

Материал поступил в редакцию: 23-04-2015

Материал принят к печати: 30-07-2015

УДК 616:579.61

Monitoring of intestinal microbiocenosis of children under 15 years

Nelya Bissenova, Aigerim Ergaliyeva, Aigul Kuanyshbekova, Marina Sitnikova

JSC «National Scientific Medical Center», Astana, Kazakhstan

The aim of this study: the monitoring of intestinal microbiocenosis of children under 15 years.

Methods: During 2012 - 2014 conducted prospective bacteriological examination of the large intestine 255 children under 15 years. Primary inoculation of clinical material was performed quantitative method to culture media in accordance with the regulations. The identification of isolates was performed by microbiological analyzer Vitek 2-Compact.

Results: From 2012 to 2014 bacteriological examination for intestinal dysbiosis characterized by a decrease the number of obligate microflora. Escherichia coli with normal enzymatic activity normally have been allocated 59.6±3.0% of the surveyed children, bifidobacteria were detected at 62.3±3.0%, only 16.0±2.3% of infants were identified in normal lactobacilli. The study showed a detection of opportunistic enterobacteria in 21.5±2.5% of patients (in particular bacteria of the genus Proteus, Klebsiella, Enterobacter), Candida in 18.8±2.4%, Staphylococcus aureus - 16.0±2.3%.

Conclusions: Intestinal microflora of infants is characterized by a decrease in the number of lactobacilli, bifidobacteria and E.coli with normal enzymatic activity. As part of intestinal microbiocenosis of children surveyed increased the number of opportunistic enterobacteria, Candida and Clostridium.

Key words: intestinal dysbiosis in children – bifidobacteria – lactobacilli - opportunistic enterobacteria.

J Clin Med Kaz 2015; 2(36):30-33

Автор для корреспонденции: Бисенова Неля Михайловна, руководитель микробиологической лаборатории Национального научного медицинского центра. Тел.: 8-701-405-39-96. E-mail: nelyabis@mail.ru

ОН БЕС ЖАСҚА ДЕЙІНГІ БАЛАЛАРДЫҢ ІШЕК МИКРОБИОЦЕНОЗЫНА ЖҮРГІЗІЛГЕН МОНИТОРИНГ

Бисенова Н.М., Ергалиева А.С., Қуанышбекова А.Б., Ситникова М.А.

«Ұлттық ғылыми медициналық орталық» АҚ, Астана, Қазақстан

Зерттеудің мақсаты: 15 жасқа толмаған балалардың ішек микробиоценозына мониторинг жүргізу.

Зерттеудің әдістері: 2012-2014 жылдар аралығында 1 жастан 15 жасқа дейінгі 255 бала арасында тоқ ішек микрофлорасына проспективтік бактериологиялық зерттеу жүргізілді. Клиникалық материалдың біріншілікті егуі нормативті құжаттарға сәйкес сандық әдіс арқылы жүзеге асты. Бөлінген микроорганизмдердің таза дақылдары «Vitek 2 - Compact» микробиологиялық компьютерлік анализаторында жүргізілді.

Нәтижесі: 2012-2014 жылдар аралығында берілген санаттағы балалардың ішек дисбактериозының бактериологиялық зерттеуі кезінде тоқ ішекте көбіне облигатты микрофлораның санының төмендеуі анықталды. Зерттелген балаларда қалыпты ферментативтік белсенділігі бар ішек таяқшасының шамамен 59,6±3,0% болса, бифидобактериялар нәжісте 62,3±3,0% балаларда анықталды, ал 1 жасқа толмаған балалардың 16,0±2,3% шамамен лактобациллалар анықталды. Факультативті микрофлораны зерттеу кезінде шартты - патогенді энтеробактериялардың шамамен 21,5±2,5% болса, Proteus, Klebsiella, Enterobacter туыстығына жататын бактериялар, сонымен қатар Candida туыстығына жататын саңырауқұлақтар 18,8±2,4%, ал патогенді стафилококктар 16,0±2,3% шамасында анықталған.

Қорытынды: Әр түрлі жастық санатта зерттелген балалардың ішек микрофлорасында лактобактериялар, бифидобактериялар және қалыпты ферментативтік белсенділігі бар E.coli-дің сандық сапасының біршама төмендеуі байқалған. Зерттелген балалар ішек микробиоценозының құрамында шартты-патогенді энтеробактериялардың, Candida туыстығына жататын саңырауқұлақтар, клостридиялардың біршама артқандығы байқалған.

Маңызды сөздер: балалардың ішек дисбактериозы – бифидобактериялар – лактобактериялар - шартты-патогенді энтеробактериялар.

МОНИТОРИНГ КИШЕЧНОГО МИКРОБИОЦЕНОЗА У ДЕТЕЙ ДО 15 ЛЕТ

Бисенова Н.М., Ергалиева А.С., Қуанышбекова А.Б., Ситникова М.А.

Национальный научный медицинский центр, Астана, Казахстан

Цель исследования: мониторингирование кишечного микробиоценоза у детей до 15 лет.

Методы: В течение с 2012 по 2014 годы проведено проспективное бактериологическое исследование толстого кишечника 255 детей в возрасте от 1 года до 15 лет. Первичный посев клинического материала проводили количественным методом на питательные среды в соответствии с нормативными документами. Идентификацию выделенных чистых культур микроорганизмов проводили на микробиологическом компьютерном анализаторе «Vitek 2 – Compact».

Результаты. В период с 2012 по 2014 годы при бактериологическом исследовании на дисбактериоз кишечника данной категории детей в основном дисбиоз толстой кишки был обусловлен снижением количества облигатной микрофлоры. Кишечная палочка с нормальной ферментативной активностью в норме была выделена у 59,6±3,0% обследуемых детей, бифидобактерии обнаруживались в фекалиях у 62,3±3,0% детей, только у 16,0±2,3% детей в норме были выявлены лактобациллы.

Исследование факультативной микрофлоры показало обнаружение условно-патогенных энтеробактерий у 21,5±2,5% обследованных (в частности бактериями рода Proteus, Klebsiella, Enterobacter), дрожжеподобных грибов рода Candida у 18,8±2,4%, патогенного стафилококка у 16,0±2,3% обследованных.

Выводы. Микрофлора кишечника детей данной возрастной категории характеризуется снижением количества лактобактерий, бифидобактерий и E.coli с нормальной ферментативной активностью. В составе кишечного микробиоценоза обследуемых увеличивается количество условно патогенных энтеробактерий, дрожжеподобных грибов рода Кандида и клостридий.

Ключевые слова: дисбактериоз кишечника у детей – лактобактерии – бифидобактерии - условно-патогенные энтеробактерии.

Введение

Дисбактериоз кишечника характеризуется разнообразием и неспецифичностью клинических проявлений. Снижение защитной функции облигатной микрофлоры кишечника ведет к увеличению влияния дисбиозного состояния [1,2].

Обособление детей в возрасте до 15 лет в отдельную возрастную категорию основывается на анатомо-физиологических особенностях развития ребенка. Основанием для подростковой медицины являются особенности подростков (морфологические, физиологические, психологические, социальные и клинические), смена поступательного характера развития ребенка на бурный ростовой скачок, сочетающийся с энергичной перестройкой и интенсификацией всех функциональных систем.

Сдвиги в нормальной флоре чаще всего являются вторичными, т.е. отражением факторов, меняющих внутренний баланс в системе самого микробиоценоза, который нарушается факторами экзогенной и эндогенной природы. Однако характерными причинами развития дисбактериоза кишечника у подростков является нахождение в замкнутых коллективах, аллергические реакции, частые острые респираторно-вирусные инфекции [3].

С целью диагностики дисбактериоза чаще всего исследуется микрофлора толстого кишечника, так как она наиболее разнообразна, стабильна и легкодоступна для исследования, которое основывается на определении количественного содержания в фекалиях бифидобактерий, энтеробактерий (кишечной палочки и ее гемолитических вариантов, лактозонегативных, эшерихий, протей), энтерококков, стафилококков, синегнойной палочки, кандид. При этом акцент ставится на снижении количества облигатной микрофлоры, а также на активации количества потенциально-патогенных микроорганизмов.

Дисбиотические нарушения кишечника широко распространены у детей, так по данным Немченко У.М. с соавт. (2012) при исследовании микробиоценоза кишечника у 86 детей в возрасте до 12 лет дисбиотические изменения в составе нормальной микрофлоры регистрировались у 90,7% обследованных [4]. Результаты ранее проведенных исследований (Бисенова с соавт. 2011) показали, что у более 90% подростков обнаружен дисбактериоз кишечника различной степени [5].

Учитывая, что функционально-морфологическое состояние кишечника и организма человека в определенной степени зависит от состояния и состава кишечной микробиоты, исследование микрофлоры толстой кишки с каждым годом становится все более актуальным [6]. В связи с отсутствием данных о бактериологических исследованиях дисбиоза кишечника у подростков г.Астаны, актуально исследование количественного и качественного изменения микрофлоры данного биотопа. Целью работы было изучение качественно-количественных нарушений микрофлоры толстой кишки в динамике за 3 года у детей до 15 лет.

Материалы и методы

Дизайн исследования

В течение с 2012 по 2014 годы проведено проспективное бактериологическое исследование детей в возрасте от 1 года

до 15 лет на дисбактериоз толстой кишки. За исследуемый период согласно стандартам микробиологических методов исследования были собраны и обработаны 255 образцов исследуемого материала. Полученные данные о качественном и количественном составе основной микрофлоры кишечника сопоставляли с нормальными показателями.

Сбор исследуемого материала

Бактериологическому исследованию подвергалось содержимое толстой кишки, которое доставлялось в лабораторию в стерильном флаконе в количестве 2-3 г, без консерванта в течение 2 часов с момента забора. Сбор материала производили до применения антибиотиков, а также бактериальных препаратов (пробиотиков, эубиотиков и др.) или после отмены антибиотиков через 2-3 дня [7].

Культивирование образцов

Первичный посев клинического материала проводили количественным методом на питательные среды в соответствии с нормативными документами [8]. Количественный анализ исследуемого материала проводили с использованием питательных сред (кровяной агар, среда Эндо, висмутсульфит агар, желточно-солевой агар, Candida агар, среда Калины, среда Вильсон-Блера, лактоагар, среда Блаурокка). Посевы культивировали 24 часа при 37°C, чашки с Candida агар культивировали 5 суток при 22°C.

Идентификация изолятов

Микроорганизмы, после выделения чистой культуры и окраски по Граму, идентифицировали на микробиологическом компьютерном анализаторе «Vitek 2-Compact» (bioMerieux) и согласно определителю [9].

Дисбактериоз кишечника диагностировался по следующим микробиологическим критериям (изменениям количества микрофлоры в бактериальных картах фекалий):

- снижение количества бифидобактерий менее 108 КОЕ /г фекалий;
- снижение лактобацилл менее 106 КОЕ /г;
- появление эшерихий с изменёнными свойствами (лактозоотрицательных форм кишечной палочки или кишечной палочки с изменёнными ферментативными свойствами) более 10% от общего количества;
- появление гемолитической микрофлоры;
- наличие облигатно-патогенных бактерий (сальмонелл, шигелл, патогенных сероваров кишечной палочки), являющихся экзогенным этиологическим фактором ОКИ;
- обнаружение условно-патогенных энтеробактерий (представителей родов Enterobacter, Proteus, Klebsiella, Citrobacter и др.), а также бактерий родов Pseudomonas, Acinetobacter и др. Этиологически значимой принималась концентрация данных бактерий выше 105 КОЕ в 1 грамме;
- появление грибов рода Candida 105 и выше КОЕ в 1 грамме;
- наличие патогенного стафилококка;
- обнаружение Clostridium более 105 КОЕ/г.

Статистическую обработку данных проводили с определением средней величины, ошибку средней (m), t-критерий Стьюдента, уровень доверительного интервала (p). Результаты считали достоверными, если вероятность нуль-гипотезы не превышала 0,05 (p<0,05).

Результаты

Результаты проведенных исследований показывают, что микробиоценоз фекалий детей данной возрастной категории был представлен как облигатной, так и факультативной микрофлорой.

Микробиологические показатели обследования фекалий детей в возрасте от 1 года до 15 лет на облигатную и факультативную микрофлору представлены в таблице 1. Кишечная палочка с нормальной ферментативной активностью за исследуемый период была выделена у

59,6±3,0% обследуемых детей в количестве 107 и более КОЕ/г, бифидобактерии в количестве 108 и более КОЕ/г у 62,3±3,0%, лактобациллы в количестве 106 КОЕ/г и более у 16,0±2,3%.

Процентный показатель обнаружения условно-патогенных энтеробактерий составил 21,5±2,5%, патогенного стафилококка – 16,0±2,3%, дрожжеподобных грибов рода *Candida* 18,8±2,4%.

Микробный пейзаж условно-патогенных энтеробактерий представлен родами *Enterobacter*, *Klebsiella* и *Proteus* (таблица 2).

Таблица 1 Микробиологические показатели облигатной и факультативной микрофлоры кишечника у детей до 15 лет

	2012	2013	2014	P
Показатели облигатной микрофлоры кишечника				
Количество, n	74	72	109	
Кишечная палочка с нормальной ферментативной активностью	60,8±5,6	55,5±5,8	61,4±4,6	>0,05
Бифидобактерии	68,9±5,3	63,3±4,6	54,1±4,7	<0,05
Лактобактерии	9,7±3,4	16,2±4,2	20,1±3,8	<0,05
Показатели факультативной микрофлоры кишечника				
Условно-патогенные энтеробактерии	24,3±4,9	25,0±5,1	17,4±3,6	>0,05
<i>Staphylococcus aureus</i>	9,4±3,4	9,7±3,4	24,7±4,1	<0,01
<i>Candida spp.</i>	14,8±4,1	16,5±3,5	26,3±5,1	>0,05
<i>Clostridium</i>	31,0±5,3	4,1±2,3	12,8±3,2	<0,001
<i>Enterococcus spp.</i>	27,7±5,2	31,0±5,3	43,1±4,7	<0,05

Таблица 1 Родовой пейзаж условно-патогенных энтеробактерий микрофлоры кишечника у детей до 15 лет

	2012	2013	2014	P
Количество, n	18	18	19	
<i>Enterobacter aerogenes</i>	11,1±7,4	11,1±7,4	15,7±8,3	>0,05
<i>Enterobacter cloacae</i>	11,1±7,4	5,5±5,4	5,2±5,1	>0,05
<i>Enterobacter gergoviae</i>	5,5±5,4		5,2±5,1	>0,05
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	27,7±10,5	11,1±7,4	21,0±9,3	>0,05
<i>Klebsiella oxytoca</i>	5,5±5,4	5,5±5,4	10,5±7,0	>0,05
<i>Kluyvera ascorbata</i>		5,5±5,4	10,5±7,0	>0,05
<i>Proteus mirabilis</i>	11,1±7,4	10,5±7,0	44,4±11,7	<0,01
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	11,1±7,4	5,5±5,4	10,5±7,0	>0,05

Обсуждение

Нарушения микрофлоры кишечника широко распространены у детей в возрасте от 1 года до 15 лет. В основном дисбиоз толстой кишки обусловлен снижением количества облигатной микрофлоры. Котова Л.А. (2008) в результате бактериологических исследований микрофлоры толстого кишечника подростков г. Алматы выявила нормоценоз лишь у 22,5% обследованных, у 77,5% подростков обнаружен дисбактериоз кишечника различной степени [10].

По данным Суворовой М.А с соавт. (2011) при исследовании 55 детей в возрасте от 3 до 10 лет у всех обследованных детей в 100% случаев обнаруживались бактериологические признаки дисбактериоза: снижение титра бифидобактерий у 55,5% пациентов, лактобактерий – 82,2%, высева клостридий -33,8%, грибов рода *C. albicans*

-20%, золотистого стафилококка -20% и энтеробактерий -17% [11].

По данным Немченко У.М. с соавт. (2012) при исследовании микробиоценоза кишечника у 86 детей в возрасте до 12 лет спектр определяемой условно-патогенной флоры характеризовался доминирующим положением энтеробактерий (65,1%), коагулазоположительных стафилококков (26,7% обследованных) [4].

Проведенный нами мониторинг исследования облигатной микрофлоры толстого кишечника показывает динамику достоверного снижения частоты обнаружения бифидобактерий с 68,9±5,3% в 2012 году до 54,1±4,7% в 2014 году (p<0,05). В тоже время, если в 2012 году количество пациентов, с нормальным содержанием лактобактерий составляло 9,7±3,4%, то в 2014 году процент таких лиц достоверно увеличился до 20,1±3,8% (p<0,05).

Исследование факультативной микрофлоры кишечника показало тенденцию достоверного снижения частоты обнаружения клостридий с $31,0 \pm 5,3\%$ в 2012 году до $12,8 \pm 3,2\%$ в 2014 году ($p < 0,001$). В 2012 году количество лиц с нормальным содержанием энтерококков было $27,7 \pm 5,2\%$, а в 2014 году достоверно увеличилось до $43,1 \pm 4,7\%$ ($p < 0,05$). Также больше стало пациентов с повышенным содержанием в кишечнике дрожжеподобных грибов рода *Candida* ($14,8\%$ в 2012 году и $26,3\%$ в 2014 году).

Результаты данного исследования показывают, что за исследуемый период, у $16,0\%$ обследованных детей обнаруживался патогенный стафилококк, в то время как в раннее проведенном нами исследовании (Бисенова с соавт., 2011) микрофлоры кишечника этот показатель составил около половины обследуемых детей ($43,6\%$) [12]. Мониторинг кишечной микрофлоры детей с 2012 по 2014 годы наглядно демонстрирует динамику достоверного увеличения доли патогенного стафилококка с $9,4 \pm 3,4\%$ в 2012 году до $24,7 \pm 4,1\%$ в 2014 году ($p < 0,01$). Процентный показатель обнаружения условно-патогенных энтеробактерий показывает тенденцию их снижения с $24,3\%$ в 2012 году до $17,4\%$ в 2014 году.

Из выделенных условно-патогенных энтеробактерий наиболее часто выделялся *Klebsiella pneumoniae* ($27,7 \pm 6,0\%$), род *Enterobacter*, представленный четырьмя видами составлял этот же процентный показатель, *Proteus*

mirabilis ($21,8 \pm 5,5\%$). Отмечается достоверное увеличение *Proteus mirabilis* с $11,1 \pm 7,4\%$ до $44,4 \pm 11,7\%$ ($p < 0,01$).

Полученные результаты свидетельствуют о том, что микробиоценоз кишечника данной возрастной категории характеризуется дисбиотическими изменениями в составе микрофлоры кишечника. Данные, полученные в ходе исследования необходимы для рациональных методов коррекции дисбиоза кишечника и дальнейшем применении в практической сфере.

Выводы

Микрофлора кишечника детей в возрасте до 15 лет характеризуется снижением количества лактобактерий, бифидобактерий и *E.coli* с нормальной ферментативной активностью. В составе кишечного микробиоценоза обследуемых детей увеличивается количество условно-патогенных энтеробактерий, дрожжеподобных грибов рода *Candida* и клостридий. При выявлении дисбактериоза кишечника одним из рациональных методов коррекции является поддержание высокого популяционного уровня нормальной микрофлоры с помощью препаратов и биологически активных добавок к пище, содержащих пробиотические микроорганизмы в высокой концентрации, обладающими ярко выраженными антагонистическими свойствами против условно-патогенных микроорганизмов.

Литература

1. Kipshakbaev R.K., Kipshakbaeva F.M. Obzor problem disbioza kishechnika u detej (Overview of problems of intestinal dysbiosis in children), *Zhurnal Chelovek i lekarstvo*, 2014, No.7, pp. 2-5.
2. Denisov M.Ju. Disbioticheskie narusheniya kishechnika u detej (Dysbiotic bowel disorders in children), *Pediatricheskaja farmakologija*, 2011, No.5, pp.54-60.
3. Otrasevoj standart RF «Protokol vedenija bol'nyh. Disbakterioz kishechnika» (Industry Standard of the Russian Federation "Treatment Protocol. Intestinal dysbiosis"), Moskva, 2003, pp.10-14.
4. Nemchenko U.M., Popkova S.M., Dzhiyev Ju.P. i dr. Vidovoe raznoobrazie bifidobakterij u detej s funkcional'nymi zheludochno-kishechnogo trakta (Species diversity bifidobacteria in children with functional gastrointestinal), *Bjulleten' Vostochno-Sibirskogo nauchnogo centra RAMN*, 2012, No.2, pp.50-54.
5. Bisenova N.M., Mitus N.M., Tuleubaeva Je.A. i dr. Rol' uslovno-patogennyh jenterobakterij v razvitii disbakterioza kishechnika u detej (The role of opportunistic enterobacteria in the development of intestinal dysbiosis in children), *Klinicheskaja medicina Kazahstana*, 2011, No.3-4, pp.343-344.
6. Batchaev H.H., Arapova V.I., Pilipenko T.D. Harakteristika narushenij kishečnoj mikrobioty (Characteristics of violations of the intestinal microbiota), *ZhMJeI*, 2010, No.2, pp.99-101.
7. Standarty vzjatija, dostavki i hraneniya biomateriala dlja mikrobiologicheskikh issledovanij v laboratorii klinicheskoi mikrobiologii (Standards capture, delivery and storage of biological material for microbiological studies in the clinical microbiology laboratory), *Metodicheskie instrukcii*, Astana, 2008, pp.11-12.
8. Bakteriologicheskaja diagnostika disbakterioza kishechnika (The bacteriological diagnosis of intestinal dysbiosis), *Metodicheskie ukazaniya № 10.05.044.03*, Almaty, 2003, pp.8-18.
9. Opredelitel' bakterij Berdzhi (The determinant of bacteria Burgi). Pod. red. Dzh. Hoult. M.:Mir, 1997, T.1., pp.180-196.
10. Kotova A.L. Normoflora i disbakteriozy cheloveka (Normal flora and human dysbacterioses), Almaty, 2008, pp.331-340.
11. Suvorova M.A., Rjabchuk F.N. Chuvstvitel'nost' mikrobioty kishechnika k bakteriofagam i probiotikam u detej s zabolevanijami organov pishhevareniya (The sensitivity of the intestinal microbiota to bacteriophages and probiotics in children with digestive diseases), *Lechashhij vrach*, 2011, No.6, pp. 14-16.
12. Bisenova N.M., Ergalieva A.S. Fakul'tativnaja mikroflora kishechnika u detej pervogo goda zhizni (Optional intestinal microflora in infants), *Astana Medicinalyk Zhurnaly*, 2011, No.2, pp.33-35.