

ПРОФИЛАКТИЧЕСКАЯ МЕДИЦИНА

УДК 616.992.282

Е.В. Бухарова, С.М. Попкова, Е.Б. Ракова, Ю.П. Джигоев, Н.М. Шабанова, Е.И. Иванова,
У.М. Немченко, М.В. СавелькаеваМИКРОЭКОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РЕГИОНАЛЬНЫХ ПОПУЛЯЦИЙ
KLEBSIELLA SPP. В КИШЕЧНОЙ МИКРОБИОТЕ ДЕТЕЙ г. ИРКУТСКА

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

В работе представлена микрoэкологическая характеристика региональных популяций *Klebsiella spp.* в кишечной микробиоте детей первого года жизни. У 373 детей (55,9 % от общего количества обследованных) были дисбиотические изменения микрофлоры кишечника, связанные с увеличением количества клебсиелл. Исследована чувствительность аутоштаммов к ряду антибиотических препаратов (групп: β -лактамов, аминогликозидов, хинолонов) и их фагочувствительность (к очищенному фагу клебсиелл пневмонии и очищенному бактериофагу клебсиелл поливалентному). Выборка выделенных штаммов ($n = 142$) характеризовалась высоким удельным весом антибиотикочувствительных клебсиелл. Фаголизательность к коммерческим препаратам бактериофагов определяли у 268 штаммов *Klebsiella spp.* двух видов (146 штаммов *K. oxytoca* и 122 штаммов *K. pneumoniae*). Высокая доля резистентных к исследованным бактериофагам возбудителей (*Klebsiella oxytoca* 66 % и *Klebsiella pneumoniae* 77,8 %) может быть причиной низкой эффективности фаготерапии специфическими фагами и объясняет высокую частоту встречаемости клебсиелл при дисбиозах у детей раннего возраста.

Ключевые слова: кишечная микробиота, дисбиотические нарушения, антибиотикочувствительность, фагочувствительность

MICROECOLOGICAL CHARACTERISTICS OF *KLEBSIELLA SPP.* REGIONAL
POPULATIONS IN THE INTESTINAL MICROBIOTA OF IRKUTSK CHILDRENE.V. Bukharova, S.M. Popkova, E.B. Rakova, Yu.P. Dzhigoev, N.M. Shabanova, E.I. Ivanova,
U.M. Nemchenko, M.V. Savelkaeva

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

In this paper the microecological characteristics of *Klebsiella spp.* regional populations in the intestinal microbiota of infants were represented. 373 children (55,9 % of general quantity of researched) had disbiotic changes of intestinal microbiota related to increasing number of *Klebsiella*. The autostrains sensitivity to antibiotic drugs (β -lactams, aminoglycosides, quinolones) and to purified *Klebsiella pneumoniae* phage and purified polyvalent *Klebsiella* phage were researched. Samples of isolates ($n = 142$) characterized by a high proportion of antibiotic susceptible strains. Phage sensitivity of bacteriophage to the commercial preparations was determined in 268 strains of *Klebsiella spp.* of two types (146 strains of *K. Oxytoca* and 122 strains of *K. pneumoniae*). Probably high frequency of pathogens resistant to studied bacteriophages (*K. oxytoca* 66 % and *K. pneumoniae* in 77.8 % of cases) was the reason of low efficiency of phage therapy by specific phage and can explain high frequency of occurrence of *Klebsiella* at dysbiosis in children of early age.

Key words: intestinal microbiota, disbiotic disorder, antibiotic susceptibility, phagesensitivity

Дисбиотические нарушения в настоящее время – широко распространенное явление в России. Особенно часто встречается дисбиоз кишечника, от которого, по данным различных исследователей, в той или иной степени страдает до 90 % населения страны [1, 3, 7].

Отмечают, что частота эпизодов диареи у грудных детей колеблется от одного до трех в течение года. В зависимости от степени нарушения общего самочувствия детей, тяжести диспепсического синдрома и данных анамнеза эти эпизоды расцениваются по-разному: часто как следствие нарушений микробиоты кишечника, транзиторной ферментативной недостаточности, реже – как инфекционная диарея [13, 15]. Этиология диареи у грудных детей обусловлена неустойчивым микробиотом кишечника, связанного с микробной сукцессией при формировании микрофлоры, особенностями иммунной системы, неадекватным иммунным ответом организма на за-

селение кишечника условно-патогенными микроорганизмами [11]. Частота распространенности кишечных инфекций у детей напрямую связана с социально-экономическими факторами, питанием, качеством воды, климатогеографическими и иными условиями. Кишечные инфекции представляют собой большую группу инфекционных заболеваний человека с энтеральным механизмом заражения, вызываемых патогенными микроорганизмами, вирусами, простейшими. Самый распространенный путь передачи инфекции для детей раннего возраста – контактно-бытовой [3].

Клебсиеллы известны как возбудители заболеваний дыхательных путей, риносклеромы и озы. В последние годы их выделение описано при заболеваниях урогенитального тракта, мозговых оболочек, глаз, суставов и позвоночника, при различных гнойно-септических осложнениях, а также при острых желудочно-кишечных заболеваниях. Клебсиелл счи-

тают возбудителями внутрибольничных инфекций, различных заболеваний новорожденных [1, 15].

Проблема антибиотикорезистентности штаммов условно-патогенной микробиоты, несмотря на все усилия, становится неконтролируемой. Неуклонный рост устойчивости микроорганизмов к антимикробным препаратам является проблемой общемирового масштаба. Низкая эффективность эмпирического использования антибиотиков сочетается с побочными явлениями или нежелательными реакциями в виде снижения иммунитета, подавления нормальной микрофлоры кишечника и последующим формированием дисбиозов [8, 14, 18].

Среди альтернативных антимикробных препаратов особый интерес вызывают бактериофаги. Как в нашей стране, так и за рубежом интерес к лечебным бактериофагам появился вновь. В настоящее время отмечен успешный опыт применения лечебных бактериофагов в хирургии, онкологии, урологии, гинекологии, офтальмологии и т.д. [9, 17].

Одно из важных преимуществ бактериофагов – их специфичность. В то время как антибиотики подавляют бактерии многих видов – не только патогенную, но и нормальную микрофлору, – бактериофаги действуют только против конкретных возбудителей. Исследования показали, что бактериофаги активно проникают в очаг инфекции, тогда как лишь немногие антибиотики обладают такой способностью [2, 7]. В нашей стране бактериофаги разрешены для использования и активно применяются в различных областях медицины [9, 17]. Они не токсичны, не имеют противопоказаний к применению, могут быть использованы в сочетании с любыми другими лекарственными препаратами, в том числе с антибиотиками. Фаги можно назначать беременным, кормящим матерям и детям любого возраста, включая недоношенных. Основным условием успешного применения является проверка выделенной культуры на чувствительность к соответствующему фагу. Кроме того, бактериофаги могут быть использованы не только для лечения, но и для профилактики инфекционных заболеваний [2, 19].

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Оценить уровень чувствительности региональных популяций клебсиелл, выделенных от детей первого года жизни, к антибактериальным препаратам (антибиотикам) и лечебным бактериофагам.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследованы копрологические пробы 667 детей первого года жизни. У 373 детей был бактериологически установлен дисбиоз кишечника, связанный с вегетацией клебсиелл в диагностически значимых концентрациях ($\geq 10 \times 4$ КОЕ/г). Все дети имели функциональные нарушения кишечника (абдоминальный синдром, боли, расстройства дефекации и билиарного тракта), проявляющиеся у них более двух недель.

Бактериологическое исследование содержимого толстой кишки производили согласно [12] и в соответствии с утвержденными методическими рекомендациями. Выделенные микроорганизмы идентифицировали общепринятыми методами [3].

Антибиотикорезистентность клебсиелл определяли диско-диффузионным методом [10]. Для этого пропитанные антибиотиками бумажные диски производства «НИЦФ» ЗАО и «HiMedia Laboratories» накладывали на поверхность питательной среды Мюллера-Хинтона, засеянной исследуемым штаммом, и через 18–20 ч измеряли зоны задержки роста вокруг дисков. В зависимости от величины зон задержки роста микроорганизмов их подразделяли на чувствительные, умеренно чувствительные и устойчивые к антибиотикам.

Использовались антибиотические препараты следующих групп: β -лактамы (амоксциллин, цефтазидим, ампициллин, цефотаксим), аминогликозиды (амикацин), хинолоны (норфлоксацин).

Лизабельность специфическими бактериофагами определяли у 268 изолированных и идентифицированных штаммов клебсиелл. Фагочувствительность определялась к коммерческим препаратам бактериофагов – очищенному фагу клебсиелл пневмонии и очищенному бактериофагу клебсиелл поливалентному производства НПО «Микроген». Тестирование проводилось согласно [5]. Исследования проводили со штаммами клебсиелл, выделенными у детей в течение 2010–2012 гг.

Для статистической обработки результатов использовали пакет прикладных программ «STATISTICA», Microsoft Excel.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Микроэкологический дисбаланс у детей в основном характеризовался тем, что на фоне дефицита бифидобактерий отмечалась высокая плотность бактерий рода *Klebsiella*. Причем, *K. pneumoniae* и *K. oxytoca* встречались в примерно равных долях (48,6 % и 51,4 % случаев соответственно).

Выделенные штаммы *Klebsiella* spp. имели следующие морфологические признаки: на плотных питательных средах клебсиеллы образовывали пышные, частично сливающиеся слизистые колонии – большие, влажные. На средах Эндо и Плоскирева *Klebsiella* spp. образовывали окрашенные колонии с металлическим блеском, что характерно для бактерий, ферментирующих лактозу.

Морфологически *Klebsiella* spp. определялись как грамотрицательные, лишенные спор палочки, имеющие и не имеющие капсулу, неровно-овальной формы, располагающиеся единично, парами или цепочками, что представляет собой типичный пейзаж, характерный для клебсиелл.

В мазках 60 % аутоштаммов клебсиелл имели плотную полисахаридную капсулу, что свидетельствует об устойчивости микроорганизмов.

У 373 детей (55,9 % от общего количества обследованных) дисбиотические изменения микробиоты кишечника были связаны с высокой обсемененностью бактериями рода *Klebsiella* ($> 10 \times 4$ КОЕ/г) на фоне дефицита бифидобактерий – в 62 % случаев, эшерихий – в 10,5 %. При этом в 96,5 % случаев плотность лактобацилл приближалась к нижней границе возрастной нормы (10×6 КОЕ/г) (рис. 1).

В ассоциациях клебсиеллы чаще встречались со *Staphylococcus aureus* ($48,3 \pm 2,5$ %), реже – в сочетаниях с

грибами рода *Candida* ($14,4 \pm 1,8\%$). Ассоциации клебсиелл с другими условно-патогенными микроорганизмами (УПМ) отмечены в $37,3 \pm 2,5\%$ случаев. Спектр этих УПМ достигал 5 видов, из которых по мере убывания частоты отмечены *Citrobacter freundii*, *Clostridium* spp., *Enterococcus* spp., *E. coli* (рис. 2).

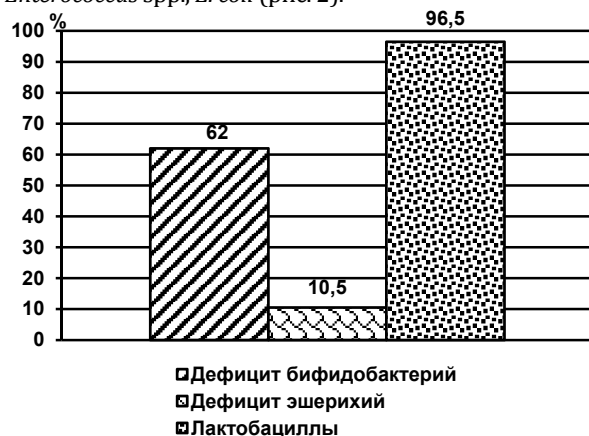


Рис. 1. Микроэкологическая характеристика индигенной микробиоты кишечного биотопа у детей с вегетацией *Klebsiella* spp., %.

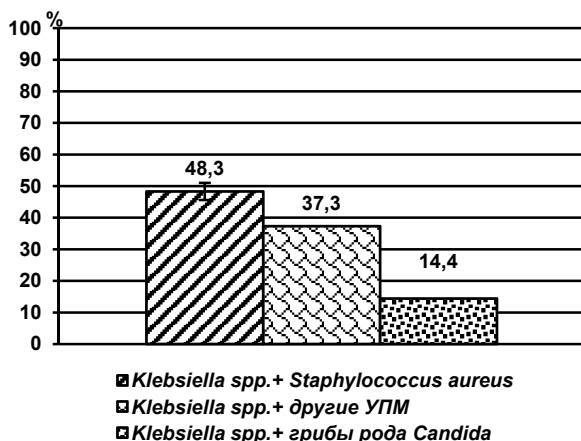


Рис. 2. Варианты ассоциаций клебсиелл с другими УПМ в кишечном биотопе детей первого года жизни, %.

Характеристика чувствительности 142 штаммов *Klebsiella* spp. к антибиотикам представлена на рисунке 3. Установлено, что практически ко всем тестируемым антибиотикам исследуемые штаммы клебсиелл чувствительны: к группе β -лактамов антибиотиков процент чувствительных штаммов составлял от $71,5 \pm 3,8\%$ (цефтазидим), $82,8 \pm 3,2\%$ (амоксиклав), до $88,9 \pm 2,6\%$ (цефотаксим). Исключение составил ампициллин, к которому резистентны $65,8 \pm 4,0\%$ штаммов. Также высок процент чувствительных штаммов камикацину ($91,4 \pm 2,4\%$) из группы аминогликозидов и норфлоксацину ($88,6 \pm 2,7\%$) из группы хинолонов.

Фаголизабельность к коммерческим препаратам бактериофагов определяли у 268 штаммов *Klebsiella* spp. двух видов (146 штаммов *K. oxytoca* и 122 штаммов *K. pneumoniae*) (табл. 1).

В $66 \pm 4,5\%$ случаев штаммы *K. oxytoca* были нечувствительны к бактериофагу поливалентному (0х-1х). Умеренный уровень чувствительности к фагу наблюдался у $25,8 \pm 3,6\%$ штаммов (2х). Высокий уровень чувствительности наблюдался лишь в $8,2 \pm 2,3\%$ случаев (3х-4х).

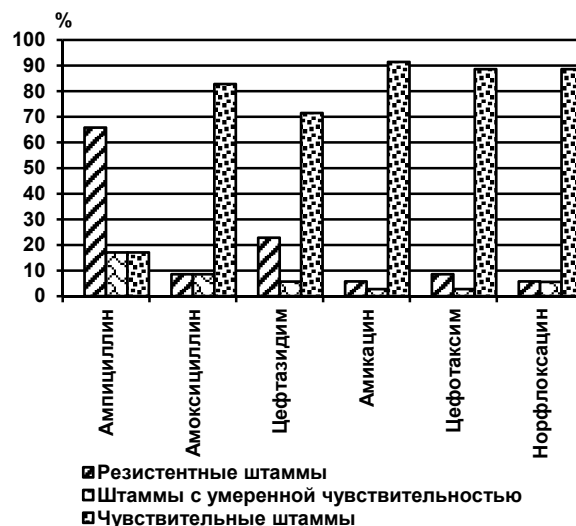


Рис. 3. Характеристика чувствительности антибиотикам штаммов *Klebsiella* spp., выделенных у детей первого года жизни (%).

Таблица 1
Характеристика чувствительности к бактериофагам штаммов *Klebsiella* spp., выделенных у детей первого года жизни, %

Активность бактериофага	<i>K. oxytoca</i> (n = 146)	<i>K. pneumoniae</i> (n = 122)
	Бактериофаг поливалентный	Бактериофаг клебсиелл пневмоний
0х-1х	66 ± 4,5	77,8 ± 3,8
2х	25,8 ± 3,6	11,1 ± 7,5
3х-4х	8,2 ± 2,3	11,1 ± 7,5

Примечание: 0х – штамм нечувствителен; 1х – лизис менее чем на 2х; 2х – не более 50 отдельных негативных колоний; 3х – полусливной лизис; 4х – сливной лизис.

Штаммы *K. pneumoniae* имели слабую чувствительность в $77,8 \pm 3,8\%$ случаев (0х-1х). Сливной лизис со вторичным ростом (2х) наблюдался в $11,1 \pm 7,5\%$ случаев. Высокий уровень чувствительности (3х-4х) к бактериофагу клебсиелл пневмоний наблюдался также редко ($11,1 \pm 7,5\%$ случаев).

Таким образом, в целом, региональные штаммы клебсиелл характеризовались низким уровнем чувствительности к специфическим лечебным бактериофагам, что может быть одной из основных причин низкой эффективности терапии используемыми в настоящее время коммерческими бактериофагами.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Более чем у половины обследованных детей ($55,9\%$ от общего количества обследованных) первого года жизни отмечены дисбиотические отклонения в составе микробиоты кишечника, связанные с увеличением плотности бактерий рода клебсиелла ($> 10 \times 4$ КОЕ/г). Микроэкологический дисбаланс у этих детей в основном характеризовался тем, что высокая плотность клебсиелл регистрировалась на фоне дефицита бифидобактерий. Выявляемость двух основных клинически значимых видов клебсиелл (*K. pneumoniae* и *K. oxytoca*) была примерно равной и составляла $48,6\%$ и $51,4\%$ случаев соответственно.

Оптимальная плотность лактобацилл у большинства детей (более 90 %) свидетельствует либо об особенностях сукцессии кишечного тракта, либо о компенсаторном увеличении их количества, обусловленным сложным механизмом межмикробных коммуникаций. При этом антагонистическая активность лактобацилл явно недостаточна для защиты от экспансии таких условных патогенов, как *Klebsiella* spp.

Региональные аутоштаммы *Klebsiella* spp. обладали высокой степенью чувствительности к группе β-лактамовых антибиотиков, за исключением ампициллина. Также высок процент штаммов, чувствительных в группе аминогликозидов и хинолонов.

При проведении исследования установлено, что аутоштаммы клебсиелл в большинстве случаев проявляли слабую чувствительность к фагам, что является одной из причин неэффективности терапии специфическими бактериофагами и объясняет высокую частоту встречаемости клебсиелл при дисбиозах у детей раннего возраста. Данное обстоятельство может свидетельствовать о низкой либо умеренной лизогенной активности современных расс коммерческих бактериофагов и может представлять риск селекции фагоустойчивых бактерий, в геном которых умеренными фагами, которые не разрушают бактерию, переносится генетический материал от других бактерий [4, 14].

ЛИТЕРАТУРА

1. Блохина И.Н., Дорофейчук В.Г. Дисбактериозы. – М.: Медицина, 1976. – С. 176.
2. Боговазова Г.Г., Ворошилова Н.Н., Бондаренко В.М. Иммунобиологические свойства и терапевтическая эффективность препаратов бактериофагов клебсиелл // ЖМЭИ. – 1992. – № 3. – С. 30–33.
3. Бондаренко В.М., Мацулевич Т.В. Дисбактериоз кишечника как клиничко-лабораторный синдром: современное состояние проблемы. – М.: ГЭОТАР-медиа, 2007. – С. 300.
4. Взаимодействие клебсиелл с коммерческим бактериофагом в кишечнике детей / Н.Н. Зинин-Бермес [и др.] // Журн. Мать и дитя в Кузбассе. – 2005. – № 3 (22). – С. 30–31.
5. Голубева И.В., Килессо В.А., Кисилева Б.С. Энтеробактерии: руководство для врачей. – М., Медицина, 1985. – С. 321.
6. Дарбеева О.С. Эпидемиологическая эффективность фагопрофилактики гнойно-септических заболеваний в акушерских стационарах: автореф. дисс. ... канд. мед. наук. – М., 1982. – С. 21.
7. Дисбактериозы желудочно-кишечного тракта / В.М. Бондаренко [и др.] // Рос. Журн. гастроэнтерол. гепатол. колопроктол. – 1998. – № 8. – С. 66–70.
8. Кюттер Э. Фаговая терапия: бактериофаги как антибиотики. – СПб., 2001.
9. Лазарева Е.Б. Бактериофаги и пектины в коррекции нарушений микробиоценозов при гнойно-воспалительных процессах: дисс. ... д-ра биол. наук. – М., 2007. – С. 179.
10. Методические указания МУК 4.4.1890–04. Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам, 2004.
11. Микророзкологический пейзаж кишечного биоценоза у детей с функциональными нарушениями желудочно-кишечного тракта / У.М. Немченко [и др.] // Бюллетень ВСНЦ СО РАМН. – 2011. – № 5 (81). – С. 89–93.
12. Отраслевой стандарт ОСТ 91500.11.0004–2003. Протокол ведения больных. Дисбактериоз кишечника. Утв. 09.06.03.
13. Пинегин Б.В., Мальцев В.Н., Коршунов В.М. Дисбактериозы кишечника. – М., Медицина, 1984. – С. 144.
14. Препараты бактериофагов: краткий обзор современного состояния и перспектив развития / И.В. Красильников [и др.] // Сибирский медицинский журнал (Иркутск). – 2011. – Т. 26. – № 2 (2). – С. 33–37.
15. Самсыгина Г.А. Особенности становления биоценоза кишечника и кишечный дисбактериоз / Педиатрия // Consilium Medicum. – 2003. – № 2. – С. 30–33.
16. Урсова Н.И. Дисбактериозы кишечника у детей: руководство для практикующих врачей / под ред. Г.В. Римарчук. – М.: ООО «Компания БОРГЕС», 2006.
17. Bruttin A., Brusson H. Human volunteers receiving Escherichia coli phage T4 orally: a safety test of phage therapy // Antimicrob Agents Chemother. – 2005. – Vol. 49, N 7. – P. 2874–2878.
18. Intestinal microflora in early infancy: composition and development / S. Farano [et al.] // Acta Paediatr. – 2003. – Vol. 91. – P. 48–55.
19. Kutateladze M., Adamia R. Bacteriophages as potential new therapeutics to replace or supplement antibiotics // Trends Biotechnol. – 2010. – Vol. 28 (12). – P. 591–595.

Сведения об авторах

Бухарова Екатерина Владимировна – младший научный сотрудник лаборатории микророзкологии Федерального государственного бюджетного учреждения «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека» СО РАМН (664003, г. Иркутск, ул. Тимирязева, 16; тел.: (3952)33-34-41; e-mail: buharowa.ekaterina@yandex.ru)

Попкова София Марковна – доктор биологических наук, руководитель лаборатории микророзкологии Федерального государственного бюджетного учреждения «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека» СО РАМН (664003, г. Иркутск, ул. Тимирязева, 16; тел.: (3952)33-34-41; e-mail: smpopkova@gmail.com)

Ракова Елена Борисовна – научный сотрудник лаборатории микророзкологии Федерального государственного бюджетного учреждения «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека» СО РАМН

Джигоев Юрий Павлович – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник Федерального государственного бюджетного учреждения «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека» СО РАМН

Шабанова Наталья Михайловна – младший научный сотрудник лаборатории микророзкологии Федерального государственного бюджетного учреждения «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека» СО РАМН

Иванова Елена Иннокентьевна – младший научный сотрудник лаборатории микророзкологии Федерального государственного бюджетного учреждения «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека» СО РАМН

Немченко Ульяна Михайловна – младший научный сотрудник лаборатории микророзкологии Федерального государственного бюджетного учреждения «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека» СО РАМН