

УДК 616.348-002.44-008.87

Характеристика кишечной микрофлоры у больных язвенным колитом

И.А. Лягина, Т.К. Корнева, О.В. Головенко, А.В. Веселов

(Государственный научный центр колопроктологии Федерального агентства по высокотехнологичной медицинской помощи, Москва)

The characteristic of intestinal microflora in patients with ulcerative colitis

I.A. Lyagina, T.K. Korneva, O.V. Golovenko, A.V. Veselov

Цель исследования. Проанализировать состояние кишечной микрофлоры у больных язвенным колитом (ЯК) и здоровых лиц с помощью двух методов – бактериологического посева и применения разработанного по специальной технологии фиксированного окрашенного препарата для прямого микроскопирования.

Материал и методы. С помощью указанных выше методов обследованы 200 человек, из них 150 больных ЯК и группа сравнения – 50 здоровых лиц. Просмотрено 400 препаратов.

Результаты. У больных ЯК по сравнению со здоровыми методом бактериологического посева установлены изменения в концентрации и частоте встречаемости основной и факультативной флоры. В микробном пейзаже не удалось выделить ведущие в количественном отношении виды микроорганизмов, что говорит о нестабильности микробного сообщества.

Сравнительный анализ полученных данных позволил определить у больных ЯК основные морфотипы микробов кишечной микрофлоры, их количество, соотношение грампозитивной и грамотрицательной микрофлоры, а также размеры микробных клеток, разнообразие и преобладание определенных морфотипов.

Заключение. Метод прямой микроскопии нативного биосубстрата выявил новые критерии для оценки нарушений кишечной микрофлоры у больных ЯК. Непосредственное (прямое) наблюдение за микрофлорой просвета толстой кишки может стать перспективным с точки зрения получения информации о связи микробного ценоза с состоянием толстой кишки. Прямая бактериоскопия лучше поддается стандартизации и воспроизводству, чем рутинный бактериологический посев.

Ключевые слова: прямая бактериоскопия, нарушение кишечной микрофлоры, язвенный колит, воспалительные заболевания кишечника.

Aim of investigation. To analyze the state of intestinal microflora in patients with ulcerative colitis (UC) and healthy persons with the help of two methods - bacteriological investigation and application of fixed stained preparation developed on special technology for direct microscopy.

Stuff and methods. Using two above-mentioned methods 200 persons were investigated, of them 150 patients with UC and control group - 50 healthy persons. 400 specimens were studied.

Results. In patients with UC in comparison to healthy people changes in concentration and frequency of occurrence of basic and facultative flora were detected by bacteriological method. In microbial landscape it was not possible to define leading species of microorganisms in quantitative aspect that indicates instability of microbial assembly.

Comparative analysis of obtained data has allowed to determine basic morphotypes of microbes of intestinal microflora, their quantity, interrelation of gram-positive and gram-negative microflora, as well as sizes of microbial cells, diversification and predominance of fixed morphotypes in UC patients.

Conclusion. Method of direct microscopy of native biosubstrate has revealed new criteria for evaluation of disorders of intestinal microflora at patients with UC. Direct visualization of microflora of large intestinal lumen can provide information on relation of microbial coenosis with state of large intestine. The direct bacterioscopy allows better standartization and reproduction, than routine culture.

Key words: direct bacterioscopy, disorders of intestinal microflora, ulcerative colitis, inflammatory bowel diseases.

Важнейшую роль в жизнедеятельности организма человека играют симбионтные микроорганизмы, формирующие микрофлору кишечника. В норме биоценоз *желудочно-кишечного тракта* (ЖКТ) представлен облигатной, факультативной и транзитной микрофлорой. Облигатной (обязательной) микрофлорой являются бифидобактерии, лактобактерии, нормальные кишечные палочки, энтерококки, бактероиды. Они преобладают в кишечной микрофлоре по сравнению с некоторыми другими сапрофитными бактериями, которые являются дополнительной (факультативной) микрофлорой и укрепляют микробное сообщество (например, пептококки). В здоровом кишечнике микробная флора выстилает слизистую оболочку в виде биопленки.

Метаболические и регуляторные возможности индигенной микрофлоры, как известно, чрезвычайно велики. По сути, индигенная микрофлора — метаболически и регуляторно весьма активный «дополнительный орган» человеческого организма [1].

В настоящем сообщении анализируется микрофлора фекалий у больных *язвенным колитом* (ЯК). Кишечная микрофлора у пациентов с этой патологией изучается в нашем центре на протяжении уже многих десятилетий. На основе исследований именно этого микробного сообщества формировалась методика определения нарушений кишечной микрофлоры, существующая до сих пор (метод количественного посева).

Экспериментальные исследования на мышах с генетическими дефектами иммунной системы показали, что наличие кишечной микрофлоры является необходимым условием для развития воспаления [10]. Есть все основания считать, что у больных с воспалительными заболеваниями кишечника потеряна иммунологическая толерантность к бактериям, населяющим желудочно-кишечный тракт [9].

Изменение нормальных соотношений в составе кишечного микробиоценоза снижает его защитную и витаминсинтезирующую функции, сказывается на ферментативных процессах, приводит к увеличению объема нежелательных продуктов метаболизма условно-патогенных видов. Все это помимо дисфункции ЖКТ приводит к деструктивным изменениям кишечной стенки, расстройствам электролитного обмена, блокаде и извращению иммунологических реакций, нарушению мембранного транспорта, изменению окислительного фосфорилирования [8]. Формирующийся при этом дисбактериоз кишечника, в свою очередь, запускает и поддерживает каскад воспалительных реакций в стенке толстой и тонкой кишки. За счет продукции биологически активных веществ кишечные микроорганизмы способны активно влиять на различные функции толстой кишки, в частности секреторную и моторную [10].

Стандартное бактериологическое исследование просветной микрофлоры толстой кишки, громоздкое и трудоемкое, не всегда компенсирует своей результативностью затраты на него и не дает информации о взаимосвязи между микробным пейзажем и характером поражения в кишке. В связи с этим мы предприняли попытку анализа фекальной флоры у больных ЯК и здоровых лиц с помощью разработанного нами метода прямой бактериоскопии кала. Полученные результаты сравнивались с данными параллельно выполняемого бактериологического посева.

Материал и методы исследования

С 2005 по 2007 г. было обследовано 150 человек в возрасте от 20 до 64 лет (средний возраст $39,0 \pm 4,3$ года). По результатам клинико-эндоскопического обследования у них был диагностирован ЯК (*основная группа*): тотальное поражение выявлено у 67, левостороннее — у 39, дистальное — у 44. *Группу сравнения* по данным эндоскопического исследования составили 50 здоровых лиц.

При бактериологическом исследовании кала использовали метод количественного посева, модифицированный в 1974 г. [5], практически соответствующий Отраслевому стандарту [7]. В целях сравнения применялся разработанный нами метод прямой бактериоскопии нативного кала [4]. Количественный фиксированный препарат анализировался с помощью видео тест-системы, повышающей информативность исследования. Было просмотрено 400 препаратов.

При изучении микробного ценоза с помощью прямой бактериоскопии проводились: учет численности различных морфотипов, видеорегистрация морфотипов, анализ видового разнообразия, определение соотношения грамположительных и грамотрицательных форм, а также различных размеров клеток микробов.

Результаты исследования и их обсуждение

При использовании метода бактериологического посева основными маркерами, позволяющими сделать заключение о дисбиотических изменениях, являются: видовая принадлежность «анаэробов» и «аэробов», количественная характеристика (концентрация) и частота встречаемости этих групп микроорганизмов (табл. 1). Базируясь на видовой идентификации, определяют **облигатную микрофлору**. Это бифидо-, лактобактерии, бактероиды, клостридии, типичные эшерихии, энтерококки и анаэробные кокки. По мнению А.А. Воробьева и соавт., подкрепленному экспериментальными исследованиями, присутствие в кишечнике облигатных (индигенных, аутохтонных)

Таблица 1

Микрофлора фекалий у больных язвенным колитом (метод бактериологического посева)

Микроорганизмы	Больные ЯК (n=150)		Здоровые лица (n=50)	
	частота обнаружения, %	количество, lg	частота обнаружения, %	количество, lg
Бифидобактерии	58,3	8,0	71,6	7,3
Бактероиды	53,8	8,0	61,3	8,1
Анаэробные кокки	80,5	8,0	70,2	7,4
Прочие аспорогенные	78,4	8,0	54,5	7,3
Анаэробы				
Клостридии	69,5	6,0	72,7	4,0
Лактобактерии	52,0	6,5	45,4	4,7
Эшерихии типичные	91,6	6,0	97,7	6,8
Эшерихии нетипичные лактозоотрицательные	17,3	6,2	11,3	5,0
Из них:				
эшерихии с гемолитическими свойствами	25,0	2,6	9,0	7,0
протеи	8,3	9,0	6,8	7,0
Другие энтеробактерии	56,4	6,9	13,4	2,2
Неферментирующие бактерии	8,6	6,0	4,5	5,0
Стафилококк золотистый	26,0	3,8	12,2	2,2
Другие стафилококки	58,3	5,2	13,6	3,7
Энтерококки	41,6	6,8	20,4	5,2
Стрептококки с гемолитическими свойствами	13,3	5,0	2,2	3,0
Дрожжевые грибы	65,7	4,4	50,0	3,9
Плесневые грибы	8,3	4,0	28,5	4,5

микроорганизмов устанавливается и контролируется генотипически. Что касается факультативной (условно-патогенной) и транзитной (случайной) флоры, то ее изменчивость практически всегда определяется преобладающим влиянием средовых факторов [2].

К **факультативной** (условно-патогенной) флоре (УПФ) можно отнести эшерихии с нетипичными биохимическими свойствами, *E. coli* с гемолитическими свойствами, протеи, цитробактеры, энтеробактеры, клебсиеллы, иерсинии, кампилобактерии, некоторые пастереллы, аэромонады, клостридии (а именно *Cl. difficile*), грибы дрожжевые, золотистые стафилококки, β -гемолитический стрептококк.

К **транзитным** (случайным) микроорганизмам могут быть причислены неферментирующие бактерии, некоторые аэробные негемолитические стрептококки, аэробные споровые бациллы, плесневые грибы, псевдомонады.

Концентрация облигатных видов, перечисленных выше, изменяется как генотипически, так и под воздействием среды. Количество же условно-патогенных видов зависит от среды и изменения микробиологических условий в кишечнике.

Еще один показатель, используемый для анализа кишечной микрофлоры при бактериологиче-

ском посеве, — частота встречаемости. По данным А.А. Воробьева и соавт., у индигенных видов она в 2,4 раза выше, чем у транзитных.

Исходя из сказанного, мы можем представить изменение видов микрофлоры у больных ЯК в сравнении со здоровыми (табл. 2). У больных ЯК облигатные виды составляют 46,6%, а не 70,1% как у здоровых. Доля условно-патогенных и транзитных видов при ЯК возрастает до 32,7 и 20,7% по сравнению с 17,0 и 12,9% у здоровых. Это обусловлено изменениями в концентрации и частоте встречаемости различных видов микроорганизмов у обследованных двух групп.

Таким образом, если согласиться с логикой рассуждений о генотипической предопределенности ведущих популяций микроорганизмов кишечной флоры, можно сделать вывод о том, что они не могут нормально персистировать при ЯК почти у $2/3$ больных. Наиболее стойкими к изменившимся условиям существования оказались кишечные палочки с типичными свойствами, высеваемые у 95,5% больных и сохраняющие концентрацию (lg 6,9), близкую к нормальной.

УПФ в различных сочетаниях встречается практически у всех больных ЯК, а у здоровых только в 21,1%. Кроме того, если в «здоровом» микробном ценозе в среднем обнаруживается

Таблица 2

Облигатная и факультативная микрофлора у больных ЯК

Группа микроорганизмов	Удельный вес в микробном ценозе, %		Концентрация, г	Частота встречаемости
	Здоровые лица (n=50)	Больные ЯК (n=150)		
Облигатная	70,1	46,6	В 1,7 раза меньше	В 1,5 раза меньше
Условно-патогенная	17,0	32,7	В 2,7 раза больше	Нет
Транзиторная	12,9	20,7	В 1,9 раза больше	Нет

не более 0,2 вида УПФ, то у больных ЯК — 2,1 вида, т. е. в 10,5 раза больше. Концентрация условно-патогенных видов у больных ЯК составила lg 5,2, а у здоровых — 2,2.

К транзитным для нормальной микрофлоры толстой кишки видам могут быть отнесены неферментирующие бактерии, различные стафилококки, кроме золотистых, проанализированных выше, стрептококки, плесневые грибы. Частота встречаемости этих видов составила в среднем 25,1%, а концентрация — lg 5,0.

Полученные данные позволяют предположить, что основными признаками нарушения кишечной микрофлоры при ЯК являются:

— выраженное нарушение в облигатной флоре, существование которой у индивидуального генотипа жестко зависит от состояния и функциональных свойств слизистой оболочки толстой кишки. У больных ЯК в таком «микробном пейзаже» не удастся выделить ведущие в количественном отношении виды микроорганизмов;

— многовидовость внутрислизистой кишечной флоры (обилие видов по сравнению с нормой, говорящее о нестабильности микробных сообществ, живущих в нестабильной, ненормальной среде).

В связи с дефектом популяций бифидо-, лактобактерий, а также некоторых аспорогенных анаэробов нарушается целостность микробной биопленки на слизистой оболочке толстой кишки. Формирующееся при этом нарушение микрофлоры кишечника, в свою очередь, запускает и поддерживает каскад воспалительных реакций в стенке толстой и тонкой кишки. За счет продук-

ции биологически активных веществ кишечные микроорганизмы способны активно влиять на различные функции толстой кишки, в частности секреторную и моторную. Поскольку нарушение кишечной микрофлоры носит вторичный характер, его нельзя рассматривать как триггерный фактор. Нарушение симбиотной микрофлоры может лишь способствовать поддержанию неспецифического воспалительного процесса.

Предварительный сравнительный анализ данных, полученных у больных ЯК, позволил выявить основные морфотипы микробов фекалий и подсчитать их количество, установить особенности соотношения грамположительной и грамотрицательной флоры, а также мелких и крупных микробных клеток, определить разнообразие морфотипов и преобладание тех или иных морфологических форм.

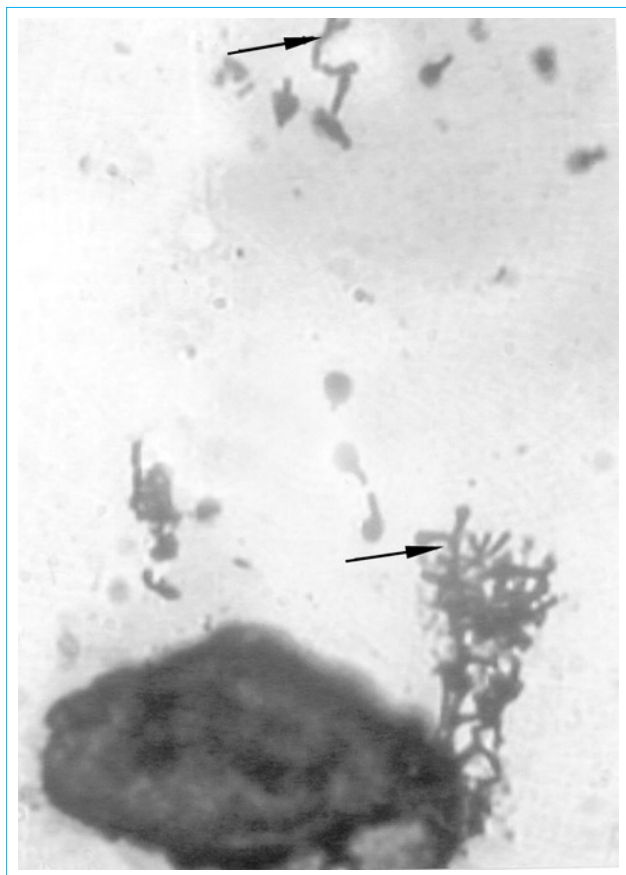
Мы проанализировали разнообразие морфологических типов у больных ЯК, обнаруживаемое методом посева и бактериоскопии. Как видно из табл. 3, наибольшее разнообразие морфотипов обнаружено методом прямой бактериоскопии. Эти показатели в среднем составили 8 и более вариантов, а у некоторых больных регистрировалось до 10 и более форм микроорганизмов.

Бифидобактерии — клетки характерной морфологии с бифуркациями, шаровидными вздутиями, грамположительные (см. рисунок) в нативном препарате выявлялись в 12,5% по сравнению с 58,3% в посевах (табл. 4). По-видимому, в условиях биотопы (*in vivo*), а не на питательной среде (*in vitro*) не все популяции бифидобактерий выглядят как описано выше.

Таблица 3

Количество морфотипов у больных ЯК по данным бактериоскопии и бактериологического посева

Число морфотипов	Больные ЯК		Здоровые лица	
	%	среднее количество у 1 больного	%	среднее количество у 1 больного
При бактериоскопии				
7 и менее	21,0	6,2	78,7	6,7
8 и более	79,0	8,7	21,3	8,7
При бактериологическом посеве				
7 и менее	75,0	5,6	90,5	6,3
8 и более	25,0	8,2	9,5	8,0



Бифидобактерии. Окраска по Граму, увеличение ×450

Морфотипы, соответствующие тем или иным видам аспорогенных анаэробов — бактериоидов, высеяны в 53,8%, а в микропрепарате — в 100% наблюдений. Грамположительные бактерии в посевах регистрировались на среде Блаурокка и

МРС в 100% случаев. Такие же результаты получены и при бактериоскопии субстрата.

Среди кокковых форм совпала частота встречаемости стафилококков, высеянных в 84,3% наблюдений и зарегистрированных в 87,5% в микропрепарате. Что касается дипло- и стрептококков, то они обнаруживались в нативных препаратах гораздо чаще — в 87,5% случаев по сравнению с 54,9% в посевах. Сходные данные по частоте встречаемости отмечены для споровых форм — 69,5 и 62,5%.

Особую группу морфотипов, регистрируемых в основном только бактериоскопически, составляют извитые формы бактерий, обнаруживаемые у 94,7% больных. Длина этих форм составляла в среднем 5–10 мкм. В подавляющем большинстве это были грамотрицательные микроорганизмы. Среди них 18,4% — кампилоподобные, 76,3% — изогнутые «типа коромысла» или нитевидные (табл. 5). На питательных средах, используемых при исследовании кишечной микрофлоры [7], такие формы не высевались. То же можно сказать об актинобактериях. Частота обнаружения подобных форм составила 16,7% при использовании метода прямой бактериоскопии. Эти грибовоподобные микроорганизмы крайне трудно культивируются, требуя специальных условий и навыков. В то же время с помощью новых технологий определено, что они составляют 50% биомассы микроорганизмов пристеночной флоры [6].

Дрожжевые и плесневые грибы высеяны в 65,7 и 8,3% проб фекалий соответственно, в препаратах прямой бактериоскопии регистрировались в 12,5% случаев.

Окрашивание по Граму отражает принципиальные особенности микроорганизмов с точки

Таблица 4

Сравнение результатов бактериоскопии и бактериологического посева, %

Признак	Бактериоскопия	Посев
Количество морфотипов	10,0	5,5
Резидентные морфотипы	49,4	92,8
Бифидобактерии	12,5	58,3
Бактериоиды	100,0	53,8
Грибы:		
дрожжевые	12,5	74,0
плесневые	5,3	8,3
Грамположительные палочки различной морфологии	100,0	100,0
Кокки типа стафилококки	87,5	84,3
Стрептококки	87,5	13,3
В том числе:		
диплококки	75,0	0
Извитые формы бактерий	94,7	0
Грамположительные споровые бактерии	62,5	69,5
Актинобактерии	98,7	0

Таблица 5

Бактериоскопическая характеристика микрофлоры фекалий у больных язвенным колитом

Признак	Больные ЯК (n=150)	Здоровые лица (n=50)
Количество морфотипов у одного больного	10,1	5,0
Соотношение палочек и кокков	63,6/36,4	61,5/38,5
Размеры палочек:		
крупные	34,9	64,7
мелкие, средние	56,9	23,9
кокковидные	20,6	8,5
Соотношение грамотрицательных и грамположительных микроорганизмов	90,0/40,8	42,7/72,2
Количество наиболее многочисленных резидентов	3,1/46,3	3,2/63,0
Количество дополнительных видов	4,4/53,7	3,9/37,0
Частота обнаружения неправильных форм палочек	100,0	46,7
В том числе:		
кампилоподобные	18,4	12,1
спириллы	5,3	Нет
изогнутые, нитевидные	76,3	15,4

Таблица 6

Сравнение возможностей метода бактериологического посева и прямой бактериоскопии фекалий (+ → да; — → нет)

Регистрируемые факторы	Бактериологический посев	Бактериоскопия
Определение концентрации жизнеспособных клеток микроорганизмов	+	+
Определение жизнеспособных микроорганизмов и их концентрации	—	+
Определение специфических морфотипов и их концентрации:		
бифидобактерии	+	+
грибы	+	+
споровые анаэробы	+	+
бактероиды	+	+
кокки	+	+
Определение видовой принадлежности	+	—
Соотношение грамположительных и грамотрицательных видов	+	+
Соотношение мелких и крупных форм	—	+
Определение других морфотипов (извитые формы, актиномицеты и др.)	—	+

зрения строения клеточной стенки и морфологии в целом [3]. К грамположительным видам принадлежат такие резиденты кишечной микрофлоры, как бифидо-, лакто-, пропионовые бактерии, лактококки. К этой же группе относятся условно-патогенные виды — коринебактерии, некоторые стафилококки, актиномицеты, сахаромицеты.

Данные литературы [8] свидетельствуют, что в здоровой кишке преобладают грамположительные виды (72,2%). У больных ЯК их доля равна 40,8%. Инфраструктура этой группы различна. Если в норме она сформирована бифидобактерия-

ми, морфотипами, соответствующими лактобактериям, зубактериям, пропионовым бактериям, то у больных большая часть грамположительных форм принадлежит актинобактериям, споровым палочкам, грибам, коккам. Таким образом, предварительные данные показывают, что в нормальном микроценозе грамположительная флора составляет от 30 до 60% (в среднем 42,7%), а у больных ЯК преобладает грамотрицательная флора, достигая 90%.

Различия выявлены также при анализе морфотипов с точки зрения размеров клеток микробов

(см. табл. 5). Следует сказать, что этот показатель отражает условия жизни популяции. Если они хорошие, соответствуют норме и при этом микроорганизмы получают пищевые ресурсы в нужном объеме и соответствующего химического состава, то доминируют крупные и средние клетки микробов. Преобладание мелких размеров, включая кокки, говорит о нарушении трофических связей с организмом хозяина, т. е. пищевые субстраты изменены и поступают не с той периодичностью, как в норме.

Подводя итог, еще раз проанализируем возможности рассмотренных методов (табл. 6). Итак, по данным бактериологического посева заключение об имеющихся нарушениях в кишечной микрофлоре у конкретного пациента базируется на двух показателях — видовой принадлежности и концентрации микроорганизмов.

При использовании бактериоскопии получают также количественные характеристики концентрации, но только не видов, а морфологических типов, анализ которых несет новую информацию. Окрашенный фиксированный препарат, изготовленный для прямой бактериоскопии, позволяет учесть количество микроорганизмов, разнообраз-

ные морфотипы, в частности такие, как бифидобактерии, бактероиды, грибы, клостридии. Этот метод выявляет новые резидентные формы микроорганизмов, не обнаруживаемые в посевах, например актинобактерии, различные извитые формы, в том числе аспергиллы и др.

Заключение

Метод бактериоскопии предлагает новые критерии в оценке нарушений кишечной микрофлоры — визуальный учет соотношения грамположительной и грамотрицательной микрофлоры, превалирования тех или иных морфотипов, определение различных размеров бактериальной клетки. И все это не в течение недели, а за 2–3 ч от начала исследования. При этом повышаются избирательная способность, полнота морфологического учета и информативность прямой бактериоскопии при обнаружении всего разнообразия микробных ассоциаций.

Метод бактериоскопического исследования кишечной микрофлоры лучше поддается стандартизации и воспроизводству, чем рутинные бактериологические методики.

Список литературы

1. Бабин В.Н., Минушкин О.Н., Дубинин А.В. и др. Молекулярные аспекты симбиоза в системе хозяин—микрофлора // Рос. журн. гастроэнтерол. гепатол. колопроктол. — 1998. — Вып. 6. — С. 76–82.
2. Воробьев А.А., Несвижский Ю.В., Буданова Е.В., Иноземцева Л.О. Популяционно-генетические аспекты микробиологического фенотипа кишечника здорового человека // Журн. микробиол. эпидемиол. иммунол. — 1995. — Вып. 4. — С. 30–35.
3. Гусев А.А. Методы и реактивы для стандартизированной фиксации и окрашивания мазков крови при проведении автоматизированных цитоморфометрических исследований // Клин. лаб. диагн. — 1999. — № 10. — С. 28.
4. Лягина И.А., Корнева Т.К. Патент на изобретение № 2273853 от 28.12.2004. «Способ бактериоскопической экспрессной идентификации микрофлоры содержимого толстой и прямой кишки».
5. Марко О.П., Корнева Т.К., Юхвидова Ж.М. К вопросу о кишечной микрофлоре при неспецифическом язвенном колите (Предварительное сообщение) // Журн. микробиол. эпидемиол. иммунол. — 1974. — Вып. 1. — С. 78–81.
6. Осипов Г.А., Парфенов А.И., Богомолов П.О. Сравнительное хроматомасс-спектрометрическое исследование состава химических маркеров микроорганизмов в крови и биоптатах слизистой оболочки кишечника // Рос. гастроэнтерол. журн. — 2001. — Вып.1. — С. 54–69.
7. Отраслевой стандарт «Протокол ведения больных. Дисбактериоз кишечника». (ОСТ 91500.11.0004-2003, приказ Министерства здравоохранения РФ № 231 от 09.06.2003).
8. Шендеров Б.А. Медицинская микробиологическая экология и функциональное питание. — М.: Изд. МГУ, 1989. — С. 3–28.
9. Duchmann R., May E., Heike M. et al. T-cell specificity and cross reactivity towards *Enterobacteria*, *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, and antigens from resident intestinal flora in humans // Gut. — 1999. — Vol. 44. — P. 812–818.
10. Sartor R.B. Microbial influences in inflammatory bowel disease, role in pathogenesis and clinical implications // Kirsner's inflammatory bowel diseases. — 6th Ed. — 2004. — Section II. — P. 138–157.