



Microbiological intestinal indicators of children at first year

Nelya Bissenova, Natalya Mitus, Elmira Tuleubayeva, Aigerim Yergaliyeva

National Scientific Medical Research Center, Microbiology laboratory, Astana, Kazakhstan

Abstract

The aim of this study. The analysis of microbiological parameters intestine in children in the first year of life.

Materials and methods. During 2012 and 2014 conducted prospective bacteriological examination of the large intestine 318 children in the first year of life. 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 (bioMerieux).

Results. During 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 60.6% of the surveyed children, bifidobacteria were detected at 59.4%, only 24.8% of infants were identified in normal lactobacilli. As a consequence, there was an increased colonization of pathogenic staphylococci (47.4%), opportunistic enterobacteria (27.3%) in particular bacteria of the genus Enterobacter, Klebsiella, yeast fungi of the genus Candida (12.5%).

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 microbiota of children surveyed increased the number of opportunistic enterobacteria, Candida and E.coli with reduced enzymatic activity.

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

J Clin Med Kaz 2015; 4(38):56-59

Автор для корреспонденции: Бисенова Неля Михайловна, д.б.н., руководитель микробиологической лаборатории Национального научного медицинского центра. Тел.: +7701-405-39-96. E-mail: nelyabis@mail.ru.

ЖАСҚА ТОЛМАҒАН НӘРЕСТЕЛЕРДЕГІ ІШЕК МИКРОФЛОРАСЫНЫҢ МИКРОБИОЛОГИЯЛЫҚ КӨРСЕТКІШТЕРІ

Бисенова Н.М., Митус Н.М., Тілеубаева Э.А., Ергалиева А.С.

Ұлттық ғылыми медициналық орталық, микробиологиялық зертхана, Астана, Қазақстан

Тұжырымдама

Зерттеудің мақсаты. Жасқа толмаған нәрестелердің ішек микрофлорасының микробиологиялық көрсеткіштерін талдау.

Зерттеудің құралдары мен әдістері. 2012-2014 жылдар аралығында 318 ге жуық жасқа толмаған нәрестелердің тоқ ішек микрофлорасына бактериологиялық зерттеу жүргізілді. Алынған клиникалық материалдардың барлығын қоректік орталарға біріншілікті егуі нормативтік құжаттармен сәйкес сандық әдіс арқылы жүргізілді. Микроорганизмдерден бөлініп алынған таза дақылдарды әрі қарай саралау Vitek 2 (bioMerieux) микробиологиялық компьютерлік анализаторында іске асты.

Нәтижесі. 2012-2014 жылдар аралығында жасқа толмаған нәрестелерден ішек дисбактериозына бактериологиялық зерттеу жүргізілген кезде тоқ ішекте облигатты микрофлораның төмендегені анықталған. Зерттелген нәрестелерде қалыпты ферментативтік белсенділігі бар ішек таяқшасы 60,6% бөлінген болса, бифидобактериялар 59,4%, ал лактобациллалар 24,8% нәрестелерде анықталған.

Сонымен қатар, патогенді стафилококктардың (47,4%) бөлініп, айқын жоғарлағаны байқалса, шартты-патогенді энтеробактериялар (27,3%), ал Enterobacter, Klebsiella, Candida туыстығына жататын саңырауқұлақтардың кейбір түрлері (12,5%) ажыратылып алынды.

Қорытынды. Зерттей келе жасқа толмаған нәрестелердің ішек микрофлорасында бифидобактериялар, лактобактериялар және қалыпты ферментативтік белсенділігі бар E.coli айқын төмендеуі байқалады. Сонымен қатар зерттелген балалардың ішек микробиоценозының құрамында шартты-патогенді энтеробактериялардың, ферментативтік белсенділігі төмен E.coli, Candida туыстығына жататын саңырауқұлақтардың артқандығы дәлелденген.

Маңызды сөздер: балалардағы ішек дисбактериозы – лактобактериялар – бифидобактерия – шартты-патогенді энтеробактериялар.

МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ КИШЕЧНИКА ДЕТЕЙ ПЕРВОГО ГОДА ЖИЗНИ

Бисенова Н.М., Митус Н.М., Тілеубаева Э.А., Ергалиева А.С.

Национальный научный медицинский центр, микробиологическая лаборатория, Астана, Казахстан

Резюме

Цель исследования. Анализ микробиологических показателей кишечника у детей первого года жизни.

Материалы и методы исследования. В течение с 2012 по 2014 годы проведено проспективное бактериологическое исследование толстого кишечника 318 детей первого года жизни. 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 (bioMerieux).

Результаты. В период с 2012 по 2014 годы при бактериологическом исследовании на дисбактериоз кишечника детей первого года жизни в основном дисбиоз толстой кишки был обусловлен снижением количества облигатной микрофлоры. Кишечная палочка с нормальной ферментативной активностью в норме была выделена у 60,6% обследуемых детей, бифидобактерии обнаруживались в фекалиях у 59,4% детей, только у 24,8% детей первого года жизни в норме были выявлены лактобациллы.

Как следствие этого, наблюдалась повышенная колонизация патогенным стафилококком (47,4%), условно-патогенными энтеробактериями (27,3%) в частности бактериями рода Enterobacter, Klebsiella, дрожжевыми грибами рода Candida (12,5%).

Выводы. Микрофлора кишечника детей первого года жизни 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 Кандида и E.coli со сниженной ферментативной активностью.

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

Введение

Бактериальная колонизация кишечника детей обусловлена двумя важными моментами, которые оказывают уникальное влияние. Первый связан с рождением ребенка и с последующей первичной колонизацией стерильного кишечника, другой - с отменой грудного вскармливания, при котором происходит качественное изменение питания, влияющее на состав микрофлоры кишечника.

Микрофлора кишечника формируется с первых дней жизни. В период прохождения плода через родовые пути происходит заглывание околоплодных вод, результатом чего является колонизация пищевого тракта ребенка вагинальной микрофлорой матери. При формировании биоценоза толстой кишки, отмечается присутствие уже на четвертый день жизни ребенка лактобактерий (108 КОЕ/г), кишечной палочки (107 КОЕ/г), стафилококков и стрептококков (106 КОЕ/г). К концу первой недели у новорожденного выявляются бифидобактерии (108-109 КОЕ/г), а количество лактобактерий и кишечной палочки становится выше на один порядок [1].

Как известно, у взрослых, дисбактериоз является вторичным, одной из причин которого является антибактериальная терапия, что касается детей первого года жизни, то первичность дисбактериоза объясняется таким фактором как патология перинатального периода, искусственное вскармливание, а также обсемененность окружающей среды [2,3]. Одной из причин развития дисбактериоза кишечника у детей может быть снижение специфического иммунитета; острая кишечная инфекция; нарушение режима питания (ранний перевод на искусственное вскармливание); недостаток витаминов.

Дисбактериоз кишечника чаще и быстрее возникает у детей первого года жизни. Любая кишечная инфекция в этом возрасте в 100% случаев сопровождается дисбиозом. Дисбактериоз осложняет и затягивает течение основного заболевания. Он может быть для него как неблагоприятным фоновым состоянием, так и осложнением. Очевидно, что дисбактериоз кишечника у детей раннего возраста, связан с несовершенством защитных реакций организма [4,5].

Позднее становление бифидофлоры и частая патологическая контаминация *S.aureus*, грамотрицательными бактериями у детей первого года жизни ведет к значительному увеличению количества сульфатредуцирующих клостридий, условно-патогенных энтеробактерий, дрожжеподобных грибов рода *Candida*.

В связи с вышеизложенным, является актуальным дальнейшее мониторирование особенностей микробиоценоза кишечника детей 1 года, что позволит определить изменение микробного спектра дисбиоза и определить рациональные методы коррекции.

Цель настоящего исследования – изучить микробиологические показатели кишечника детей первого года жизни за 2012-2014 годы.

Материалы и методы

В течение с 2012 по 2014 годы проведено проспективное бактериологическое исследование больных на дисбактериоз толстой кишки детей в возрасте до 1 года. За исследуемый период согласно стандартам лабораторных методов исследования были собраны и обработаны 318 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 [6].

Культивирование образцов. Первичный посев клинического материала проводили количественным методом на питательные среды в соответствии с нормативными документами [7]. Количественный анализ исследуемого материала проводили с использованием питательных сред (кровяной агар, среда Эндо, желточно-солевой агар, *Candida* агар). 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 [8].

Дисбактериоз 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 измененными свойствами (лактозоотрицательных форм кишечной палочки или кишечной палочки с измененными 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 104 КОЕ в 1 грамме;
- появление грибов рода *Candida* 103и выше КОЕ в 1 грамме;
- наличие патогенного стафилококка;
- обнаружение *Clostridium* более 104 КОЕ/г.

Полученные результаты подвергали статистической обработке. Определяли: средние 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 1 года жизни был представлен как облигатной, так и факультативной микрофлорой (таблица 1).

Таблица 1

Микробиологические показатели облигатной и факультативной микрофлоры кишечника у детей первого года жизни за 2012-2014гг.

	2012	2013	2014	Итого
Показатели облигатной микрофлоры кишечника				
Количество, n	113	78	127	318
Кишечная палочка с нормальной ферментативной активностью	62,0±4,5	62,8±5,4	58,2±4,3	60,6±2,7
Бифидобактерии	48,7±5,6	58,4±4,6	66,9±4,1*	59,4±2,7
Лактобактерии	21,2±3,8	23,0±4,7	29,1±4,0	24,8±2,7
Показатели факультативной микрофлоры кишечника				
Условно-патогенные энтеробактерии	26,5±4,1	29,4±5,1	26,7±3,9	27,3±2,4
<i>Staphylococcus aureus</i>	38,1±4,6	44,8±5,6	51,1±4,4*	47,4±2,8
<i>Candida spp.</i>	12,3±3,0	10,2±3,4	14,1±3,0	12,5±1,8
<i>Clostridium</i>	29,2±4,2	6,4±2,7	14,1±3,0*	17,6±2,1

Примечание: * - сравнение показателей с 2012 годом (p<0,05)

К облигатным представителям нормофлоры кишечника относятся бифидобактерии, лактобактерии, вся сумма кишечных палочек и энтерококков. Кишечная палочка с нормальной ферментативной активностью была выделена у 60,6% обследуемых детей в количестве 107 и более КОЕ/г. Бифидобактерии в количестве 109 и более КОЕ/г обнаруживались в фекалиях у 59,4% детей. Только у 24,8% детей 1 года жизни были выявлены лактобациллы в количестве 106 КОЕ/г и более.

Факультативная микрофлора кишечника включает стафилококки, условно патогенные энтеробактерии, дрожжеподобные грибы рода *Candida*, клостридии. Полученные результаты показывают, что у 47,4%

обследуемых детей был обнаружен патогенный стафилококк, у 27,3% условно-патогенные энтеробактерии, у 12,5% дрожжеподобные грибы р. *Candida*.

Среди представителей семейства энтеробактерий, выделенных из кишечника детей 1 года жизни лидируют представители родов *Enterobacter* и *Klebsiella*. В 2012 году, на первом местесреди условно патогенных энтеробактерий находится род *Klebsiella* (40,0%), представленный тремя видами, среди которых наиболее часто выделялся *Klebsiella pneumoniae* (30,0%). Род *Enterobacter*, представленный четырьмя видами составляет 39% от общего количества выделенных условно-патогенных энтеробактерий, причем лидирует *Enterobacter aerogenes* – 24,1%. (таблица 2).

Таблица 2

Родовой пейзаж условно-патогенных энтеробактерий микрофлоры кишечника у детей первого года жизни за 2012-2014гг.

Условно-патогенные энтеробактерии	2012	2013	2014	Итого
Количество, n	30	23	34	87
<i>Enterobacter aerogenes</i>	13,3±5,1	26,0±9,1	32,3±7,0*	24,1±4,5
<i>Enterobacter cloacae</i>	6,6±4,5	17,3±7,8	5,8±4,0	9,1±3,0
<i>Enterobacter gergoviae</i>	-	4,3±4,2	2,9±2,8	2,2±1,5
<i>Enterobacter agglomerans</i>	6,6±4,5	-	2,9±2,8	3,4±1,9
<i>Citrobacter freundii</i>	13,3±6,1	-	2,9±2,8	5,7±2,4
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	30,0±5,3	14,7±5,9	13,0±6,0*	19,5±4,2
<i>Klebsiella oxytoca</i>	6,6±4,5	8,6±5,8	5,8±4,0	6,8±2,6
<i>Klebsiella planticola</i>	3,3±3,2	-	2,9±2,8	2,2±1,5
<i>Kluyvera ascorbata</i>	6,6±4,5	13,0±7,0	11,7±5,5	10,3±3,2
<i>Pantotea agglomerans</i>	3,3±3,2	-	2,9±2,8	2,2±1,5
<i>Proteus mirabilis</i>	3,3±3,2	13,0±7,0	8,8±4,8	8,0±2,9
<i>Proteus penneri</i>	-	4,3±4,2	-	1,1±1,1

Примечание: * - сравнение показателей с 2012 годом (p<0,05)

Обсуждение

В послеродовой период новорожденные дети продолжают колонизироваться микроорганизмами от матери, персонала роддома и из окружающей среды. Такой важный фактор, как тип питания ребенка (естественное или искусственное вскармливание) оказывает существенное влияние на формирование микробного биоценоза кишечника. Все это может приводить к появлению

различных дисбиотических состояний.

Х.Х. Батчаев с соавт. (2010) зафиксировали наибольший удельный вес патобиоценозов у детей первого года жизни: 92-100% [9].

Полученные нами результаты исследования фекалий детей 1 года жизни показывают, что наблюдается снижение количества нормофлоры кишечника, а именно кишечной палочки с нормальной ферментативной активностью,

лактобактерий и бифидобактерий. По данным Т.С. Лазаревой (2011) при исследовании 62 детей в возрасте от 1 до 60 месяцев более чем у половины больных (69%) имело место отсутствие или дефицит отдельных представителей нормофлоры кишечника (бифидо-, лактобактерии, кишечная палочка с нормальными ферментативными свойствами) [10]. Результаты нашего исследования показывают что наибольший дефицит нормофлоры проявлялся снижением количества лактобактерий 75,2%, бифидобактерий 40,6% и кишечной палочки с нормальными ферментативными свойствами 39,4%. Вместе с этим, наблюдается достоверное увеличение частоты обнаружения бифидобактерий с 48,7% до 66,9% ($p < 0,05$).

По данным И.В. Вальшевой с соавт. (2011) при исследовании на дисбактериоз у детей до 1 года дисбиоз толстой кишки I степени встречался в 86%, II степени - 8%, III степени - 4%. Чаще всего дисбиотические нарушения характеризовались высоким уровнем колонизации бактериями рода *Klebsiella* (47%) и кандидами (20%) [11].

Согласно нашим результатам исследования, микробиоценоз кишечника детей первого года жизни характеризовался увеличением процентного показателя патогенного стафилококка, клостридий, условно-патогенных энтеробактерий, дрожжеподобных грибов рода *Candida*. Результаты нашего исследования, приведенные в таблице 1, показывают, что у около половины обследуемых детей (47,4%) в фекалиях обнаруживался *Staphylococcus aureus*. Мониторинг динамики с 2012 по 2014 годы показывает достоверное увеличения доли патогенного стафилококка с 39,1% в 2012 году до 51,1% в 2014 году ($p < 0,05$).

Процентный показатель обнаружения условно-патогенных энтеробактерий остается стабильным в течение всего периода наблюдения, в среднем 27,3%. Процент выделения дрожжеподобных грибов рода *Candida* колеблется в пределах с 10,2% до 14,1%.

Согласно нашим ранее проведенным исследованиям (Бисенова Н.М., 2011) при исследовании 238 детей первого года жизни, дисбиоз толстой кишки был обусловлен повышенной колонизацией условно-патогенными энтеробактериями (38,6%), патогенным стафилококком

(43,6%), дрожжеподобными грибами р.*Candida* (17,2%) [12].

Суммируя количество выделенных условно-патогенных энтеробактерий за три года, наиболее часто выделялся *Enterobacter aerogenes* – 24,1% и *Klebsiella pneumoniae* – 19,5%. Результаты исследования показывают смену наиболее часто высеваемого вида условно-патогенных энтеробактерий. Обнаружено достоверное снижение частоты высеваемости *Klebsiella pneumoniae* с 30,0% до 13,0% ($p < 0,05$) и увеличение *Enterobacter aerogenes* с 13,3% до 32,3% ($p < 0,05$).

Таким образом, нарушения микрофлоры кишечника широко распространены у детей первого года. В основном дисбиоз толстой кишки был обусловлен снижением количества облигатной микрофлоры. Дефицит кишечной палочки с нормальной ферментативной активностью составил в среднем 39,4%, снижение бифидобактерий составило около 40%, лактобактерий более 75%. Как следствие этого наблюдалась повышенная колонизация патогенным стафилококком (47,4%), условно-патогенными энтеробактериями (27,3%) в частности бактериями рода *Enterobacter*, *Klebsiella*, дрожжевыми грибами рода *Candida* (12,5%). 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.

Выводы

У 47,4% обследуемых детей первого года жизни наблюдалась колонизация кишечника патогенным стафилококком (увеличение в динамике). Микрофлора кишечника детей первого года жизни 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 Кандида.

References

1. Buharin O.V., Perunova N.B., Ivanova E.V. Vzajmodejstvie Bifidobacterium bifidum s predstaviteljami normal'noj mikroflory v mikrosmbiocenoze kishechnika cheloveka, *Zhurnal mikrobiologii, jepidemiologii i immunnobiologii*, 2012, No. 4, pp. 48–50.
2. Kipshakbaev R.K., Kipshakbaeva F.M. Obzor problem disbioza kishechnika u detej, *Zhurnal Chelovek i lekarstvo*, 2014, No.7, pp. 2-5.
3. Shherbakov P.L., Nizhevich A.A., Loginovskaja V.V. i dr. Mikrojekologija kishechnika u detej i ee narushenija, *Farmateka*, 2007, No., pp. 28-34
4. Kotova A.L., Ramazanova B.A., Mustafina K.K. et al. Normoflora i disbakteriozy cheloveka, *Ljuka Binder Servis. Almaty*. 2008, 512 p.
5. Baranovskij A.Ju., Kondrashina Je.A. Disbakterioz kishechnika, Piter, 2007, pp.51-59.
6. Standarty vzjatija, dostavki i hranenija biomateriala dlja mikrobiologicheskikh issledovanij v laboratorii klinicheskoy mikrobiologii. *Metodicheskie instrukcii*, Astana, 2008, pp.11-12.
7. Bakteriologicheskaja diagnostika disbakterioza kishechnika № 10.05.044.03, Алматы, 2003, pp.8-18.
8. Opredelitel' bakterij Berdzhi, *Mir. Moskva*, 1997, pp.180-196.
9. Batchaev H.H., Arapova V.I., Pilipenko T.D.. Harakteristika narushenij kishechnoj mikrobioty, *ZhMJeI*, 2010, No.2, pp.99-101.
10. Lazareva T.S. Novye podhody k lecheniju disbakterioza u detej s hronicheskoy diareej, *Zhurnal Trudnyj pacient*, 2011, No.5, pp.15-17.
11. Valysheva I.V., Sycheva M.V., Suleeva L.F. i dr. Osobennosti mikrobiocenoza tolstoj kishki pri disbioticheskikh narushenijah, *ZhMJeI*, 2011, No.1, pp.67-70.
12. Bisenova N.M., Ergalieva A.S. Fakul'tativnaja mikroflora kishechnika u detej pervogo goda zhizni, *Astana medicinalnykh zhurnaly*, 2011, No.2, pp. 33-35.