Биологические свойства энтерококков, выделенных из кишечника детей с разной степенью дисбактериоза

**Введение**

Энтерококки, входящие в состав нормальной микрофлоры пищеварительного тракта человека, играют важную роль в обеспечении колонизационной резистентности слизистых. В то же время они являются представителями группы условно-патогенных бактерий, способных вызывать аутоинфекцию, а при накоплении в окружающей среде - приводить к экзогенному инфицированию. Длительное время они рассматривались как довольно безопасные комменсалы желудочно-кишечного тракта человека и животных. Однако уже более 100 лет назад появились первые свидетельства об этиологической роли микроорганизмов этой группы в возникновении госпитальных инфекций у ослабленных пациентов. Кардинальное изменение представления об энтерококках произошло в 1980-е годы, когда был выявлен высокий уровень устойчивости бактерий к ампициллину. Возросшее клиническое значение микроорганизмов было подкреплено появлением и быстрым распространением в 1990-е годы в больницах США ванкомицинустойчивых изолятов энтерококков. Эти события сразу переместили энтерококки в «премьер-лигу» грамположительных патогенов со множественной устойчивостью к антибиотикам вместе с метициллинрезистентными Staphylococcus aureus и пенициллинрезистентными Streptococcus pneumoniae**.** [16]

Современные методы исследования микроорганизмов, успехи геномики и протеомики позволили обнаружить и детально исследовать значительное количество детерминант патогенности и антибиотикорезистентности энтерококков.

Однако большая часть исследований по оценки патогенного потенциала энтерококков выполнена на клинических изолятах микроорганизмов, выделенных при различных инфекционных процессах. Данные о частоте встречаемости основных свойств, определяющих патогенность бактерий, у культур из естественного места обитания (кишечника) практически отсутствуют. В связи с этим, **цель** **данной работы** - оценить факторы патогенности и чувствительность к антибиотикам у энтерококков, выделенных из кишечника детей с разной степенью дисбактериоза.

**Задачи работы**:

. провести качественное и количественное исследование испражнений для определения степени дисбактериоза кишечника;

. идентифицировать выделенные энтерококки до вида;

. определить продукцию ферментов патогенности: гемолизинов, желатиназы и дезоксирибонуклеазы;

. изучить адгезивные свойства энтерококков;

. определить антибиотикочувствительность выделенных культур;

. оценить выраженность факторов патогенности в зависимости от вида энтерококков и степени дисбактериоза.

**1.** **Обзор литературы**

**.1 Характеристика рода Enterococcus**

Энтерококки - род грамположительных кокков. Микроорганизм был описан впервые Эшерихом в 1886 г., когда им был выделен кокк из кишечника младенца, названный им за его удлиненную форму овальным микрококком. В течение первых 25 лет этот микроб не привлек внимания бактериологов и считался безобидным сапрофитом. Однако его частое присутствие в качестве сапрофита в организме человека, особенно в кишечнике и мочеполовом тракте, а также несомненная патогенность повели к тщательному изучению его свойств. Название энтерококк не сразу утвердилось за этим микробом; лишь в 1889 г. французский ученый Тирселен выделил аналогичного кокка при энтеритах с нагноениями и дал ему название энтерококка, оставшееся и в настоящее время за этим микробом. Вплоть до 1984 года бактерии рода Enterococcus классифицировались как стрептококки группы D, пока методом геномного анализа ДНК не было показано, что более правильно выделение их в отдельный род. По современной классификации род Enterococcus входит в семейство Enterococcaceae, порядок Lactobacillales, класс Bacilli, тип Firmicutes, царство Бактерии. Род включает следующие виды: Е. faecalis, Е. faecium, Е. avium, E. pallens, Е. casseliflavus, Е. durans, Е. gallinarum, Е. raffinosus, Е. gilvus, Е. irae, Е. malodoratus и Е. mundtii. В клиническом материале от человека встречаются Е. faecalis, Е. faecium, Е. gilvus, E. durans и E. pallens. [21]

**Морфология.** Энтерококк слегка удлинен и напоминает по форме пневмококка, но не имеет капсулы и несколько крупнее его размером. Между двумя кокками заметна небольшая щель; кокки расположены попарно и короткими цепочками, иногда небольшими кучками. Они отличаются полиморфизмом и порой принимают вид диплобактерий, хорошо окрашиваются анилиновыми красками и по Граму. Спор не образуют. Энтерококки являются факультативными анаэробами, оптимальная температура культивирования которых составляет 35-37 °С. Энтерококки осуществляют метаболизм бродильного типа, ферментируют разнообразные углеводы с образованием в основном молочной кислоты, но не газа, снижая рН до 4,2-4,6. В некоторых случаях восстанавливают нитрат, обычно лактозопозитивные. [11]

**Экология.** Обитают эти бактерии преимущественно в тонком кишечнике. Но немалое их количество находится и в толстом кишечнике, а также они встречаются в небольших количествах во рту и в половых органах. У детей в возрасте до года количество энтерококков в кале составляет до 100 000 000 клеток на 1 г. фекалий. Как постоянные представители микрофлоры кишечника, энтерококки участвуют в усвоении сахаров, синтезе витаминов, уничтожении патогенных микроорганизмов. Энтерококки высокорезистентны к различным факторам внешней среды и дезинфицирующим средствам, могут длительное время сохранять жизнеспособность на предметах домашнего обихода, в течение нескольких месяцев - на обычных агаровых косяках.

**Культуральные свойства.** Энтерококк хорошо растет на всех обычных питательных средах при 37 °С, так же и при комнатной t; на агаре дает прозрачные капелькообразные колонии, типичные для стрептококковой группы, величиной в 1-2 мм. Могут давать гамма-гемолиз на кровяном агаре. В бульоне энтерококк всегда образует равномерную муть; через несколько дней на дне появляется тянущийся осадок. Энтерококк выдерживает нагревание до 60°, сбраживает маннит, разлагает гликозиды (эскулин, салицин и метил-гликозид), не разлагает раффинозы, не растворяется желчью и стоек в отношении оптохина. Для дифференциальной диагностики энтерококков от стрептококков используют критерии Шермена: рост при 10оС и при 45оС, рост при рН 9,6, рост в среде с 40% желатина, рост в среде с 6,5% NaCl, рост в молоке с 0,1% метиленового синего, терморезистентность. [18]

**Клиническое значение.** Энтерококки вызывают следующие заболевания: дивертикулит, менингит, бактериемия, септический артрит, поражения мочеполовой системы, эндокардит, остеомиелит, интраабдоминальные инфекции, инфекции дыхательных путей. Особенно часто энтерококковые циститы и уретриты имеют место у беременных. Немецкие исследователи обнаруживали энтерококки в различных процессах нагноения при аппендиците, парапроктите. Практически каждый второй случай воспаления желчных путей сопровождался выделением энтерококков в анализах. Иногда эти бактерии могут вызывать плевриты, сепсис и эндокардит. Хронические энтериты у младенцев также могут быть вызваны бактериями рода Enterococcus. Постоперационные гнойные инфекции, а также воспалительные заболевания, вызванные длительной катетеризацией мочевыводящих путей, нередко вызываются энтерококками в ассоциациях с другими патогенными микроорганизмами. Встречались даже отдельные случаи, когда энтерококки были выделены в качестве единственного источника заражения. Энтерококки вызывают пищевые отравления и кишечные дисбактериозы. Хотя, видимо, не всегда и только у тех людей, которые имеют ослабленную иммунную систему. Ведь в сыр сорта «Чеддер» для улучшения вкуса добавляют культуру энтерококков. До сих пор вроде бы не было массовых случаев острых пищевых отравлений этим видом сыров. [10]

Состояние иммунной системы играет важную роль в профилактике и лечении заболеваний, вызываемых энтерококками. И в этой связи хотелось бы отметить такой немалозначимый аспект, как микрофлора желудочно-кишечного тракта. Баланс лакто- и бифидобактерий, которые сосуществуют в норме с энтерококками и регулируют их численность, может быть нарушен. Способствуют этому явлению различные стрессовые факторы и заболевания, а также прием антибиотиков. У младенцев иммунная система еще не развита и, как следствие, любое лечение антибиотиками может вызвать серьезные дисбактериозы, в которых принимают участие как различные энтеробактерии, так и энтерококки. Поэтому в составе комплексного лечения и для профилактики подобных явлений необходимо восстанавливать баланс бактерий в организме. [14]

**Использование в промышленности.** Энтерококки являются активным ингредиентом некоторых лекарственных средств-пробиотиков, предназначенных для лечения дисбактериоза и восстановления нормальной микрофлоры кишечника. В частности, в лекарственные препараты-пробиотики Бифиформ, (фирма-изготовитель Ferrosan) Линекс (изготовитель Lek) и Bioflorin (изготовитель Cerbios-Pharma) включён специально подобранный, отличающийся высоким уровнем антибиотикорезистентности и непатогенности штамм Enterococcus faecium SF68, в геноме которого отсутствуют известные для патогенных клинических изолятов энтерококков гены вирулентности. Беззародышевый водный субстрат продуктов обмена веществ Enterococcus faecium DSM 4086 входит в состав противодиарейного лекарства Хилак форте.

Для включения в пробиотики обычно используют штаммы энтерококков, исходно селекционированные для создания пищевых продуктов. Эти штаммы не приспособлены к длительному пребыванию в организме человека и за одну-две недели полностью выводятся из него. СанПиН 2.3.2.2340-08, утвержденный Постановлением Главного государственного санитарного врача РФ 18 февраля 2008 г. №13, разрешает к использованию в пищевой промышленности энтерококки Enterococcus durans и Enterococcus faecium.

Будучи широко распространенными в природе и обладая важной способностью гидролизовать ряд сахаров, включая лактозу, энтерококки широко и с давних пор используются в производстве пищевых продуктов. Так, энтерококки необходимы в сыроварении, применяются для приготовления целого ряда мясных продуктов, ферментированных продуктов на основе сои и зерновых. Основной причиной, объясняющей столь широкое применение энтерококков в пищевой промышленности, помимо их высокой устойчивости к воздействию кислот, солей и высокой температуры является их способность эффективно подавлять болезнетворные бактерии в самих пищевых продуктах. Незначительное содержание энтерококков в колбасах, сырах и мясном фарше не позволяет размножаться в пищевых продуктах таким микроорганизмам, как стафилококки, листерии и кишечные палочки. Основная причина антагонистической активности энтерококков - их способность продуцировать короткие пептиды - энтероцины. Данные пептиды, которые чаще всего относятся к педиоциноподобным бактериоцинам второго класса, способны при контакте с бактерией вызывать повреждение клеточной стенки с последующей гибелью клетки**.** [10]

Таким образом, энтерококки играют неоднозначную роль в жизни человека. Эти микроорганизмы широко распространены в природе. Они являются представителями резидентной нормальной микрофлоры человека и животных, встречаются в пищевых продуктах, воде, растениях, у животных, птиц и насекомых. Некоторые штаммы данных микроорганизмов, приобретя ряд признаков патогенности, могут вызывать серьезные инфекционные заболевания. Ключевым критерием для отдифференцировки энтерококков, полезных для человека, от энтерококков патогенных является наличие или отсутствие у штамма энтерококков набора генов патогенности.

**1.2 Факторы патогенности энтерококков**

В настоящее время микроорганизмы рода Enterococcus занимают лидирующие позиции в качестве причины нозокомиальных и оппортунистических инфекций. Так, при послеоперационных осложнениях из брюшной полости Enterococcus spp. Выделяют в 15% случаев, и они стоят на втором месте по частоте встречаемости. Подобные данные получены и исследователями в Саудовской Аравии, где при нозокомиальных инфекциях энтерококки выделяют в 25% случаев. На территории Японии среди грамположительных аэробных микроорганизмов энтерококки стоят на первом месте по частоте встречаемости при хирургических инфекциях. Ведущим этиологическим фактором при инфекциях мочевыводящих путей и хроническом бактериальном простатите также являются энтерококки. Возникающая после гемодиализа бактериемия в 30% случаев вызвана энтерококками. Данные российских авторов подтверждают эту тенденцию**.** [9]

Способность энтерококков вызывать инфекционный процесс обусловлена наличием у некоторых штаммов широкого спектра факторов вирулентности:

· факторы адгезии и колонизации: адгезин Еsp, адгезин Asa, фактор агрегации, адгезин EfaA, рецептор коллагена;

· факторы пенетрации и повреждения тканей: желатиназа, сериновая протеиназа, гиалуронидаза, Fsr-регулятор;

· факторы гемолиза, токсигенности, бактериоциногенности: гемолизины, бактериоцины и феромоны;

· устойчивость к антибиотикам и микробицидным факторам организма (устойчивость к желчным кислотам). [4]

При этом нельзя не отметить, что многие из так называемых факторов патогенности энтерококков являются необходимыми компонентами их функционирования, обеспечивающими их существование в свойственной им экосистеме, и не связаны напрямую с повреждением тканей хозяина или подавлением системы иммунитета. Так, адгезины жизненно необходимы для нормальной колонизации в желудочно-кишечном тракте, а гидролаза желчных кислот повышает их шансы выжить в двенадцатиперстной кишке. Детальный молекулярно-генетический анализ вирулентных штаммов энтерококков показал, что большинство генов вирулентности локализовано достаточно компактно на геноме данных штаммов. В настоящее время достаточно хорошо установлено, что участки генома с генами вирулентности являются мобильными элементами и могут передаваться от одного штамма другому. Данные генетические элементы, называемые «островами» патогенности, могут содержать различный набор генов вирулентности, включая гены устойчивости к антибиотикам. [5]

**1.3 Факторы адгезии и колонизации**

Адгезияявляется пусковым механизмом инфекционного процесса. Под адгезией понимают способность микроорганизма адсорбироваться на чувствительных клетках с последующей колонизацией. Структуры, ответственные за связывание микроорганизма с клеткой называются адгезинами и располагаются они на его поверхности. Адгезины очень разнообразны по строению и обусловливают высокую специфичность - способность одних микроорганизмов прикрепляться к клеткам эпителия дыхательных путей, других - кишечного тракта или мочеполовой системы и т.д. На процесс адгезии могут влиять физико-химические механизмы, связанные с гидрофобностью микробных клеток, суммой энергии притяжения и отталкивания. У энтерококков адгезины представляют собой белки и тейхоевые кислоты клеточной стенки.

Помимо адгезинов у энтерококков выделяют еще субстанцию агрегации. Это поверхностный белок, опосредующий агрегацию микроорганизмов в процессе конъюгации. В ходе инфекций этот фактор обеспечивает непосредственное токсическое действие на ткани миокарда и легких. Субстанция агрегации, как правило, выявляется у штаммов, продуцирующих цитолизин. Вероятно, между указанными факторами проявляется синергизм. [21]

Одним из факторов реализации колонизационной резистентности кишечника является адгезия представителей индигенной микрофлоры. Обладая мощным адгезивным потенциалом, представители нормофлоры, колонизируя экониши естественного обитания, препятствуют адгезии патогенных микроорганизмов. Однако при диcбиотических нарушениях микробиоценозного гомеостаза происходит чаще всего увеличение численности представителей аэробной части микрофлоры и усиление агрессивного потенциала этих бактерий, что способствует преодолению ими барьера приэпителиального слоя кишечника и транслокацию во внутреннюю среду организма. В этом случае адгезивные свойства бактерий выступают в роли фактора патогенности. Наибольшее значение из аэробной части нормофлоры имеют Escherichia coli и микроорганизмы рода Enterococcus, которые все чаще являются этиологическим фактором возникновения гнойно-септических и нозокомиальных инфекций. [15]

**.4 Ферменты агрессии энтерококков**

Микробные ферменты способствуют инвазии бактерий и помогают им противостоять защитным реакциям организма.

Желатиназа - фермент, гидролизует желатин, коллаген, гемоглобин и некоторые другие низкомолекулярные пептиды. Является продуктом гена gelE.

Геалуронидаза - катализирует реакции гидролитического расщепления и деполимеризации гиалуроновой кислоты и тем самым способствует повышению проницаемости тканей. Продукт гена cyl.

Супероксиддисмутаза - фермент, локализованный в цитоплазме. Обеспечивает высокую устойчивость к O2.

Сериновая протеиназа - относится к группе эндопептидаз, имеющих в каталитическом центре остаток серина. Способна «разрезать» белки рассечением пептидных связей. Продукт гена spr. [5]

Цитолизин - цитолитический (в частности, гемолитический) токсин белковой природы, обладающий также свойствами бактериоцина. Цитолизин с высокой частотой обнаруживают у штаммов E. faecalis, выделяемых при инфекциях различной локализации.

У энтерококков выделяют 2 класса бактериоцинов: I - цитолизин и II - энтероцины и мундтицины. I класс присущ патогенным видам энтерококков. Непатогенные E. faecalis и другие виды Enterococcus, выделенные от здоровых людей и животных, а также из пробиотических и пищевых продуктов, секретируют, как правило, бактериоцины класса II. Именно эти нетоксигенные антимикробные пептиды представляют максимальный медицинский интерес. [9]

Цитолизин (гемолизин) - представляет собой дипептид, состоящий из двух субъединиц - CylL и CylS с молекулярными массами 3,4 и 2,0 кДа соответственно. Только штаммы, способные синтезировать обе субъединицы, обладают гемолитической активностью. Он может разрушать человеческие, бараньи и лошадиные эритроциты, полиморфноядерные лейкоциты, эпителиоциты кишечника и клетки сетчатки глаза человека.

Генетический локус, обеспечивающий продукцию цитолизина, находится в высокотрансмиссивной плазмиде pAD1 (58 кБ), содержащей гены, кодирующие субъединицы бактериоцина и пептид Cyl A, который необходим для их внеклеточной активации. Кроме того, большое значение имеет присутствие в геноме продуцента генов cylB, сylM, cylI, cylR2 и cylR1, обеспечивающих ABC-транспорт, внутриклеточную модификацию субъединиц бактериоцина, иммунитет продуцента к его действию, синтез регуляторных белков. Синтез цитолизина происходит в виде двух субъединиц пептидной природы, лидирующие части (N-части) которых распознаются «транспортными» АТФ-азами АВС-типа и регулируются двухкомпонентной регуляторной системой под контролем двух регуляторных белков (CylR2 и CylR1).

Цитолизин энтерококков обладает способностью образовывать поры в цитоплазматической мембране грамположительных бактерий: Listeria monocytogenes, Pediococcus spp. и Lactococcus spp. [6]

Одним из критериев оценки вирулентности энтерококков является устойчивость к антибиотикам. Энтерококки имеют широкий спектр природной устойчивости к антибактериальным препаратам разных классов, таких как цефалоспорины, пенициллины, устойчивые к действию пенициллаз (оксациллин), аминогликозиды (низкие концентрации), хинолоны и линкозамиды. Естественная устойчивость не передается горизонтально, риск ее передачи к патогенным бактериям отсутствует.

Энтерококки способны приобретать устойчивость к антибактериальным препаратам путем переноса плазмид, транспозонов, хромосомным обменом или вследствие мутаций. Приобретенная устойчивость к большинству антибиотиков, вместе с природной устойчивостью и устойчивостью к факторам окружающей среды, позволило энтерококкам хорошо приспособиться к существованию и распространению в больничных условиях. [8]

Гликопептидные антибиотики (ванкомицин) традиционно используются при лечении энтерококковых инфекций, вызываемых штаммами микроорганизмов, устойчивых к β-лактамным антибиотикам. Однако и эти антибиотики, подобно β-лактамам, обладают только бактериостатическим действием в отношении энтерококков. Для достижения бактерицидного эффекта гликопептиды целесообразно комбинировать с аминогликозидами. Несмотря на то, что ванкомицин применяется в медицинской практике с начала 50-х годов, первое сообщение об устойчивости энтерококков к этому антибиотику появилось только в конце 80-х годов (Vancomycin resistant Enterococcus - VRE).

VRE особенно распространены в США. Другие развитые страны, такие как Великобритания, были менее задеты эпидемией VRE, а Сингапур в 2005 году остановил ее. VRE поддается лечению комбинацией антибиотиков хинупристин / далфопристин (Synercid, в России не зарегистрирован), с чувствительностью около 70%. [13]

Бензилпенициллин и ампициллин в концентрациях, создаваемых в крови и других тканях, практически не оказывают бактерицидного действия на энтерококков. При тяжелых энтерококковых инфекциях рекомендуется сочетать какой-либо из этих препаратов с аминогликозидом, поскольку in vitro эта комбинация обладает синергичным бактерицидным действием. Ампициллин достигает достаточно высоких концентраций в моче, поэтому его используют для монотерапии неосложненных инфекций мочевых путей. При остальных энтерококковых инфекциях к нему добавляют гентамицин (при нормальной функции почек - 1 мг/кг каждые 8 ч). При аллергии к пенициллинам ампициллин заменяют ванкомицином, назначая его также в сочетании с аминогликозидом. Цефалоспорины в отношении энтерококков неактивны. При тяжелых энтерококковых инфекциях определяют чувствительность возбудителя и на ее основании выбирают схему антимикробной терапии. Большинство штаммов энтерококков устойчиво к стрептомицину. Не имея данных о чувствительности возбудителя, этот препарат при энтерококковой инфекции не используют. Распространена среди энтерококков и устойчивость к гентамицину (МПК более 2000 мкг/мл). Однако устойчивые к гентамицину штаммы могут оказаться чувствительными к другим аминогликозидам, в том числе к стрептомицину. Если возбудитель устойчив ко всем аминогликозидам, может оказаться успешной монотсрапия бензилпенициллином или ампициллином. [7]

**2.** **Дисбактериоз кишечника**

Организм человека и колонизирующие его органы и ткани микробы представляют единую экологическую систему, находящуюся в состоянии динамического равновесия. Видовой состав и количественные соотношения микроорганизмов в норме относительно стабильны и характеризуют микробиологический статус организма, называемый также эубиозом. Наиболее заселенным автохтонной флорой является пищеварительный тракт. Его экологический гомеостаз обеспечивается целым рядом защитно-приспособительных механизмов: иммунологических (секреторный IgA; комплемент; интерфероны; лизоцим; трансферрин; лактоферрин и др.), механических (обновляющийся каждые 6-8 дней эпителий, макро- и микроворсинки с гликокаликсом, перистальтические движения, илеоцекальный канал), химических (слюна, желудочный, панкреотический и кишечный сок, желчь, жирные кислоты), биологических (кишечная микрофлора). [19]

Нормальная микрофлора желудочно-кишечного тракта, по существу, является первичной мишенью приложения любого попадающего с пищей или водой соединения, первым метаболическим органом, который вовлекается в адсорбцию, трансформацию и / или перенос естественных и чужеродных субстанций, полезных и потенциально вредных агентов. В ряде случаев такие агенты прямо или косвенно влияют на формирование и функционирование биопленки, выстилающей слизистые желудочно-кишечного тракта и содержащие многочисленные ассоциации микроорганизмов. Если по своей интенсивности такое влияние превышает компенсаторные возможности экологической системы «макроорганизм его нормальная микрофлора», то возникают микробиологические (дисбиотические) нарушения, которые нередко служат пусковым механизмом развития, а в последующем и поддержания различных патологических состояний. Дисбиотические нарушения в пищеварительном тракте проявляются изменением абсолютного числа анаэробных и аэробных бактерий, их видового и штаммового состава, ареала обитания микроорганизмов, спектра и количества образуемых метаболитов и другими признаками. Реакции органов и тканей хозяина на дисбиотические изменения разнообразны по времени возникновения и степени выраженности, что зависит от направления сдвигов в микрофлоре, глубины отклонения от состояния равновесия и наличия условий для возвращения в исходное состояние. При этом спектр клинических проявлений дисбиоза пищеварительного тракта достаточно широк (диареи, запоры, колиты, язвенная болезнь, гиперхолестерининемия, мочекаменная болезнь, кариес, эндо- и суперинфекции разной локализации, различные аллергические проявления и т.д.) и имеет тенденцию к расширению.

**Понятие дисбактериоза кишечника.** Термин дисбактериоз, впервые предложенный в 1916 г. A. Nissle, обозначает качественные и количественные изменения состава микрофлоры и соотношений между отдельными видами микроорганизмов, обусловленные динамическим нарушением микроэкологии кишечника в результате срыва адаптационных, защитных и компенсаторных механизмов и сопровождающиеся рядом клинических проявлений. [1]

В последнее время в связи с неблагоприятной социально-экономической и экологической обстановкой, гипо- и авитоминозами, нерациональной антибиотико-, гормоно- и химиотерапией, нарушением питания наблюдается повсеместное распространение дисбиотических проявлений эубиоценоза полости рта, кожи, кишечника, влагалища. С целью диагностики дисбактериоза кишечника чаще всего исследуют микрофлору толстого кишечника.

Существенным моментом, осложняющим исследование на дисбактериоз, является отсутствие единого, стандартного методологического подхода в бактериальной диагностике.

Наиболее часто проводимое исследование позволяет, путем нескольких десятикратных разведений кала и высева их на специальные среды, определять количественное содержание в биоматериале энтеробактерий, лактобактерий, бифидобактерий, клостридий, энтерококков, стафилококков, грибов; в некоторых лабораториях перечень изолируемых микроорганизмов в последние годы расширился, за счет определения в биоматериале бактероидов и анаэробных пептококков и пептострептококков. Несмотря на известные недостатки, этот метод позволяет выявить отклонение в составе микрофлоры толстого кишечника в сравнении с усредненными нормальными показателями, установленными для данного метода. Поскольку до настоящего времени нет однозначного мнения, какие изменения в микрофлоре толстого кишечника являются адаптивными, а какие выходят за пределы физиологической нормы, различия в анаэробном компоненте в пределах одного-двух lg и в аэробном- в пределах двух-четырех lg, принято считать физиологическими колебаниями.

Микрофлора толстой кишки здорового ребенка представлена тремя группами микробов [Приложение 1, Таблица 1]:

. Главная микрофлора: анаэробная флора, составляющая 95-99% биоценоза (бифидобактерии, бактероиды), она осуществляет основные физиологические функции.

. Сопутствующая: лактобактерии и нормальные штаммы кишечной палочки, которые также участвуют в защитной и пищеварительной функциях.

. Остаточная: аэробная сапрофитная и условно-патогенная флора, которая составляет не более 1% биоценоза (энтерококки, энтеробактерии, стафилококки, протей, дрожжи и т.д.).

**Показания к проведению исследования.**

Прямыми показаниями к исследованию на дисбактериоз кишечника являются:

· затянувшийся период реконвалесценции после дизентерии или других острых кишечных заболеваний;

· длительно протекающие кишечные расстройства (дисфункции), при которых не удается выделить патогенные микроорганизмы;

· дисфункция кишечника у лиц, длительно подвергающихся воздействию некоторых производительных вредностей (ионизирующие излучения, токсичные химические соединения и др.), а также при интенсивной антибиотико- или иммуносупрессивной терапии;

· обострения хронических заболеваний желудочно-кишечного тракта (колиты, холециститы, язвенная болезнь и др.);

· наличие системной воспалительной реакции и бактериемии без выраженного очага воспаления;

· наличие трудно поддающихся лечению гнойно-воспалительных очагов и вялотекущих инфекционных процессов;

· подготовка к оперативному вмешательству на органах пищеварения;

· дисфункция кишечника у новорожденных.

Существует несколько классификаций дисбактериоза кишечника, используемых как клиницистами, так и микробиологами. Наиболее часто употребляемые классификации дисбиоза основаны на определении причины, степени нарушений состава микрофлоры, ее вида и характера нарушения пищеварения.

## **Классификация по причине:**

1) первичный (у практически здоровых лиц, если причину определить не удалось);

2) возрастной дисбиоз (развивается в связи с закономерными возрастными изменениями в основных органах и системах организма);

) сезонный дисбиоз (вызван сезонными изменениями характера питания и свойств организма);

) пищевой дисбактериоз (вызван резким изменением характера питания, например, при диарее путешественников);

) профессиональный (в результате воздействия профессиональных вредностей);

) дисбактериоз у болеющих (вторичный - его причиной часто является другое заболевание):

- дисбактериоз при заболеваниях пищеварительного тракта;

- заболеваниях печени, при гельминтозах, инфекционных, паразитарных заболеваниях, новообразованиях;

- медикаментозный дисбактериоз;

- дисбактериоз вследствие воздействия радиоактивных веществ;

) смешанный дисбактериоз (комплекс разных причин).

## **Клиническая классификация.**

Врачи используют клиническую классификацию, которая помогает выбрать оптимальную стратегию лечения. Клиническая классификация дисбактериоза кишечника основывается на выделении вида дисбактериоза в зависимости от возбудителя, степени компенсации дисбактериоза, его клинических форм.

**Вид дисбактериоза по возбудителю:**

1) стафилококковый;

2) протейный;

) дрожжевой;

) ассоциированный (стафилококковый, протейный, дрожжевой).

**По степени компенсации:**

1) компенсированная - клинических проявлений может не быть;

2) субкомпенсированная - появление локального воспалительного процесса;

) декомпенсированная - приспособительные механизмы истощены, вылечить дисбактериоз трудно. [17]

Согласно нормам **ОСТ 91500.11.0004-2003** условно выделяют три степени дисбактериоза [Приложение 1, Таблица 2]:

**1) I степень** (латентная, компенсированная форма) характеризуется незначительными изменениями в аэробной части микробиоценоза, касающимися уменьшения или увеличения количества кишечной палочки с нормальной ферментативной активностью, удельного веса кокковой флоры, и некоторого снижения общего количества анаэробной флоры до нижних значений нормы. Кишечные дисфункции, как правило, не регистрируются.

**2) II степень** (субкомпенсированная форма) сопровождается снижением концентрации основных представителей анаэробной флоры и количественными и качественными изменениями колибактериальной флоры, включая повышение уровня условно-патогенных микроорганизмов. Эта форма дисбактериоза характеризует пограничное состояние, поэтому обследуемого можно отнести к группе «риска». Если указанные изменения микрофлоры выявлены на фоне лечения бактерийными препаратами, то можно думать о начавшейся нормализации микробиоценоза кишечника. Целесообразно продолжить лечение бактерийными препаратами до восстановления нормальной флоры даже в случае отсутствия явных клинических проявлений и дисфункций кишечника.

**3) III степень** характеризуется значительным снижением количества или отсутствием облигатных анаэробов, резким качественным и количественным изменением кишечной палочки и соотношений в составе аэробной микрофлоры, численным превосходством условно-патогенных энтеробактерий, псевдомонад, дрожжеподобных грибов, стафилококков и их ассоциаций, что, как правило, сопровождается кишечными дисфункциями и, нередко, деструктивными изменениями кишечной стенки. При таких состояниях необходимым является незамедлительное назначение бактерийных преператов и других средств для восстановления нормальной микрофлоры.

Дисбактериоз является неотъемлемой частью многих заболеваний, сопровождающихся снижением общей или местной иммунологической реактивности. Однако возникающие при дисбактериозе нарушения процессов пищеварения и всасывания в тонкой кишке, усиление газообразования и моторики кишечника могут проявляться упорными диспепсическими расстройствами. О нарушениях процессов пищеварения и всасывания можно судить по такому показателю, как масса тела ребенка. Поэтому диагноз дисбактериоза правомочен. У детей с дисбактериозом отмечается медленное восстановление массы тела, плохая прибавка на первом месяце жизни. Заболевание имеет длительное, затяжное течение, у большинства детей развивается гипотрофия, может быть анемия, рахит, отмечается увеличение печени. [18]

**3. Собственные исследования**

**.1 Материалы и методы исследований**

Исследования проводили на базе микробиологической лаборатории МБУЗ ДГКБ №8 г. Челябинска в период с ноября 2012 по март 2013 года. Всего было обследовано 110 детей в возрасте от 1 года до 5 лет (средний возраст 3 года 10 мес.).

.1. Материалом для исследования служил кал после естественной дефекации, который собирали в стерильный герметичный контейнер с широким горлышком и плотно закрывающейся крышкой, без консерванта. Материал брали из средней порции кала стеклянной или деревянной палочкой в количестве не менее 2 г. Доставляли кал в лабораторию в ближайшие сроки, не позднее, чем через 2 часа после взятия пробы.

Исследование кала проводили в соответствии с **МУК №10.05.044.03** [1].

После взвешивания 1 г нативного кала его гомогенизировали в 9 мл физиологического раствора, получая исходное разведение материала (10-1). Затем готовили 100-кратные разведения материала в физиологическом растворе: 10-3, 10-5, 10-7 и 10-9. Из разведений делали дозированные посевы на питательные среды для культивирования различных групп микроорганизмов [Приложение 2, Схема 1]. Посевы инкубировали при 37оС 24-48 часов; чашки со средой Сабуро оставляли после этого еще на 2 суток при комнатной температуре. Для культивирования анаэробов использовали анаэростаты; посевы инкубировали не менее 2-х суток. [1]

Для оценки степени дисбактериоза качественно и количественно учитывали результаты посева согласно нормам **ОСТ 91500.11.0004-2003** [3] [Приложение 1, Таблица 1, Таблица 2].

.2. **Энтерококки** выделяли на кровяном агаре при посеве испражнений по методу Lindsey [Приложение 3, Схема 2]. Количество энтерококков учитывали по таблице [Приложение 3, Таблица 3].

Для идентификации энтерококков использовали следующие биохимические тесты:

. расщепление эскулина (используется плотная питательная среда с добавлением солей железа, которые при расщеплении эскулина на виноградный сахар и эскулетин вступают с последним в соединения, окрашенные в черный цвет);

. рост в 6,5% солевом бульоне;

. ферментация маннита;

. ферментация сорбита;

. цвет культуры при посеве на Энтерококкагар (ФГУП ГНЦПМ, Оболенск).

По полученным результатам биохимических тестов идентифицировали энтерококков до вида [Приложение 4, Таблица 4].

Гемолитическую активность определяли посевом культуры «пятачком» на 5% кровяной агар. Инкубировали при 37оС 24 часа, измеряли диаметр зоны гемолиза.

Продукцию желатиназыоценивали с помощью 3% желатина: в пробирку со столбиком желатина уколом вносили культуру и инкубировали при 37оС 24 часа. При положительной реакции происходило разжижение желатина.

Для определения фермента дезоксирибонуклеаза (ДНКаза) проводили посев исследуемых культур энтерококков в виде «бляшек» на DNAse TEST AGAR (Manufactured by Hispanlab, S.A., Madrid). Посевы инкубировали при 37оС 24 часа, оценивали наличие зоны просветления вокруг «бляшки».

Адгезивную способность энтерококков изучали согласно методике В.И. Брилиса. [12] Смесь эритроцитов человека 0 (І) группы крови Rh+ и одномиллиардной суспензии энтерококков инкубировали при 37оС в течение 30 минут, регулярно встряхивая смесь. После этого готовили мазок, высушивали, фиксировали и окрашивали синькой. Изучение адгезии проводили под световым микроскопом, подсчет вели на 25 эритроцитах, учитывая не более 5 эритроцитов в одном поле зрения. При оценке адгезивных свойств использовали следующие показатели:

· СПА (средний показатель адгезии) - среднее количество микробных клеток прикрепленных к одному эритроциту;

· К (коэффициент адгезии) - количество эритроцитов из 100, принимавших участие в адгезии;

· ИАМ (индекс адгезивности микроорганизмов) - отношение среднего количества микробных клеток расположенных на одном эритроците к величине коэффициента адгезии в пересчете на 100.

Микроорганизмы считают неадгезивными при ИАМ≤1,75; низкоадгезивными - от 1,76 до 2,5; среднеадгезивными - от 2,51 до 4,0 и высокоадгезивными - ≥4,0.

АБ чувствительностьопределяли диско-диффузионным методом. Культуры разводили по стандарту мутности 0,5 McFarland и наносили на Мюллер-Хинтон агар. Использовали диски с антибиотиками в соответствии с МУК 4.2.1890-04 [2] [Приложение 5, Таблица 5].

Обработку полученных результатов проводили методами статистической обработки программы Microsoft Excel.

**3.2 Результаты собственных исследований**

1) При оценке качественного и количественного соотношения микроорганизмов было выявлено 3 степени дисбактериоза кишечника [Приложение 6, Диаграмма 1]:

· 1 степень - 28 детей (32,9%);

· 2 степень - 27 детей (31,8%);

· 3 степень - 30 детей (35,3%).

) Энтерококки были выделены от 90 детей. Таким образом, частота выделения энтерококков составила 81,8%.

3) Из выделенных культур энтерококков (n=90):

· 74 культуры были идентифицированы как E. faecalis (82,2%);

· 11 культур - как E. faecium (12,2%);

· 5 культур - как E. durans (5,6%) [Приложение 6, Диаграмма 2].

) Гемолизины были выявлены у 17 культур энтерококков, что составило 18,9%. Из них E. faecalis - 15 культур (88,2%), E. faecium - 2 культуры (11,8%). Культуры E. durans гемолитической активностью не обладали [Приложение 7, Диаграмма 3].

) Продукция желатиназы была обнаружена у 8 культур энтерококков, из них E. faecalis - 7 культур (87,5%), E. faecium - 1 культура (12,5%). Культуры E.durans протеолитической активностью не обладали [Приложение 7, Диаграмма 4].

) Фермент ДНКаза был обнаружен у 3 культур E. faecalis. Остальные виды данным ферментом не обладали [Приложение 7, Диаграмма 5].

) 2 культуры E. faecalis обладали одномоментно и гемолизинами, и желатиназой.

) Адгезивная способность энтерококков представлена в таблице [Приложение 8, Таблица 6].

Энтерококки видов E. faecalis и E. faecium являются высокоадгезивными (ИАМ=6,77±0,42 и 4,8±0,36 соответственно). E. durans были среднеадгезивными (ИАМ=3,45±0,29).

Различия показателей ИАМ E. faecalis и E. durans статистически достоверны (p<0,001).

) Все выделенные культуры энтерококков были чувствительны к ванкомицину [Приложение 9, Диаграмма 6].

E. durans также проявил 100% чувствительность к ампициллину и доксициклину [Приложение 12, Диаграмма 9]. Примерно половина штаммов E. faecalis и E. faecium оказались резистентными к эритромицину (41,9% и 54,5% резистентных культур соответственно) [Приложения 10-11, Диаграммы 7-8]. Также для всех трех видов характерно наличие резистентности к аминогликозидам (гентамицин): 20-36,4% резистентных культур.

) Выраженность факторов патогенности в зависимости от степени дисбактериоза [Приложение 13, Таблица 7]:

**1 степень.** Чаще всего выделялся вид E. faecalis (86,2%). E. faecium и E.durans выделялись в 6,9% случаях каждый. Гемолитическую активность энтерококки проявляли в 17,2% случаев. Желатиназную - в 10,3%, ДНКазную - 3,4%. Большинство энтерококков (85,3%) были со средней адгезивной активностью - ИАМ 3,6±0,32.

**2 степень**.Чаще выделялся вид E. faecalis (82,8%), E. faecium - в 13,8% случаев и E.durans выделялся с частотой 3,4%. Гемолитическую активность энтерококки проявляли в 20,7% случаев. Желатиназную - в 6,9%, ДНКазную - 3,4%. Большинство энтерококков (96,6%) были со средней адгезивной активностью - ИАМ 3,95±0,35.

**3 степень.** E. faecalis выделялся с частотой 78,1%, E. faecium - 15,6% и E.durans - 6,3%. Гемолизинами обладали 18,8% культур, желатиназой - 9,4%, ДНКазой - 3,1% культур. 93,8% энтерококков обладали высокой адгезивной активностью - ИАМ 6,5±0,41.

**Заключение**

В последнее время резко возросла значимость энтерококков как возбудителей инфекций. Несмотря на небольшое количество факторов патогенности, энтерококки без своевременного лечения могут наносить большой вред организму, вплоть до летального исхода. Большинство энтерококковых инфекций носит эндогенный характер, то есть при неблагоприятных для макроорганизма условиях энтерококк, входящий в нормальную микрофлору человека, может навредить своему «хозяину».

Проведя исследования по оценке патогенности энтерококков, выделенных из естественных экологических ниш (кишечника), мы доказали, что частота встречаемости факторов патогенности у клинически незначимых изолятов очень мала, по сравнению с клинически значимыми. Но тем не менее, они имеют место быть, и в определенные моменты, когда иммунитет человека ослабевает, энтерококки, заселяющие естественные экониши, путем реализации своего патогенетического материала могут послужить источниками эндогенных инфекций.

**Список источников**

1. Методические указания МУК №10.05.044.03. Бактериологическая диагностика дисбактериоза кишечника - Астана, 2004. - 35 с.

2. Методические указания МУК 4.2.1890-04. Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам - Москва, 2004.

3. Отраслевой стандарт 91500.11.0004-2003. Протокол ведения больных. Дисбактериоз кишечника - Москва, 2003.

4. Бондаренко В.М. Симбиотические энтерококки и проблемы энтерококковой оппортунистической инфекции - М., 2007. - 30 с.

. Валышев А.В. Факторы патогенности энтерококков кишечной микрофлоры человека // Жур. Микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. -2012. - №4. - Стр. 41-43.

. Валышева И.В. Генетическая характеристика вирулентного потенциала энтерококков кишечной микробиоты человека // Жур. Микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. -2012. - №4. - Стр. 44-47.

. Ермоленко Е.И. Бактериоцины энтерококков: проблемы и перспективы использования (обзор литературы) // Вестник Санкт-Петербургского Университета. - 2009. - Сер.11. - Вып.3. - Стр. 78-93.

. Сидоренко С.В. Клиническое значение антибиотикорезистентности грамположительных микроорганизмов // Инфекции и антимикробная терапия. - 2003. - №5. - С. 3-15.

. Сидоренко С.В. Молекулярные основы резистентности к антибиотикам // Успехи биологической химии. - 2004. - т. 44. - С. 263-306.

. Черданцева Г.А. Характеристика биологических свойств энтерококков различного происхождения // Жур. Микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. -2000. - №4. - Стр. 101-104.

. Янковский Д.С. Микробная экология человека: современные возможности ее поддержания и восстановления // К.: «Эксперт ЛТД». - 2005. - 361 с.

12. Chenoweth C. The epidemiology of Enterococcus // Eur. J. Gin. Microbiol. - 2005. - №9. - Р. 80-89.

. Franz C. Enterococci in foods - a conundrum for food safety // Int. J. Food Microbiol. - 2003. - Vol. 88. - P. 105-122.

. Murray B.E. The life and times of the Enterococcus // J. Clin. Microbiol. - 1990. - №3. - Р. 46-65.

. Sigrun R. Structure and DNA-binding properties of the cytolysin regulator CylR2 from Enterococcus faecalis // The EMBO J. - 2004. - №18. - P. 3632-3642.

кишечник дисбактериоз патогенность энтерококк