

ЛАБОРАТОРНАЯ ОЦЕНКА МИКРОЭКОЛОГИЧЕСКОГО ДИСБАЛАНСА ТОЛСТОЙ КИШКИ

А.М. МАИВЕЛЯН, М.А. БАЛАЯН, Э.С. ПЕНОЯН,
С.А. АГАЯН, А.З. ПЕНОЯН

Институт молекулярной биологии НАН РА, Ереван, 0014

Исследованы особенности роста комменсальных изолятов *Escherichia coli* на MS среде и на питательных средах с различными углеводами. Полученные данные позволяют рассмотреть специфику роста изолятов *E. coli* на дезоксирибозной среде как контрольный тест здорового состояния микрофлоры кишечника.

Ստուճնատիրվել է կոճենատ *Escherichia coli* անջատույճների աճի առանձնատկույթությունները տարբեր ածխաջրատներով և MS միջավայրերի վրա: Առաջված արդյունքները թույլ են տալիս դիտարկել կոճենատ *E. coli* անջատույճների աճի առանձնատկույթությունները ղեկգծսիտիթղզային միջավայրի վրա որպես առողջ աղիքային միկրոֆլորայի ստուգիչ քննա:

Features of *Escherichia coli* commensal isolates' growth on MS medium and on nutrient media with various carbohydrates were investigated. The specificity of growth of commensal *E. coli* isolates on deoxyribose medium can serve as a basis for control test of a healthy condition of gut microflora.

*Комменсальная микрофлора - E. coli - кишечный дисбиоз -
антибиотикорезистентность*

Известно, что состояние микробной экологии кишечника имеет важную, а возможно, и решающую роль в патогенезе многих болезней [4, 6, 7, 9, 11, 12].

В связи с этим за последние годы активировался процесс разработки экспресс-методов, которые позволяют за короткое время точно диагностировать кишечный дисбиоз. Прогностическим является хроматографический метод [1, 3], с помощью которого в человеческих выделениях выявляются различные химические соединения, связанные с деятельностью нормальной кишечной микрофлоры. Микробиологические и биохимические методы диагностики дисбиоза имеют как недостатки, так и преимущества, в связи с чем на данный момент применяется недавно разработанный метод лабораторной диагностики дисбактериоза толстой кишки, включающий оба вышеуказанных метода [2, 5]. Он служит оценкой паспорта микробного метаболизма кала и эффективности применяемой терапии. Несмотря на преимущества этого метода определения дисбиоза, он имеет ряд недостатков, связанных с частотой встречаемости основных представителей кишечного микробиоценоза и их средним количеством в кишечнике. Имелись

это и побудило интерес к более детальному анализу некоторых особенностей роста комменсальных изолятов *Escherichia coli* на различных средах роста.

Материал и методика. Исследовалась кишечная микрофлора 55 добровольцев с периодической болезнью (ПБ), с язвенным колитом, с синдромом послепаления кишечника (СВК) и с раком молочной железы (средний возраст 24,4 лет, пациенты из Республиканской клинической больницы и Онкологического центра им. Фанарджяна), и кишечная микрофлора 35 здоровых контрольных лиц. За 2-3 недели до исследования контрольные лица не принимали антибиотиков, гормональных препаратов, радиотерапии и других иммуностимулирующих препаратов или химиотерапевтических агентов.

Свежий фекальный образец (1 г) растворяли в 9 мл физиологического раствора и выдерживали 2 мин. Осадок удаляли с помощью центрифугирования на низкой скорости, а надосадок постепенно разбавляли в физиологическом растворе. Для первичной идентификации энтеробактерий разбавленный раствор высевали на агаре МакКонки, после чего продолжали анализ, используя селективную среду и известные биохимические тесты [8, 10].

Для наблюдения роста изолированных бактерий на 2-D дезоксирибозе была использована MS среда (50 мМ дифосфата калия, 20 мМ хлорида аммония, 4 мМ лимонной кислоты, 1 мМ сульфата магния, 3 мМ хлорида железа, 1 мМ хлорида марганца и 1 мМ хлорида кальция) с добавлением 1,8 % агара.

Пять комменсальных изолятов *E. coli* от каждого пациента были исследованы на чувствительность к следующим антибиотикам: тетрациклин (15 мкг/мл), доксициклин (15 мкг/мл), амоксициллин (25 мкг/мл), ампициллин (35 мкг/мл), цефоперазон (75 мкг/мл), цефокситин (50 мкг/мл), канамицин (50 мкг/мл), гентамицин (50 мкг/мл), левомицетин (30 мкг/мл) и стрептомицин (50 мкг/мл). Бактерии выращивали аэробно в течение 18ч при 37°.

Результаты и обсуждение. Данные сравнительного анализа роста на различных питательных средах комменсальных изолятов *E. coli* из кишечной микрофлоры здоровых людей и больных, страдающих гастроэнтерологическими заболеваниями и раком молочной железы, не показывают различия в росте комменсальных изолятов *E. coli* в зависимости от содержания типа углевода в среде для больных и здоровых лиц (табл. 1). Интерес представляют результаты исследования роста комменсальных изолятов *E. coli* на дезоксирибозной среде. Как видно из табл. 2, при CFU/г выше 10^3 CFU/г рост комменсальных изолятов *E. coli*, растущих на дезоксирибозной среде, в контрольной группе практически наблюдался только у 6 % здоровых людей. У пациентов с гастроэнтерологическими заболеваниями и раком молочной железы показатели были значительно выше и в разных группах составляли 40-47%.

Результаты были наиболее выраженными при низких титрах бактерий в фекальном материале. Как свидетельствуют данные табл. 1, при CFU/г ниже 10^2 рост комменсальных изолятов *E. coli* на дезоксирибозной среде наблюдается у 23-26% больных. При данном значении CFU/г в контрольной группе роста изолятов *E. coli* на дезоксирибозной среде не наблюдалось.

Полученные данные позволяют рассматривать специфику роста изолятов *E. coli* на дезоксирибозной среде (особенно при CFU/г ниже 10^2) как контрольный тест здорового состояния микрофлоры кишечника.

Таблица 1. Рост комменсальных изолятов *E. coli* на разных питательных средах

Среда	Субъекты с титром бактерий ниже 10^3 CFU/г в фекальном материале, %	
	Здоровые люди	Больные
Сахароза	0	0
Лактоза	100	100
D-маннитол	100	100
D-(+) сорбитол	100	100
D-(+) ксилоза	100	100
D-(+) арабиноза	100	100
Душитол	100	100
Глюкоза	100	100
Дезоксирибоза	0	23- 26

В ходе работы исследовали антибиотикорезистентность комменсальных *E. coli*. Было показано, что процентное соотношение чувствительных к антибиотикам клеток *E. coli* у больных (39%-43%) было почти в два раза ниже показателя контрольных здоровых лиц (78%) (табл. 3). В тоже время резистентные к одному конкретному классу антибиотиков изоляты *E. coli* преобладали у больных (в пять раз превышали показатели здоровых) (табл. 3). Процентные соотношения мультирезистентных комменсальных *E. coli* у больных и здоровых (в больницах и в обществе) были практически идентичны и фактически не зависели от режима использования антибиотиков. С другой стороны, обнаружено, что у *E. coli* на дезоксирибозной среде наблюдается значительное количество мультирезистентных изолятов.

Таблица 2. Комменсальные *E. coli*, растущие на дезоксирибозной среде

Бактерии	Субъекты, %				
	Здоровые люди N=35	Пациенты с ИБ N=27	Пациенты с раком молочной железы N=12	Пациенты с язвенным колитом N=7	Пациенты с СВК N=9
Комменсальные <i>E. coli</i> , выращенные на дезоксирибозной среде, титр бактерий выше 10^3 CFU/г в фекальном материале	6	45	40	47	46
Комменсальные <i>E. coli</i> , выращенные на дезоксирибозной среде, титр бактерий ниже 10^3 CFU/г в фекальном материале	0	23	25	25	26

* N - число пациентов.

Таблица 3. Профиль антибиотикорезистентности кишечных комменсальных *E. coli* у здоровых и больных

Субъекты	Комменсальные изоляты <i>E.coli</i> , %		
	Чувствительные ко всем классам использованных антибиотиков	Резистентные	Мультирезистентные
Контрольная группа, N=11, n=55	78	8	14
Пациенты, N=21, n=144	43	40	17

N - Число пациентов, n - число изолятов.

Таким образом, выявление биохимических особенностей комменсальных представителей кишечной микрофлоры открывает возможности для разработки новых принципов диагностики дисбиоза.

ЛИТЕРАТУРА

1. Осипов Г.А., Парфенов А.И., Богомолов П.О. Рос. гастроэнтерол. журн., 1, 54-69; 2001.
2. Alm J.S., Swartz J., Bjorksten B., Engstrand L., Engstrom J., Kuhn I., Lilja G., Mollby R., Norin E., Pershagen G., Reinders C., Wreiber K., Scheynius A. *Pediatr Allergy Immunol.* 13, 6, 402-11, 2002 Dec.
3. Ashby K.D., Casey T.A., Rasmussen M.A. *J Agric Food Chem.* 49, 3, 1123-7, 2001.
4. Garcia-Tsao G., Wiest R. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, 18, 2, 353-372, 2004.
5. Guerin-Danan C., Andrieux C., Popot F., Charpilienne A., Vaissade P., Gaudichon C., Pedone C., Bouley C., Szylit O. *J. Pediatr Gastroenterol Nutr.* 25, 3, 281-9, 1997 Sep.
6. Guarner F., Malagelada J.R. "Best Practice & Research Clinical Gastroenterology". 17, 5, 793-804, 2003 Oct.
7. Guarner F., Malagelada J.R. *The Lancet.* 361, 9356, 512-519, 2003 Feb
8. Hult J.G., Krieg N.R., Smeath P.H.A., Staley J.T., Williams S.T. (ed.) 9th ed, 1994.
9. Hugot J.P. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, 18, 3, 451-462, 2004.
10. Murray P.R., Baron E.J., Pfaller M.A., Tenover P.C., Tenover R.H. (eds) *Manual of Clinical Microbiology*. 6th ed. American Society for Microbiology, Washington, DC, 1995.
11. Subramanian S., Campbell B.J., Rhodes J.M. Division of Gastroenterology, School of Clinical Sciences, University of Liverpool, Liverpool, UK. *Curr Opin Infect Dis.* 19, 5, 475-84, 2006.
12. Vedantam G., Hecht D.W. *Current Opinion in Microbiology*, 6, 5, 457-461, 2003.

Поступили 02.V.2007