

# Диагностическая микробиология и вирусология



“У тучных и худых людей разная микрофлора”

Смеянов Владимир Владиславович, кмн

[vvsmeianov@gmail.com](mailto:vvsmeianov@gmail.com)

# Лекция 2. Микроэкология тела человека. Дисбактериоз и методы исследования.

- 1. Определения. Симбиоз и его виды.**
- 2. Нормальная микрофлора (микробиота) различных отделов тела человека.**
  - а. Качественный и количественный состав микробиоты различных отделов тела человека.
  - б. Формирование нормальной микробиоты.
- 3. Роль микробиоты в поддержании здоровья и в патологии.**
- 4. Нарушения микроэкологии.**
  - а. Дисбактериоз и стадии дисбактериоза.
  - б. Бактериологический метод диагностики дисбактериоза.
  - в. Препараты, используемые для коррекции микробиоты.

# Нормальная микрофлора (микробиота) человека

- **Микробиота** – это совокупность микроорганизмов, населяющих тело человека
- **Индигенная** или резидентная или аутохтонная или облигатная микробиота – это микроорганизмы, постоянно присутствующие в определенном отделе макроорганизма
- **Транзиторная** или аллохтонная микробиота – посторонние микроорганизмы, не способные к постоянному присутствию в макроорганизме
- Индигенная микробиота - **эволюционно образовавшаяся система** , симбиотически связанная с макроорганизмом, часто выполняет **защитную** и другие полезные для него функции, а также сама получает устойчивые условия для существования
- **Общее количество** микробных клеток в организме человека превышает количество собственных клеток в 10 раз:  $10^{14}$  и  $10^{13}$
- **Масса:** от 300 до 1500 гр

# Симбиоз: паразитизм, комменсализм, мутуализм

**Симбиоз** (др. греч. «жизнь вместе») – близкое и часто длительное сосуществование различных биологических видов

- **Мутуализм** (англ. *mutual* – взаимный) – вид симбиоза, при котором различные виды получают преимущества
- **Комменсализм** (лат. – «за одним столом») – вид симбиоза, при котором один из участников получает выгоду без ущерба для других
- **Паразитизм** (др. греч – «нахлебник») – вид симбиоза, при котором один из участников получает выгоду за счет другого
- Индигенные микроорганизмы **в нормальных условиях** чаще всего являются строго мутуалистическими или комменсалами



# Нормальная микробиота тела человека.

## Duodenum and Jejunum:

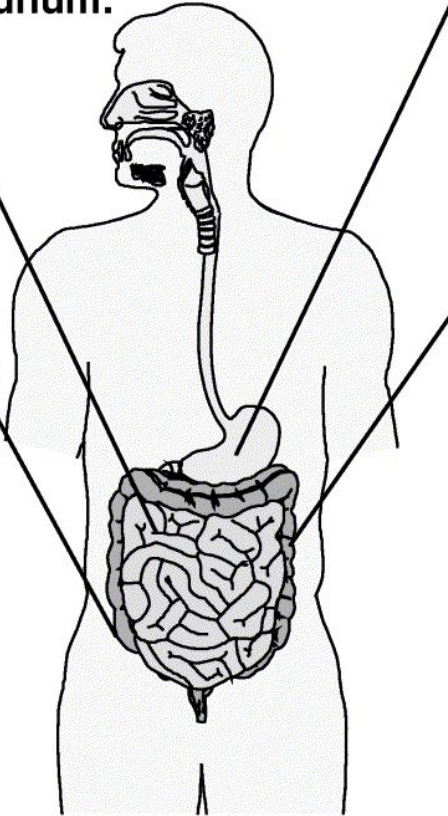
$10^2-10^5$  cfu ml<sup>-1</sup>

*Lactobacillus*  
*Streptococcus*  
*Bifidobacterium*  
*Enterobacteriaceae*  
*Staphylococcus*  
Yeast

## Ileum and Caecum:

$10^3-10^9$  cfu ml<sup>-1</sup>

*Bifidobacterium*  
*Bacteroides*  
*Lactobacillus*  
*Streptococcus*  
*Enterobacteriaceae*  
*Staphylococcus*  
*Clostridium*  
Yeast



## Stomach:

$10^0-10^3$  cfu ml<sup>-1</sup>

*Lactobacillus*  
*Streptococcus*  
*Staphylococcus*  
*Enterobacteriaceae*  
Yeast

## Colon:

$10^{10}-10^{12}$  cfu g<sup>-1</sup>

*Bacteroides*  
*Eubacterium*  
*Clostridium*  
*Peptostreptococcus*  
*Streptococcus*  
*Bifidobacterium*  
*Fusobacterium*  
*Lactobacillus*  
*Enterobacteriaceae*  
*Staphylococcus*  
Yeast

- **Основная популяция** – в ЖКТ, а именно в толстом кишечнике, более 500 видов
- **Кожа:**  $10^4 - 10^6$  на см<sup>2</sup> (Стафилококки коагулазнегативные *S. epidermidis*, коринебактерии, стрептококки)
- **Конъюктива:** коринебактерии, стафилококки
- **Верхние дыхательные пути:** стрептококки, бактериоиды, нейссерии
- **Влагалище:** лактобациллы, бактериоиды, бифидобактерии, гарднереллы (30-60%), микоплазмы (30%)

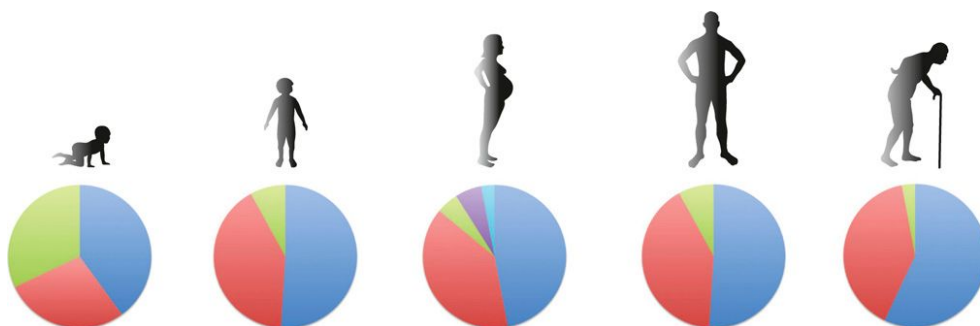
# Микробиота толстого кишечника: доминирование анаэробов

Состав микробиоты кишечника у людей (КОЕ/г)  
на основании культуральных методов исследования

Микроорганизм	Дети (<1 г.)	Взрослые	Престарелые
<i>Bifidobacterium</i>	$10^{10}-10^{11}$	$10^9-10^{10}$	$10^9-10^{10}$
<i>Lactobacillus</i>	$10^6-10^7$	$10^7-10^8$	$10^6-10^7$
<i>Bacteroides</i>	$10^7-10^9$	$10^9-10^{10}$	$10^{10}-10^{11}$
<i>Fusobacterium</i>	$<10^6$	$10^8-10^9$	$10^8-10^9$
<i>Veillonella</i>	$<10^5$	$10^5-10^6$	$10^5-10^6$
<i>Eubacterium</i>	$10^6-10^7$	$10^9-10^{10}$	$10^9-10^{10}$
<i>Peptostreptococcus</i>	$<10^5$	$10^9-10^{10}$	$10^{10}$
<i>Clostridium</i>	$<10^7$	$10^7-10^8$	$10^8-10^9$
<i>Enterobacteria</i>			
<i>E. coli</i>	$10^7-10^8$	$10^7-10^8$	$10^7-10^8$
<i>Enterococcus</i>	$10^6-10^7$	$10^7-10^8$	$10^6-10^7$
<i>Staphylococcus</i>			
<i>S. epidermidis</i>	$<10^5$	$<10^4$	$<10^3$
<i>S. aureus</i>	$<10^1$	$<10^2$	$<10^2$
<i>Bacillus</i>	$<10^3$	$<10^5$	$<10^5$
<i>Candida</i>	$<10^3$	$<10^4$	$<10^4$

Строгие  
Анаэробы

Факультативные анаэробы  
(«аэробы»)

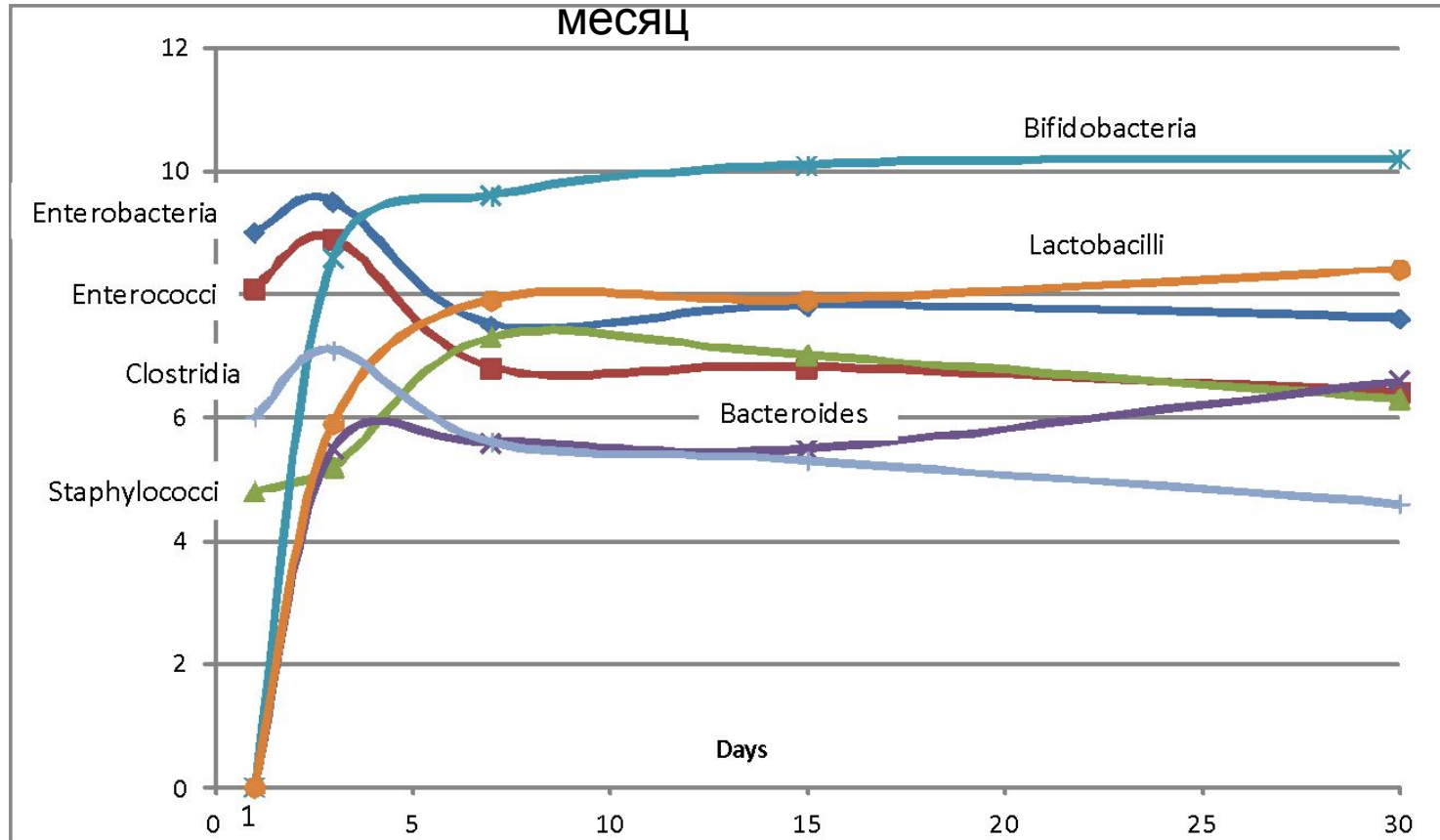


Возрастные изменения

- Бактероиды
- Фирмикуты (лактобакт., стаф, стрепт.)
- Актинобактерии (бифидо, коринебактерии)
- Протеобактерии (энтеробактерии)
- Другие

# Формирование микробиоты кишечника

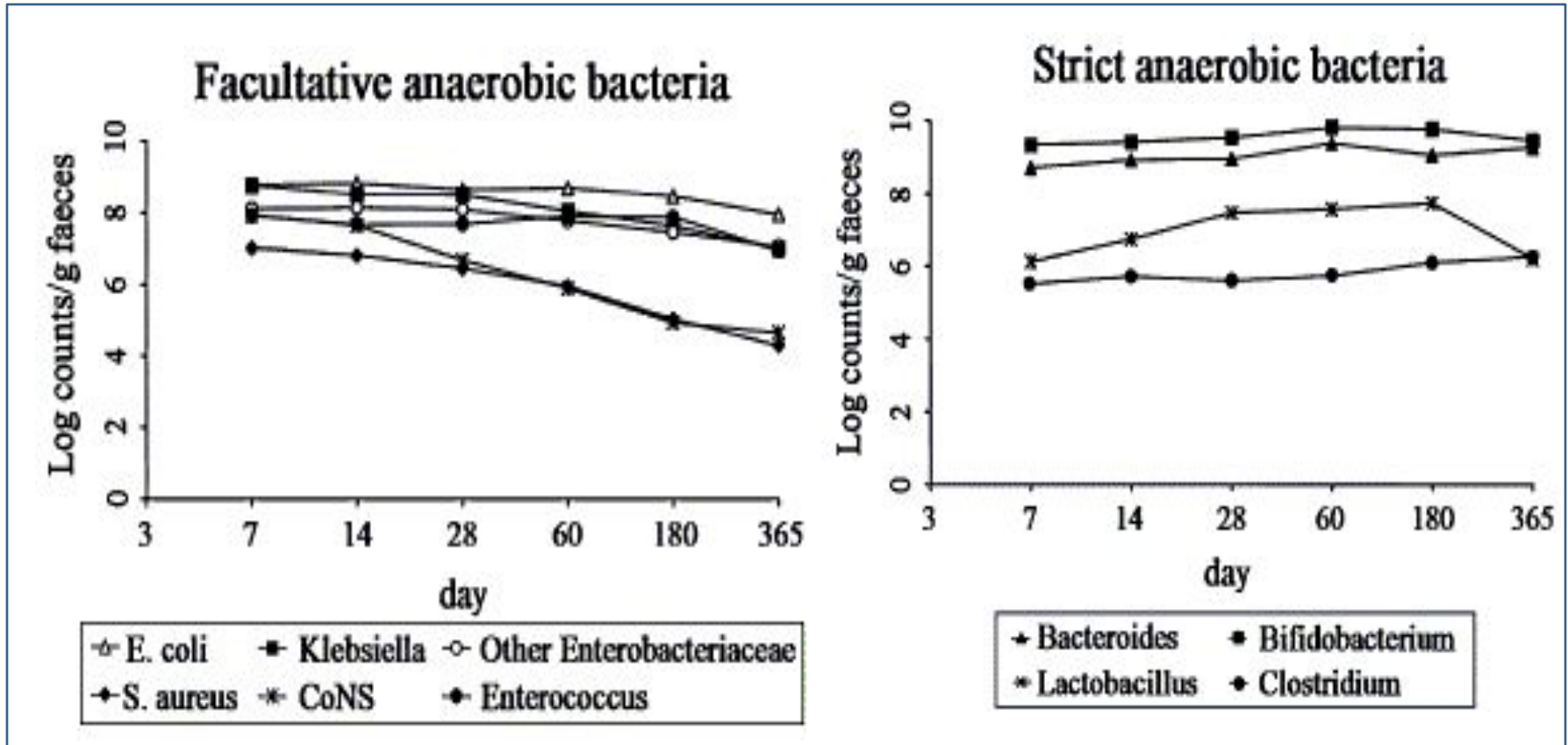
## Человека Первый



- Первыми появляются энтеробактерии и фирмикуты (staphylococci, streptococci and clostridia)
- Бифидобактерии доминируют к 7 дню
- Бактероиды начнут повышение к концу неонатального периода (28 дн)

# Формирование микробиоты кишечника человека

## Первый год



- Бифидобактерии продолжают доминировать ( $10^8 - 10^{10}$  КОЕ/г фекалий)
- Факультативные анаэробы снижаются
- Бактероиды начинают доминировать вместе с бифидобактериями



# Микробиота новорожденных: доминирование бифидобактерий (молекулярный метод)

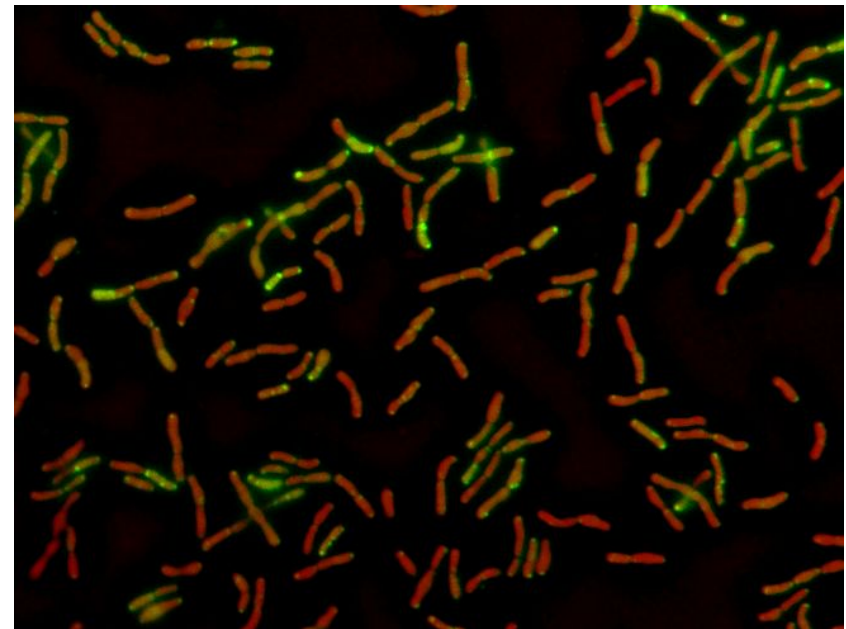
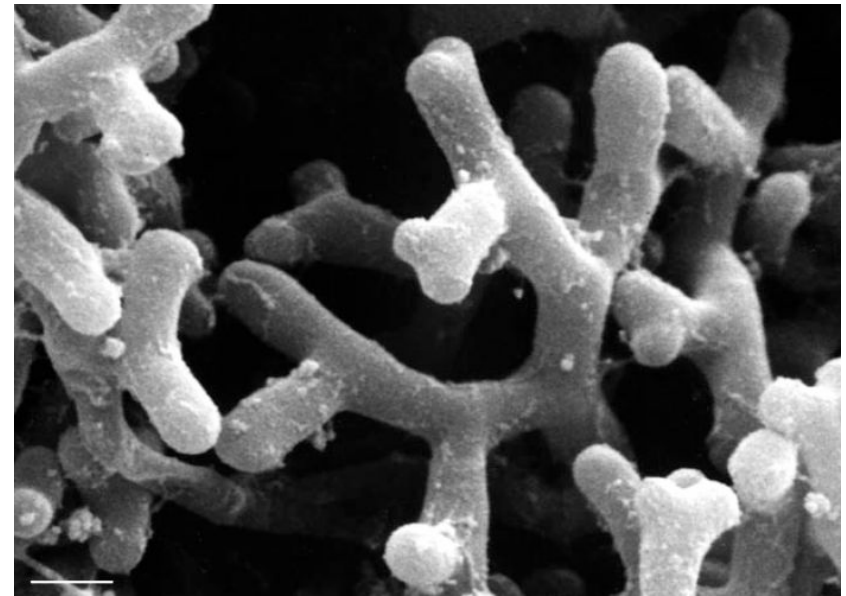


Turroni *et al.*, Plos One, 2012:

- Бифидобактерии преобладают у 1,5-3 мес. новорожденных
- Способ получения ДНК и праймеры влияют на результаты
- Низкое кол-во Bacteroides

# Бифидобактерии

- Открыты в 1899 г. Генри Тиссье, Инст. Пастера, Франция ("*Bacillus bifidus*") как преобладающий микроорганизм в стуле детей на грудном вскармливании
- Грам-положительные полиморфные палочки, часто иррегулярно окрашенные, могут показывать различные типы разветвления и бифуркаций
- Не образуют спор, неподвижные, анаэробные, в большинстве – каталаз-негативные
- G+C содержимое ДНК 55-67%, размеры генома 2,0-2,8 Mbp
- Класс *Actinobacteria*, Порядок *Bifidobacteriales*, Семейство *Bifidobacteriaceae*, Род *Bifidobacterium* (также включает Род *Gardnerella*)
- «Человеческие» виды: *B. longum*, *B. bifidum*, *B. breve*, *B. infantis*, *B. adolescentis*, *B. catenulatum*, *B. pseudocatenulatum*, *B. angulatum*, *B. dentium*



# Роль

## 1. Защита

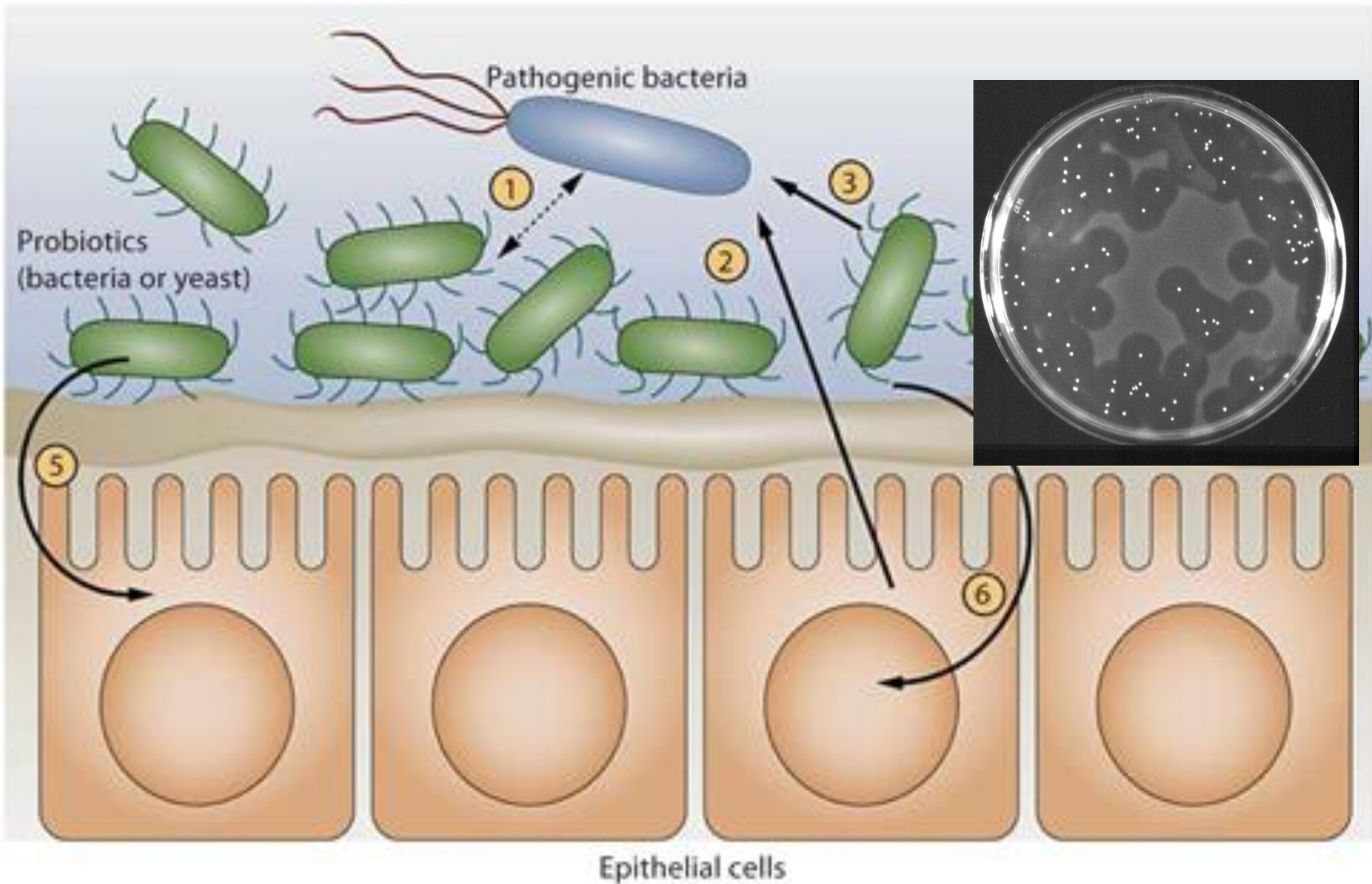
- П
- С
- С

Применение  
пробиотиков  
применение  
ципрофлоксацина  
вызывает

## 2. Регуляция

- у
- то
- ан

подавления Th2 и Th17 клеток, а также  
индукции Treg (регуляторных) клеток



### **3. Участие в пищеварении и энергетическом метаболизме:**

- расщепление полисахаридов, особенно сложных растительных
- продукция карбоновых кислот (бутират, ацетат – одни из важнейших источников энергии для организма, а также регуляторы пролиферации энтероцитов)
- участие в метаболизме желчных кислот
- регуляция энергетического метаболизма (возможно, через кишечные эндокринные клетки)

### **4. Выработка витаминов: например vitK и B7)**

### **5. Переработка ксенобиотиков:**

например – лекарственных препаратов: дигоксин – важный сердечный гликозид, у некоторых людей присутствует бактерия *Egghertella lenta*, которая его инактивирует)

# Роль микробиоты в патологии

## 1. Резервуар для условно-патогенных микроорганизмов («патобионтов»):

- **анаэробные инфекции:** *Bacteroides fragilis* (хирургия), *Clostridium difficile* (псевдомембранозный колит)
- **энтеробактерии:** *E. coli*, *Klebsiella*, *Proteus* (кишечные и уро-нефрологические инфекции)
- **грибковые:** *Candida* (мочеполовой тракт)
- **другие:** *Gardnerella*, *Enterococci*, *Staphylococci*, *Fusobacteria*

## 2. Дисрегуляция иммунной системы:

- **Аллергии:** снижение нормально доминантной флоры+снижение разнообразия (бифидобактерии) + повышение стафилококков, энтеробактерий
- **Аутоиммунные заболевания:** напр. Диабет I
- повышение определенных видов бактериоидов (?), снижение бифидобактерий (?); бактерия-универсальный индуктор Th17 –звена (?)
- **Астма**
- **Аутизм (?)**
- - **Снижение резистентности к** бактериальным и вирусным заболеваниям : микробиота необходима для оптимальной вирулентности некоторых вирусов (полиовирус) и вертикальной (от родителей) передачи других (ретровирусы)

# Роль микробиоты в патологии

## 3. Дисрегуляция метаболизма:

- **Ожирение** – увеличение эффективности переработки пищи микробиотой. хронический воспалительный статус! За счет увеличения кол-ва бактериоидов (?), лактобацилл (?), снижения/исчезновения других бактерий (?), влияния на эндокринные клетки стенки кишечника (?)

- **Диабет II** – часто сопровождается ожирением! хронический воспалительный статус! снижение бутират-продуцентов, снижение противовоспалительных бактерий (Treg-индукторов)

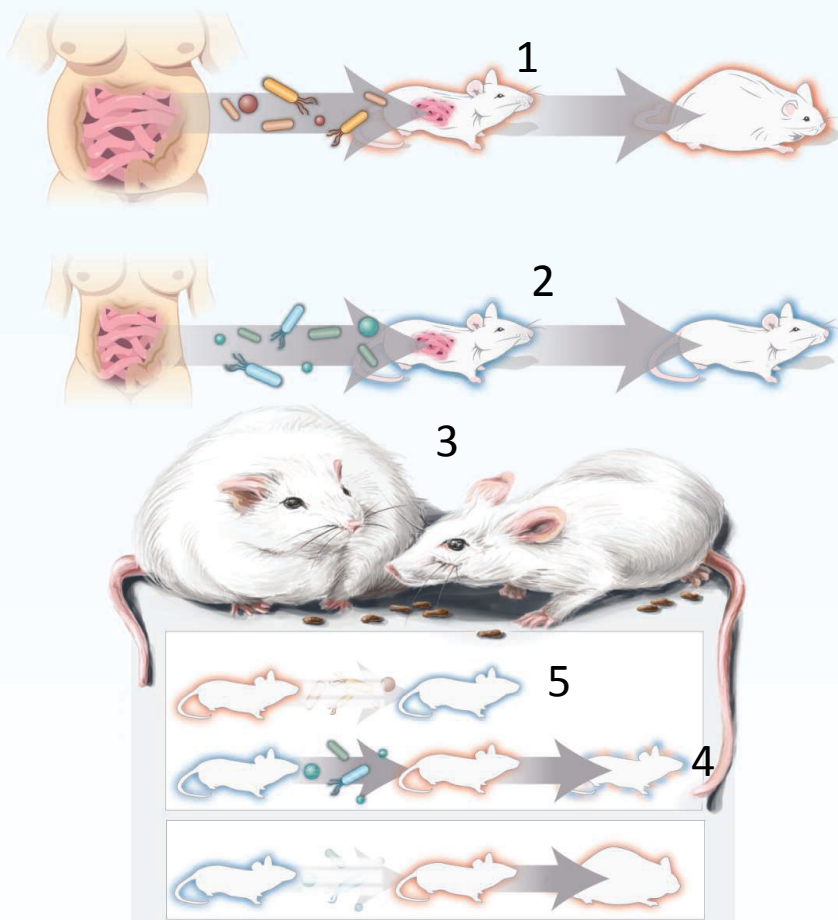
## 4. Онкологические заболевания:

- **рак толстого кишечника:** *Fusobacteria, Bacteriodes fragilis*
- **рак шейки матки:** измененная микробиота (бактерийный вагиноз) увеличивает чувствительность к папилломавирусу
- **рак желудка:** *Helicobacter pylori*

# «У тучных и худых людей разная микрофлора»

Ridaura *et al.*, *Science*, 2013

- Стерильные мыши заселялись микробиотой от близнецов с (1) увеличенным или (2) нормальным весом
- Эффект совпадал со статусом близнеца
- В микробиоте мышей с увеличенным весом наблюдалось снижение бактериоидов
- При совместном содержании (3) заселенных мышей-гнотобионтов\* и определенной диеты (низкое кол-во жиров, высокое кол-во растительных полисахаридов) наблюдалась нормализация микробиоты и снижение веса (4)
- Обратного процесса не наблюдалась, т.е. «микробиота ожирения» не передавалась мышам с нормальным весом (и нормальной микробиотой)
- Попытки установить бактерию (-и), ответственную за эффект снижения веса не были успешными



\* **Гнотобионт** – животное с известным («гното» – знание) микробным статусом. Получается путем кесарева сечения в стерильных условиях с последующим содержанием в гнотобиологических изоляторах



# Нарушения микроэкологии

**Дисбактериоз (дисбиоз):** клинико-лабораторный синдром, связанный с изменением качественного и/или количественного состава микрофлоры (кишечника) (МЗ РФ)

## **Причины:**

- 1) Антимикробная терапия
- 2) Иммунодефицитные состояния (например после облучения)
- 3) Использование гормональных препаратов и цитостатиков
- 4) Неполюценное питание (особенно у детей)
- 5) Различные заболевания: кишечные и др. инфекции, диабет, заболевания печени, онкологические эндокринные заболевания ...
- 6) Внешние экологические факторы

**Универсальная характеристика:** снижение, вплоть до исчезновения, или же выраженное изменение видового состава индигенных (облигатных) анаэробных бактерий (бифидобактерий, лактобацилл, бактероидов), сопровождающееся повышением количеств условно-патогенных аэробных (факультативно анаэробных условно-патогенных видов (энтеробактерии, стафилококки, некоторые стрептококки, грибы *Candida*)

# Стадии дисбактериоза

По выраженности изменений микробиоты различают 3 стадии дисбактериоза кишечника:

1. Нормальная анаэробная флора незначительно снижена, на 1-2 порядка (т.е. в 10-100 раз). Могут выделяться условно-патогенные организмы (стафилококки, нехактерные энтеробактерии (lac -, hem+). Клиника практически отсутствует.
2. **Снижение бифидобактерий на 3-4 порядка (до  $10^{6-7}$  кое/г), лактобацилл на 2-3 порядка (до  $10^{4-5}$  кое/г. Условно-патогенные организмы увеличиваются до  $10^{5-6}$  кое/г. Клинически дисфункция ЖКТ легкой степени.**
3. Снижение бифидобактерий до  $10^{5-6}$  кое/г, лактобациллы менее до  $10^4$  кое/г. Значительное размножение условно-патогенных организмов, включая гемолизинпродуцентов, появление токсиногенных (напр. *Bacteroides fragilis*, *Clostridium difficile*). Клинически умеренное нарушение ЖКТ.
4. **Бифидобактерии и лактобациллы практически не обнаруживаются бактериологическими методами (т.е. менее  $10^{3-4}$  кое/г) и замещены условно-патогенными или патогенными организмами. Клинически выраженная интоксикация и нарушения ЖКТ и других систем.**

# Степени дисбактериоза

По компенсированности различают 3 степени дисбактериоза кишечника (на примере детей):

- 1. Компенсированный дисбактериоз.** Нарушения микробиоза присутствуют, но клинически не выражены (напр. ребенок нормально развивается, стул нормальный, аппетит не нарушен). Проводят повторные исследования через 2-3 недели.
- 2. Субкомпенсированный дисбактериоз.** Общее состояние удовлетворительное, но появляются клинические симптомы: напр. ребенок вялый, плохо ест, недостаточно увеличивается масса тела, кишечные расстройства, кожные проявления (диатез, экзема).
- 3. Декомпенсированный дисбактериоз.** Значительные клинические симптомы: возможна рвота, жидкий стул, плохой аппетит, падение массы тела, симптомы авитаминоза. Повышается восприимчивость к кишечным инфекциям (вплоть до энтероколитов) и др. инфекциям.

# МБД дисбактериоза кишечника

Посевы фекалий из соответствующих разведений на селективные питательные среды:

**Бифидобактерии:** среда Блаурокк или Бактофок, анаэробная инкубация

**Лактобациллы:** среда МРС (рН+солевой состав), анаэробная инкубация

**Бактероиды:** среда Колумбия (она же КАБ), анаэробная инкубация

**Клостридии:** Клостридиальный агар (возможно добавление индикатора), анаэробная инкубация

**Энтерококки:** Энтерококковый агар (азид натрия + краситель)

**Стафилококки:** Стафилококковый агар (NaCl)

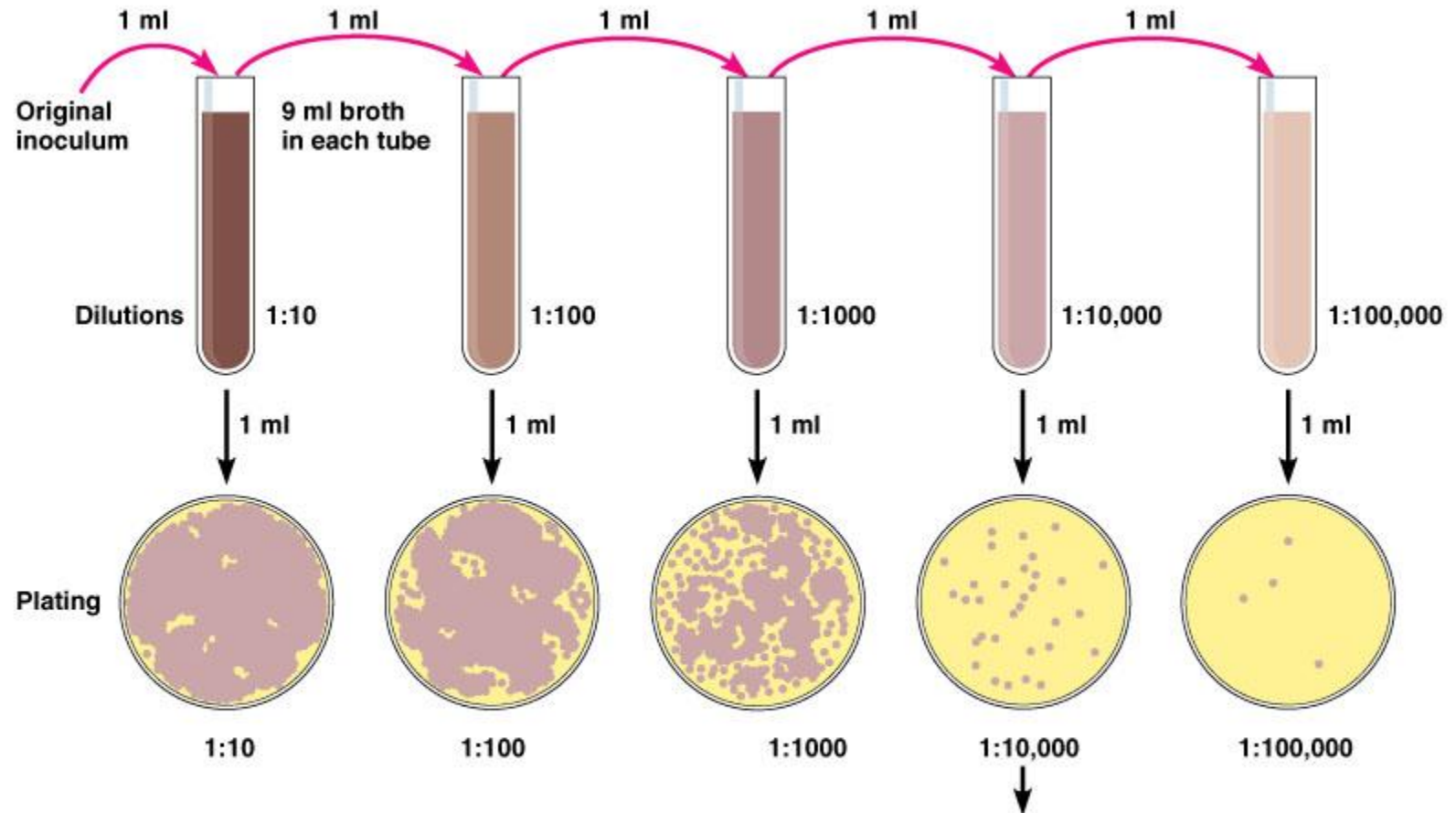
**Энтеробактерии:** агар Эндо (лактоза+индикатор), агар Плоскирева (лактоза+индикатор+желчь; для шигелл и сальмонелл)

**Candida агар** (неомицин, + кислотно-щел. индикатор)

Подсчет колоний на чашках; микроскопия; отсев для выделения чистой культуры и последующей идентификации.

Количество микроорганизмов в 1 г исследуемого материала при посеве 0,1 мл разведения:  $N = m \times 10^{n+1}$  (N- общее количество м/о, m- количество колоний, выросших на 1 чашке, n- величина разведения)

# Метод серийных разведений



**Calculation: Number of colonies on plate  $\times$  reciprocal of dilution of sample = number of bacteria/ml**  
(For example, if 32 colonies are on a plate of  $1/10,000$  dilution, then the count is  $32 \times 10,000 = 320,000/\text{ml}$  in sample.)

# Препараты, используемые для коррекции микробиоты

## Принципы:

1. компенсация недостатка протективных мутуалистов (напр. бифидобактерий)
2. элиминация условно-патогенных (напр. клебсиелл)

## Препараты:

1. Пробиотики (син. «Эубиотики») : бифибумбактерин, лактобактерин, колибактерин, бификол
2. Пребиотики – вещества, чаще всего сложные полисахариды, селективно метаболизируемые мутуалистами (бифидобактериями): фруктозо-олигосахариды
3. Препараты фагов
4. Антибиотики
5. Фекальная бактериотерапия
6. Аутобактериотерапия

# Дополнительная литература - учебники

1. Воробьев А.А., Мед. микробиология, вирусология, иммунология. 2006. стр. 88-93
2. Коротеев А.И., Бабичев С.А. Мед. микробиология, иммунология, вирусология. 2002. стр.118-121