© В.І. Русин, Г.М. Коваль, Ю.С. Лозінський, О.В. Леошик, 2017

УДК 616.343/.345-002.2-031.84:616.34-008.87

В.І. РУСИН[1], Г.М. КОВАЛЬ[2], Ю.С. ЛОЗІНСЬКИЙ[3], О.В. ЛЕОШИК[3]
[1]Ужгородський національний університет, медичний факультет, кафедра хірургічних хвороб;
[2]кафедра мікробіології, вірусології та імунології, Ужгород;
[3]Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького, кафедри хірургії № 1, Львів

МІКРОФЛОРА КИШЕЧНИКА ХВОРИХ НА НЕСПЕЦИФІЧНИЙ ВИРАЗКОВИЙ КОЛІТ ТА ХВОРОБУ КРОНА

Вивчено мікрофлору кишечника у 28 хворих на неспецифічний виразковий коліт, 17 хворих з хворобою Крона та 15 здорових людей методом бактеріоскопії. Бактеріоскопія дозволяє встановити співвідношення грампозитивної і грамнегативної флори та визначити розміри бактеріальних клітин, перевагу тих чи інших морфотипів упродовж 2–3 годин з моменту дослідження. У здоровій кишковій мікрофлорі грампозитивна становить від 30 до 60% (в середньому 43%), а у хворих з неспецифічним виразковим колітом та хворобою Крона переважає грамнегативна флора, досягаючи 90%.

Ключові слова: мікрофлора, неспецифічний виразковий коліт, хвороба Крона

Вступ. Неспецифічний виразковий коліт (НВК) та хвороба Крона (ХК) є ідеопатичними захворюваннями шлунково-кишкового тракту і складають дві найпоширеніші патології запальних захворювань товстої кишки [4].

Нормальна мікрофлора кишечника є повноцінною екологічною системою, що виконує різноманітні функції в організмі людини. Її розглядають як своєрідний «екстракорпоральний орган», що забезпечує багато аспектів життєдіяльності організму людини. Так, нормальна мікрофлора підтримує колонізаційну резистентність організму, запобігає розвитку патогенної й умовно-патогенної флори [5, 8]. У разі порушення цієї найважливішої функції зростає кількість і розширюється спектр потенційно патогенних мікроорганізмів, збільшується їх транслокація через стінку, що може супроводжуватися виникненням ендогенної інфекції або суперінфекції. При порушенні якісного й кількісного складу мікробіоценозу кишечника внаслідок розмноження умовно-патогенних бактерій в кількості, що перевищує норму, розвивається синдром надмірного бактерійного росту, що грає значну роль у патогенезі багатьох захворювань, зокрема при ускладнених формах НВК та ХК.

Хірургічне лікування наразі залишається актуальним і займає вершину так званої «піраміди» комплексного лікування запальних захворювань тонкої та товстої кишок. До того ж за умов ускладненого перебігу захворювань НВК та ХК передбачають дво- або тримоментнне виконання хірургічного втручання, де під час першого етапу накладається петлева превентивна ілеостома або колостома. До 25% пацієнтів, хворих на НВК, які перенесли колпроктетомію, формується постійна ілеостома.

Безперечно, при тимчасовій відсутності пасажу тонкої та товстої кишок і або частини товстої кишки, або постійному відключенні останнього – мікрофлора як «замкнутого відділу», так і привідної частинки кишечника повинна змінюватись.

Мета дослідження. Для покращення результатів лікування і якості життя пацієнтів вивчити мікрофлору випорожнень хворих на НВК та ХК у порівнянні зі здоровими людьми.

Матеріали та методи. Нами проведено вивчення мікрофлори 28 хворих на НВК та 17 пацієнтів з хворобою Крона. Контрольну групу склали 15 здорових пацієнтів, за співвідношенням жінок до чоловіків (3:1) групи були приблизно однакові. Вік пацієнтів з ХК у середньому становив 28±4,5 року, з НВК – 37,5±3,5 року, у контрольній групі – 46±4,2 року.

Рівномірний мазок фекального субстрату на предметному склі висушували при кімнатній температурі впродовж 15–20 хв., фіксували етиловим спиртом впродовж 8–12 хв. та фарбували за методом Грама. Кількісно нативно-фіксований препарат аналізувався за допомогою відеотест-системи, що підвищує інформативність дослідження. При вивченні мікробного ценозу за допомогою прямої бактеріоскопії проводили: облік чисельності різних морфотипів, відеореєстрацію морфотипів, аналіз видового різноманіття, визначення співвідношення грампозитивних та грамнегативних форм [2, 9].

Фекалії відразу висівали на хромогенні поживні середовища нового покоління: (*Candida* ID 2, SM ID 2 (*Salmonella*), CPS ID 3 (*E.coli, Proteus, Enterococci*), *S.aureus* ID, MRSA ID, *Haemophilus* Chocolate 2 agar (Hemin + NAD), *Campylobacter* agar, SMAC CY agar (*E.coli* O157H7) *Clostridium difficile* agar, UriSelect agar). Видову належність бактерій визначили у поєднанні класичних мікробіологічних прийомів (мікроскопія, фарбування за Грамом, каталазно-оксидантна нейтралізація і оксидазний тести, плазмокоагулазна, лецитиназна, гемолітична активність із півавтоматизованими методами типування бактерій з

використанням біохімічних та комбінованих тест-систем API. Виділені та ідентифіковані штами бактерій досліджували на їх чутливість до сучасних антибіотиків на середовищі АГВ дискодифузним методом за Бауер-Кірбі з використанням дисків виробництва фірм BioRad та OXOID у автоматичному режимі їх нанесення. В якості тест-культур для перевірки придатності антибіотиків для дослідження використовували еталонні штами бактерій: *S.aureus* ATCC 25923 (F-49), *Escherichia coli* ATCC 25922 (F-50), *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (F-51), одержані з філії національного музею мікроорганізмів інституту мікробіології та імунології ім. І.І. Мечникова. При оцінці активності антибіотиків користувалися критеріями виробника дисків, а також стандартами EUCAST (2009).

Результати досліджень та їх обговорення. При використанні методу бактеріологічного посіву основними маркерами, що дозволяють зробити висновок про дисбіотичні зміни, є: видова наявність «анаеробів» і «аеробів», кількісна характеристика (концентрація) і частота утворення цих груп мікроорганізмів [5, 6, 7].

Базуючись на видовій ідентифікації, визначали облігатну мікрофлору, біфідо-, лактобактерії, бактероїди, клостридії, типові ешерихії, ентерококи і анаеробні коки.

До факультативної умовно-патогенної флори (УПФ) слід віднести ешерихії *E.coli* з нетиповими біохімічними властивостями, *E.coli* з гемолітичними властивостями, *Proteus spp., Citrobacter spp., Enterobacter spp., Klebsiella spp., Yersinia spp., Campylobacter spp., Cl. difficile*, гриби дріжджові, золотисті стафілококи, β-гемолітичний стрептокок. До транзиторних (випадкових) мікроорганізмів можуть бути віднесені неферментуючі бактерії, деякі аеробні негемолітичні стрептококи, аеробні спорові бацили, цвілеві гриби, псевдомонади. Концентрація облігатних видів, перерахованих вище, змінювалася як генотипово, так і під впливом середовища. Кількість умовно-патогенних видів безпосередньо залежала від середовища і зміни мікроекологічних умов у кишечнику, а їх виявлення у хворих з кишковими інфекціями свідчить про початок дисбіозу.

Ми порівняли зміну видів мікрофлори у хворих з виразковим колітом та хворобою Крона у порівнянні зі здоровими людьми (табл. 1).

Таблиця 1

Облігатна та факультативна мікрофлора у хворих на виразковий коліт та хворобу Крона

Група	Питома вага в мікробному ценозі %		Концентрація
	Контрольна група (здорові)	Хворі на виразковий коліт і хворобу Крона	
Облігатна	60,1	36,6	В 1,6 разу менше
Умовно-патогенна	7,0	22,6	В 3,2 разу більше
Транзиторна	4,9	8,7	В 1,8 разу більше

У хворих пацієнтів облігатні види мікрофлори складають 36,6%, а не 60,1%, як у здорових. Частка умовно-патогенних і транзиторних видів при виразковому коліті і хворобі Крона зростає до 22,6% і 8,7% у порівнянні з 7,0 і 4,9% у здорових людей. Це обумовлено змінами в концентрації і частоті виникнення різних видів мікроорганізмів у обстежених двох груп.

Найбільш стійкими до змінених умов існування виявилися кишкові палички (*E.coli*) з типовими властивостями, що висіваються у 95,5% хворих і зберігають концентрацію (lg 6,9), близьку до нормальної.

Умовно-патогенна флора в різних поєднаннях трапляються практично у всіх хворих з колітом і хворобою Крона, а у здорових людей – тільки в 7%. Крім того, якщо в «здоровому» мікробному ценозі в середньому виявляється не більше 0,2 виду УПФ, то у хворих на коліт – 2,1 виду, тобто в 10,5 разу більше. Концентрація умовно-патогенних видів у хворих на ХК склала lg 5,2, а у здорових – 2,2.

До транзиторних видів, які ми виділяли, слід віднести стафілококи (крім золотистих), стрептококи, цвілеві гриби. Частота цих видів склала в середньому 25,1%, а концентрація – lg 5,0.

Отримані дані дозволяють припустити, що основними ознаками порушення кишкової мікрофлори при виразковому коліті й хворобі Крона є:

– виражене порушення облігатної мікрофлори, існування якої у індивідуального генотипу залежить від стану і функціональних властивостей слизової оболонки товстої кишки. У хворих із виразковим колітом, хворобою Крона в такому «мікробному пейзажі» не вдалося виділити провідні в кількісному відношенні види мікроорганізмів;

– через дефект популяцій біфідо-, лактобактерій, а також деяких аспорогенних анаеробів порушується цілісність мікробної біоплівки на слизовій оболонці товстої кишки. При цьому формується порушення мікрофлори кишечника, в свою чергу, запускає і підтримує каскад запальних реакцій в стінці товстої і тонкої кишки. Внаслідок продукції біологічно активних речовин кишкові мікроорганізми здатні активно впливати на різні функції товстої кишки, зокрема секреторну і моторну. Оскільки порушення кишкової мікрофлори має вторин-

ний характер, його не можна розглядати як тригенний чинник. Порушення симбіонтної мікрофлори може лише сприяти підтримці неспецифічного запального процесу.

Порівняльний аналіз даних, отриманих від хворих з неспецифічним виразковим колітом та хворобою Крона, дозволив виявити також основні морфотипи мікроорганізмів з фекалій [2] і підрахувати їх кількість, встановити особливості співвідношення грампозитивної і грамнегативної флори. Ми проаналізували різноманітність морфологічних типів у хворих, що виявляється методом посіву і бактеріоскопії. Ці показники в середньому склали 7 і більше варіантів, а у деяких хворих реєструвалося до 12 і більше форм мікроорганізмів.

Біфідобактерії в нативному препараті виявлялися у 17,5% у порівнянні з 68,9% у посівах. Аспорогенні анаероби-бактероїди висіяні в 63,2%, а в мікропрепараті – у 100% спостережень. Серед кокових форм мікрофлори збігалася частота стафілококів, висіяних у 94,1% спостережень і зареєстрованих у 97,5% в мікропрепараті. Стосовно дипло- і стрептококів, то вони виявлялися в нативних препаратах у 82,5% випадків у порівнянні з 51,9% в посівах. Такі дані за частотою відзначені для спорових форм – 69,5 і 62,5% відповідно.

Особливу групу мікроорганізмів, що реєстрували, в основному, тільки бактеріоскопічно, складають звивисті або ниткоподібні кампілоподібні форми бактерій, довжиною до 10 мкм, які виявлялися у 91% хворих. На поживних середовищах, що використовуються при дослідженні кишкової мікрофлори, такі форми не висівали.

Дріжджові й цвілеві гриби висіяні у 55,2 і 10,3% проб фекалій відповідно, в препаратах прямої бактеріоскопії реєструвалися у 15,0 % випадків.

Літературні дані [1, 3] свідчать, що в організмі здорової людини переважають грампозитивні види (72,2%) мікроорганізмів. У хворих на виразковий коліт та хворобу Крона їх частка дорівнює 39,6%. Інфраструктура цієї групи мікроорганізмів різна. Якщо в нормі вона сформована біфідобактеріями, морфотипами, відповідними лактобактеріям, еубактеріям, пропіоновим бактеріям, то у хворих більша частина грампозитивних форм належить кампілобактеріям, споровим паличкам, грибам, кокам. Таким чином, попередні дані вказують, що в нормальному мікроценозі грампозитивна флора становить від 30 до 60% (в середньому 43,1%), а у хворих на виразковий коліт і хворобу Крона переважає грамнегативна флора, досягаючи 90%.

Отже, за даними бактеріоскопічного методу та бактеріологічного посіву висновок про наявні порушення кишкової мікрофлори у конкретного пацієнта базується на двох показниках – видовій належності і концентрації мікроорганізмів. При використанні бактеріоскопії отримують також кількісні характеристики концентрації, але тільки не видів, а морфологічних типів, аналіз яких несе нову інформацію. Пофарбований фіксований препарат, виготовлений для прямої бактеріоскопії, дозволяє врахувати кількість мікроорганізмів, різноманітні морфотипи, зокрема такі, як біфідобактерії, бактероїди, гриби, клостридії. Цей метод виявляє нові резидентні форми мікроорганізмів, які не виявляються у посівах, наприклад, кампілобактери, звивисті форми, в тому числі аспергілли тощо.

Висновки. Метод бактеріоскопії пропонує нові критерії в оцінці порушень кишкової мікрофлори – візуальний облік співвідношення грампозитивної і грамнегативної мікрофлори, перевага тих чи інших морфотипів, визначення різних розмірів бактеріальної клітини за 2–3 годин від початку дослідження.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Воробйов А.А Популярно-генетичні аспекти мікробіологічного фенотипу кишечника здорової людини / А.А. Воробйов, Ю.В. Несвижский, Є.В. Буданова, Л.О. Іноземцева // Журн. мікробіол. епідеміол. імунол. — 2015. — Вип. 4. — С. 30—35.
2. Лягіна І.А., Корнєва Т. К. Патент на винахід № 2273853 від 28.12.2004. «Спосіб бактеріоскопічної експресному ідентифікації мікрофлори вмісту товстої і прямої кишки».
3. Марко О.П. До питання про кишкову мікрофлору при неспецифічному виразковому коліті (Попереднє повідомлення) / О.П. Марко, Т. К. Корнєва, Ж.М. Юхвідова // Журн. мікробіол. епідеміол. імунол. — 2009. — Вип. 1. — С. 78—81.
4. Олескин А.В., Ботвинко И.В., Цавкелова Е.А. Колониальная организация и межклеточная коммуникация у микроорганизмов / А.В. Олескин, И.В. Ботвинко, Е.А. Цавкелова // Микробиология. — 2014. — № 69 (3). — С. 3093—27.
5. Пищик В.Н. Особенности метаболизма бактерий рода Klebsiella / В.Н. Пищик, И.И. Черняева, Е.А. Семенова [та ін.] // Микробиология, 1997. — Т. 66, № 1. — С. 54—59.
6. Пойда А.И. Восстановительные и реконструктивно-восстановительные операции на толстой кишке: Монография / А.И. Пойда, В.М. Мельник. — Киев: Издательский центр «Имидж Украины», 2014. — 366 с.
7. Семенова Е.А. Изучение патогенности у различных представителей рода Citrobacter / Е.А. Семенова, Е.И. Белькова, В.Н. Пищик [та ін.] // Микробиол. жур. 1993. — Т. 55, № 4. — С. 75—81.

8. Duchmann R. T-cell specificity and cross reactivity towards Enterobacteria, Bacteroides, Bifidobacterium, and antigens from resident intestinal flora in humans / R. Duchmann, E. May, M. Heike [et al.] // Gut. — 1999. — Vol. 44. — P. 812—818.
9. Sartor R.B. Microbial influences in inflammatory bowel disease, role in pathogenesis and clinical implications / R.B. Sartor // Kirsner's inflammatory bowel diseases. — 2014. — 6th Ed. — Section II. — P. 138—157.

V.I. RUSYN[1], G.M. KOVAL[2], Yu.S. LOZINSKII[3], O.V. LEOSHYK[3]

[1]Uzhhorod National University, Medical Faculty, Surgery Department;
[2]Department of Microbiology, Immunology, Virology, Uzhhorod;
[3]Lviv National Medical University by Danylo Halytskyi, Surgery Department № 1, Lviv

INTESTINAL MICROBIOTA PATIENTS WITH ULCERATIVE COLITIS AND CROHN'S DISEASE

There is examination of intestinal microbiota by microscopic method in 28 patients with UC and in 17 patients with Crohn's disease. Visual changes of Gram-positive and Gram-negative ratio, definition of the different sizes of bacterioscopic cells, predominance of the certain morphotypes after 2-3 hours since the begining of the bacterioscopic research. Gram-positive bacteria in normal microbiota compile from 30 up to 60%, approximately 43%. And in the patients with UC and CD-prevalates Gram-negative microbiota and reaches 90%.

Key words: microbiota, Crohn's disease, nonspecific ulcerative colitis

Стаття надійшла до редакції: 24.01.2017 р.