

Е.И. Иванова¹, Л.И. Колесникова¹, Л.В. Рычкова¹, М.В. Савелькаева¹,
У.М. Немченко¹, Е.Б. Ракова^{1, 2}

МИКРОЭКОЛОГИЧЕСКАЯ И АССОЦИАТИВНАЯ СТРУКТУРА КИШЕЧНОГО БИОЦЕНОЗА ДЕТЕЙ С ФУНКЦИОНАЛЬНЫМИ НАРУШЕНИЯМИ ПИЩЕВАРЕНИЯ

¹ ФГБНУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека», Иркутск, Россия

² ФГБОУ ВО «Иркутский государственный медицинский университет» Минздрава России, Иркутск, Россия

Цель исследования: изучить микробный пейзаж и ассоциативную структуру микробиоты толстого кишечника у детей с функциональными нарушениями пищеварения. С помощью бактериологического метода изучен состав кишечного микробиоценоза 225 детей с функциональными нарушениями пищеварения и 100 здоровых детей. Отличительной особенностью микроэкологического статуса кишечного биоценоза является значительно большая, по сравнению со таковой у здоровых детей, распространённость энтерококков, что может стать риском для появления штаммов с наличием ряда факторов патогенности, вызывающих инфекционные процессы.

Ключевые слова: функциональные расстройства пищеварения, кишечная микробиота, ассоциации микроорганизмов, дисбиотические изменения.

MICROECOLOGICAL AND ASSOCIATIVE STRUCTURE OF INTESTINAL BIOCECENOSIS IN CHILDREN WITH FUNCTIONAL GASTROINTESTINAL DISORDERS

E.I. Ivanova¹, L.I. Kolesnikova¹, L.V. Rychkova¹, M.V. Savelkaeva¹, U.M. Nemchenko¹,
E.B. Rakova^{1, 2}

¹ Scientific Centre for Family Health and Human Reproduction Problems, Irkutsk, Russia

² Irkutsk State Medical University, Irkutsk, Russia

The article is devoted to one of actual problems of gastroenterology – study of microbiocenosis of gastrointestinal tract in functional disorders. Functional gastrointestinal disorders (FGID) or minimal dysfunctions of digestion are frequent in the first months of child's life and provoke anxiety both in parents and in pediatricians.

Aim: to explore the microbial landscape and the associative structure of the microbiota of the large intestine in children with functional disorders of the gastrointestinal tract.

Subjects and methods: Intestinal microbiota composition of 225 children with functional gastrointestinal disorders and 100 healthy children was studied using bacteriological method.

Results. The 88.4 % frequency of detection of intestinal eubiosis disorders is discussed. Information is provided on the species composition of the major opportunistic organisms that inhabit this biotope. According to the results, decrease of bifidobacteria amount in structure of large intestine microbiota increases rate of detection of opportunistic microorganisms – predominantly, Klebsiella genus bacteria and Staphylococcus aureus. The intestinal microbial community is dominated by multicomponent transient association. The frequency of detection of pathogenic Staphylococcus in children under one year is discussed in detail.

Conclusions. A distinctive feature of the intestinal biocenosis microecological status is significantly greater spread of enterococci than in healthy children, which can be a risk for the emergence of strains with the presence of a number of pathogenicity factors that cause infectious processes.

Key words: functional gastrointestinal disorders, intestinal microbiota, associations of microorganisms, dysbiotic changes

Состояние микробиоты кишечника является важнейшим фактором здоровья ребёнка. Как показывают последние исследования, индивидуальность и определённое постоянство микробиоты каждого человека во многом определены генетически, но в то же время микробиоценоз чутко реагирует на любые внешние воздействия, что характеризует его лабильность [6, 7]. Нарушение бактериальной составляющей микробиоты кишечника может привести к угнетению метаболической и секреторной активности клеток кишечного эпителия, снижению резистентности слизистых барьеров, изменению метаболизма колоноцитов и повлиять на местный иммунный ответ [8, 9]. Очевидно, что поддержание гомеостаза и нормального обмена веществ невозможно без восстановления разнообразия нормальных ассоциаций микроорганизмов кишечника [3].

Цель исследования: изучить микробный пейзаж и ассоциативные структуры микробиоты толстого кишечника у детей с функциональными нарушениями пищеварения.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом для исследования служили копрограммы 225 детей с функциональными нарушениями пищеварения (ФНП) (колики, функциональная диарея, функциональные запоры, дисфункция билиарного тракта в течение не менее 12 недель за последние 12 месяцев) и 100 здоровых детей в возрасте до 15 лет. Факторами исключения из исследования были хронические заболевания, в том числе желудочно-кишечного тракта, приём антибактериальных и пробиотических препаратов в предшествующие до обследования 3 месяца. Исследования проводились в соответствии с этическими стандартами Хельсинской декларации Всемирной медицинской ассоциации (2008 г.).

Изучение видового и количественного состава кишечной микробиоты проводили с использованием классических бактериологических методов на базе лаборатории микробиома и микроэкологии ФГБНУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека». Степень дисбиотических нарушений микробиоты толстого кишечника определяли со-

гласно Отраслевому стандарту «Протокол ведения больных. Дисбактериоз кишечника».

Для выявления долевого участия разных видов в структуре биоценоза использовали показатель постоянства (c), определяемый по формуле:

$$c = (p / P) \times 100 \%,$$

где c – показатель постоянства; p – число наблюдений, содержащих изучаемый вид; P – общее число наблюдений. В зависимости от полученного значения, виды подразделяли на постоянные ($c > 50 \%$), добавочные ($25 \% < c < 50 \%$) и случайные ($c < 25 \%$) [4].

Для статистической обработки полученных данных использовали стандартный пакет программ Excel. Вычисляли средние значения, стандартное отклонение, стандартную ошибку.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

По результатам бактериологических исследований копрологических проб установлено, что почти у всех детей с ФНП регистрируются дисмикробиотические нарушения. Более чем у половины из них отмечался дисбиоз кишечника II степени (62,2 %), а дисбиоз I и III степени – в 22,2 % и 4,0 % случаев соответственно. И только у 11,6 % детей микробиота находилась в состоянии динамического равновесия и соответствовала понятию нормы.

У большей части обследованных (73,3 ± 2,9 %) наблюдался дисбаланс облигатной микробиоты. Так, дефицит бифидобактерий зарегистрирован у половины детей (55,5 ± 3,3 %), а дефицит лактобацилл – только у 1,3 ± 0,7 %. В 16,4 ± 2,4 % случаев (40 чел.) у детей определялся дефицит *E. coli* с нормальными ферментативными свойствами.

На фоне снижения доминирования и значимости индигенной симбиотической биоты в микроэкологической системе кишечника отмечалась персистенция различных представителей условно патогенных микроорганизмов (УПМ) в значительном количестве (5–7 lg КОЕ/г).

Всего в кишечной микробиоте идентифицированы следующие виды микроорганизмов с показателем постоянства (c): для *Enterococcus* spp. – 71,6 % (средний уровень популяционной плотности – 6,8 ± 0,5 lg КОЕ/г), *Klebsiella* spp. – 37,3 % (6,0 ± 1,0 lg КОЕ/г), *E. coli* со слабой ферментативной активностью – 27,1 % (7,2 ± 0,6 lg КОЕ/г), *Staphylococcus* spp. – 24,5 % (4,8 ± 0,6 lg КОЕ/г), *Clostridium* spp. – 17,3 % (4,6 ± 1,4 lg КОЕ/г), *Candida* spp. – 15,1 % (4,7 ± 0,7 lg КОЕ/г), *E. coli* с гемолитической активностью – 11,6 % (7,3 ± 0,6 lg КОЕ/г), *Enterobacter* spp. – 9,7 % (5,6 ± 0,9 lg КОЕ/г), *Citrobacter* spp. – 4,4 % (5,6 ± 0,8 lg КОЕ/г), *Pseudomonas* spp. – 3,1 % (5,1 ± 1,1 lg КОЕ/г) и *Proteus* spp. – 1,8 % (6,7 ± 0,5 lg КОЕ/г) (рис. 1).

Таким образом, доминирующим видом, формирующим ядро микробиоценоза кишечника, являлся *Enterococcus* spp, добавочными (видами-наполнителями) – *Klebsiella* spp., *E. coli* со слабой ферментативной активностью и *Staphylococcus* spp., остальные выявленные виды относились к транзитной (случайной) микробиоте [5].

У большей части детей (66,2 %) из копропроб выделены различные виды условно-патогенных микроорганизмов. В монокультуре представители УПМ встречались у каждого третьего ребёнка (31,6 %). Наиболее выявляемыми в монокультуре являлись следующие представители факультативной микробиоты: *Klebsiella* spp. (12,4 %), реже – *Clostridium* spp. (5,8 %), *Enterobacter* spp. (4,9 %), *Staphylococcus aureus* (4,4 %) и *Candida* spp. (2,7 %); *Pseudomonas aeruginosa* (1,3 %), *Citrobacter* spp. (0,4 %) и *S. epidermidis* (0,4 %). В 34,7 % случаев у обследованных детей выделены ассоциации, состоящие от 2 до 4 компонентов (ассоциантов) в биотопе, что является критерием выраженных нарушений формирования нормобиоценоза кишечника. Кроме того, необходимость изучения микроорганизмов как ассоциантов в сообществе, а не как суммы монокультур, обосновывается тем, что в ассоциациях микробные продукты действуют синергически, способствуя росту и размножению бактерий, экспрессии факторов патогенности [1, 2].

У четверти обследованных детей (25,3 %) в кишечном биотопе обнаруживались двухкомпонентные сочетания УПМ. Ассоциации, состоящие из 3 и 4 ассоциантов, регистрировались крайне редко (7,1 % и 2,2 % соответственно) (рис. 2).

Из двухкомпонентных ассоциаций преобладали *Klebsiella* spp. + *S. aureus* (28,1 %), *Klebsiella* spp. + *Candida* spp. (26,3 %), реже встречались *Klebsiella* spp. + *Clostridium* spp. (8,8 %), *Enterobacter* spp. + *S. aureus* (7,0 %), *Klebsiella* spp. + *Citrobacter* spp. (3,5 %). Другие двухкомпонентные сочетания УПМ встречались крайне редко (около 2 % случаев).

Из двухкомпонентных ассоциаций преобладали *Klebsiella* spp. + *S. aureus* (28,1 %), *Klebsiella* spp. + *Candida* spp. (26,3 %), реже встречались *Klebsiella* spp. + *Clostridium* spp. (8,8 %), *Enterobacter* spp. + *S. aureus* (7,0 %), *Klebsiella* spp. + *Citrobacter* spp. (3,5 %). Другие двухкомпонентные сочетания УПМ встречались крайне редко (около 2 % случаев).

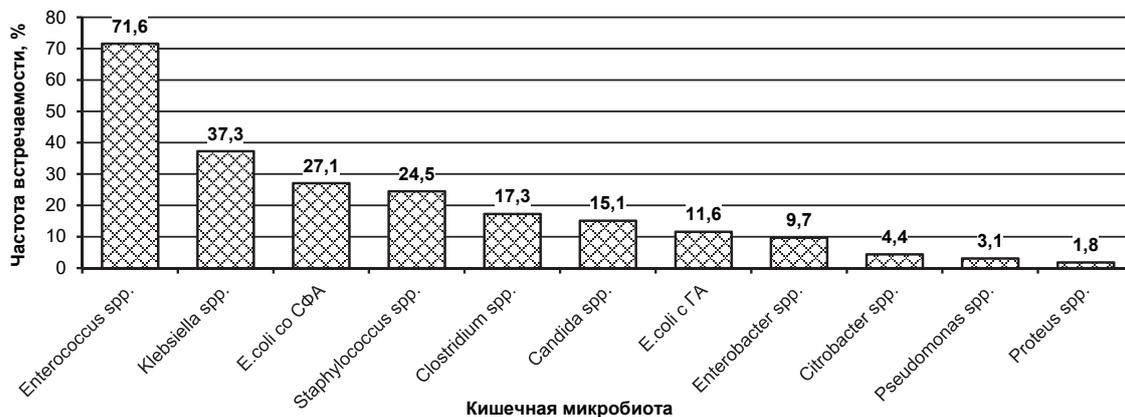


Рис. 1. Спектр и частота встречаемости микроорганизмов желудочно-кишечного тракта у детей с ФН ЖКТ (n = 225).

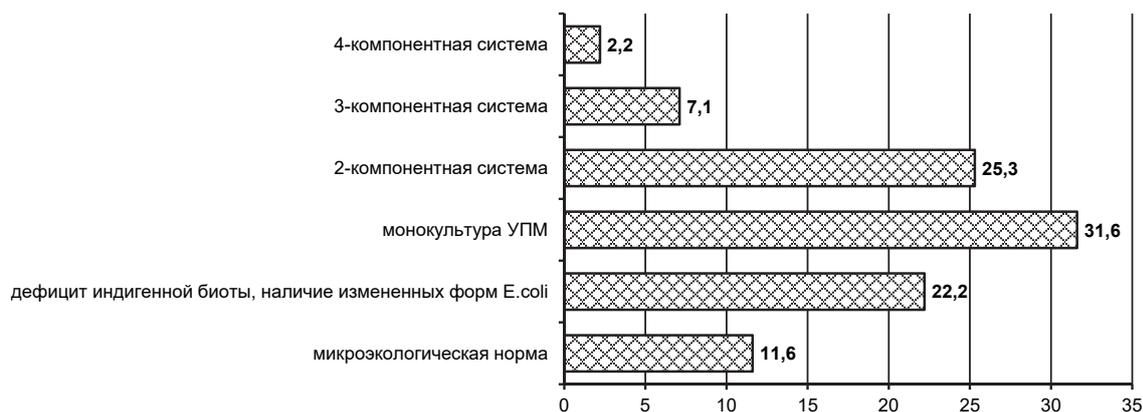


Рис. 2. Ассоциативная структура кишечного микробиоценоза у детей с ФН ЖКТ (%).

Таблица 1
Частота обнаружения и количество микроорганизмов в 1 г копроматериала у здоровых детей

Наименование микроорганизма	Частота обнаружения (коэффициент постоянства, с), %	Популяционная плотность (M ± m), lg КОЕ/г
Анаэробные микроорганизмы		
Бифидобактерии	100	8,2 ± 0,1
Лактобактерии	100	6,2 ± 0,1
Аэробные микроорганизмы		
<i>E. coli</i> с нормальной ферментативной активностью	100	6,2 ± 0,3
<i>E. coli</i> со слабой ферментативной активностью	12,7 ± 3,3	6,1 ± 0,5
<i>Enterococcus</i> spp.	13,0 ± 3,3**↓	4,1 ± 0,2
<i>Staphylococcus</i> spp.	5,6 ± 2,3	3 ± 0,1

Примечание. **↓ – p < 0,01, по сравнению с аналогичным показателем у детей с ФН.

В группе здоровых детей микробный пейзаж копропроб характеризовался доминирующим положением облигатных анаэробных микроорганизмов (бифидобактерий и лактобацилл), из числа аэробных микроорганизмов в 100,0 % случаев выделялась нормальная кишечная палочка (табл. 1).

Состав микробиоты толстой кишки у детей первого года жизни и старше с ФНП имел свои особенности. Распространённость дефицита представителей индигенной биоты у детей первого года жизни и детей старшего возраста с ФНП регистрировалась приблизительно на одинаковом уровне. Частота встречаемости *E. coli* со слабой ферментативной активностью и патогенных энтеробактерий (*Klebsiella* spp.) у детей первого года жизни была почти в 2 раза выше, по сравнению с детьми старше года. Носительство *S. aureus* у детей младшей группы регистрировалось в 6 раз чаще, по сравнению с детьми старшей возрастной группы, и составляло 49,4 %, что свидетельствует о более глубоком нарушении микробиоты именно у детей первого года жизни. Эти возрастные особенности микробиологических характеристик согласуются с процессами сукцессии кишечного тракта, особенно активно проходящих в первый год жизни детей.

С возрастом у детей спектр регистрируемых нами условно патогенных микроорганизмов снижался, за исключением грибов рода *Candida*. Колонизация кишечника дрожжеподобными грибами рода *Candida* среди детей старшей группы была выше в 3 раза таковой у детей младшей группы и составляла 20,0 ± 3,3 %.

Таким образом, наряду с общими закономерностями, связанными с широким распространением среди детей с ФНП дефицита индигенной микробиоты, отличительной особенностью микробиологического статуса кишечного биоценоза является значительно большее, по сравнению со здоровыми детьми, распространение энтерококков. Это может быть риском для появления штаммов с наличием ряда факторов патогенности, вызывающих инфекционные процессы. Кроме того, нами отмечено, что у детей с пониженной колонизационной резистентностью, к коим относятся дети с ФНП, процессы сукцессии, установление микробиологического гомеостаза завершаются достаточно поздно – к 3–4-му году жизни. Совокупность полученных результатов настоящего исследования существенно расширяет и дополняет имеющиеся представления для оценки микробиологического статуса кишечника при функциональных нарушениях у детей, что может служить прогностическим критерием течения заболевания.

**ЛИТЕРАТУРА
REFERENCES**

1. Бухарин О.В., Кремлева Е.А., Сгибнев А.В. Роль ассоциативных микросимбионтов в функционировании ассоциативного симбиоза // Журнал микробиологии. – 2012. – № 6. – С. 89–95.

Bukharin OV, Kremleva EA, Sgibnev AV (2012). Role of associative microsymbionts in functioning of associative symbiosis [Rol' assotsiativnykh mikrosimbiontov

v funkcionirovaniy assotsiativnogo simbioza]. *Zhurnal mikrobiologii*, (6), 89-95.

2. Бухарова Е.В., Попкова С.М., Ракова Е.Б., Джиоев Ю.П., Шабанова Н.М., Иванова Е.И., Немченко У.М., Савелькаева М.В. Микроэкологическая характеристика региональных популяций *Klebsiella* spp. в кишечной микробиоте детей г. Иркутска // Бюллетень ВСНЦ СО РАМН. – 2013. – № 2, ч. 2. – С. 93–96.

Bukharova EV, Popkova SM, Rakova EB, Dzhioev YP, Shabanova NM, Ivanova EI, Nemchenko UM, Savelkaeva MV (2013). Microecological characteristics of *Klebsiella* spp. regional populations in the intestinal microbiota of Irkutsk children [Mikroekologicheskaya kharakteristika regional'nykh populyatsiy *Klebsiella* spp. v kishechnoy mikrobiote detey g. Irkutsk]. *Bulleten' Vostочно-Sibirskogo nauchnogo centra*, 2 (2), 93-96.

3. Егшатын Л.В., Ткачева О.Н., Кафарская Л.И., Шкопоров А.Н., Тяхт А.В. Изменения кишечной микрофлоры, ассоциированные с возрастом и образом жизни // Ожирение и метаболизм. – 2015. – Т. 12, № 2 – С. 3–9.

Egshatyan LV, Tkacheva ON, Kafarskaya LI, Shkoporov AN, Tyakht AV (2015). The changes of gut microbiota associated with age and lifestyle [Izmeneniya kishechnoy mikroflory, assotsiirovannye s vozrastom i obrazom zhizni]. *Ozhirenie i metabolism*, 12 (2), 3-9.

4. Захарова Ю.В. Биологические свойства бифидобактерий в ассоциативном симбиозе толстой кишки // Медицина в Кузбассе. – 2010. – № 1. – С. 14–16.

Zakharova YV (2010). Biological properties of bifidobacteria in associative symbiosis of the large intestine [Biologicheskie svoystva bifidobakteriy v assotsiativnom simbioze tolstoy kishki]. *Meditsina v Kuzbasse*, (1), 14-16.

5. Иванова Е.И., Попкова С.М., Джиоев Ю.П., Ракова Е.Б., Немченко У.М., Рычкова Л.В. Выявление шига-токсинпродуцирующих штаммов *Escherichia coli* в популяциях нормальной кишечной микробиоты у детей с функциональными нарушениями желудоч-

но-кишечного тракта // Клиническая лабораторная диагностика. – 2014. – Т. 59, № 11. – С. 56–60.

Ivanova EI, Popkova SM, Dzhioev YP, Rakova EB, Nemchenko UM, Rychkova LV (2014). Detection of Shiga toxin-secreting *Escherichia coli* strains in the populations of normal intestinal microbiota in children with functional disorders of the gastrointestinal tract [Vyavlenie shiga-toksinproduktivnykh shtammov *Escherichia coli* v populyatsiyakh normal'noy kishechnoy mikrobioty u detey s funktsional'nymi narusheniyami zheludochno-kishechnogo trakta]. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*, 59 (11), 56-60.

6. Макарова С.Г., Намазова-Баранова Л.С. Кишечная микробиота и использование пробиотиков в практике педиатра. Что нового? // Педиатрическая фармакология. – 2015. – Т. 12, № 1 – С. 38–45.

Makarova SG, Namazova-Baranova LS (2015). Intestinal microbiota and use of probiotics in pediatric practice: What's new? [Kishechnaya mikrobiota i ispol'zovanie probiotikov v praktike pediatria. Chto novogo?]. *Pediatricheskaya farmakologiya*, 12 (1), 38-45.

7. Мамонтова Л.М., Савилов Е.Д., Протодьяконов А.П., Маркова Ю.А. Инфекционная «агрессивность» окружающей среды: концепция микробиологического мониторинга. – Новосибирск, 2000. – 240 с.

Mamontova LM, Savilov ED, Protodyakonov AP, Markova YA (2000). Infectious "aggressiveness" of the environment: microbiological monitoring concept [Infektsionnaya «agressivnost'» okruzhayushchey sredy: kontseptsiya mikrobiologicheskogo monitoringa], 240.

8. Garcia Rodriguez C (2007). Toll-like receptor 4 dependent pathways as sensors of endogenous «danger» signals. New evidences and potential therapeutic targets. *Immunology*, 26 (4), 210-215.

9. Sawant PD, Venkatraman J, Ducrotté PR (2010). Evaluation of *Lactobacillus plantarum* 299v Efficacy in IBS: Results of a randomized placebo-controlled trial in 200 patients. *Digestive Disease Week*, 34.

Сведения об авторах Information about the authors

Иванова Елена Иннокентьевна – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник ФГБНУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека» (664025, г. Иркутск, ул. Карла Маркса, 3, тел.: 8 (3952) 33-34-41; e-mail: ivanova.iem@gmail.com)

Ivanova Elena Innokentyevna – Candidate of Biological Sciences, Senior Research Officer of Scientific Centre for Family Health and Human Reproduction Problems (664025, Irkutsk, Karl Marks str., 3; tel.: +7 (3952) 33-34-41; e-mail: ivanova.iem@gmail.com)

Колесникова Любовь Ильинична – член-корреспондент РАН, заслуженный деятель науки РФ, научный руководитель ФГБНУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека» (664003, г. Иркутск, ул. Тимирязева, 16, тел.: 8 (3952) 20-73-67)

Kolesnikova Lyubov Iljinichna – Corresponding Member of RAS, Scientific Advisor of Scientific Centre for Family Health and Human Reproduction Problems (664003, Irkutsk, Timiryazev str., 16; tel.: +7 (3952) 20-73-67)

Рычкова Любовь Владимировна – доктор медицинских наук, профессор, директор ФГБНУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека» (e-mail: zam_gunc@mail.ru)

Rychkova Lyubov Vladimirovna – Doctor of Medical Sciences, Professor, Director of Scientific Centre for Family Health and Human Reproduction Problems (e-mail: zam_gunc@mail.ru)

Савелькаева Марина Владимировна – заведующая отделением гастроэнтерологии клиники ФГБНУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека» (тел.: 8 (3952) 33-34-45; e-mail: for-samarina@yandex.ru)

Savelkaeva Marina Vladimirovna – Head of the Department of Gastroenterology of the Clinic of Scientific Centre for Family Health and Human Reproduction Problems (tel.: +7 (3952) 33-34-45; e-mail: for-samarina@yandex.ru)

Немченко Ульяна Михайловна – кандидат биологических наук, научный сотрудник ФГБНУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека» (e-mail: umnemch@mail.ru)

Nemchenko Ulyana Mikhaylovna – Candidate of Biological Sciences, Research Officer of Scientific Centre for Family Health and Human Reproduction Problems (e-mail: umnemch@mail.ru)

Ракова Елена Борисовна – кандидат биологических наук, научный сотрудник ФГБНУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека»

Rakova Elena Borisovna – Candidate of Biological Sciences, Research Officer of Scientific Centre for Family Health and Human Reproduction Problems