

ЧАСТОТА ВИЯВЛЕННЯ ТА БІОЛОГІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ СТАФІЛОКОКІВ, ВИДІЛЕНИХ ПРИ ДИСБІОЗІ КИШКІВНИКА

Дніпропетровський національний університет ім. Олесь Гончара

(Україна, м. Дніпропетровськ)

voronkova_olga@inbox.ru

Роботу було виконано у межах держбюджетної теми № 1-262-12 «Теоретичні та практичні основи життєдіяльності мікробіоценозів, форм взаємовідносин з тваринами і рослинами», що виконується на кафедрі мікробіології, вірусології та біотехнології Дніпропетровського національного університету ім. Олесь Гончара, № державної реєстрації 0112U00192.

Вступ. Нормальна мікрофлора визначається як сукупність мікробіоценозів організму, що займають такі екологічні ніші як шкіра та слизові оболонки [7]. Нормальна мікрофлора забезпечує колонізаційну резистентність слизових оболонок, здійснюючи реалізацію механізмів підтримання сталості якісного та кількісного складу мікроорганізмів, що попереджує заселення і надмірний розвиток умовно-патогенних мікроорганізмів. Мікробіоценоз не є сталою системою: зміни відбуваються постійно і пов'язані із впливом зовнішнього середовища та внутрішніми факторами. Мікробіоценоз кишківника входить до компонентів мікробіоти макроорганізму та є одним з факторів його природного захисту [2, 16]. В нормі мікрофлора шлунково-кишкового тракту (ШКТ) є багатокомпонентною, і домінування однієї групи мікроорганізмів (представленої переважно умовно-патогенними бактеріями), при зниженні кількості біфідобактерій та нормальної кишкової палички або навіть їх зникненні, можна розцінювати як дисбактеріоз, що є патологічним станом [7, 9]. Порушення складу мікрофлори кишківника можуть мати важкі наслідки, обумовлюючи розлад травної системи та пов'язаних з нею інших систем [1, 3]. Отже, питання корекції порушень мікрофлори ШКТ стає одним з важливих, бо, крім того, є дані про можливість обміну мікроорганізмами між різними біотопами, найчастіше про обмін з репродуктивним трактом [4, 9]. Але питання корекції потребує обов'язкового дослідження складу мікроорганізмів з метою виявлення домінуючих груп, що необхідно для вибору найбільш адекватної стратегії лікування.

Відомо, що одними з найбільш розповсюджених умовно-патогенних мікроорганізмів, що викликають ураження різних систем організму людини, є стафілококи. Останні набули значення переважно через

набуття множинної стійкості до антибіотичних препаратів та високої колонізаційної активності по відношенню до слизових [13, 14], у тому числі і за рахунок утворення біоплівки [11, 12]. У складі останньої бактерії набувають посилення виживаності при дії несприятливих факторів довкілля, у тому числі стають стійкими до дії антибіотиків у звичайних терапевтичних дозах [8, 10], що призводить до утрудень лікування, викликаних ними уражень.

У зв'язку з цим, **метою роботи** було встановити частоту виявлення стафілококів при дисбіозі ШКТ у жінок репродуктивного віку та дослідити їх біологічні властивості.

Об'єкт і методи дослідження. Об'єктом дослідження була частота виявлення стафілококів при дисбіозі ШКТ та прояв у них факторів патогенності і здатності до утворення біоплівки у лабораторних умовах.

Дослідження проводили на базі лабораторії мікробіології та імунології ДУ «НДІ Гастроентерології НАМН України» м. Дніпропетровськ.

Досліджувані штами бактерій були виділені з матеріалу (фекалії) при підозрі на дисбіоз. Всього було досліджено 29 зразків матеріалу, взятих від жінок репродуктивного віку. Стан дисбіозу визначали за результатами бактеріологічного дослідження [5]. Виділення, ідентифікацію та дослідження біологічних властивостей бактерій проводили згідно з наказом «Об унификации микробиологических (бактериологических) методов исследования» [6].

Для оцінки активності формування біоплівок штамами золотистого стафілококу використовували модифіковану методу G. O'Toole et al. [15]. Дослідження проводили на поверхні 96-луночкових плоскодонних полістиролових планшетів для імуноферментного аналізу. Активність формування біоплівки оцінювали за рівнем адсорбції барвника етанолом, виміряного в одиницях оптичної густини (OD_{620}) на фотометрі SUNRISE (Tecan, Австрія) при довжині хвилі 620 нм.

Результати досліджень та їх обговорення. При дослідженні 29 зразків біологічного матеріалу було виділено 242 ізоляти мікроорганізмів, що належали до представників нормофлори та

Таблиця

Частота виявлення мікроорганізмів з порушенням показника норми, абс. / %

Мікроорганізми	Норма	Кількість випадків порушення норми
<i>Bifidobacterium</i> spp.	$\geq 10^7$	22/75,9
<i>Lactobacillus</i> spp.	$\geq 10^6$	14/48,3
Лактозопозитивні <i>E. coli</i>	$\geq 10^7$	11/37,9
<i>Staphylococcus</i> spp.	$\leq 10^4$	24/82,8
<i>Streptococcus</i> spp.	$\leq 10^4$	9/31,0
<i>Enterococcus</i> spp.	$\leq 10^5$	6/20,7
Лактозонегативні <i>E. coli</i>	$\leq 10^4$	6/20,7
<i>Pseudomonas</i> spp.	$\leq 10^4$	5/17,2
<i>Proteus</i> spp.	$\leq 10^5$	5/17,2
<i>Candida</i> spp.	$\leq 10^4$	13/44,8

Примітка: для інших 127 ізолятів мікроорганізмів не було зафіксовано перевищення показнику норми або значення менше за цей показник.

умовно-патогенних мікроорганізмів, виявлення яких свідчить про дисбіоз кишківника (табл.).

Відповідно до класифікації дисбіотичних порушень за Куваєвою-Ладодо [5] для 28 (96,6%) було підтверджено невідповідність складу мікрофлори норми (рис. 1). Найбільш часто фазу дисбіотичних порушень визначали як III (фаза агресії аеробної мікрофлори) – 45% випадків, коли відмічали виявлення 2-3 представників умовно-патогенних мікроорганізмів у кількостях, що перевищують норму. З меншою частотою визначали II (пускову) фазу – 28%, що виражалось як зниження кількості біфідо- та лактобактерій на тлі виявлення умовно-патогенних мікроорганізмів. Склад бактерій у 21% зразків відповідав I (латентній) фазі дисбіотичних порушень, коли було визначено зниження кількості сапрофітних бактерій і було виявлено нижні порогові кількісні значення для одного з умовно-патогенних мікроорганізмів. У єдиному випадку (3%) дисбіоз було віднесено до IV фази.

У 1 випадку підозру на дисбіоз не було підтверджено бактеріологічно: кількість біфідобактерій, лактобацил та лактозопозитивної кишкової палички відповідала нормі, а кількість умовно-патогенних мікроорганізмів не перевищувала порогових значень.

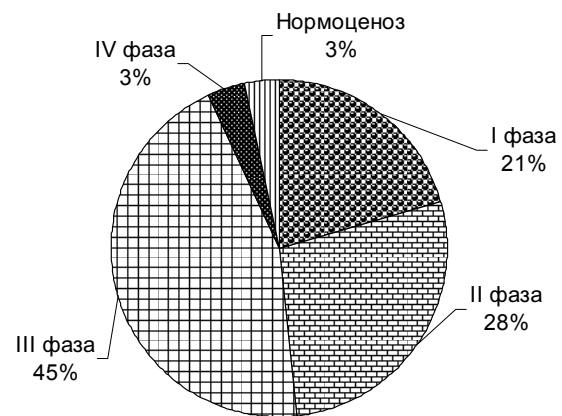


Рис. 1. Частота виявлення рідних фази дисбіотичних розладів.

Найбільш часто виявлюваними умовно-патогенними мікроорганізмами у дослідженні виявилися стафілококи, які були присутні у 82,8% зразків у кількостях, що перевищували норму, що погоджується з відомими даними [3]. У кількостях відповідних стану норми стафілококи було виявлено ще у 2 зразках (6,9%). Для 26 виділених ізолятів стафілококів було здійснено ідентифікацію до виду та досліджено біологічні властивості. Встановлено, що абсолютна більшість ізолятів стафілококів – 22 (84,6%) була здатна продукувати плазмокоагулазу і належала до виду *S. aureus*, інші 4 (15,4%) ізоляти, що не продукували коагулазу, було віднесено до виду *S. saprophyticus*.

Дослідження прояву факторів патогенності дозволило встановити (рис. 2), що переважно штами золотистого стафілокока мали активний прояв факторів патогенності, а штами сапрофітного були менш активні. Так, здатним до продукції гемолізинів

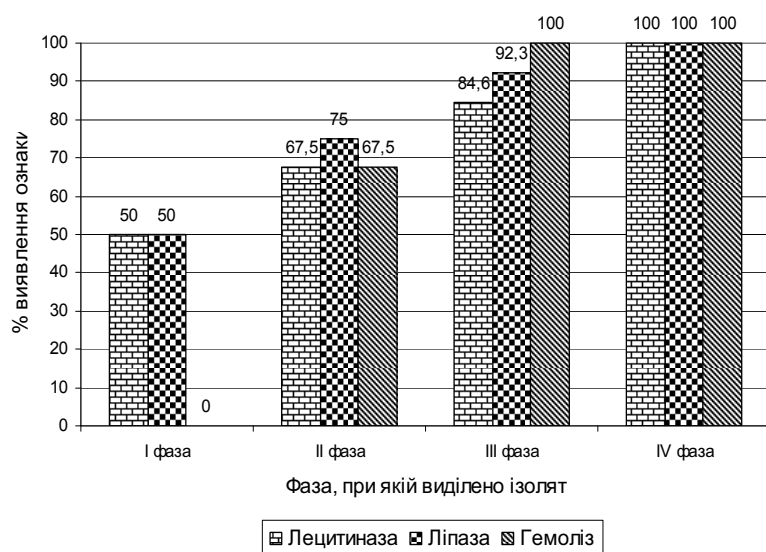


Рис. 2. Частота прояву ознак патогенності ізолятами стафілококів.

виявився лише 1 ізолят з 4 досліджених. Всі 4 ізоляти сапрофітного стафілокока було виявлено при I фазі дисбіотичних порушень і з них тільки 2 з відповідністю кількості нижньому граничному значенню дисбіозу. Ізоляти золотистого стафілокока у більшості випадків мали прояв всіх досліджених факторів, причому слід відмітити, що активність прояву ураховувалася при встановленні фази дисбіотичних порушень.

Дослідження здатності виділених ізолятів стафілококів до утворення біоплівки дозволило виявити її візуальне формування у лабораторних умовах для 16 (61,5%) ізолятів. Аналіз результатів дослідження оптичної густини вимитого барвника відповідно до критеріїв Stepanovic S. et al. [17] показав, що більшість ізолятів – 68,8% належали до таких, що мають високу здатність до утворення біоплівки, 25% – мали середню здатність і 6,25% мали низьку здатність до утворення плівки. Для 10 ізолятів з усіх досліджених такої здатності виявлено не було. Жоден з ізолятів сапрофітного стафілокока не проявив здатності до утворення біоплівки.

Формування біоплівки значно підвищує колонізаційний потенціал бактерій, що може мати вирішальне значення для розвитку дисбіозу, адже мікроорганізми мають закріпитися у пристінковій зоні, для чого потрібно адгезуватися на епітелії, а більш виражена адгезивна активність характерна, як правило, саме для плівкоутворюючих штамів [11, 13]. Тобто здатність до утворення біоплівки у лабораторних умовах може стати одним з потенційних маркерів вірогідності розвитку дисбіотичних порушень.

Висновки.

1. При бактеріологічному дослідженні 29 зразків матеріалу (фекалії), взятого від жінок репродуктив-

ного віку, відповідність стану дисбіозу підтверджено для 28 (96,6%).

2. Фази дисбіотичних порушень визначено як I – 21%, II – 28%, III – 45% і IV – 3%. Нормобіоз визначено у 3% зразків.

3. У понад 75% випадків визначено зниження кількості сапрофітних бактерій до рівня менше норми. З умовно-патогенних мікроорганізмів при дисбіозі найбільш часто виявляли стафілококи – 82,8%, з яких 22 (84,6%) належали до виду *S. aureus* і 4 (15,4%) – до виду *S. saprophyticus*. Понад 67,5% ізолятів мали активний прояв факторів патогенності.

4. Здатністю до утворення біоплівки у лабораторних умовах володіли 16 (61,5%) ізолятів стафілококів. З них 68,8% належали до таких, що мають високу здатність до утворення біоплівки, 25% – мали середню здатність і 6,25% мали низьку здатність до утворення плівки.

Перспективи подальших досліджень. З огляду на думку про те, що лише бактеріологічного дослідження при підозрі на дисбіоз може бути недостатньо слід здійснювати пошук додаткових маркерів, у тому числі і серед біологічних властивостей мікроорганізмів, що можуть бути пов'язані із підвищеним ризиком виникнення дисбіозу. Насамперед мова йде про вивчення адгезивних властивостей та здатності до біоплівкоутворення, що можуть обумовлювати посилення патогенетичних властивостей бактерій.

**Автори висловлюють подяку
завідувачу лабораторії мікробіології
та імунології
ДУ «НДІ Гастроентерології НАМН України»
(м. Дніпропетровськ)
кандидату біологічних наук,
доценту В. Є. Кудрявцевій**

Література

1. Ардатская М. Д. Дисбактериоз кишечника: современные аспекты изучения проблемы, принципы диагностики и лечения / М. Д. Ардатская, А. В. Дубинин, А. Н. Минушкин // Терапевтический архив. – 2001. – № 2. – С. 67-72.
2. Білько І. П. Нормальна мікрофлора травного тракту людини / І. П. Білько // Сімейна медицина. – 2005. – № 2. – С. 70-72.
3. Дисбактериозы желудочно-кишечного тракта / В. М. Бондаренко, Б. В. Боев, Е. А. Лыкова [и др.] // Росс. журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. – 1999. – № 1. – С. 66-70.
4. Микробиологические аспекты репродуктивного здоровья женщины и современные подходы к его поддержанию / Б. М. Венцовский, В. А. Товстановская, Д. С. Янковский [и др.] // Здоровье женщины. – 2002. – № 3. – С. 86-91.
5. Незгода І. І. Дисбактеріоз кишківника у дітей: проблемні питання, сучасні методи діагностики / І. І. Незгода, О. М. Науменко // Клінічна імунологія. Алергологія. Інфектологія. – 2011. – № 5. – С. 29-32.
6. Об унификации микробиологических (бактериологических) методов исследования, применяемых в клинико-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений : приказ № 535. – [чинний від 22.04.1985р.]. – М. : МОЗ СССР, 1985. – 65 с.
7. Сидорова И. С. Микробиоценоз половых путей женщин репродуктивного возраста / И. С. Сидорова, А. А. Воробьёв, Е. И. Боровкова // Акушерство и гинекология. – 2005. – № 2. – С. 7-9.
8. Тец В. В. Эффективность действия антибиотиков на бактерии в биопленках / В. В. Тец, Н. В. Заславская // ЖМЭИ. – 2005. – № 5. – С. 24-26.
9. Янковский Д. С. Микробная экология человека : современные возможности её поддержания и восстановления / Д. С. Янковский. – К. : Эксперт ЛТД, 2005. – 362 с.
10. Antibioticresistance of bacterial biofilms / N. Hsiby, T. Bjarnsholt, M. Givskov [et al.] // Int. J. of Antimic. Agents. – 2010. – Vol. 35 (4). – P. 322-332.
11. Costerton J. W. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections / J. W. Costerton, P. S. Stewart, E. P. Greenberg // Science. – 1999. – Vol. 284. – P. 1318-1322.

12. Donlan R. M. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms / R. M. Donlan, J. W. Costerton // Clin. Microbiol. Rev. – 2002. – Vol. 15. – P. 167-193.
13. Gotz F. Staphylococcus and biofilms / F. Gotz // Mol. Microb. – 2002. – Vol. 43 (6). – P. 1367-1378.
14. Hall S. L. Bacterial biofilms : from the natural environment to infectious diseases / S. L. Hall, J. W. Costerton, P. Stoodley // Nat. Rev. Microb. – 2004. – Vol. 2, №2. – P. 95-108.
15. O'Toole G. A. Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, con-vergent signalling pathways: a genetic analysis / G. A. O'Toole, R. Kolter // Mol. Microbiol. – 1998. – Vol. 28 (3). – P. 449-461.
16. Shi H. N. Bacterial colonization and the development of intestinal defences / H. N. Shi, A. Walker // Can. J. Gastroenterol. – 2004. – Vol. 18 (8). – P. 493-500.
17. Stepanovic S. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation / S. Stepanovic, D. Vukovic, I. Dakic [et al.] // J. Microbiol. Methods. – 2000. – Vol. 40. – P. 175-179.

УДК 579. 864:616. 1

ЧАСТОТА ВИЯВЛЕННЯ ТА БІОЛОГІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ СТАФІЛОКОКІВ, ВИДІЛЕНИХ ПРИ ДИСБІОЗІ КИШКІВНИКА

Сумська М. С., Воронкова О. С., Вінников А. І.

Резюме. Порушення складу мікрофлори шлунково-кишкового тракту, обумовлені надмірним розмноженням умовно-патогенних мікроорганізмів, можуть стати причиною погіршення загального стану здоров'я людини, що вказує на необхідність дослідження їх чинників. Метою роботи було встановити частоту виявлення стафілококів при дисбіозі ШКТ у жінок репродуктивного віку та дослідити їх біологічні властивості. У результаті дослідження встановлено, що у 28 (96,6%) випадків мав місце дисбіоз. За відповідністю бактеріологічним критеріям фази дисбіотичних порушень визначені як: I – 21%, II – 28%, III – 45% і IV – 3% випадків. У понад 75% випадків визначено зниження кількості сапрофітних бактерій до рівня менше норми. З умовно-патогенних мікроорганізмів при дисбіозі найбільш часто виявляли стафілококи – 82,8%. Понад 67,5% ізолятів продукували ліпазу, лецитіназу та гемолізини. Здатністю до утворення біоплівки у лабораторних умовах володіли 16 (61,5%) ізолятів стафілококів.

Ключові слова: стафілокок, фактори патогенності, біоплівка, дисбіоз.

УДК 579. 864:616. 1

ЧАСТОТА ВЫЯВЛЕНИЯ И БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА СТАФИЛОКОККОВ, ВЫДЕЛЕННЫХ ПРИ ДИСБИОЗЕ КИШЕЧНИКА

Сумская М. С., Воронкова О. С., Винников А. И.

Резюме. Нарушения состава микрофлоры желудочно-кишечного тракта, обусловленные чрезмерным размножением условно-патогенных микроорганизмов, могут стать причиной ухудшения общего состояния здоровья человека, что указывает на необходимость изучения их причин. Целью работы было определить частоту выявления стафилококков при дисбиозе ЖКТ у женщин репродуктивного возраста и изучить их биологические свойства. В результате исследования установлено, что дисбиоз имел место в 28 (96,6%) случаев. На основании соответствия бактериологическим критериям фазы дисбиотических нарушений определены как: I – 21%, II – 28%, III – 45% и IV – 3% случаев. В более чем 75% случаев определено снижение количества сапрофитных бактерий до уровня ниже нормы. Из условно-патогенных микроорганизмов при дисбиозе наиболее часто выявляли стафилококки – 82,8%. Более 67,5% изолятов продуцировали липазу, лецитиназу и гемолизины. Способностью к образованию биопленки в лабораторных условиях обладали 16 (61,5%) изолятов стафилококков.

Ключевые слова: стафилококк, факторы патогенности, биопленка, дисбиоз.

UDC 579. 864:616. 1

Frequency of Isolation and Biological Properties of Staphylococci, Isolated under Intestinal Dysbiosis **Sumska M. S., Voronkova O. S., Vinnikov A. I.**

Abstract. Normal microflora is defined as a set microbiocenosis body, occupying ecological niches such as skin and mucous membranes. Normal microflora provides colonization resistance of the mucous membranes, making implementation mechanisms maintaining sustainability qualitative and quantitative composition of microorganisms, that prevents excessive settlement and development of opportunistic microorganisms. Violation of the composition of the microflora of the gastrointestinal tract caused by excessive multiplication of opportunistic pathogens can cause deterioration of the general state of health, indicating a need for studies of causative factors, one of them is opportunistic bacteria. It's known, that one of the most common opportunistic microorganisms that cause lesions of various systems of the human body is staphylococci, which have some biological properties as factors of pathogenicity, resistance to antibiotics, filmformation ability. The aim of research was to determine the frequency of detection of staphylococci under gastrointestinal dysbiosis in women of reproductive age and investigate their biological properties. In research standard bacteriological methods of isolation and identification of bacteria were used. For study of filmforming ability used microtiter plate test with definition of optical density. Under bacteriological analysis of 29 samples of the material (feces) 242 strains of microorganisms were isolated. In result compliance state of

dysbiosis confirmed for 28 (96.6%) persons. Phases of dysbiotic violations defined as the first (latent) – 21%, the second (starting) – 28%, the third (aggression of aerobic microflora) – 45% and fourth (associative dysbiosis) – 3%. Normobiosis defined in 3% of causes. More than 75% of the identified isolates of saprophytic bacteria had an decrease of number less than normal. For 115 (47.5%) of isolates took place an increasing of number more than values of normocenosis. From the opportunistic microorganisms under dysbiosis most often found staphylococci – 82.8%, of which 22 (84.6%) belonged to the species *S. aureus* and 4 (15.4%) – to *S. saprophyticus*. More than 67.5% of staphylococci isolates were active expression of pathogenicity factors, such as lecitinase, lipase, haemolysins. The ability to form biofilms in vitro had 16 (61.5%) isolates of staphylococci. Of these, 68.8% belonged to those that have a high capacity to form biofilms, 25% – have high resolution and 6.25% had low ability to form a film. Isolates of *S. saprophyticus* were non-filmforming. Besides of staphylococci with increasing of normal values were isolated also representatives of next bacteria: *Streptococcus spp.* – 9 (31.0%), *Enterococcus spp.* – 6 (20.7%), lactosenegative *E. coli* – 6 (20.7%), *Pseudomonas spp.* – 5 (17.2%), *Proteus spp.* – 5 (17.2%); with decreasing of normal values – *Bifidobacterium spp.* – 22 (75.9%), *Lactobacillus spp.* – 14 (48.3%) and lactosepositive *E. coli* – 11 (37.9%). The fungi of genus *Candida* were isolated from 13 (44.8%) of samles.

In view of the opinion, that only bacteriological studies is not enough to confirmed dysbiosis, there is a need in search additional markers, including biological properties of bacteria that may associate with high risk of dysbiosis, for example, factors of adherence and ability to biofilmformation.

Keywords: *staphylococci*, factors of pathogenicity, biofilm, dysbiosis.

Рецензент – проф. Скрипник І. М.

Стаття надійшла 27. 02. 2015 р.