УДК 579.61

У.М. Немченко, С.М. Попкова, Ю.П. Джиоев, Е.Б. Ракова, М.В. Савелькаева

ВИДОВОЕ РАЗНООБРАЗИЕ БИФИДОБАКТЕРИЙ У ДЕТЕЙ С ФУНКЦИОНАЛЬНЫМИ НАРУШЕНИЯМИ ЖЕЛУДОЧНО-КИШЕЧНОГО ТРАКТА

ФГБУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека» СО РАМН (Иркутск)

Основная цель данной работы состояла в определении соотношения и сочетаемости видов бифидобактерий у детей с функциональными нарушениями желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) посредством метода ПЦР с видоспецифичными праймерами. Одновременно была произведена оценка состава симбионтов кишечной микробиоты. Обследовано 86 детей. Выявлены дисбиотические изменения в микробиоте толстого кишечника I—II степени. Определение видового профиля бифидобактерий, характеризующегося доминированием B. longum, B. catenulatum и B. bifidum, позволит оптимизировать лечение данной патологии.

Ключевые слова: *кишечная микробиота, дисбиоз кишечника, бифидобактерии, ПЦР-диагностика*

SPECIES DIVERSITY OF BIFIDOBACTERIA IN CHILDREN WITH FUNCTIONAL DISORDERS OF GASTROINTESTINAL TRACT

U.M. Nemchenko, S.M. Popkova, Yu.P. Dzhioev, E.B. Rakova, M.V. Savelkaeva

Scientific Center of Family Health Problems and Human Reproduction SB RAMS, Irkutsk

The main aim of this research was to identify species ratio and compatibility in children with functional disorders of gastrointestinal tract (GIT) using PCR method with species-specific primers for bifidobacteria. The assessment of intestinal microbiota symbionts composition was made simultaneously. Dysbiosis changes of I—II degree in large intestine microbiocenosis in 86 children examined were detected. The definition of bifidobacteria species profile with the dominance of B. longum, B. catenulatum and B. bifidum will allow to optimize the treatment of this pathology.

Key words: *intestinal microbiota, intestinal dysbiosis, bifidobacteria, PCR-diagnostics*

ВВЕДЕНИЕ

Микрофлора кишечника играет многофакторную роль в поддержании нормальной работы различных функций организма человека, обеспечивая защиту от патогенной и условно-патогенной микрофлоры (УПМ) [2, 11]. Однако роль микробиоты не ограничивается только антагонистическим действием, она участвует в синтезе белков, углеводов, поддержании ионного гомеостаза организма. Отсутствие нормальной микрофлоры, с одной стороны, ведет к количественным и качественным иммуноморфологическим изменениям, которые приводят к функциональным сдвигам в системе иммунитета, т.к. микрофлора желудочно-кишечного тракта организма взаимосвязана с его иммунной системой [6]. С другой стороны, иммунодефицитные состояния, как правило, приводят к возникновению дисбиозов. Дисбиоз кишечника в настоящее время определяют как «клинико-лабораторный синдром, связанный с изменением качественного и/или количественного состава нормофлоры определенного биотопа, транслокацией различных ее представителей в несвойственные ей биотопы, метаболическими и иммунными нарушениями, сопровождающимися у части пациентов клиническими симптомами» [3, 6, 11]. Дисбиотические состояния в кишечнике являются следствием микробного дисбаланса между индигенной и УПМ, в которой бактерии рода *Bifidobacterium* являются доминирующим компонентом индигенной микрофлоры. У детей раннего возраста бифидобактерии составляют до 95 % от общей популяции микроорганизмов и не только являются объектом многочисленных научных исследований, но и широко используются в медицинской практике в составе пробиотических препаратов [2, 12]. Состав видовых и штаммовых композиций бифидобактерий для коррекции дисбиозов обосновывается разноплановым положительным воздействием на здоровье людей. Однако случаи отсутствия таких эффектов заставляют исследователей искать причины этих феноменов, одними из которых могут быть как региональные особенности видовой архитектоники, так и генетический внутривидовой полиморфизм бифидобактерий. Поэтому весьма актуальным является проведение сравнительного регионального мониторинга нормальной микрофлоры толстого кишечника у детей с привлечением методов молекулярно-генетической идентификации и видового типирования штаммов бифидобактерий [8, 9, 10, 15, 16]. Кроме того, идентификация доминирующего вида бифидобактерий позволяет подбирать адекватный метод коррекции дисбиоза на индивидуальном уровне [13].

Таким образом, **целью** данной работы было определение при помощи метода ПЦР с видоспецифичными праймерами видового соотношения и сочетаемости бифидобактерий у детей с функциональными нарушениями желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) на фоне оценки состава симбионтов кишечной микробиоты.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Микробиологические методы

Микробиоценоз толстого кишечника был исследован у 86 детей от рождения до 12 лет с моторной и секреторной дисфункцией, проходивших обследование на дисбиоз кишечника в Центре диагностики и профилактики дисбактериозов ФГБУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека» СО РАМН.

Бактериологическое исследование качественного и количественного состава содержимого кишечника проводили по стандартным методикам [1, 7]. Для оценки состояния микробиоценоза толстой кишки пользовались классификацией К.С. Куваевой и И.Б. Ладодо [4]. Культуральная биомасса бифидобактерий была выращена на стандартной тиогликолевой среде (ФГУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии», Оболенск, Россия), согласно Методическим рекомендациям [7]. Материал собирался в течение 2008–2011 гг.

Молекулярные методы

Для выделения бактериальной ДНК бифидобактерий была модифицирована методика подготовки и хранения образцов, которая включала в себя: осаждение бактериальной биомассы из тиогликолевой среды путем центрифугирования (13000 об./мин, 3 мин), последующее суспендирование осадка клеток бифидобактерий в буфере Трис-ЭДТА (ТЭ), pH = 7,4 и хранение при –20 °С. В таких условиях бактериальная ДНК сохраняла свои качества в течение года и дольше. Молекулярно-генетический анализ проводили методом ПЦР с использованием видоспецифичных праймеров на основе гена 16S рРНК, отобранных, согласно литературным источникам, к восьми видам бифидобактерий (*B. bifidum, B. longum, B. catenulatum, B. infantis, B. adolescentis, B. breve, B. angulatum, B. dentium*) [14, 17].

Суммарную бактериальную ДНК выделяли с использованием комплекта реагентов «РИБОпреп» (ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Россия). ПЦР-амплификацию проводили с помощью коммерческого набора AmpliSens-200-1 (ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Россия). Для одновременного проведения ПЦР амплификации с наборами праймеров к первым четырем видам бифидобактерий (*B. bifidum, B. longum, B. catenulatum, B. infantis*) амплификацию проводили по схеме: первичная денатурация ДНК при 95 °С в течение 3 мин, далее 30 циклов амплификации при 94 °С в течение 30 сек, при 56 °С – в течение 30 сек, при 72 °С – в течение 2 мин, а после окончания циклов – при 72 °С в течение 7 мин. Для видов *B. adolescentis, B. breve, B. angulatum, B. dentium* амплификацию осуществляли по следующей схеме: первоначальная денатурация при 95 °С в течение 5 мин, 35 циклов при 94 °С в течение 20 сек, при 55 °С – в течение 20 сек, 72 °С – в течение 30 сек, а после окончания циклов – при 72 °С в течение 5 мин. ПЦР-продукты были визуализированы при помощи электрофореза в 1% агарозном геле, содержащем 5 мкл бромистого этидия и проводимом в 1 × ТА (трис-ацетатном) буфере. Положительным контролем для типирования бифидобактерий служил стандартный маркер длин фрагментов ДНК (ZipRuler Express DNA Ladder Set, Fermentas, Литва). Отрицательным контролем служила проба, в реакционной смеси которой отсутствовала искомая ДНК бифидобактерий.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Исследование микробиоценоза кишечника у 86 детей показало, что у 90,7 % регистрировались дисбиотические изменения в составе их нормальной микрофлоры, при этом в 61,6 % преобладал дисбиоз I степени, и на втором месте (в 29,1 %) был дисбиоз II степени. Случаи нормы определялись у 9,3 % обследованных детей (у 7 детей в возрасте 4–6 лет и у 1 ребенка 1 года). Изменения состава облигатной микрофлоры проявлялось снижением уровня бифидобактерий у 40,7 % обследованных, дефицитом лактобактерий, нормальной кишечной палочки – у 6,8 %, наличием кишечной палочки с измененными биологическими свойствами – у 33,7 % обследованных детей. Спектр определяемой УПМ был достаточно широк и характеризовался доминирующим положением микроорганизмов сем. *Enterobacteriaceae* (у 65,1 %) и коагулазоположительных стафилококков (у 26,7 % обследованных детей) (рис. 1).

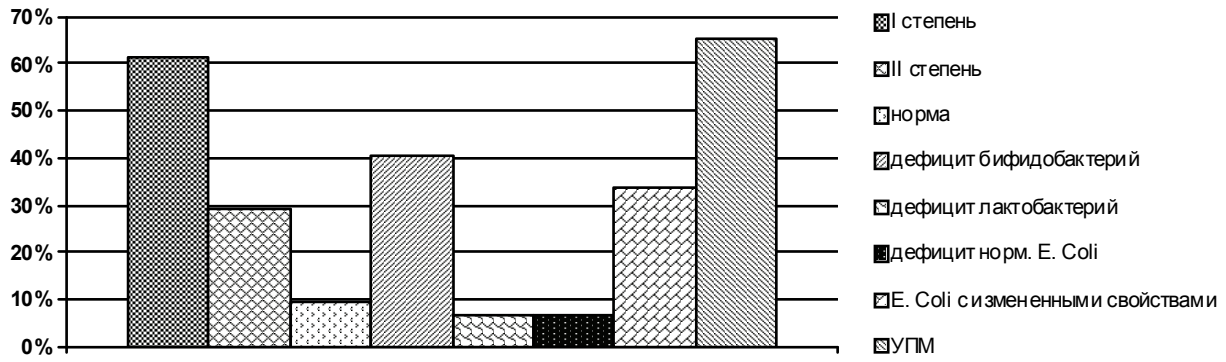

Рис. 1. Характеристика дисбиотических изменений у детей разного возраста.

Таким образом, у детей разного возраста с функциональными нарушениями ЖКТ, наиболее часто обнаруживается угнетение индигенной флоры при наличии потенциально патогенных микроорганизмов сем. *Enterobacteriaceae*, среди которых выявляются представители родов *Klebsiella spp., Enterobacter spp.* Обнаружение видов сем. *Enterobacteriaceae* у детей старшего возраста (4 – 6 лет) свидетельствует о длительной персистенции этих микроорганизмов в условиях организма-хозяина, в результате чего возможно возникновение хронической инфекции и бактерионосительство. Отмечено, что такие дисбиотические нарушения, как правило, плохо поддаются коррекции и требуют длительного лечения пробиотиками и антимикробными препаратами [5].

Для эффективной коррекции дисбиотических нарушений необходимо применение пробиотических препаратов, максимально приближенных по составу к естественному микробиоценозу ЖКТ человека в определенный возрастной период. Поэтому первостепенное значение приобретает необходимость изучения видового спектра бифидобактерий у детей с функциональными нарушениями ЖКТ, нуждающихся в коррекции дисбиотических состояний.

Результаты исследования видового состава кишечной бифидофлоры у детей различного возраста, полученные с помощью ПЦР-типирования и визуализированные электрофорезом в агарозном геле, представлены на рисунке 2.

В результате видового генотипирования 86 образцов в 75 пробах был выявлен различный спектр количественного представительства всех 8 исследуемых видов бифидобактерий. Доминирующими видами бифидобактерий в кишечной микрофлоре исследуемой группы детей определялись виды *B. longum* (60,5 %), *B. bifidum (*46,6 %) и *B. catenulatum* (50,0 %). Кроме того, выявлялись минорные виды бифидобактерии в следующих количественных пропорциях: *B. infantis* – 16,3 %, *B. breve* – 9,3 %, *B. dentium* – 4,6 %, *B. adolescentis* – 3,5 %, *B. angulatum* – 1,1 % (рис. 3).

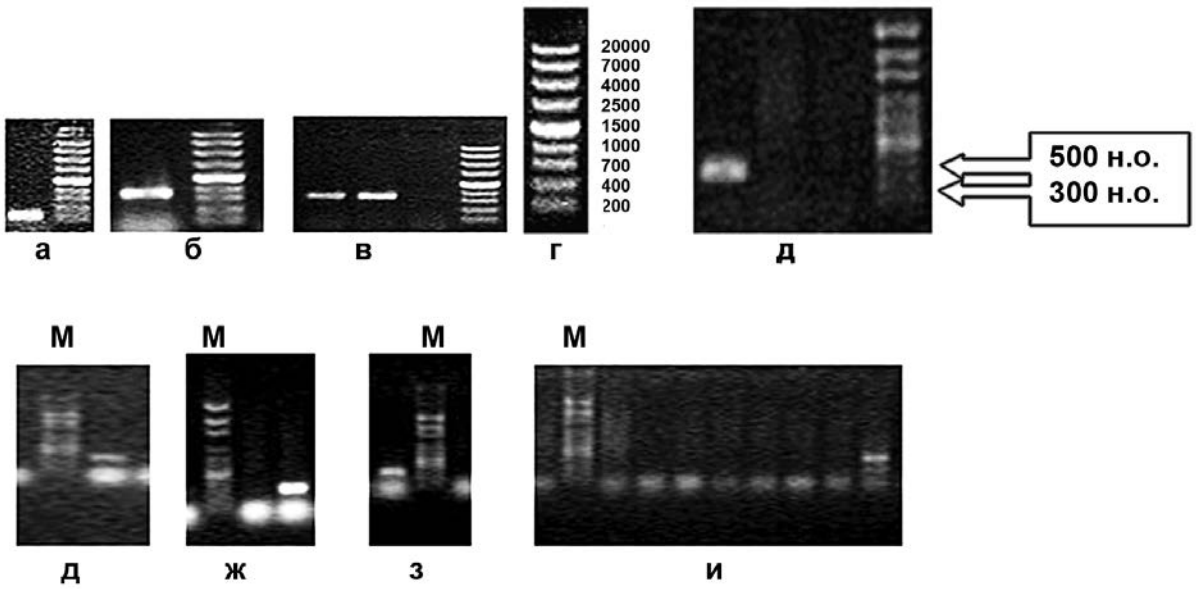

Рис. 2. Электрофореграммы сравнительной интерпретации ДНК-фрагментов видов бифидобактерий со специфическими праймерами, полученными в результате ПЦР-амплификации. Виды исследуемых бифидобактерий: **а** – *B. bifidum;* **б** – *B. longum;* **в** – *B. infantis;* **д** – *B. catenulatum;* **е** – *B. adolescentis*; **ж** – *B. breve*; **з** – *B. angulatum*; **и** – *B. dentium*; **г** – размерность маркера молекулярной массы.

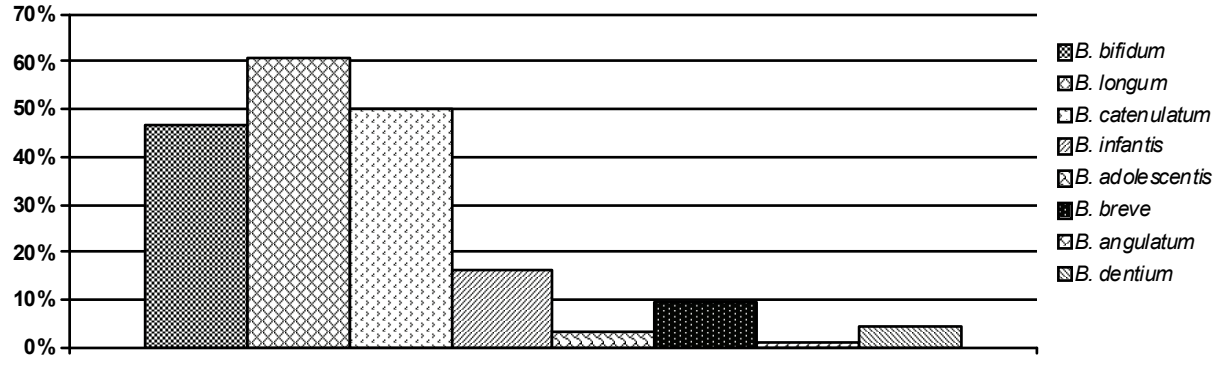

Рис. 3. Частота встречаемости видов бифидобактерий у детей разного возраста.

При этом было обнаружено, что у большинства детей виды бифидобактерии встречались в различных комбинационных сочетаниях, выявлялись как ассоциации видов, так и моновиды (табл. 1.).

Таблица 1
Качественный состав бифидобактерий в микрофлоре детей разного возраста

Вид бифидобактерий / комбинация видов	Частота встречаемости, % (*n* = 86)
B. adolescentis	3,5
B. angulatum	1,1
B. bifidum	46,5
B. breve	9,3
B. catenulatum	50,0
B. dentium	4,6
B. infantis	16,3
B. longum	60,5
Комбинации видов	
Один	33,7
Два	19,8
Три	22,1
Четыре и более	11,6

В результате проведенного исследования было установлено, что бифидобактерии видов *B. bifidum, B. longum*, *B. catenulatum* с высокой частотой встречались у детей всех возрастов, а *B. infantis* обнаруживался у детей как 4 – 6 лет (6,9 %), так и до 2 лет (9,4 %). Виды *B. dentium* и *B. breve* встречались только у детей до 2 лет, вид *B. adolescentis* – у детей 4 – 6 лет. В 11 (12,8 %) образцах ДНК не удалось выявить ни одного вида бифидобактерий из 8 исследуемых. Этот результат может свидетельствовать о том, что в этих изолятах в основном присутствуют те виды бифидобактерий, которые в данном исследовании не типировались, или, возможно, в амплифицируемых фрагментах ДНК определяемых видов в комплементарных исследуемым праймерам участках произошли мутационные замены нуклеотидных последовательностей. Подобный анализ спектра видового разнообразия бифидобактерий и их сочетаний в кишечной биоте детей проводится впервые, и полученные результаты свидетельствуют о том, что кишечная микробиота является сложным конгломератом не только видового представительства, но и форм взаимосвязанных отношений друг с другом в различных комбинациях при условиях определенных состояний развития иммунной системы детей разных возрастов. Поэтому авторы представляемой работы убеждены в актуальности проводимых исследований и понимают необходимость продолжения их дальнейшего углубленного изучения как в фундаментальном аспекте, так и в последующем приложении их результатов в практической сфере.

ЛИТЕРАТУРА

1. Диагностика, профилактика и лечение дисбактериозов кишечника: метод. рекомендации / МЗ СССР №10-11/4. – М., 1991. – 15 с.

2. Защитная роль бифидофлоры в организме новорожденных / Г.И. Гончарова, В.И. Чистякова, А.М. Лянная [и др.] // Сб. МНИИЭМ. – М., 1990. – С. 48 – 53.

3. Копанев Ю.А., Соколов А.Л. Дисбактериоз кишечника: микробиологические, иммунологические и клинические аспекты микроэкологических нарушений у детей. – М., 2002. – 148 с.

4. Куваева И.Б., Ладодо К.С. Микроэкологические и иммунные нарушения у детей. – М., 1991. – 240 с.

5. Леванова Л.А. Микроэкология кишечника жителей Западной Сибири, коррекция дисбиотических состояний: автореф. дис. ... докт. мед. наук. – М., 2003. – 48 с.

6. Леванова Л.А. Состояние нормальной микрофлоры кишечника у детей дошкольного возраста, проживающих в экологически неблагополучном районе // Ж. микробиологии. – 2002. – № 1. – С. 64 – 68.

7. Методические рекомендации по микробиологической диагностике дисбактериоз кишечника в лечебно-диагностических учреждениях армии и флота. – СПб.: СПНИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, 1999. – 36 с.

8. Молекулярно-генетический анализ видового и штаммового разнообразия бифидобактерий у детей раннего возраста // А.Н. Шкопоров, Л.И. Кафарская, С.С. Афанасьев [и др.] // Вест. Российской АМН. – 2006. – № 1. – С. 45 – 50.

9. Определение видовой принадлежности штаммов бифидобактерий на основе секвенирования фрагментов генов 16S рРНК и трансальдолазы // М.В. Карзанова, О.Л. Воронина, В.Г. Лунин [и др.] // Сб. докладов Россельхозакадемии. – М., 2006. – № 5. – С. 9 – 12.

10. ПЦР в реальном времени. – 2007. – Режим доступа: http://www.ld.ru/catalog/rts/pcr/realtime-pcr.html (дата обращения: 25.09.2011).

11. Хавкин А.И. Эволюция представлений о роли кишечной микрофлоры. – 2005. – Режим доступа: http://www.disbak.ru. (дата обращения: 06.11.2011).

12. Характеристика и использование бифидобактерий, выделенных от взрослых и детей / Г.И. Гончарова, А.М. Лянная, Н.И. Бевз [и др.] // Сб. МНИИЭМ. – М., 1990. – С. 48 – 53.

13. Шендеров Б.А. Функциональное и персональное питание. Современное состояние и перспективы // Гастроэнтерология. – СПб., 2010. – № 2, 3. – С. 2 – 6.

14. Distribution of bifidobacterial species in human intestinal microflora examined with 16S rRNA-gene-targeted species-specific primers / T. Matsuki, K. Watanabe, R. Tanaka [et al.] // Appl. Environ. Microbiol. – 1999. – Vol. 65 (10). – P. 4506 – 4512.

15. Gueimonde M., Tolkko S., Korpimaki T. New real-time quantitative PCR procedure for quantification

of bifidobacteria in human fecal samples // Appl. Environ. Microbiol. — 2004. — Vol. 70 (7). — P. 4165—4169.

16. O'Sullivan D.J. Methods for analysis of the intestinal microflora // Curr. Issues Intest. Microbiol. — 2000. — N 1(2). — P. 39—50.

17. Quantitative PCR with 16S rRNA-gene-targeted species-specific primers for analysis of human intestinal bifidobacteria / T. Matsuki, K. Watanabe, J. Fujimoto [et al.] // Appl. Environ. Microbiol. — 2004. — Vol. 70 (1). — P. 167—173.

Сведения об авторах

Немченко Ульяна Михайловна – младший научный сотрудник лаборатории микроэкологии ФГБУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека» СО РАМН (664025, г. Иркутск, ул. Тимирязева, 16)

Попкова София Марковна – доктор биологических наук, руководитель лаборатории микроэкологии ФГБУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека» СО РАМН (664025, г. Иркутск, ул. Тимирязева, 16; тел.: 8 (3952) 33-34-41; e-mail: smpopkova@gmail.com)

Джиоев Юрий Павлович – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории молекулярной эпидемиологии и генетической диагностики ФГБУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека» СО РАМН (664025, г. Иркутск, ул. Тимирязева, 16; e-mail: alanir07@mail.ru)

Ракова Елена Борисовна – кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории микроэкологии ФГБУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека» СО РАМН (664025, г. Иркутск, ул.Тимирязева, 16)

Савелькаева Марина Владимировна – заведующая отделением гастроэнтерологии клиники ФГБУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека» СО РАМН, врач высшей категории (664025, г. Иркутск, ул. Тимирязева, 16; тел.: 8 (3952) 33-34-45)