

УДК 616.24-008.4:616-08-035: 576.858

Примак Т.Д., Эрдынеева Б.С., Днепровская Е.А.

АССОЦИАЦИИ БАКТЕРИАЛЬНОЙ МИКРОФЛОРЫ ЖЕЛУДОЧНО-КИШЕЧНОГО ТРАКТА И ЦИРКУЛИРУЮЩИХ ГЕРПЕТИЧЕСКИХ ВИРУСОВ У ВЗРОСЛЫХ

*Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования Читинская государственная медицинская академия
Министерства здравоохранения Российской Федерации*

Цель исследования. Целью исследования явилось изучение микробиоценоза желудочно-кишечного тракта и ферментативных свойств *Escherichia coli* у взрослых лиц, имеющих присутствие герпетических вирусов в кровотоке.

Материалы и методы. Проведено бактериологическое и молекулярно-генетическое исследование микробных изолятов, выделенных от 70 взрослых, и полученные данные были сопоставлены с результатами функционирования кишечника обследованных лиц.

Результаты. У лиц с функциональными нарушениями ЖКТ в биотопах кишечника, ротоглотки, крови обнаружены ассоциации измененной кишечной палочки *Escherichia coli* – лактозонегативной, низкоферментативной, главным образом, гемолитической с грамположительными кокками – *S. aureus* (22,2%), микробное число $3,4 \pm 0,3$ в кишечном биологическом, $5,2 \pm 0,5$ – в ротоглотке, что сопровождалось повышением вирусной нагрузки кровотока и ротоглотки представителями семейства *Herpetoviridae*.

Заключение. Полученные данные свидетельствуют в поддержку гипотезы, что кишечная микрофлора в сочетании с вирусами вовлечены в развитие патологического процесса в желудочно-кишечном тракте.

Ключевые слова: микрофлора, кишечная палочка, стафилококк, герпесвирусы.

Primak T.D., Erdynyeva B.S., Dneprovskaya E.A.

ASSOCIATION OF BACTERIAL MICROFLORA OF THE GASTROINTESTINAL TRACT AND CIRCULATING GERPESVIRUSES IN ADULTS

Chita State Medical Academy, Chita, Russia

The aim of the research. The aim of the study was to examine the gastrointestinal microflora and enzymatic properties of *Escherichia coli* in adult individuals with presence of herpetic viruses in the blood.

Materials and methods. Isolates of microbiota from 70 adults was collected, the DNA extracted, and 16S rRNA analysis performed. Resulting taxa of microbes were correlated to clinical variables.

Results. Individuals with functional impairments intestinal tract in biotopes of the bowel, oropharynx, blood found association modified *Escherichia coli* - laktonegativ, increasefermentativ, hemolytic with grampozitiv bacterial - *S. aureus* (22.2%), microbial number 3.4 ± 0.3 in the intestinal tract, 5.2 ± 0.5 - in the oropharynx, which was accompanied by an increase in viral load in blood flow and oropharyngeal representatives *Herpetoviridae* family.

Conclusion. This provides the evidence to support the hypothesis that the intestinal microbiome derived from viral status may be involved in the inflammatory response.

Keywords: microbiota, *Escherichia coli*, *S aureus*, *Herpetoviridae*.

Микробиота тела человека все чаще рассматривается как фактор окружающей среды, вносящий свой вклад в развитие не только инфекционной, но и соматической патологии человека [1, 2, 3].

Исходный дисбиоз с нарушением стабильности микробного сообщества может служить отправной точкой формирования эндокринных, метаболических и иммунологических нарушений, приводящих к значительным изменениям в функционировании внутренних органов [4, 5]. Особое значение имеет взаимодействие между представителями облигатной микрофлоры тела человека и условно-патогенными микроорганизмами, включая бактерии, археи, вирусы, простейшие, грибы [6, 7]. Остается открытым вопрос о влиянии условно-патогенных вирусов, обитающих в организме человека и активно циркулирующих в кровотоке, на функциональные свойства резидентной микробиоты, в частности, ассоциативные возможности и ферментативную активность кишечной палочки *Escherichia coli* [8].

Целью исследования явилось изучение микробиоценоза желудочно-кишечного тракта и ферментативных свойств *Escherichia coli* у взрослых лиц, имеющих присутствие герпетических вирусов в кровотоке.

Материалы и методы. В амбулаторных условиях проведено бактериологическое и молекулярно-генетическое исследование кишечной микрофлоры и ротоглотки 70 взрослых в возрасте 30-55 лет, предъявлявших жалобы со стороны желудочно-кишечного тракта. Контрольную группу составили 25 лиц, не имевших функциональных расстройств пищеварительного тракта.

Исследовали микробиоценоз фекалий с оценкой ферментативной активности *Escherichia coli* (Табл. 1) бактериологическим методом с определением количественного и качественного состава кишечной микрофлоры в соответствии с Методическими рекомендациями МЗ СССР №10-11/31 «Применение бактериальных биологических препаратов в практике лечения больных кишечными инфекциями. Диагностика и лечение дисбактериоза кишечника» (1986 г), Информационным письмом МЗ РФ № 22-01-11-381 «Совершенствование метода диагностики дисбактериоза толстого кишечника» (2002г) и на основании ОСТ 91500.11.0004-2003, утвержденного Приказом МЗ РФ № 231 от 09.06.2003 г.

Материал из ротоглотки брали натошак стерильным ватным тампоном. Посев производили на питательные среды: кровяной мясопептонный агар, желточно-солевой агар, среду Эндо, среду Сабуро с последующей микроскопией полученных на плотных питательных средах колоний с окраской по Граму, определением биохимической активности с целью идентификации микроорганизмов.

Исследование крови на наличие циркулирующих герпетических вирусов – цитомегаловируса (*CMV*), вируса Эпштейна-Барра (*EBV*), герпетического вируса шестого типа (*HHV6*) методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридационно-флюоресцентной детекцией в режиме «реального времени» с использованием комплекта реагентов «РИБО-преп» вариант 100, «ПЦР-комплект» вариант FRT-100F в составе набора «АмплиСенс® *EBV/CMV/HHV6*-скрин-FL», разработанных и рекомендованных ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, на амплификаторе роторного типа «Rotor-Gene 6000» (Corbett Research, Австралия).

Статистическая обработка результатов исследования проведена с использованием программы Statistica 6,0. Различия между группами считали статистически достоверными при $p < 0,05$. Для доказательства эффективности применения t-критерия Стьюдента использован критерий Шапиро-Уилка. Наличие связей между показателями определяли, используя коэффициент линейной корреляции Пирсона (r).

Таблица 1

Общее количество лабораторных исследований биологического материала в обследуемых группах

Наименование биотопов	Количество исследований			
	Бактериологическое исследование		ПЦР-исследование	
	Взрослые с функциональными изменениями ЖКТ	Контрольная группа	Взрослые с функциональными изменениями ЖКТ	Контрольная группа
Ротоглотка	40	20	20	20
Фекалии	45	25	-	-
Кровь	-	-	19	20

Результаты и их обсуждение. Среди взрослых, имевших проблемы со стороны пищеварительного тракта, у 35,7% (16) преобладала склонность к запорам, оставшаяся часть обследованных – 64,3% (29) имели в анамнезе частые диарейные проявления в виде неоформленного учащенного до трех-пяти раз в день стула. В результате проведенного бактериологического исследования копрокультур лиц с функциональными нарушениями со стороны ЖКТ обнаружено снижение количества облигатных микроорганизмов, преимущест-

венно бифидумбактерий и бактериоидов, а также повышение содержания кишечной палочки с измененными ферментативными свойствами (Табл. 2).

Таблица 2

Характеристика микробиоты кишечника лиц с жалобами со стороны ЖКТ

Микроорганизмы	Взрослые с жалобами со стороны ЖКТ (n=45)		
	Частота обнаружения микроорганизмов		Концентрация выделенных микроорганизмов (lg)
	абс	%	
<i>Bifidumbacterium spp.</i>	45	100	7,54±0,12
Бактероиды	44	97,8	6,7±0,8
<i>Lactobacillus spp.</i>	45	100	7,12±1,1
<i>Lactococcus spp.</i>	45	100	7,0±0,9
<i>Enterococcus spp.</i>	45	100	5,76±0,6
<i>E. coli</i> с нормальными ферментативными свойствами	43	95,6	7,28±0,5
<i>E. coli</i> лактозонегативная	42	93,3	6,52±0,8
<i>E. coli</i> низкоферментативная	41	91,1	7,14±0,24
<i>E. coli</i> гемолитическая	9	20,0	4,6±1,0
КОС	42	93,3	3,42±0,8
<i>S. aureus</i>	10	22,2	3,4±0,9
<i>Candida spp.</i>	42	93,3	4,0±0,41
<i>Clostridium spp.</i>	9	20,0	3,3±1,6
Другие УПМ	8	17,8	6,9±0,6

Большинство обследованных не имели значительных проблем с функционированием ЖКТ. Исследование микробиоты ЖКТ у 45 взрослых с неустойчивыми показателями функционирования пищеварительного тракта позволило выявить следующие различия в пейзаже микрофлоры кишечника у лиц с наличием жалоб и в контрольной группе (Табл. 3). В наблюдаемой группе взрослых с изменениями в функционировании ЖКТ наблюдалось снижение частоты встречаемости бифидобактерий, бактериоидов, более частое обнаружение лактозонегативных и низкоферментативных кишечных палочек, других УПМ рода стафилококков и семейства энтеробактерий, включая их ассоциации (Рис. 1). Среди УПМ преобладали представители рода *Staphylococcus spp.* (*S. aureus* и др.), бактерии семейства *Enterobacteriaceae* чаще идентифицировались как *Klebsiella spp.*(4), *Citrobacter spp.* (2) и *Enterobacter spp.* (2). *S. aureus* был выделен из содержимого просвета кишечника у 10 (22,2%) взрослых с функциональными нарушениями ЖКТ и в 100% случаев сопровождался по данным анамнеза пациентов склонностью к диарее.

Таблица 3

Состав микробиоты у взрослых с функциональными нарушениями ЖКТ по сравнению с контрольной группой

Микроорганизмы	Частота встречаемости		
	Взрослые с функциональными нарушениями со стороны ЖКТ (n=45)	Контрольная группа (n=25)	Уровень значимости отклонения H_0 , p (одностор. критерий)
	К-во наблюд.	К-во наблюд.	P
<i>Bifidumbacterium spp.</i>	45	25	0,5
<i>Lactobacillus spp.</i>	45	25	0,1
<i>Enterococcus spp.</i>	45	25	0,08
<i>E. coli</i> с нормальными ферментативными свойствами	43	25	0,46

<i>E. coli</i> лактозонегативная	42	10	0,21
<i>E. coli</i> с низкой ферментативной активностью	41	11	0,42
<i>E. coli</i> с гемолитическими свойствами	9	-	0,09
КОС	42	24	0,21
<i>S. aureus</i>	10	1	0,001*
<i>Candida spp.</i>	42	16	0, 1
Другие УПМ	8	-	0,001*

Примечание: * - $p < 0,05$

Оценка плотности микробных популяций микробиоты в двух сравниваемых группах взрослых выявила значительные расхождения количественных характеристик бифидумбактерий, лактобактерий, лактококков, энтерококков, измененных эшерихий на фоне отсутствия в контрольной группе кишечной палочки с гемолитическими свойствами и УПМ (Рис. 2).

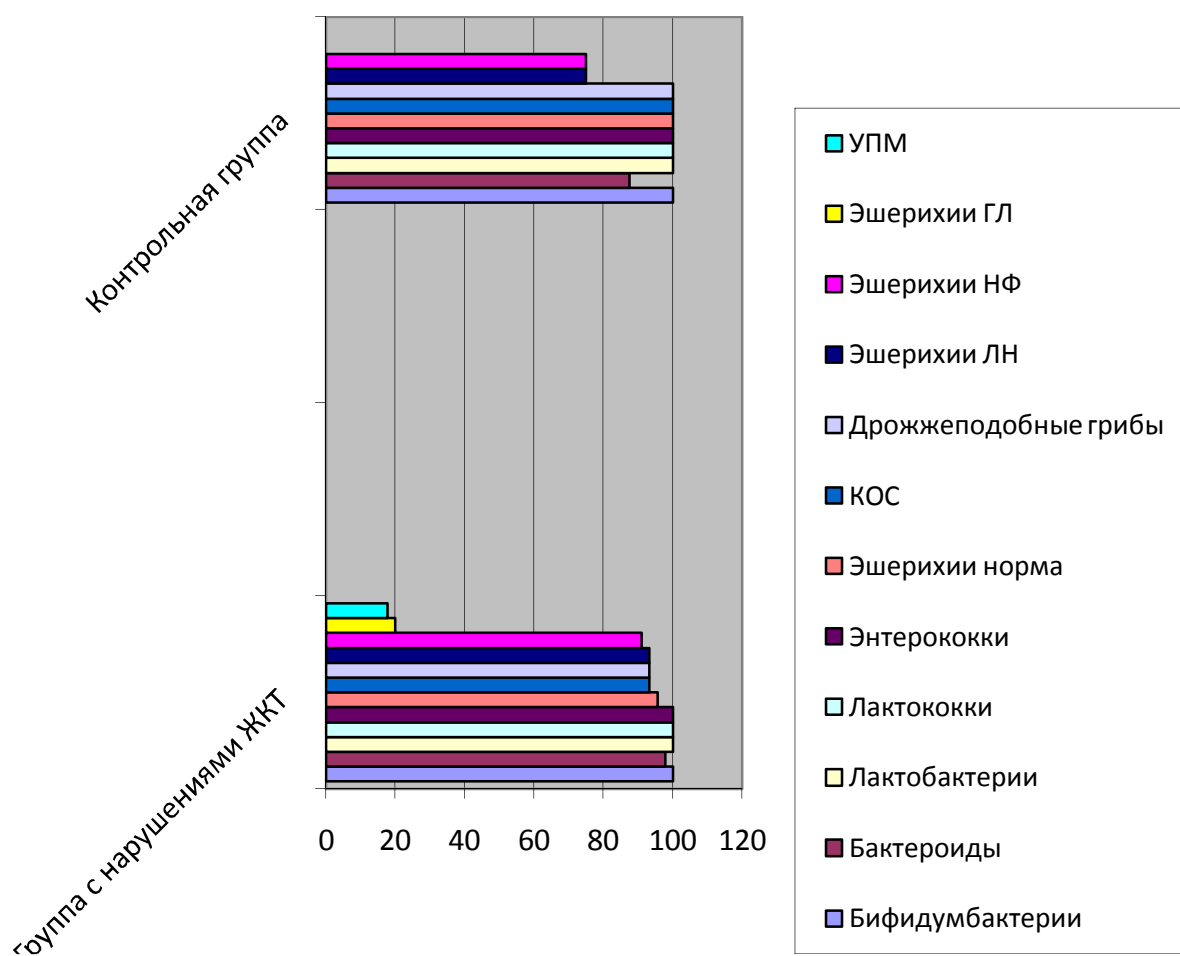


Рис. 1. Микробный пейзаж кишечника взрослых с функциональными нарушениями ЖКТ (%) (n=45) и в контрольной группе (n=25)

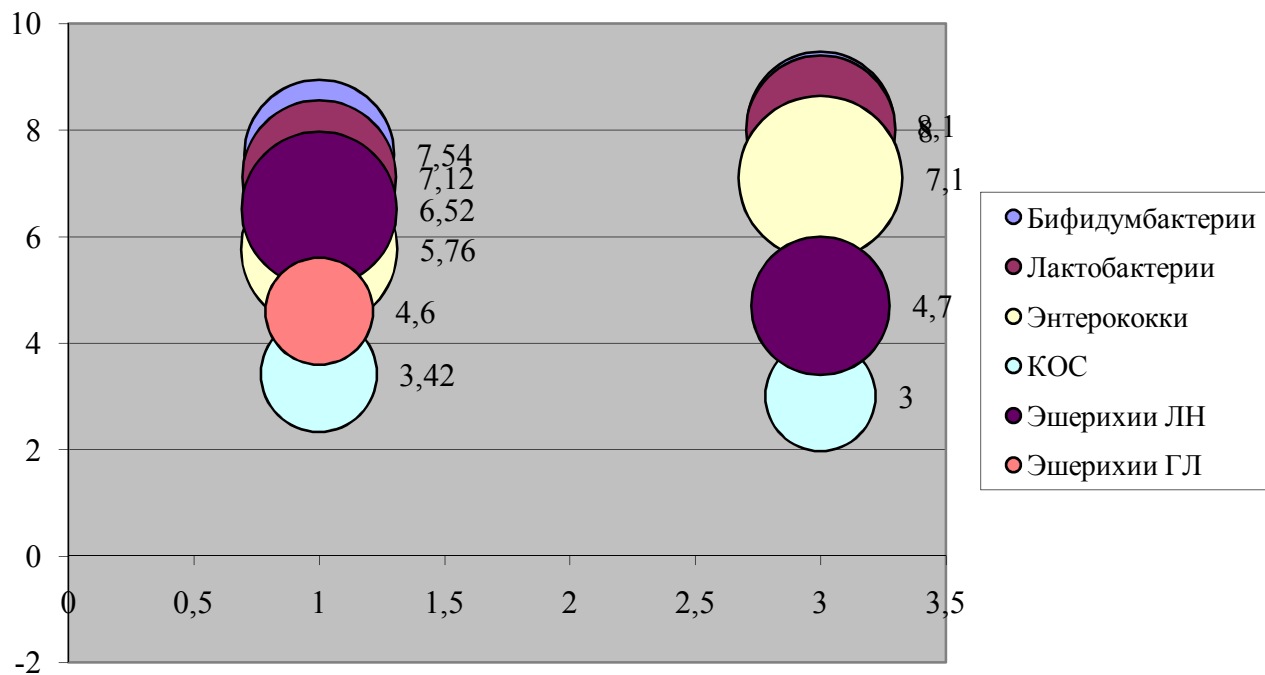


Рис. 2. Микробное число микробиоты ЖКТ взрослых с функциональными нарушениями ЖКТ (n=45) и в контрольной группе (%) (n=25)

Немногочисленное обнаружение условно-патогенных микроорганизмов в составе кишечного биотопа обследованных лиц при наличии значительного количества кишечной палочки с измененными ферментативными свойствами вплоть до гемолитической активности поставило задачу поиска ассоциативных связей с наличием активной оппортунистической микрофлоры в смежных биотопах и в кровотоке.

Таблица 4

Микробное обсеменение ротоглотки взрослых с функциональными нарушениями ЖКТ по сравнению с контрольной группой

Микроорганизмы	M±m	
	Взрослые с функциональными нарушениями ЖКТ (n=40)	Контрольная группа (n=20)
КОС	5,3±0,3*	3,6±0,3
<i>S. aureus</i>	5,2±0,5	-
α -гемолитические стрептококки	5,8±0,1*	4,1±0,1
β -гемолитические стрептококки	3,0±0,7	-
<i>Enterococcus spp.</i>	3,5±0,4*	1,5±0,4
<i>Candida spp.</i>	3,8±0,6*	2,9±0,3
<i>E. coli</i>	3,8±0,3	-

Примечание: * – $p < 0,05$

В составе микробиоценоза ротоглотки у лиц с функциональными нарушениями ЖКТ обнаруживались ассоциации стафилококков, стрептококков, представителей кишечного биотопа и дрожжеподобных грибов (Табл. 4). В контрольной группе микробиота была менее разнообразной по микробному составу и достоверно меньшей по микробному числу ассоциантов.

Проведено ПЦР-исследование крови и отделяемого ротоглотки, как биологуса ЖКТ на присутствие ДНК вирусов семейства *Herpesviridae* подгрупп β и γ , отличающихся наиболее выраженным воздействием на иммунокомпетентные клетки и микрофлору, в группе

взрослых с функциональными нарушениями ЖКТ (39) и в контрольной группе (40). Определялась вирусная нагрузка *CMV* – цитомегаловируса, *EBV* – вируса Эпштейна-Барра, *HHV6* – вируса герпеса шестого типа.

На слизистой зева ДНК исследуемых герпетических вирусов отсутствовала в 25% общего числа проб среди взрослых, имеющих проблемы со стороны ЖКТ, и в 80% случаев в контрольной группе. Выделенные вирусы были представлены вирусами Эпштейна-Барра и герпеса шестого типа (Табл. 5). В кровотоке отсутствие исследуемых вирусных ДНК обнаружено у 15,8% лиц с функциональными нарушениями ЖКТ, тогда как в контрольной группе - у 75% обследованных взрослых. По частоте встречаемости преобладала в крови ДНК вируса Эпштейна-Барра – 52,6% проб (Табл. 6). Вирусная нагрузка *EBV* в крови составила $1,6 \pm 0,3$, в ротоглотке – $1,3 \pm 0,6$, количество копий *HHV6* в крови – $1,61 \pm 0,41$, в ротоглотке – $1,5 \pm 0,5$ lg ДНК вируса на 10^5 клеток.

Таблица 5

Количество положительных проб и вирусный пейзаж ротоглотки взрослых с функциональными нарушениями ЖКТ в сравнении с контрольной группой

Микроорганизмы	Взрослые с функциональными нарушениями ЖКТ (n=20)		Взрослые контрольной группы (n=20)		Уровень значимости отвержения H_0 , p (односторонний критерий)
	абс.	%	абс.	%	
ДНК <i>Herpetoviridae</i> (-)	5	25,0	16	80,0	0,05*
<i>CMV</i>	-	-	1	5,0	0,1
<i>EBV</i>	6	30,0	1	5,0	0,21
<i>HHV6</i>	9	45,0	2	10,0	0,003*

Примечание: *- $p < 0,05$

Таблица 6

Количество положительных проб и вирусный пейзаж кровотока взрослых с функциональными нарушениями ЖКТ в сравнении с контрольной группой

Микроорганизмы	Взрослые с функциональными нарушениями ЖКТ (n=20)		Взрослые контрольной группы (n=20)		Уровень значимости отвержения H_0 , p (односторонний критерий)
	абс.	%	абс.	%	
ДНК <i>Herpetoviridae</i> (-)	3	15,78	15	75,0	0,047*
<i>CMV</i>	2	10,52	1	5,0	0,31
<i>EBV</i>	10	52,6	2	10,0	0,003*
<i>HHV6</i>	4	21,05	2	10,0	0,49

Примечание: *- $p < 0,05$

Таким образом, присутствие эшерихий с неизменными ферментативными свойствами в составе ротоглоточного биотопа сопровождалось положительными пробами на наличие ДНК рецидивирующих вирусов – представителей семейства *Herpetoviridae* - *HHV6* и *EBV*. Вирусный пейзаж кровотока при этом характеризовался преимущественно ДНК *EBV*. Число копий колебалось в пределах $1,3-1,6$ lg ДНК вирусов на 10^5 клеток.

В ходе данного исследования обнаружена сильная положительная корреляционная взаимосвязь между микробным числом измененной кишечной палочки в микробиоте кишечника и показателями вирусной нагрузки герпесвирусов в кровотоке ($r=0,86$; $p < 0,01$).

В условиях антропогенного изменения микробиоценозов окружающей среды, нарушения природных экосистем микробиота организма современных людей претерпела значительные изменения за последние несколько десятилетий. Рост заболеваемости населения со стороны органов ЖКТ сопровождается нарушениями функционирования резидентной мик-

рофлоры, изменениями ее метаболической роли, а также активацией условно-патогенных микроорганизмов, включая эндогенные вирусы.

Ассоциации оппортунистических микроорганизмов, определенные в данном исследовании, в составе измененной кишечной палочки, преимущественно в гемолитическом варианте, патогенного стафилококка и эндогенных герпетических вирусов участвуют в формировании функциональных нарушений желудочно-кишечного тракта у взрослых. Современное рассмотрение инфекционного процесса с позиций полиэтиологичности оппортунистических заболеваний дополняется рассмотрением вирусно-бактериальных ассоциаций, в частности, измененной *E. coli*, *S. aureus* и представителей семейства *Herpetoviridae*.

Выводы. Присутствие герпетических вирусов в кровотоке, в частности, вируса Эпштейна-Барра (*EBV*) и вируса герпеса шестого типа (*HHV6*) тесно взаимосвязано с формированием оппортунистических микробных ассоциаций на слизистой ЖКТ с участием измененной кишечной палочки *E. coli*, что подтверждается выявлением генетического материала вирусов семейства *Herpetoviridae* на слизистой поверхности ротоглотки.

Литература:

1. Кунгурцева Е.А., Попкова С.М., Лещенко О.Я. Взаимоформирование микрофлоры слизистых оболочек открытых полостей различных биотопов у женщин как важный фактор их репродуктивного здоровья. Вестник РАМН. 2014. 9-10. 27-31.
2. Daeffler K.N., Galley J.D., Sheth R.U., Ortiz-Velez L.C., Bibb C.O., Shroyer N.F., Britton R.A., Talor J.J. Engineering bacterial thiosulfate and tetrathionate sensors for detecting gut inflammation. *Molecular Systems Biology*. 2017; DOI:10.15252/msb.20167416.
3. Ignýs I., Szachta P., Gałęcka M., Schmidt M., Pazgrat-Patan M.. Methods of analysis of gut microorganism - actual state of knowledge *Ann. Agric. Environ Med*. 2014. 21(4). 799-803.
4. Бухарин О.В., Иванова Е.В., Перунова Н.Б., Чайникова И.Н. Роль бифидобактерий в формировании иммунного гомеостаза человека. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2016. 6. 98-104.
5. Мескина Е.Р. Кишечная микрофлора и кишечные инфекции. Лечение и профилактика. 2012. 3 (4). 57-68.
6. Han B., Sivaramakrishnan P., Lin C.J., Neve J.A.A., He J., Tay L.W.R., Sowa J.N., Sizovs A., Du G., Wang J., Herman C., Wang M.C. Microbial Genetic Composition Tunes Host Longevity. *Cell*. 2017. DOI:10.1016/j.cell.2017.05.
7. Davison J.M., Lickwar C.R., Song L., Breton G., Crawford G.E., Rawis J.F. Microbiota regulate intestinal epithelial gene expression by suppressing the transcription factor hepatocyte nuclear factor 4 alpha. *Genome Research*. 2017. DOI:10.1101/gr.220111.116.
8. Allen R.C., Pfrunder-Cardozo K.R., Meinel D., Eqli A., Hall A.R. Associations among Antibiotic and Phage Resistance Phenotypes in Natural and Clinical *Escherichia coli* Isolates. *MBio*. 2017 Oct 31;8(5). pii: e01341-17. doi: 10.1128/mBio.01341-17.

References:

1. Kungurtseva E.A., Popkova S.M., Leschenko O.Ya. Reciprocal Formation of Mucosal Microflora of Open Cavities of Different Habitats in Women as an Important Factor of Their Reproductive Health. *Vestnik Rossiiskoi Akademii Meditsinskikh Nauk — Annals of the Russian Academy of Medical Sciences*. 2014. 9–10. 27–32. in Russian.
2. Daeffler K.N., Galley J.D., Sheth R.U., Ortiz-Velez L.C., Bibb C.O., Shroyer N.F., Britton R.A., Talor J.J. Engineering bacterial thiosulfate and tetrathionate sensors for detecting gut inflammation. *Molecular Systems Biology*. 2017; DOI:10.15252/msb.20167416.
3. Ignýs I., Szachta P., Gałęcka M., Schmidt M., Pazgrat-Patan M.. Methods of analysis of gut microorganism - actual state of knowledge *Ann. Agric. Environ Med*. 2014. 21(4). 799-803.
4. Bukharin O.V., Ivanova E.V., Perunova N.B., Chaynikova I.N. The role of bifidobacterium in the formation of immune homeostasis. *J. of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*. 2016. 6. 98-104.

5. Meskina E.R. Intestinal microflora and intestinal infections. Treatment and prevention. 2012. 3 (4). 57-68.
6. Han B., Sivaramakrishnan P., Lin C.J., Neve J.A.A., He J., Tay L.W.R., Sowa J.N., Sizovs A., Du G., Wang J., Herman C., Wang M.C. Microbial Genetic Composition Tunes Host Longevity. *Cell*. 2017. DOI:10.1016/j.cell.2017.05.
7. Davison J.M., Lickwar C.R., Song L., Breton G., Crawford G.E., Rawis J.F. Microbiota regulate intestinal epithelial gene expression by suppressing the transcription factor hepatocyte nuclear factor 4 alpha. *Genome Research*. 2017. DOI:10.1101/gr.220111.116.
8. Allen R.C., Pfrunder-Cardozo K.R., Meinel D., Eqli A., Hall A.R. Associations among Antibiotic and Phage Resistance Phenotypes in Natural and Clinical *Escherichia coli* Isolates. *MBio*. 2017 Oct 31;8(5). pii: e01341-17. doi: 10.1128/mBio.01341-17.