

УДК 579:616-078

О. П. Конарева¹, В. О. Іваниця¹, С. П. Гвоздій¹, О. В. Шпортун²¹ Одеський національний університет ім. І. І. Мечникова, кафедра мікробіології і вірусології,
вул. Дворянська, 2, Одеса, 65026, Україна, e-mail: ivanitsa@yandex.ru;² Інститут мікробіології і вірусології НАН України,
вул. Заболотного, 154, Київ, 03143, Україна

ХАРАКТЕРИСТИКА ДРІЖДЖЕПОДІБНОЇ МІКРОБІОТИ ШЛУНКУ ПРИ РІЗНИХ ГАСТРОДУОДЕНАЛЬНИХ ПАТОЛОГІЯХ НА ФОНІ ХЕЛІКОБАКТЕРІОЗУ

Вивчено дріжджеподібну мікробіоту слизової оболонки шлунку у хворих з різними гастродуоденальними патологіями на фоні хелікобактеріальної інфекції.

Встановлено залежність ступеня обсіменіння шлунку дріжджеподібними грибами і *Helicobacter pylori* від рН шлункового соку: при рН від 1 до 3 слизова шлунку переважно контамінована *Helicobacter pylori*, при рН від 5 до 7 — дріжджеподібними грибами.

Виділено 38 штамів дріжджеподібних грибів, віднесених до 5 родів: *Candida* (16 штамів), *Cryptococcus* (17), *Prototheca* (3), *Rhodotorula* (1) і *Torulopsis* (1). Вивчено чутливість виділених штамів до антибіотиків. Показано, що дріжджеподібні гриби роду *Cryptococcus*, на відміну від представників роду *Candida*, більш чутливі до антибіотиків широкого спектру дії, ніж до протигрибкових препаратів.

Ключові слова: дріжджеподібні гриби, *Helicobacter pylori*, гастродуоденальні патології, рН шлункового соку

Протягом останніх років увага багатьох дослідників прикута до вивчення ролі *Helicobacter pylori* в розвитку гастродуоденальних захворювань, таких як гастрити, виразкова хвороба шлунку та дванадцятипалої кишки (ВХП і ВХДК). При цьому практично не звертається увага на супутні *Helicobacter pylori* мікроорганізми, зокрема дріжджеподібні гриби, частота виявлення яких у шлунку, за даними літератури, становить 40—80% [1]. Традиційно вважається, що дріжджеподібні гриби є компонентом нормальної мікробіоти травного тракту [2, 3, 4]. Однак повсюдне зростання кількості уражень, що їх ініційовано патогенними дріжджами, зумовлює необхідність більш уважного відношення до персистенції цих організмів.

Відомо також, що грибкова інвазія виразок шлунку негативно позначається на їхній репарації, подовжуючи терміни гоєння виразкових дефектів [5].

Метою даної роботи було виявлення і вивчення дріжджеподібної мікробіоти шлунку за різних гастродуоденальних патологій на фоні хелікобактеріальної інфекції.

Матеріали і методи

Об'єктом дослідження служили 24 проби біоптатів слизової антрального відділу шлунку, одержані від хворих з різними гастродуоденальними патологіями під час фіброгастродуоденоскопії.

Ділянки слизової розміром $6,0 \pm 0,5$ мм³ поміщали в транспортне тіогліколеве середовище і досліджували не пізніше, як через 2 години [3].

Біоптати подрібнювали до одержання однорідної суспензії. Одержану суспензію висівали на щільні кров'яні поживні середовища (еритрит-, колумбія-, бруцелла-агар) з доданням 10% кінської сироватки. Посіви було інкубовано 48 годин при 37 °С в атмосфері, яка містить 5 % кисню, 10 % вуглекислого газу і 85% азоту.

Паралельно готували мазки-відбитки для бактеріоскопічного виявлення *Helicobacter pylori*. Препарати забарвлювали метиленовим синім за методом Мансона [3]. Оцінку рівня обсіменіння вели за триплюсовою системою: + — слабе, ++ — середнє і +++ — високе обсіменіння [6].

Колонії, що зросли, проглядали під біокулярною лупою (МБС-10), з них готували препарати, фарбували їх водним розчином фуксину і підозрілі на дріжджеподібні гриби відсівали на середовище Сабуро.

Належність штамів до дріжджеподібних грибів встановлювали за такими морфологічними ознаками, як розмір клітин, здатність до брунькування, утворення псевдоміцелію і хламідоспор, наявність капсули, диференціювання ядра і цитоплазми [7].

Видову належність виділених культур визначали на основі вивчення деяких біохімічних і тинкторіальних властивостей: утилізації вуглеводів за аеробних і анаеробних умов, наявності уреаз, редукції нітратів, росту при 10% NaCl, здатності утворювати крохмаль, наявності жирових включень, а також характеру росту на щільних та рідких поживних середовищах, росту при різних температурних режимах [8].

Результати і обговорення

Контингент обстежених хворих було поділено відповідно виявленим хворобам:

1. Поверхневий гастрит і поверхневий гастродуоденит (ПГ и ПГД);
2. Ерозивний гастрит (ЕГ);
3. Виразкова хвороба шлунку і виразкова хвороба 12-палої кишки (ВХШ і ВХДК);
4. Жовчний рефлюкс (ЖР).

Попередній аналіз наведених у таблиці 1 даних показав, що ступінь обсіменіння слизової шлунку дріжджеподібними грибами і їхній якісний склад залежав не стільки від характеру патології, скільки від рН шлункового соку. Тому надалі дані всіх обстежень було поділено на 2 групи залежно від значення рН шлункового соку: до першої групи входили хворі, у яких рН шлункового соку була в межах

від 1 до 3 — що становило 51,2 % обстежених, до другої — з рН від 5 до 7, тобто 48,8 % обстежених хворих.

Таблиця 1

Кількісний вміст дріжджеподібних грибів при різних патологіях шлунку і 12-палої кишки ($P \leq 0,05$)

№ проб	рН шлункового соку	Клінічний діагноз	Ступінь обсіменіння	
			дріжджеподібними грибами (КУО/мм ³)	<i>Helicobacter pylori</i>
1	2	ПГ	50±14	+++
2	2	“	42±10	+
3	3	“	320±12	++
4	3	“	132±18	+++
5	3	ЕГ	150±12	++
6	3	“	180±16	++
7	1	“	10±1	-
8	3	“	250±12	+
9	3	ВХДК	240±28	++
10	3	“	280±21	++
11	3	“	160±24	++
12	3	ВХШ	380±21	+++
13	3	ЖР	8±2	-
14	3	“	4±1	-
15	3	“	24±3*	+
16	6	ПГД	2400±31	-
17	6	“	1400±25	-
18	5	“	398±16	+
19	6	“	2100±18	-
20	6	“	1690±15	-
21	7	“	3200±27	-
22	6	“	2150±32	-
23	6	ВХДК	350±14	+
24	6	“	750±30	+

Примітка: пояснення до таблиці у тексті

Одержані дані (табл. 1) свідчать про те, що дріжджеподібні гриби було виявлено в 95,8 % досліджуваних проб біоптатів. Тільки в одній пробі дріжджеподібних грибів виявлено не було. Обсіменіння цього зразка становило $24 \pm 3^*$ КУО/мм³ і, можливо, було обумовлене наявністю *Helicobacter pylori*. У хворих при ПГ, ЕГ, ВХШ і ВХДК з підвищеною кислотністю шлункового соку (рН 1—3) обсіменіння дріжджеподібними грибами знаходилось у межах від 4 до 320 КУО/мм³ біоптату. Ступінь обсіменіння біоптатів при рН шлункового соку, що дорівнює 1—2, був на порядок вищим за рівень обсіменіння при рН рівному 3.

При значеннях рН шлункового соку від 5 до 7 ступінь обсіменіння біоптатів був на порядок вищим, ніж при рН 3, і на два порядки — у порівнянні з рівнем при рН 1—2 (від 350 до 3200 КУО/мм³).

Це, очевидно, пов'язано з тим, що оптимальним для життєдіяльності дріжджеподібних грибів є рН 5,5—6,5. При рН 1—2 спроможні виживати лише найбільш стійкі до впливу соляної кислоти і ферментів шлунку дріжджеподібні гриби.

Що стосується *Helicobacter pylori*, то оптимальним значенням для даного мікроорганізму *in vivo* є рН 2—3 [9]. Це підтверджують дані, які представлено в таблиці 1. Слизова шлунку хворих на ПГ, ЕГ, ВХШ і ВХДК з рН шлункового соку 1—3 за виключенням одного випадку була в різній мірі інфікована *Helicobacter pylori*. При рН 5—7 слизова шлунку переважно контамінована дріжджеподібними грибами.

Встановлено, що ступінь обсіменіння біоптатів дріжджеподібними грибами при діагнозі жовчний рефлюкс значно відрізнявся від такого при інших клінічних діагнозах (4—24 проти 132—380 КУО/мм³ відповідно при рН шлункового соку, що дорівнює 3). Скоріше за все це пов'язано із згубним впливом жовчних кислот на ці мікроорганізми.

В результаті проведених досліджень виділено 38 штамів дріжджеподібних грибів, які було віднесено до 5 родів: *Cryptococcus* (17 штамів), *Candida* (16), *Prototheca* (3), *Rhodotorula* (1) и *Torulopsis* (1).

Необхідно відзначити, що нами вперше були описані біологічні властивості дріжджеподібних грибів роду *Cryptococcus*, виділених зі слизової шлунку. Причому деякі властивості у штамів дріжджеподібних грибів, що вивчалися (табл. 2), відрізнялися від властивостей, описаних у літературі [2, 10—13]. Автори вказують на низьку здатність криптококків зброджувати вуглеводи. В наших дослідженнях, на відміну від даних літератури, дріжджеподібні гриби роду *Cryptococcus* в більшій чи меншій мірі ферментували цукри (табл. 2).

Як видно з даних, представлених в таблиці 3, найбільша частота стривальності приходить на гриби роду *Cryptococcus* (75%) і роду *Candida* (62,5%). Серед штамів роду *Cryptococcus* найбільш часто зустрічалися *Cryptococcus neoformans* (50%), а серед штамів роду *Candida* — *Candida albicans* (43,8%).

За усередненими даними, згідно з питомою вагою чисельності різних представників дріжджеподібних грибів у сумі всіх ізольованих із зразка, домінують представники родів *Cryptococcus* і *Candida*, частка інших дріжджеподібних грибів незначна (рис. 1). Серед поєднань найбільш часто зустрічається поєднання грибів родів *Cryptococcus* і *Candida* (в 95,8 % випадків).

Оскільки при лікуванні різних гастродуоденальних захворювань рекомендується вживання антибіотиків для ерадикації *Helicobacter pylori* як етіологічного фактора запального процесу, певний інтерес представляє вивчення чутливості виділених домінуючих дріжджеподібних грибів до ряду антибіотиків як протигрибкового, так і широкого спектру дії.

Таблиця 2
Біологічні властивості дріжджеподібних грибів, виділених від хворих з різними патологіями шлунку та 12-палої кишки

Вид	Зростання при 37° С	Наявність капсули	Псевдоміцелій	Ріст при 10% NaCl	Ріст на рідких середовищах	Редукція нітратів	Утилізація вуглеводів							
							Окиснення				Ферментація			
							малтоза	лактоза	галактоза	глюкоза	малтоза	лактоза	галактоза	глюкоза
<i>Candida albicans</i>	+	-	+	+	ДЗ	-	+	-	+	-	+	-	+	-
<i>Candida krusei</i>	+	-	+	-	Пл	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Candida sp.</i>	+	-	-	-	Ос	-	-	-	+	-	+	-	-	-
<i>Cryptococcus neoformans</i>	+	+	-	+	Ос	-	+	+	+	+	+	+	+	-
<i>Cryptococcus laurentii</i>	+	+	-	+	ДЗ	-	+	+	+	-	+	+	+	+
<i>Cryptococcus species</i>	+	+	-	+	Ос	+	+	-	-	+	+	-	+	-
<i>Prototheca wickerhamii</i>	+	-	-	-	ДЗ	-	+	+	+	+	-	-	-	-
<i>Rhodotorula minuta</i>	+	-	-	-	Ос	+	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>Torulopsis glabrata</i>	+	-	-	-	Пл	-	+	+	+	-	-	-	-	-
					ДЗ	-	-	-	-	+	-	-	-	-

Умовні позначення: ДЗ — дифузне зростання; Пл — плівка; Ос — осад

Таблиця 3

Частота стрівальності дріжджеподібних грибів у хворих з різними патологіями шлунку та 12-палої кишки ($P \leq 0,05$)

Рід. вид	Частота стрівальності (%)
<i>Candida</i>	62,5±1,8
<i>Candida albicans</i>	43,8±3,2
<i>Candida krusei</i>	18,8±0,2
<i>Candida sp.</i>	37,4±1,2
<i>Cryptococcus</i>	75,0±2,4
<i>Cryptococcus neoformans</i>	50,0±3,5
<i>Cryptococcus laurentia</i>	27,8±1,4
<i>Cryptococcus sp.</i>	22,2±2,3
<i>Prototheca wikerchamii</i>	45,8±1,9
<i>Rhodotorula minuta</i>	41,6±1,7
<i>Torulopsis glabrata</i>	3,2±0,5

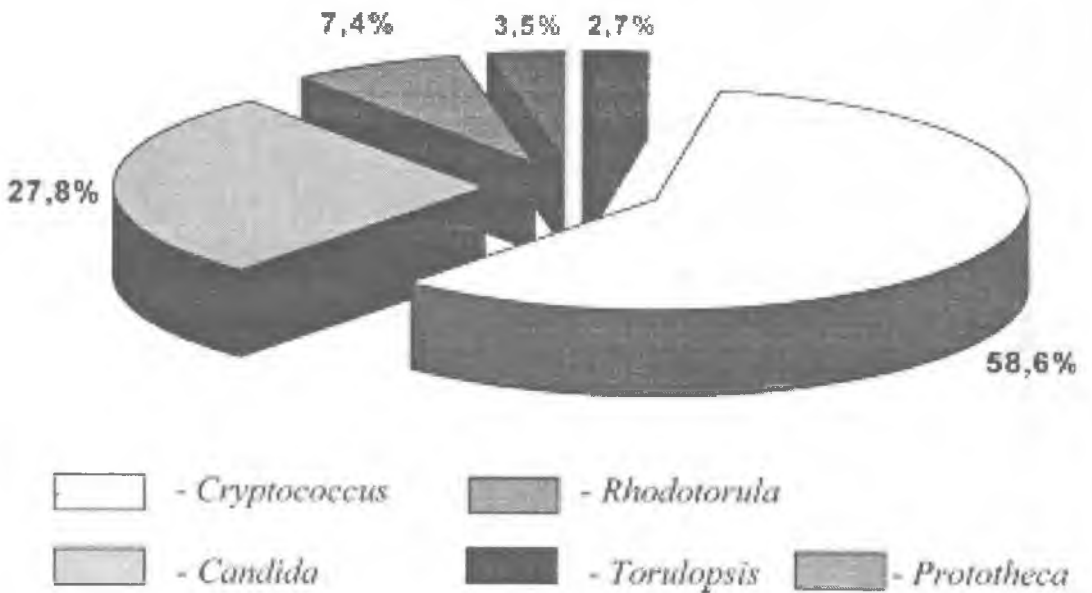


Рис. 1. Усереднені дані за питомою вагою чисельності різних представників дріжджеподібних грибів, що контамінують слизову шлунка

Таблиця 4

Чутливість виділених штамів дріжджеподібних грибів до антибіотиків

Антибіотик	Кількість чутливих штамів			
	<i>Cryptococcus</i>		<i>Candida</i>	
	абс.	%	абс.	%
Цефазолін	6	35,3	0	0
Фузідін	7	41,2	0	0
Неоміцин	10	58,8	0	0
Тоброміцин	8	47,1	0	0
Кліндаміцин	10	58,8	0	0
Доксіциклін	12	70,6	2	12,5
Олеандоміцин	8	47,1	0	0
Ріфампіцин	9	52,9	3	17,6
Левоміцетин	8	47,1	2	12,5
Амфотеріцин В	4	23,5	14	87,5
Ністатин	4	23,5	16	100
Клотрімазол	11	64,7	16	100
Всього штамів	17		16	

Як видно з таблиці 4, представники роду *Cryptococcus* найбільшу чутливість виявили у відношенні доксіцикліну і клотрімазолу. До кліндаміцину, неоміцину, ріфампіцину виявилися чутливими близько 50% штамів. Найменшу чутливість криптококки виявляли до дії амфотеріцину В і ністатину.

Що стосується грибів роду *Candida*, то 100 % штамів були чутливими до ністатину і клотрімазолу, 87,5 % — до амфотеріцину. При цьому 100 % штамів резистентні до дії цефазоліну, фузідіну, неоміцину, тоброміцину, кліндаміцину і oleандоміцину. До доксіцикліну, ріфампіцину, левоміцетину гриби роду *Candida* виявили слабку чутливість.

Виходячи з одержаних даних, слід відмітити, що виділені дріжджеподібні гриби відрізнялися ступенем чутливості до досліджуваних антибіотиків. На гриби роду *Candida* впливали переважно протигрибкові препарати, тоді як на дріжджеподібні гриби роду *Cryptococcus* — антибіотики широкого спектру дії.

Таким чином, в результаті проведених досліджень було встановлено, що одним із факторів, які впливають на ступінь обсіменіння мі-

кроорганізмами слизової шлунка і якісний склад мікробіоти, є рН шлункового соку.

Слизова шлунка у осіб з різними гастродуоденальними патологіями значною мірою контамінована дріжджеподібними грибами, переважно родів *Cryptococcus* і *Candida*. Причому деякі представники цих родів, зокрема *Cryptococcus neoformans* і *Candida albicans*, за даними літератури [7, 14, 15], є патогенними для людини дріжджами, що викликають різні грибкові ураження та інвазію, і грають, очевидно, не останню роль у розвитку виразкових хвороб.

З'ясовано, що за наявності у біоптатах *Helicobacter pylori* питома вага дріжджеподібних грибів значно нижча, ніж за його відсутності, тобто виявлено зворотну залежність у кількісних співвідношеннях *Helicobacter pylori* і дріжджеподібних грибів.

Висновки

1. Одним із факторів, які впливають на ступінь обсіменіння мікроорганізмами слизової шлунку і якісний склад мікробіоти, є рН шлункового соку.
2. Слизова шлунка у осіб з різними гастродуоденальними патологіями значною мірою контамінована дріжджеподібними грибами, переважно родів *Cryptococcus* і *Candida*.
3. За наявності у біоптатах *Helicobacter pylori* питома вага дріжджеподібних грибів значно нижча, ніж за його відсутності.
4. На гриби роду *Candida* впливали переважно протигрибкові препарати, тоді як на дріжджеподібні гриби роду *Cryptococcus* — антибіотики широкого спектру дії.

Література

1. Крылов А. А., Земляной А. Г., Михайлович В. А., Иванов А. И. Неотложная гастроэнтерология: руководство для врачей. — Л.: Медицина. — 1988. — С. 10—12.
2. Борисов Л. Б. Медицинская микробиология, вирусология, иммунология. — М.: ООО "Медицинское информационное агентство", 2002. — С. 606—633.
3. Минаев В. И., Черкасский Б. Л., Минаева Н. З. Лабораторная диагностика компиобактериоза в современных условиях // ЖМЭИ. — 1991. — № 8. — С. 18—21.
4. Хмельницкий О. К., Аравийский Р. А. Кандидоз // Патол., анатомия, химиотерапия. — Л.: Медицина. — 1984. — 199 с.
5. Баженов Т. Г., Перепелова И. Н. *Helicobacter pylori* и грибы рода *Candida* при гастродуоденальной патологии // ЖМЭИ. — 1997. — № 3. — С. 100—101.
6. Ильченко А. А., Коршиков В. М., Аруин Л. И. Микрофлора кишечника и кислотообразующая функция желудка у больных язвенной болезнью с пилорическим хеликобактериозом // ЖМЭИ. — 1991. — № 10. — С. 17—19.
7. Елинов Н. П. Патогенные дрожжеподобные организмы. — М.: Медицина, 1964. — 384 с.
8. Кашкин Л. Н., Хохряков М. К., Кашкин Л. П. Определитель патогенных, токсигенных и вредных для человека грибов. — М.: Медицина, 1979. — 270 с.
9. Ивашкин В. Г. *Helicobacter pylori*: биологические характеристики, патогенез, перспективы, эрадикация // Рос. журн. гастроэнтерол., гепатол., колопрот. — 1997. — № 1. — С. 21—23.

10. Голубев В. И. Таксономия и идентификация дрожжеподобных грибов рода *Cryptococcus*. — Пушино: НЦБИ, 1980. — 90 с.
11. Медицинская микробиология / Под ред. акад. РАМН В. И. Покровского. — М.: ГЭОТАР-МЕД, 2001. — С. 505—523.
12. Behrend G. Yeasts. — Amsterdam, 1952. — 241 p.
13. Benham R. W. The genus *Cryptococcus* the present status and the criteria for the identification of species // Trans New York Acad. Sci. — 1955. — 11, № 17. — P. 418—430.
14. Лещенко В. М. Лабораторная диагностика грибковых заболеваний. — М.: Медицина, 1982. — 143 с.
15. *Manual of Clinical Microbiology* / Editor in Chief, Albert Balows. — Washington, American Society for microbiology. — 1991. — 1364 p.

О. П. Конарева, В. А. Иваница, С. П. Гвоздий, О. В. Шпортун
Одесский национальный университет им. И. И. Мечникова,
ул. Дворянская, 2, Одесса, 65026, Украина;

Институт микробиологии и вирусологии НАН Украины,
ул. Заболотного, 154, Киев, 03143, Украина

ХАРАКТЕРИСТИКА ДРОЖЖЕПОДОВОЙ МИКРОБИОТЫ ЖЕЛУДКА ПРИ РАЗЛИЧНЫХ ГАСТРОДУОДЕНАЛЬНЫХ ПАТОЛОГИЯХ НА ФОНЕ ХЕЛИКОБАКТЕРИОЗА

Резюме

Изучена дрожжеподобная микробиота слизистой желудка больных с различными гастродуоденальными патологиями на фоне хеликобактерной инфекции.

Установлена зависимость степени обсеменения желудка дрожжеподобными грибами и *Helicobacter pylori* от pH желудочного сока: при pH 1—3 слизистая желудка преимущественно контаминирована *Helicobacter pylori*, при pH 5—7 — дрожжеподобными грибами.

Выделено 38 штаммов дрожжеподобных грибов, которые были отнесены к 5 родам: *Candida* (16 штаммов), *Cryptococcus* (17), *Prototheca* (3), *Rhodotorula* (1) и *Torulopsis* (1).

Изучена чувствительность выделенных штаммов к антибиотикам. Показано, что дрожжеподобные грибы рода *Cryptococcus*, в отличие от представителей рода *Candida*, в большей степени чувствительны к антибиотикам широкого спектра действия, нежели к противогрибковым препаратам.

Ключевые слова: дрожжеподобные грибы, *Helicobacter pylori*, гастродуоденальные патологии, pH желудочного сока.

O. P. Konareva, V. A. Ivanitsa, S. P. Gvosdiy, O. V. Shportun

I. I. Mechnikov Odessa National University,
Institute of Microbiology and Virology,
National Academy of Sciences of Ukraine, Kiev

**CHARACTERISTIC OF STOMACH YEAST-LIKE MICROBIOTA IN
VARIOUS GASTRODUODENAL PATHOLOGIES ON THE
BACKGROUND OF PYLORIC HELICOBACTERIOSIS**

Summary

The yeast-like microbiota of stomach mucosa in patients with various gastroduodenal pathologies complicated by helicobacterial infection has been studied.

The dependence of stomach contamination upon yeast-like fungi and *Helicobacter pylori* from gastric juice pH has been established: the stomach mucosa was contaminated mostly by *Helicobacter pylori* at pH 1—3 and mostly by yeast-like fungi at pH 5—7.

38 strains referred to five genera have been isolated: *Candida* (16 strains), *Cryptococcus* (17), *Prototheca* (3), *Rhodotorula* (1) i *Torulopsis* (1).

Sensitivity of the isolated strains to antibiotics has been studied. It was shown that yeast-like fungi of genus *Cryptococcus* unlike the representatives of genus *Candida* are more sensitive to wide-spectrum antibiotics than to antifungal medicines.

Keywords: yeast-like fungi, *Helicobacter pylori*, gastroduodenal pathologies, pH of gastric juice.