

6. Электронный ресурс URL: <http://www.baltinfo.ru/2012/08/28/V-Peterburge-u-migrantov-chasche-vsego-vyuavlyayut-tuberkulez-i-venericheskie-zabolevaniya-300573>
7. Скрынник Н.А. Особенности организации работы районного противотуберкулезного диспансера крупного города в современных эпидемиологических условиях. Автореф. дис. ... канд. мед. наук. Санкт-Петербург. 2012. 21 с.
8. Электронный ресурс URL: <http://baltinfo.ru/2012/10/06/Poltavchenko-prizval-natsionalnye-diaspory-k-aktivnomu-uchastiyu-v-programme-Migratciya-308909>

Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet  
2014. Special issue

ORIGINAL ARTICLES

## MIGRANTS AND TUBERCULOSIS – AN EXTERNAL FACTOR OF ECOLOGICAL INFLUENCE

Isayeva N.Yu.

**Abstract.** Tuberculosis is one of the most dangerous infections. First of all it strikes socially unprotected part of the population. The migrants which number grows in St. Petersburg, represent stress expressive category of the people reducing protective forces of immunity. Incidence of tuberculosis among migrants usually significantly exceeds incidence of permanent residents of the city. There are the difficulties connected with problems of adaptation, shortcomings of lows, finance. Thus, the influencing on ecological system of the city more than one million arrived migrants undoubtedly. It is necessary to prevent development of tuberculosis epidemic among migrants by providing with preventive inspection and complete treatment of all new cases of tuberculosis irrespective of their legal and social status.

**Key words:** tuberculosis, migrants, ecology.

# СИНЭКОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ МИКРОБИОТЫ ЧЕЛОВЕКА КАК ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ПРЕДПОСЫЛКИ ПРОБИОТИКОТЕРАПИИ

И.В. Соловьева, И.В. Белова, А.Г. Точилина, В.А. Жирнов, Т.П. Иванова

*ФБУН «Нижегородский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Нижний Новгород, Россия*

**Резюме.** Проанализирована база данных результатов бактериологического исследования микрофлоры толстой кишки 3268 «больных» и «здоровых» людей разного возраста. Получены новые знания о формировании микробиоты человека, выявлены возрастные особенности качественного и количественного состава микрофлоры «здоровых» и «больных» людей, а также детей первых лет жизни, которые могут быть рассмотрены как теоретические предпосылки для создания пробиотиков.

**Ключевые слова:** микроорганизмы, микрофлора кишечника людей, толстая кишка, возрастные группы, пробиотики.

## Введение

Изучение микробной эндоэкологии человека (микрoэкологии) относится к одному из наиболее актуальных направлений прикладных и фундаментальных исследований

в области экологии, биологии, и медицины. Это связано с важной ролью, которую играет микробиота в жизнедеятельности макроорганизма, а также с повсеместно наблюдаемыми изменениями экологии микроорганиз-

мов, повлекшими нарастание удельного веса заболеваний, вызываемых микробами-оппортунистами [1]. В связи с этим большой интерес представляет изучение видовой разнообразия и структуры симбиотических сообществ микроорганизмов микробиоты человека, среди которых наибольшим видовым богатством характеризуется микробное сообщество толстой кишки, прямо или косвенно влияющее практически на все функции макроорганизма [2].

Новые доступные высокотехнологичные методы исследований, появившиеся в настоящее время, позволяют более подробно изучать видовую структуру сообществ симбиотических микроорганизмов. Современные информационные технологии дают возможность структурировать обширные базы данных, оценивать как множество единичных показателей, так и их совокупность в многомерном пространстве показателей, проводить статистический и экологический анализ. Следует отметить, что описание видовой структуры сообществ организмов успешно проведено для наземных и водных экосистем: зоо- и фитопланктона, зообентоса, растений, сообществ мелких млекопитающих [3–6]. Аналогичные исследования проведены в отношении симбиотических сообществ микробиоценозов миндалин человека [7], а в отношении микробиоты желудочно-кишечного тракта подобных исследований не проводилось.

В связи с этим актуальным вопросом является изучение закономерностей, управляющих динамикой численности популяций микроорганизмов в составе микробиоты, ее пространственной и видовой структурой, изучение разнообразных типов межпопуляционных отношений, обеспечивающее образование сообществ как систем с относительно стабильным видовым составом. Понимание и теоретическое осмысление экологических закономерностей функционирования симбиотической микрофлоры является необходимой предпосылкой для развития и совершенствования способов влияния на ее формирование и нормализацию с помощью различных форм пробиотиков из представителей резидентной микрофлоры. Широкое распространение дисбиотических нарушений ставит на повестку дня важность разработки методов комплексной коррекции микробиоты, направленных не только на

восстановление эволюционно обусловленных микробных популяций, но и обеспечивающих воздействие на макроорганизм в целом.

Цель работы: на основании изучения экологических закономерностей формирования сообществ симбиотических микроорганизмов толстой кишки «здоровых» и «больных» людей разных возрастных групп, проживающих на территории промышленного мегаполиса, определить спектр родов микроорганизмов, приоритетных для использования в качестве штаммов-продуцентов пробиотиков.

Экспериментальная часть. Изучен качественный и количественный состав микрофлоры просвета толстой кишки 3268 «здоровых» и «больных» людей разных возрастных групп, всего проведено 5837 анализов, выделено 32 784 культуры, из них идентифицировано до вида 23 497 штаммов микроорганизмов, как представителей облигатной микрофлоры, так и условно-патогенных (УПМ) и патогенных микроорганизмов различных родов.

Изучение микрофлоры толстой кишки проводилось по методу, разработанному Р. В. Эпштейн-Литвак и Ф. Л. Вильшанской и модифицированному в Нижегородском НИИЭМ [8].

Проверка данных на нормальность распределения проводилась с применением статистических критериев Колмогорова-Смирнова и Шапиро-Уилка. Для статистической обработки полученных результатов использовались непараметрические критерии Mann-Whitney и Kruskal-Wallis [9]. Многомерный кластерный анализ данных проведен методом Варда, результаты кластеризации проанализированы с помощью метода К-средних [10]. Критический уровень значимости  $p$  принимался за 0,05. В случае множественных сравнений производилась корректировка критического уровня значимости с помощью поправки Бонферрони [10].

Для количественного описания видового разнообразия сообществ симбиотических микроорганизмов толстой кишки человека проведены расчеты с использованием общепринятых в экологии индексов: видового разнообразия Шеннона, доминирования Симпсона, видового богатства Маргалёфа и выравненности Пиелу [11–13]. Индекс Шеннона, для которого разработаны соответствующие алгоритмы, также

был применен для подтверждения сделанных обобщений и получения статистически корректных оценок различий (t-критерий Стьюдента) в видовом разнообразии микрофлоры толстой кишки разновозрастных групп здоровых и больных людей [11].

Возрастная периодизация, основанная как на физиологических параметрах, так и на состоянии микробиоты ЖКТ, предложена авторами.

Группы «здоровых» людей были сформированы по критериям здоровья, определенным для каждой возрастной группы в отдельности [14, 15].

В группы «больных» детей в возрасте 0–23 часа и 24 часа–6 суток были включены доношенные дети без врожденных уродств и выраженной патологии, отнесенные к подгруппе риска по развитию гнойно-воспалительных заболеваний по клиническим показателям состояния здоровья новорожденного по шкале Апгар (менее 8 баллов) и факторам пренатального риска у матери. К «больным» в остальных возрастных группах были отнесены лица, в анамнезе которых на момент обследования отмечались хронические заболевания в стадии обострения или клинические проявления острой формы, на фоне применения антибактериальных и/или других лекарственных средств, так и при первичном обращении до назначения этиотропной терапии, а также все не вошедшие в группу «здоровые».

Методом экспертных оценок из числа клинически значимых родов и видов микроорганизмов, определяющих качественный и количественный состав микрофлоры, были определены 29 признаков, наиболее полно отражающих состояние микробиоценоза ЖКТ человека, включающих 70 родов, 376 видов.

В соответствии с выбранными признаками результаты бактериологических анализов (количества микроорганизмов в 1 г субстрата) были занесены во вновь разработанную СУБД «Автоматизированная система микробиологического мониторинга микробиоценозов желудочно-кишечного тракта (ЖКТ)» [16].

Результаты и обсуждение. Важным и определяющим звеном в процессе формирования микробиоценоза является первичная колонизация бактериями новорожденного в раннем неонатальном периоде, так как в дальнейшем состоянии здоровья

индивидуума, и резистентность к целому ряду заболеваний во многом зависит от характера кишечной микрофлоры и ее активности. В связи с этим представляет особый интерес оценка видового разнообразия и видового богатства сообществ микроорганизмов толстой кишки в онтогенезе.

Ранее считалось, что формирование микробиоценоза начинается в процессе родов и обусловлено видовым составом микрофлоры родовых путей матери. Однако в конце 80-х гг. прошлого века доказано, что внутриутробно развивающийся плод не является стерильным, а получает от матери какое-то количество индигенных микроорганизмов *in utero*. Далее до семидневного возраста микрофлора претерпевает три стадии становления: первая – «условно-асептическая» начинается с момента рождения; вторая – «нарастающей колонизации» наступает через 10–20 часов после родов. В этот период колонизация осуществляется гетерогенными микроорганизмами, в первую очередь аэробными и факультативно аэробными бактериями, такими как *E. coli*, *Staphylococcus spp.*, *Klebsiella spp.*, *Enterococcus spp.* и др. Третья стадия – «трансформации микрофлоры» – наступает с 5–7 дня после родов, в результате которой происходит вытеснение бифидофлорой других микроорганизмов.

В настоящем исследовании после обобщения данных, полученных по каждой возрастной группе, был смоделирован процесс изменения микрофлоры «здоровых» людей в течение жизни от рождения до старости, имеющий некоторые отличия от вышеописанного.

Установлено, что в период формирования микрофлоры во вторую стадию «нарастающей колонизации» у «здоровых» младенцев параллельно идет активный рост как анаэробных микроорганизмов (лактобацилл, лактококков и бифидобактерий), так и аэробных (кишечной палочки, энтерококка и группы УПМ) в количествах  $10^5$ – $10^7$  КОЕ/г (рис. 1 А, Б). Незначительное преобладание бифидофлоры отмечается начиная с третьих суток жизни, стадия трансформации микрофлоры отсутствует.

К шестым суткам, то есть к моменту выписки из родильного дома количество представителей аэробной и анаэробной части флоры устанавливается на уровне  $10^8$  КОЕ/г, далее происходит нарастание

лакто- и бифидофлоры, и к 2 месяцам жизни ребенка она достигает значений  $10^9$ - $10^{10}$  КОЕ/г. На таком уровне количество анаэробов сохраняется и в более старшие возрастные периоды. Снижение количества лакто- и бифидобактерий начинается ближе к 60 годам. Количество нормальной *E. coli* со вторых суток не изменяется и остается на уровне  $10^8$  КОЕ/г на протяжении практически всей жизни человека. Падение количества УПМ начинается с трехмесячного возраста, к шести годам

снижается до уровня  $10^6$  КОЕ/г и далее не изменяется.

Процесс формирования микрофлоры в группе «больных» детей в первые сутки не отличается от такового у «здоровых» (рис. 1 В, Г). Количество бифидобактерий и *E. coli* до  $10^8$  КОЕ/г увеличивается на вторые сутки, лактобацилл и лактококков на третьи. Установившееся к третьим-четвертым суткам пребывания в родильном доме равновесие аэробной и анаэробной части флоры на уровне  $10^8$  КОЕ/г сохраняется до трех ме-

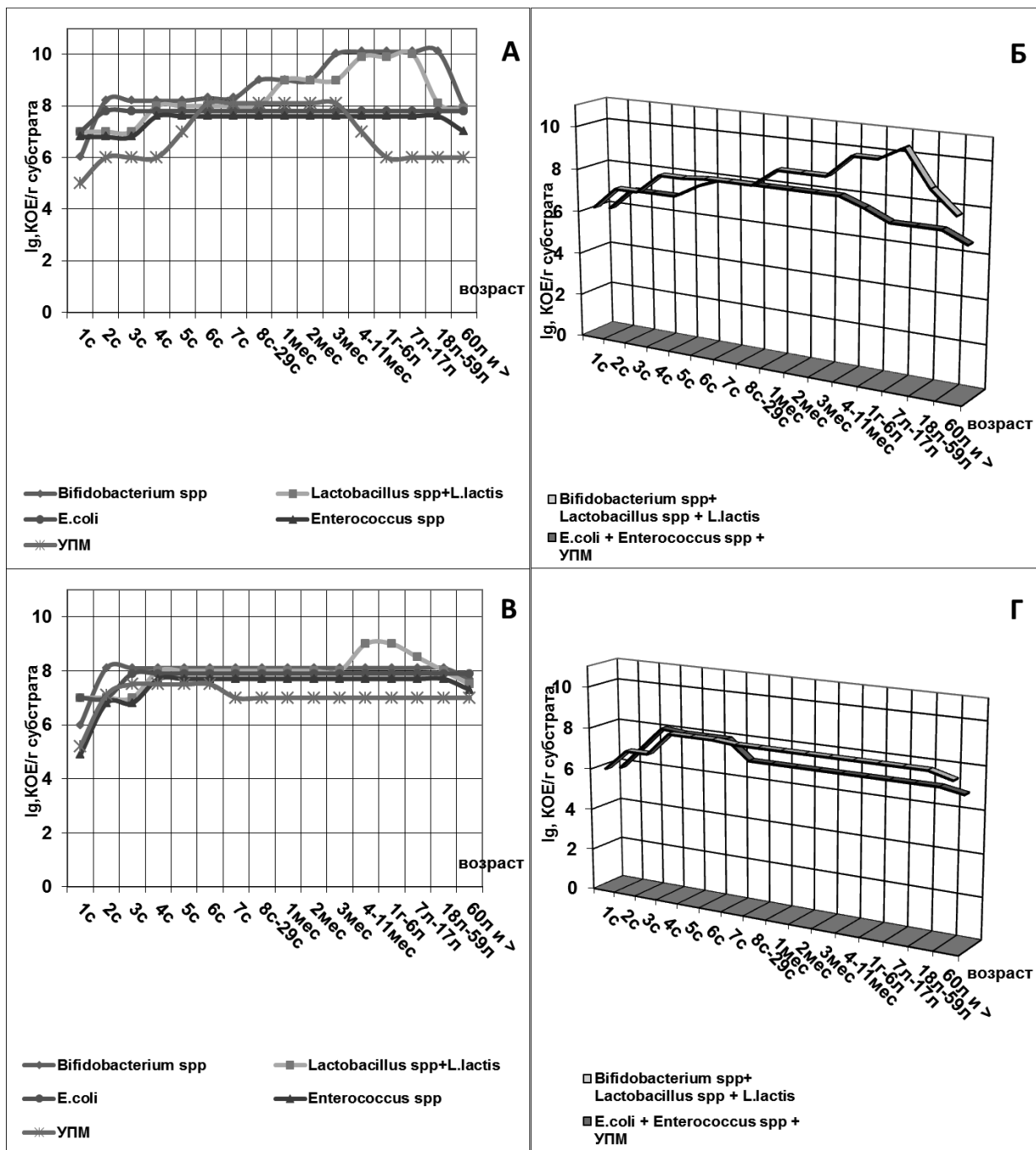


Рисунок 1. Фазы формирования микробиоценозов группы "здоровых" (А, Б) и «больных» (В, Г) людей (количество микроорганизмов приведено в усредненных значениях)

сяцев, и только на четвертый месяц число лактобацилл и лактококков увеличивается до  $10^9$  КОЕ/г. Далее количественное соотношение микроорганизмов остается неизменным до шестилетнего возраста. Начиная с шести лет количество лактобацилл и лактококков постепенно снижается и в возрастной группе 60 лет и более составляет  $10^7$  КОЕ/г.

Анализ трендов частоты выделения микроорганизмов у «здоровых» людей позволяет выделить три типа распределения по возрастным группам (рис. 2, а).

К первому типу (распределение с насыщением) относятся зависимости для *Lactobacillus spp.*, *Bifidobacterium spp.* и *E. coli*, характеризующиеся нарастанием в первые часы и сутки с последующим насыщением, выходящим на стационарный уровень от 1 года жизни и до 60 лет и более.

Второй тип – трехфазная зависимость частоты, характерна для *Lactococcus spp.* Эта зависимость имеет максимальное значение частоты выделения в первые сутки жизни с последующим снижением и выходом на стационарный уровень у детей с семидневного возраста. Вторичное снижение частоты выделения наблюдается уже у взрослых.

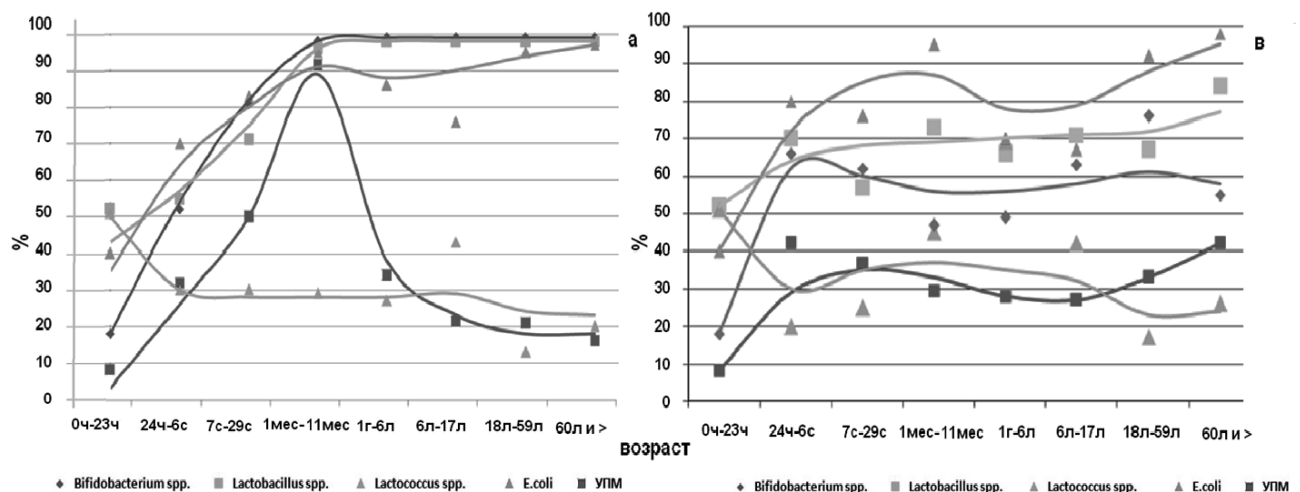
Третий тип – колоколообразная функция отклика характерна для УПМ: от первых часов до 1 года жизни частота выделения возрастает с выходом на максимум в возрастной период 1–11 месяцев, далее происходит резкое снижение частоты выделения в возрасте от 1 года до 17 лет, затем переходящее в стационарную фазу.

Данный тип распределения частоты выделения микроорганизмов подчиняется одному из фундаментальных законов теоретической экологии – закону толерантности Шелфорда [12].

Характер распределения трендов частоты выделения микроорганизмов по возрастным группам в микрофлоре «больных» людей имеет отличия от «здоровых» (рис. 2, в). Так, несмотря на сохранение тенденции для *Lactobacillus spp.*, *Bifidobacterium spp.* и *E. coli* к распределению с насыщением, они реже встречаются у «больных». Однако наиболее резкие изменения частоты выделения у «больных» касаются УПМ: типичная колоколообразная кривая заметно уплощается, демонстрируя резко сниженную и упрощенную возрастную динамику. И только трехфазная зависимость, характерная для *Lactococcus spp.*, сохраняется и в группе «больных».

Проанализировав данные о частоте встречаемости отдельных представителей микробиоценоза просвета толстой кишки в микрофлоре «здоровых» людей различных возрастных групп следует отметить, что в 93,8% дети рождаются с бактериальной флорой ЖКТ, причем в первые 24 часа жизни преобладающей флорой являются микроаэрофильные микроорганизмы родов *Lactobacillus* и *Lactococcus*, а также факультативно-анаэробные бактерии родов *Staphylococcus* и *Escherichia*.

В отличие от «здоровых» у «больных» детей в возрасте от 1 месяца до 1 года наблюдается резкое снижение частоты выделения представителей анаэробной части флоры



**Рисунок 2. Тенденция (тренд) распределения частоты выделения облигатной микрофлоры и УПМ из кишечника «здоровых» (а) и «больных» (в) людей разных возрастных групп**

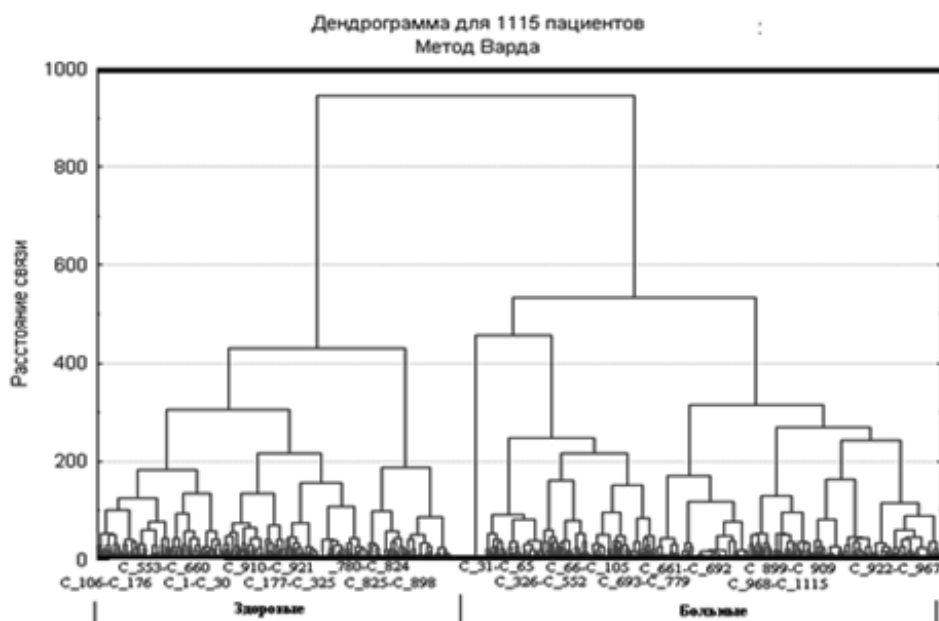
(лактобацилл и бифидобактерий). Следует отметить тот факт, что в группе «больных» детей УПМ в значимых количествах выделялись реже, чем в группе «здоровых», особенно это заметно в возрастных группах 7–29 суток и 1–11 мес. (37% и 50%, 29,5 и 91,6% соответственно). В более старших возрастных группах частота обнаружения УПМ достоверно выше у «больных», чем у «здоровых», а частота выделения анаэробов снижена. Проведенные исследования показали, что суммарная численность сообществ симбиотических микроорганизмов у «здоровых» людей на один-два порядка выше, чем у больных ( $p < 0,05$ ). Полученные результаты можно объяснить с точки зрения процесса формирования местной толерантности к резидентной микрофлоре и существующей теорией эндогенного инфицирования. Возникновение патологического процесса можно объяснить не количеством выделяемых УПМ, а их измененными свойствами и подавлением лакто- и бифидобактерий [17].

Для верификации правильности и полноты разбиения исходного массива данных на категории «здоровые» и «больные» был применен многомерный кластерный анализ по методу Варда и методу К-средних, который не только подтвердил, что микрофлора толстой кишки различается у «здоровых» и «больных» людей, но также позволил разбить и упорядочить объекты (люди) микро-

биологических данных внутри каждого из этих двух крупных кластеров на непересекающиеся подмножества – кластеры, соответствующие выбранным ранее возрастным группам (рис. 3).

В ходе статистического анализа в каждой возрастной группе пациентов были выявлены виды микроорганизмов – *Lactobacillus* и *Bifidobacterium*, а также *E. coli*, *Enterococcus spp.*, *S. epidemidis*, *S. aureus*, *Klebsiella spp.*, *Citrobacter spp.*, *Proteus spp.*, *Enterobacter spp.*, численности которых статистически значимо различались у «здоровых» и «больных» людей. Достоверность попарных различий в численности симбиотических микроорганизмов толстой кишки у здоровых и больных по 7 возрастным группам подтверждена методом Манна-Уитни. Эти микроорганизмы были определены как «информационно значимые признаки» – признаки пригодные для использования в процедурах скрининга и диагностики дисбиотических состояний.

Экологический анализ видовой структуры микробиоценозов толстой кишки показал, что во всех возрастных группах, как у «здоровых», так и «больных» людей при увеличении видового разнообразия сообществ симбиотических микроорганизмов, оцениваемого по индексу Шеннона, закономерно снижается доминирование (индекс Симпсона) и возрастает выравненность



**Рисунок 3.** Многомерный кластерный анализ методом Варда сообществ симбиотических микроорганизмов толстой кишки «здоровых» и «больных» людей разных возрастных групп

(индекс Пиелу), что полностью согласуется с основными положениями теоретической экологии.

Результаты синэкологического анализа микробиоты «здоровых» и «больных» людей послужили теоретическими предпосылками для обоснования пробиотикотерапии и разработки новых пробиотиков.

Выводы. В процессе формирования микрофлоры кишечника человека участвуют как аэробные, так и анаэробные микроорганизмы, причем в равных соотношениях с первого часа жизни, процесс нарастания анаэробной компоненты (представители родов *Lactobacillus*, *Lactococcus* и *Bifidobacterium*) идет параллельно с ростом условно-патогенных микроорганизмов, *E. coli* и бактерий рода *Enterococcus*, минуя стадию «трансформации», что подтверждено результатами синэкологического анализа базы данных видового состава симбиотических микроорганизмов толстой кишки, проведенного с использованием разработанной программы для ЭВМ «Автоматизированная система микробиологического мониторинга микробиоценозов желудочно-кишечного тракта (ЖКТ)». Оппортунистические микроорганизмы в значимых количествах ( $> 10^5$  КОЕ/г) с наибольшей частотой – в 92% случаев – выделяются в группе «здоровых» детей в возрасте от одного месяца до года. Далее частота выделения УПМ постепенно снижается до 18% (возрастная группа 60 лет и старше). Суммарная численность сообществ симбиотических микроорганизмов, выделяемых из толстой

кишки здоровых людей во всех возрастных группах на один-два порядка выше, чем у больных ( $p < 0,05$ ) за исключением группы 60 лет и старше.

Полученные результаты свидетельствуют, что все экологические законы и зависимости, свойственные другим природным биотопам и популяциям, справедливы и в отношении микробиоты человека. Кроме того, все выявленные закономерности, характерные для части микробного сообщества микрофлоры толстой кишки, представленной фиксированным набором 29 показателей, учитывающих количества различных видов микроорганизмов в одном грамме субстрата, сохраняются и развиваются также и для популяции в целом.

Выявлено, что количество бактерий родов *Lactobacillus* и *Bifidobacterium*, а также *E. coli*, *Enterococcus spp.*, *S. epidemidis*, *S. aureus*, *Klebsiella spp.*, *Citrobacter spp.*, *Proteus spp.*, *Enterobacter spp.* относится к «информационно-значимым показателям», то есть их численность статистически значимо различается у «здоровых» и «больных» людей одного возраста и между возрастными группами, что позволяет верифицировать классификационные решения по разделению пациентов на категории «здоровые» и «больные» с учетом возраста в многомерном пространстве показателей.

Результаты синэкологического анализа микробиоты «здоровых» и «больных» людей являются обоснованием для разработки и применения пробиотиков, содержащих бактерии родов *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* и *Lactococcus*.

## Список литературы

1. Шендеров Б.А. Медицинская микробная экология и функциональное питание. Т. III: Пробиотики и функциональное питание. М.: ГРАНТЪ, 2001. 288 с.
2. Дисбиоз кишечника. Руководство по диагностике и лечению. 2-е изд., испр. и доп. / под ред. Е.И. Ткаченко, А.Н. Суворова. СПб. ИнформМед, 2009. 276 с.
3. Иудин Д.И. Методология принципа самоподобия в исследовании видовой структуры биотических сообществ: Автореф. дисс. ... д-ра биол. наук. Тольятти, 2006. 40 с.
4. Гелашвили Д.Б., Пухнаревич Д.А., Иудин Д.И. Структурная организация и фрактальная природа макрозообентоса малых городских водоемов // Поволжский экологический журнал. 2007. № 1. С. 1–15.
5. Yakimov V.B., Bossuyt D., Iudin D. et al. Multifractal diversity-area relationship at small scales in dune slack plant communities // Oikos. 2008. Т. 117. Р. 33–39.
6. Гелашвили Д.Б., Дмитриев А.И., Иудин Д.И. и др. Мультифрактальный анализ видовой структуры сообществ мелких млекопитающих Нижегородского Поволжья // Экология. 2008. № 6. С. 456–461.
7. Бухарин О.В., Усвяцова Б.Я., Хуснутдинова Л.М. Межбактериальные взаимодействия // ЖМЭИ. 2003. № 4. С. 3–8.

8. Эпштейн-Литвак Р.В., Вильшанская Ф.А. Бактериологическая диагностика дисбактериоза кишечника. Метод. рекомендации. М. 1977. 22 с.
9. Банержи А. Медицинская статистика понятным языком: вводный курс / пер. с англ. под ред. В.П. Леонова. М.: Практическая медицина. 2007. 287 с.
10. Гланц С. Медико-биологическая статистика. М.: Практика, 1998. 459с.
11. Мэггаран Э. Экологическое разнообразие и его измерение. М.: Мир, 1992. 184 с.
12. Одум Ю. Основы экологии. М.: Мир, 1975. 741 с.
13. Маргалев Р. Облик биосферы. М.: Наука, 1992. 254 с.
14. Вельтишев Ю.Е., Ветров В.П. Объективные показатели нормального развития и состояния здоровья ребенка (нормативы детского возраста). М.: Наука. 2002, 96 с.
15. Казин Э.М., Блинова Н.Г., Литвинова Н.А. Основы индивидуального здоровья человека: Введение в общую и прикладную валеологию: Учеб. пособие для высш. учеб. заведений. М.: ВЛАДОС. 2000. 192 с.
16. Свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ «Автоматизированная система микробиологического мониторинга желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) №2011614233 / Ломакин Д.В., Вигура А.Н., Губернаторов В.П., Пожидаева А.С., Соловьева И.В., Ефимов Е.И., Белова И.В./ заявл. 13.04.2011, зарег. 30.05.2011.
17. Бондаренко В.М. Роль условно-патогенных бактерий кишечника в полиорганной патологии человека. Тверь: ООО «Издательство «Триада». 2007. 64 с.

## SYNECOLOGICAL ANALYSIS OF HUMAN'S MICROBIOTA AS THEORETICAL PREREQUISITES OF PROBIOTICAL THERAPY

Solovyeva I.V., Belova I.V., Tochilina A.G., Zhirnov V.A., Ivanova T.P.

**Abstract.** The research results database of microflora of the large intestine of 3268 «sick» and «healthy» people of all ages is analyzed. New knowledge about the formation of human microbiota is obtained, age-specific qualitative and quantitative composition of microflora of «healthy», «sick» people and infant. These data can be prerequisites for creation of probiotics.

**Key words:** *microorganisms, human intestine microflora, thick intestine, age groups, probiotics.*