ПЦР, ротавирусы

JUSTIFICATION FOR EXTENSION OF THE REVEAL MICROORGANISMS SPECTRUM IN INTESTINAL DYSBIOSIS RESEARCH

¹Orishak E.A. (associate professor), ¹Boitsov A.G. (professor of the chair), ²Shcheglov V.S. (head of the department)

¹North-Western Medical University named after I.I. Mechnikov (Chair of Medical Microbiology); ²ЗАО «CITILAB», Saint-Petersburg, Russia

© Collective of authors, 2013

The necessity of expanding of the reveal microorganisms spectrum in the intestinal dysbiosis diagnostics was justified. After the introduction of polymerase chain reaction as part of routine dysbiosis research the frequency of registered agents of intestinal infections, including viruses and Campylobacter, increased from 2,4% to 23,3%. The intestinal infections agents of bacterial etiology were identified in different age groups in the 4,4-14,0% of cases, the intestinal infections agents of viral etiology – in 8-20% of patients. The changes in intestinal microbiota in cases of enteric infection agents identification have been described.

* Контактное лицо: Оришак Елена Александровна, тел. (812) 543-19-20

Key words: astrovirus, campylobacteriosis, dysbiosis, intestinal infections, norovirus, PCR, rotavirus

ВВЕДЕНИЕ

Заболевания, протекающие с синдромом диареи, продолжают оставаться актуальной проблемой в Российской Федерации. Частота эпизодов диареи у грудных детей колеблется от одного до трех в течение первого года жизни. В зависимости от степени нарушения самочувствия, тяжести диспепсического синдрома и данных анамнеза эти эпизоды расценивают по-разному: чаще – как транзиторную ферментативную недостаточность либо дисбиоз, реже – как инфекционную диарею [1].

Как первичное состояние дисбиоз, как правило, встречается только у детей до года при нарушении формирования кишечного микробиоценоза. Однако дисбиоз кишечника может маскировать острые кишечные инфекции (ОКИ), усиливаясь или появляясь на их фоне. В ходе исследования на дисбиоз кишечника иногда диагностируют кишечные инфекции, возбудители которых влекут изменения в составе микробиоты. Патогенные энтеробактерии могут быть обнаружены не менее чем у 0,7% лиц, обследованных по поводу дисбиоза [2]. При отсутствии расширенного микробиологического исследования лечение может быть безуспешным. При рутинном исследовании на дисбиоз кишечника, без целенаправленного выявления прочих возможных возбудителей ОКИ – кампилобактеров, вирусов, простейших, патогенные микроорганизмы выявляют у ничтожно малого количества пациентов. Большой интерес представляют работы, обосновывающие взаимосвязь неинфекционной патологии с перенесенными ранее кишечными инфекциями, которые часто протекают под маской обострения основного неинфекционного заболевания или под маской дисбиоза, как, например, синдрома раздражённого кишечника (СРК) [3]. Установлено, что риск развития СРК выше после перенесенного кампилобактериоза, сальмонеллеза, шигеллеза [4, 5]. В последние годы вирусные агенты занимают ведущее место среди этиологических факторов острых кишечных инфекций у детей во всем мире [6]. Доля бактериальных кишечных инфекций значительно снизилась и составляет 7-10%. Возросло число микст-инфекций (вирусно-бактериальных) до 15-17% [7]. Вклад возбудителей вирусной этиологии в общую структуру кишечных инфекций детей раннего возраста составляет 57,9% (ротавирусы – 35%, норовирусы – 16,7%, астровирусы – 6,2%) [8].

По данным ФГУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, структура заболеваемости ОКИ в РФ за 2012 г. выглядела следующим образом: сальмонеллез – 6,5%, шигеллез – 1,8%, другие острые кишечные инфекции установленной этиологии – 27,4%, кишечные инфекции неустановленной этиологии – 64,3% [9].

Возможность использования ПЦР для установления этиологической структуры ОКИ существенно увеличивает процент расшифровки. ПЦР для диа-

гностики вирусных инфекций имеет ряд таких преимуществ перед другими методами диагностики (культуральный и серологический), как универсальность методики для широкого спектра возбудителей, высокая чувствительность и специфичность, невысокая себестоимость. Разработанные системы для обнаружения кампилобактеров и иерсиний также упрощают процесс диагностики инфекций, вызванных трудно культивируемыми микроорганизмами, и позволяют своевременно начать антибактериальную терапию. Учитывая высокий уровень распространения острых кишечных инфекций у детей, данная возрастная группа особенно нуждается в комплексном микробиологическом обследовании с поиском наиболее вероятных возбудителей кишечных инфекций и оценкой микробиоценоза кишечника.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

С целью бактериологической диагностики дисбиоза кишечника за период 2009-2010 гг. стандартной методикой было проведено обследование 8174 человек: 5092 ребенка в возрасте до 12-ти месяцев, 2101 – от одного года до шести лет и 981 – старше шести лет. Исследуемый материал поступал из 59 многопрофильных клиник Санкт-Петербурга в клинко-диагностическую лабораторию ЗАО «СИТИ-ЛАБ».

Обследование включало выделение бифидобактерий, лактобактерий, кишечных палочек с типичными и атипичными свойствами, условно-патогенных и патогенных энтеробактерий, неферментирующих грамотрицательных бактерий, стафилококков, гемолитических форм микроорганизмов, энтерококков, *Candida* spp. Посевы на плотные среды производили по методу Gold, на полужидкие среды однорядным «титрационным» методом [10]. Результаты оценивали в соответствии с нормативами, приведенными в Отраслевом стандарте «Протокол ведения больных. Дисбактериоз кишечника» 91500.11.0004- 2003 [11].

При комплексном обследовании на дисбиоз и кишечные инфекции, наряду с бактериологическим методом, применяли ПЦР с использованием набора праймеров «АмплиСенс® ОКИ скрин-FL» для выявления следующих возбудителей: *Adenovirus*, *Norovirus*, *Astrovirus*, *Rotavirus*, *Campylobacter* sp., *Salmonella* sp., EIEC (энтероинвазивные кишечные палочки / *Shigella* sp.), *Y. pseudotuberculosis*, *Y. enterocolitica*. С использованием ПЦР обследовано 150 пациентов в трех возрастных группах: 1) дети до года – 55 человек; 2) дети от года до шести лет – 45; 3) взрослые и дети старше шести лет – 50.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В ходе стандартной бактериологической диагностики дисбиоза проанализировали эффективность выявления возбудителей кишечных инфекций по результатам 8174 исследований фекалий. Во всех возрастных группах суммарно было выделено 114 штаммов диареогенных кишечных палочек, 60 иер-

синий и 25 сальмонелл (Рис. 1).



Рис.1. Выявление возбудителей ОКИ при стандартной методике исследований на дисбиоз

57% находок диареогенных *E.coli* (65 изолятов) обнаружили у детей до года, 35% (40 изол.) – у детей 1-6 лет и только 8% – у лиц старше 6 лет (9 изол.). 50 штаммов иерсиний были представлены *Y. enterocolitica* и 10 штаммов – *Y. pseudotuberculosis*. Отметим, что несомненный вклад в столь значительное количество находок иерсиний при проведении непрофильного исследования было связано с тем, что посев на иерсинии осуществляли на отдельную чашку с предварительной обработкой материала щелочью в соответствии с МР «Псевдотуберкулез и иерсиниоз» № 11-3/8-09 [12]. Эта методика не входит в спектр обязательных при рутинном проведении микробиологического исследования на дисбактериоз, при её отсутствии выявляемость иерсиний при исследовании на дисбактериоз значительно ниже. Находки иерсиний преобладали в группе детей старше 6 лет и взрослых – 42 штамма (70% от общего числа). В группе детей от года до 6 лет выделено 16 штаммов иерсиний (26,7%), в группе детей младше года – 2 штамма (3,3%). Сальмонеллы выявляли в возрастных группах равномерно: у детей от года до 6 лет – 10 (40% находок), до 1 года – 7 (28%), старше 6 лет и взрослых – 8 (32%).

Одновременно в микробиоценозе кишечника пациентов с выявленными диареогенными серотипами *E.coli* кишечными палочками наблюдали дисбиотические изменения. В группе детей до года отмечали возрастание количества условно-патогенных энтеробактерий (*Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., *Citrobacter* spp.) – у 35 человек (53,8% от числа пациентов с находками диареогенных кишечных палочек), присутствие *Staphylococcus aureus* – у 30 (48,4%), появление штаммов *E. coli* с гемолитическими свойствами – у 36 (55,4%), увеличение количества *Candida* spp. – у 6 (9,2%). В группе детей 1-6 лет выявляли возрастание числа условно-патогенных энтеробактерий в 14 пробах (35% от количества находок диареогенных кишечных палочек в данной группе), появление *E. coli* с гемолитической активностью – в 27 (67,5%), появление *S. aureus* – в 5 (12,5%), увеличение количества *Candida* spp. – в 1 (2,5%). В возрастной группе

детей старше 6 лет и взрослых изменение микробного пейзажа характеризовалось появлением гемолитических *E. coli* в 5 из 9 проб.

У лиц с положительным результатом на иерсинии дисбиотические изменения отмечали в 83% случаев (50 из 60). При этом в группе до года наблюдали увеличение количества условно-патогенных микроорганизмов: энтеробактерий – в 2 случаях, *S. aureus* и *E. coli* с гемолитической активностью – по одному случаю. В группе детей от 1 до 6 лет превышение числа условно-патогенных энтеробактерий имело место в 3 пробах (33,3%), *S. aureus* – в 3 (18,75%), *Candida* spp. – в 2 (12,5%), *E. coli* с гемолитической активностью – в 2 (12,5%), неферментирующих грамотрицательных бактерий (НГОВ) (*Acinetobacter* spp.) – в 1 (6,7%). У группы детей старше 6 лет и взрослых также установили возрастание условно-патогенных энтеробактерий в 8 пробах (19,1%), НГОВ (*P. aeruginosa*) – в 1 (2,3%), *E. coli* с гемолитическими свойствами – в 1 (2,3%), *Candida* spp. – в 3 (7,2%).

В группе детей до года при выявлении сальмонелл отмечали увеличение количества условно-патогенных энтеробактерий у 4 человек, наличие *S. aureus* – у 3, *E. coli* с гемолитическими свойствами – у 2. В группе детей 1-6 лет возрастание условно-патогенных энтеробактерий наблюдали в 5 образцах, наличие *S. aureus* – в 2, *E. coli* с гемолитической активностью – в 3, увеличение числа *Candida* spp. – в 1. В группе детей старше 6 лет и взрослых возрастание условно-патогенных энтеробактерий было у 1 пациента, появление *S. aureus* – также у 1.

При введении ПЦР в протокол исследования на дисбиоз кишечника количество выявляемых патогенов значительно возросло, преимущественно за счет дополнительного обнаружения вирусов и кампилобактера (Рис. 1, Рис. 2).

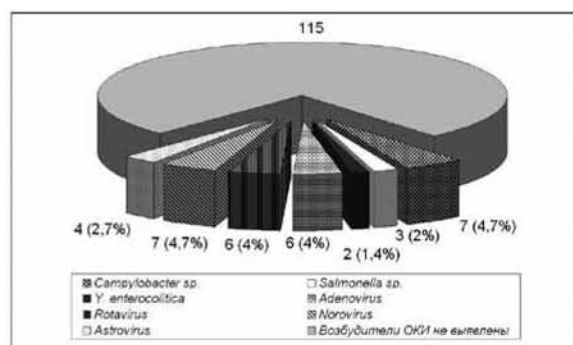


Рис. 2. Выявление возбудителей ОКИ при комплексном обследовании на дисбиоз

Обследованные пациенты представляли собой случайную выборку лиц, направленных врачами разного профиля для исследования на дисбиоз кишечника. Отбор по специфическим жалобам или клиническим проявлениям, указывающим на наличие кишечной инфекции, не производили с целью отразить истинную значимость расширения исследования. У 12 больных (8%) были выявлены бактериальные возбудители кишечных инфекций, в том числе: кампилобактер – у 7 человек (4,7%), сальмонеллы – у 3

(2%), *Y. enterocolitica* – у 2 (1,3%). У 23 обследованных лиц (15,3%) были обнаружены вирусные возбудители кишечных инфекций: *Adenovirus* – у 6 (4% обследованных), *Rotavirus* – у 6 (4%), *Norovirus* – у 7 (4,7%), *Astrovirus* – у 4 (2,7%). В группе детей до года вирусные возбудители имели место в 9 случаях (16,4% от числа детей до года), а бактериальные – в 3-х (5,4%). При этом *Y. enterocolitica* выявили у 2 детей (3,6%), кампилобактер – у 1 (1,8%), *Astrovirus* – у 2 (3,6%), *Rotavirus* – у 3 (5,4%), *Norovirus* – у 3 (5,4%), *Adenovirus* – у 1 (1,8%). В группе детей от года до шести лет вирусные возбудители определяли у 9 пациентов (20%), бактериальные – у 2 (4,4%), а именно: сальмонеллы – у 2 (4,4%), *Adenovirus* – у 1 (1,1%), *Norovirus* – у 3 (6,7%), *Astrovirus* – у 1 (2,2%), *Rotavirus* – у 1 (2,2%).

В 4,4% случаев в группе детей 1-6 лет наблюдали наличие микст-инфекции: у одного ребенка были одновременно выделены сальмонеллы и *Adenovirus*, а в одном случае обнаружили два вируса-возбудителя кишечных инфекций – *Rotavirus* и *Norovirus*. В группе детей старше шести лет и взрослых вирусные возбудители выявляли в 4 случаях (8% от числа обследованных в данной группе), а бактериальные – в 7 (14%); кампилобактер – у 6 человек (12%), сальмонеллы – у 1 (2%), *Astrovirus* – у 1 (2%), *Norovirus* – у 1 (2%), *Rotavirus* – у 2 (4%).

Согласно полученным данным, микробиоценоз кишечника детей до года наиболее часто подвержен дисбиотическим изменениям. Для оценки влияния бактерий и вирусов-возбудителей кишечных инфекций на формирование атипичного микробиоценоза сравнивали изменения в составе микробиоценоза кишечника лиц с выявленными возбудителями ОКИ и без них. Снижение количества бифидобактерий при дисбиозе с одновременным выявлением кишечных патогенов было наиболее выражено в группе детей до одного года – в 90 случаях (98,9%). Это подтверждает значительную роль дефицита бифидобактерий в развитии или поддержании дисбиоза, колонизации условно-патогенными микроорганизмами кишечного биотопа, так как снижению количества бифидобактерий сопутствовали изменения в количестве и составе УПИМ, включая ассоциации последних. В группе от года до шести лет и в группе детей старше шести лет и взрослых снижение количества бифидобактерий отмечали значительно реже (44,2% и 56,9% соответственно). Не было выявлено ни одного случая снижения количества лактобактерий в группе детей до одного года, тогда как в группах детей 1-6 лет и в группе детей старше шести лет и взрослых этот признак был представлен более значительно (61% и 54,2%). Примечательно также снижение количества *E. coli* с типичными свойствами и энтерококков в группе детей старше 6 лет и взрослых в 27,8% и 20,9% случаев соответственно, что не наблюдали в других возрастных группах. Снижение местной составляющей в разных возрастных группах имело определенные закономерности. Так, единственным значимым показателем изменений в индигенной

составляющей в группе детей до одного года было снижение количества бифидобактерий, в группе детей 1-6 лет – снижение количества лактобактерий; в группе пациентов старше шести лет – снижение всех индигенных микроорганизмов, однако определяющими показателями являлись снижение количества *E. coli* с типичными свойствами и энтерококков. И, напротив, в группе детей до одного года количество энтерококков не только не снижалось, но увеличивалось более чем в какой-либо другой группе (41,7%). При анализе возрастания числа условно-патогенных микроорганизмов (УПЭ, *Candida* spp., *S. aureus*, НГОБ) основные различия отмечали в показателях «увеличение количества условно-патогенных энтеробактерий» и «появление *S. aureus*». В группе детей до одного года увеличение количества УПЭ наблюдали у 56% детей, тогда как усредненный показатель при кишечных инфекциях составил 35,3%. В группе детей 1-6 лет данный показатель был сопоставим с усредненным значением при кишечных инфекциях и составил 32,6%. В группе детей до одного года *S. aureus* был выявлен у 41,7% детей, в остальных группах встречаемость *S. aureus* была незначительна. *E. coli* с гемолитической активностью преимущественно отмечали в группе детей до одного года (46,2%) и детей 1-6 лет (38,9%). Это единственный показатель, встречаемость которого в случаях выявления возбудителей кишечных инфекций была выше, чем при дисбиозах в целом. В группе детей старше шести лет и взрослых увеличение количества любых групп УПМ было крайне незначительным, т.е. имело место тенденция уменьшения вклада УПМ в формирование дисбиоза при наличии возбудителей кишечных инфекций по мере возрастного становления кишечного биоценоза.

Учитывая отсутствие характерных показателей в дисбиотических изменениях, которые позволили бы предположить наличие возбудителей кишечных инфекций, во всех случаях при обследовании на дисбиоз кишечника необходим поиск наиболее часто встречающихся патогенов. На основании полученных результатов можно говорить о необходимости введения в рутинную практику микробиологических лабораторий расширенного спектра исследований при диагностике дисбиоза с целью максимально полного выявления возбудителей кишечных инфекций.

ВЫВОДЫ

1. При рутинном исследовании на дисбиоз кишечника без целенаправленного обнаружения возбудителей кишечных инфекций (патогенных энтеробактерий, кампилобактеров, вирусов) патогенные микроорганизмы определяют у незначительного количества пациентов (2,4%). При использовании молекулярно-генетического метода исследования в комплексе с бактериологическим методом диагностики возрастает выявляемость кишечных инфекций (до 23,3%) у обследованных пациентов по поводу дисбиоза кишечника.

2. Дисбиотические изменения, развивающиеся на фоне кишечных инфекций, отличаются в разных возрастных группах. В группе детей до 12 месяцев имеет место снижение количества бифидобактерий у 98,9% человек и увеличение количества энтерококков – у 41,7%. В группе детей от года до шести лет наблюдали снижение лактобактерий у 61% больных. В группе пациентов старше шести лет установили снижение количества типичных кишечных палочек в 27,8% случаев и снижение количества энтерококков – в 20,9%.

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. Гончар Н.В., Березина А.В., Тихомирова О.В. и др. Выбор пробиотика для рациональной терапии клебсиеллезной инфекции у детей // Ж. микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. – 2009. – №2. – С. 85-89.
2. Войтенкова Е.В., Матвеева З.Н., Кафтырева Л.А. Находки возбудителей острых кишечных инфекций при исследовании на дисбиоз кишечника/ В кн.: Идеи Пастера в борьбе с инфекциями. – СПб.: НИИЭМ, 2008. – С. 113.
3. Симаненков В.И., Суворов А.Н., Захаренко С.М. и др. Пробиотики в терапии постинфекционного синдрома раздраженного кишечника // Гастроэнтерология Санкт-Петербурга. – 2009. – № 4. – С. 25-28.
4. Парфенов А.И., Ручкина И.Н. Синдром раздраженного кишечника // Медицинский вестник. – 2006. – №16. – С. 359.
5. Ruiz A., Garcia Rodriguez L.A., Paris J. Risk of irritable bowel syndrome after an episode of bacterial gastroenteritis in general practice: influence of comorbidities // Clin. Gastroenterol. Hepatol. – 2007. – Vol. 5, №4. – P. 465-469.
6. Горелов А.В. Терапия острых кишечных инфекций у детей в современных условиях // Вопросы современной педиатрии. – 2004. – №4. – С. 72-78.
7. Горелов А.В., Милутина Л.Н., Рейз А.Р. и др. Пути и перспективы изучения проблемы острых кишечных, респираторных инфекций и гепатитов у детей // Эпидемиология и инфекционные болезни. – 2009. – №2. – С. 51-57.
8. Боднев С.А., Малеев В.В., Жираковская Е.В. и др. Нововирусы как этиологический фактор острых кишечных инфекций у детей раннего возраста в Новосибирске // Эпидемиология и инфекционные болезни. – 2010. – №1. – С. 40-45.
9. Сведения об инфекционных и паразитарных заболеваниях (Форма 1) за январь - декабрь 2011 // Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии - <http://www.fcgsen.ru/> дата обращения: 20.08.2013.
10. Иванов В.Л. и др. Совершенствование методов диагностики дисбактериоза толстого кишечника: информационное письмо. – СПб., 2002. – 31 с.
11. ОСТ 91500.11.004–2003 (приложение) Протокол ведения больных. Дисбактериоз кишечника. – Утв. 09.06.03 г. – М., 2003. – 82 с.
12. Методические рекомендации «Псевдотуберкулез и иерсиниоз» № 11-3/8-09. утв. 11.05.04

Поступила в редакцию журнала 18.09.2013

Рецензент: Е.Б. Авалуева