

О МИКРОФЛОРЕ КАЛА ПРИ ДИФИЛЛОБОТРИОЗЕ

К. ВИЛЛАКО,
кандидат медицинских наук

Ю. ПАВЕЛ,
кандидат ветеринарных наук

По данным К. П. Виллако и Л. А. Ханге (1959), широкий лентец (*Diphyllobothrium latum* L.) вырабатывает вещества, которые задерживают *in vitro* рост ряда микробов, в том числе кишечной палочки. Далее, К. П. Виллако и Л. А. Виллако (1960), определяя суточное выделение фенолов в моче, показали, что выделение летучих фенолов при дифиллоботриозе увеличивается. Это заставляет предположить наличие изменений в микрофлоре кишечника у больных дифиллоботриозом.

Основываясь главным образом на этих работах, К. П. Виллако (1961) пришел к выводу, что изменения микрофлоры кишечника должны играть наряду с другими факторами существенную роль в патогенезе дифиллоботриозной анемии.

Настоящая работа имеет задачей установить, наблюдаются ли в микрофлоре кала больных дифиллоботриозом существенные отклонения по сравнению с контролем.

Так как методы обстоятельного исследования микрофлоры кала крайне сложны и требуют большой затраты времени, то ограничивались определением двух групп микробов — колиподобных бактерий (Carpenter, Fulton, 1937; Ewing, 1949; Williams, English, 1950; Levine, Tanimoto, 1954) и «лактобактерий». Под колиподобными бактериями подразумевались грам-отрицательные палочки, способные сбраживать лактозу в течение 48 часов. Термин «лактобактерии» относится к грам-положительным, не образующим споры микробам, растущим в подкисленном глюкозном агаре.

Было обследовано 17 больных с дифиллоботриозом, из них 12 мужчин и 5 женщин. Возраст больных колебался от 9 до 60 лет (в среднем 40 лет). У 5 больных был произведен контроль количества тех же микробов в кале после удаления паразита. Больные были госпитализированы в терапевтическом, хирургическом и неврологическом отделениях Тартуской клинической больницы с различными диагнозами. Лишь в одном случае причиной госпитализации была дифиллоботриозная анемия. У остальных больных дифиллоботриоз был обнаружен случайно.

Контрольную группу составили больные в количестве 31, находившиеся в терапевтическом отделении той же больницы, у которых общее состояние было удовлетворительным и нарушения деятельности пищеварительного тракта отсутствовали. Ни один из подвергнувшихся исследованию больных не получал антибиотиков до взятия пробы кала. В контрольной группе было 13 мужчин и 18 женщин в возрасте от 26 до 75 лет (в среднем 49 лет).

Исследуемая проба бралась стерилизованной стеклянной палочкой из средних частей свежей фекальной массы, наносилась на кусочек стерильной фильтровальной бумаги (размером в 1×2 см) и взвешивалась на торсионных весах. Затем эта проба помещалась в стерилизованную пробирку и хранилась в холодильнике в течение 24-х часов. После этого проба поступала на бактериологическое исследование. С этой целью проба кала суспендировалась в стерильной водопроводной воде с таким расчетом, чтобы концентрация суспензии кала оказалась равной 10 мг/мл. Изготовленная таким образом суспензия кала использовалась в качестве исходной. Из нее получен ряд последовательных разведений в лакмусовом молоке, с содержанием исследуемого кала соответственно $1,0$; $1 \cdot 10^{-1}$; $1 \cdot 10^{-2}$; $1 \cdot 10^{-3}$; $1 \cdot 10^{-4}$; $1 \cdot 10^{-5}$ и $1 \cdot 10^{-6}$ мг/мл.

Для количественного определения колиподобных микробов из четвертой и двух последних пробирок высеяли по 0,1 мл разведения в расплавленный и затем охлажденный бромтимолблау—лактозный агар (рН 7,1) и налили в стерильные чашечки Петри. Определение количества «лактобактерий» производили по методу А. И. Улендеева (1954). Для количественного вычисления лактобактерий основой служило второе разведение. Оценку результатов при количественном определении как колиподобных бактерий, так и лактобактерий производили через 48 часов.

Исследование лактобактерий выяснило, что при использовании рекомендуемого А. И. Улендеевым метода в подкисленном глюкозном агаре наряду с *Lactobacterium acidophilum* растут также энтерококки и другие микробы. При помощи указанного метода нам удалось только в одном случае изолировать *Lactobacterium acidophilum* в виде почти чистой культуры. В остальных случаях преобладали энтерококки, в единичных случаях до 50% также колиподобные бактерии и в меньшей мере бациллы. Хотя использованный нами метод разведений и не отличается особенной точностью, он все же позволяет получить после соответствующей статистической обработки достаточно ясную картину изменений в микрофлоре кала. Исследования, проведенные в контрольной группе, показали, что абсолютное количество как колиподобных бактерий, так и лактобактерий в кале даже при нормальных условиях колеблется в больших пределах (табл. 1). Такой результат находится в соответствии с литературными данными (Nergmann, Hoffmann, 1959).

В одном мг кала было обнаружено от $1 \cdot 10^7$ до $190 \cdot 10^7$ колиподобных бактерий и от $0,7 \cdot 10^4$ до $140 \cdot 10^4$ лактобактерий. Лишь в отдельных случаях количество микробов обоого вида было сравнительно незначительным или же особенно большим.

При сравнении результатов исследования кала больных дифиллоботриозом с результатами, полученными в контрольной группе, выяснилось, что при дифиллоботриозе в кале имеют место еще большие колебания количества колиподобных микробов и лактобактерий. У больных дифиллоботриозом было обнаружено от $1 \cdot 10^7$ до $1000 \cdot 10^7$ колиподобных микробов и от 0,1 до $130 \cdot 10^4$ лактобактерий.

Как показал статистический анализ с определением множителя корреляции Спермана (ρ), между количествами обнаруженных в кале колиподобных микробов и лактобактерий существует определенная корреляция и в контрольной группе и в группе больных дифиллоботриозом. В контрольной группе $\rho = 0,8$ (ρ является достоверным, так как вероятность нулевой гипотезы $p < 0,01$) и у больных дифиллоботриозом $\rho = 0,7$ (ρ достоверно, так как вероятность нулевой гипотезы $p < 0,01$). Однако вследствие больших колебаний абсолютных чисел оценка результатов оказалась затруднительной и нецелесообразной. Поэтому для

характеристики результатов исследования кала использовали еще отношение количеств, обнаруженных в одном мг кала колиподобных микробов и лактобактерий. В таблице 1 результаты исследования расположены в порядке возрастания этого отношения.

Таблица 1

Результаты исследования в контрольной группе
и у больных с дифиллоботриозом

| Контрольная группа | | | | Больные с дифиллоботриозом | | | |
|--------------------|--------------------------------------|------------------------------|---------------|----------------------------|--------------------------------------|------------------------------|---------------|
| № | Количество колиподобных микробов (к) | Количество лактобактерий (л) | Отношение к/л | № | Количество колиподобных микробов (к) | Количество лактобактерий (л) | Отношение к/л |
| 1 | $1 \cdot 10^7$ | $20 \cdot 10^4$ | 50 | 1 | $1 \cdot 10^7$ | $5 \cdot 10^4$ | 200 |
| 2 | $1 \cdot 10^7$ | $7 \cdot 10^4$ | 140 | 2 | $15 \cdot 10^7$ | $33 \cdot 10^4$ | 452 |
| 3 | $4 \cdot 10^7$ | $20 \cdot 10^4$ | 200 | 3 | $7 \cdot 10^7$ | $15 \cdot 10^4$ | 470 |
| 4 | $3 \cdot 10^7$ | $11 \cdot 10^4$ | 270 | 4 | $1 \cdot 10^7$ | $0,73 \cdot 10^4$ | 1333 |
| 5 | $7 \cdot 10^7$ | $21 \cdot 10^4$ | 330 | 5 | $90 \cdot 10^7$ | $66 \cdot 10^4$ | 1360 |
| 6 | $3 \cdot 10^7$ | $7,2 \cdot 10^4$ | 417 | 6 | $94 \cdot 10^7$ | $64 \cdot 10^4$ | 1469 |
| 7 | $46 \cdot 10^7$ | $100 \cdot 10^4$ | 460 | 7 | $130 \cdot 10^7$ | $66 \cdot 10^4$ | 1970 |
| 8 | $4,5 \cdot 10^7$ | $0,9 \cdot 10^4$ | 500 | 8 | $30 \cdot 10^7$ | $13 \cdot 10^4$ | 2310 |
| 9 | $3 \cdot 10^7$ | $5,3 \cdot 10^4$ | 566 | 9 | $8 \cdot 10^7$ | $3 \cdot 10^4$ | 2670 |
| 10 | $2 \cdot 10^7$ | $2,9 \cdot 10^4$ | 690 | 10 | $250 \cdot 10^7$ | $61 \cdot 10^4$ | 4100 |
| 11 | $30 \cdot 10^7$ | $43 \cdot 10^4$ | 700 | 11 | $250 \cdot 10^7$ | $61 \cdot 10^4$ | 4100 |
| 12 | $38 \cdot 10^7$ | $47 \cdot 10^4$ | 809 | 12 | $650 \cdot 10^7$ | $130 \cdot 10^4$ | 5000 |
| 13 | $3 \cdot 10^7$ | $3,5 \cdot 10^4$ | 860 | 13 | $550 \cdot 10^7$ | $78 \cdot 10^4$ | 7050 |
| 14 | $5 \cdot 10^7$ | $5,4 \cdot 10^4$ | 930 | 14 | $1000 \cdot 10^7$ | $130 \cdot 10^4$ | 7690 |
| 15 | $20 \cdot 10^7$ | $21 \cdot 10^4$ | 950 | 15 | $1 \cdot 10^7$ | $0,1 \cdot 10^4$ | 10 000 |
| 16 | $1 \cdot 10^7$ | $1 \cdot 10^4$ | 1000 | 16 | $1000 \cdot 10^7$ | $25 \cdot 10^4$ | 40 000 |
| 17 | $3 \cdot 10^7$ | $3 \cdot 10^4$ | 1000 | 17 | $1000 \cdot 10^7$ | $24 \cdot 10^4$ | 41 670 |
| 18 | $20 \cdot 10^7$ | $18 \cdot 10^4$ | 1110 | | | | |
| 19 | $80 \cdot 10^7$ | $62 \cdot 10^4$ | 1290 | | | | |
| 20 | $190 \cdot 10^7$ | $140 \cdot 10^4$ | 1360 | | | | |
| 21 | $7 \cdot 10^7$ | $5,1 \cdot 10^4$ | 1370 | | | | |
| 22 | $1 \cdot 10^7$ | $0,7 \cdot 10^4$ | 1430 | | | | |
| 23 | $8 \cdot 10^7$ | $5,3 \cdot 10^4$ | 1510 | | | | |
| 24 | $21 \cdot 10^7$ | $12 \cdot 10^4$ | 1750 | | | | |
| 25 | $73 \cdot 10^7$ | $41 \cdot 10^4$ | 1780 | | | | |
| 26 | $52 \cdot 10^7$ | $22 \cdot 10^4$ | 2367 | | | | |
| 27 | $140 \cdot 10^7$ | $58 \cdot 10^4$ | 2410 | | | | |
| 28 | $32 \cdot 10^7$ | $10 \cdot 10^4$ | 3200 | | | | |
| 29 | $80 \cdot 10^7$ | $24 \cdot 10^4$ | 3330 | | | | |
| 30 | $17 \cdot 10^7$ | $4,9 \cdot 10^4$ | 3469 | | | | |
| 31 | $88 \cdot 10^7$ | $21 \cdot 10^4$ | 4190 | | | | |

В контрольной группе в 25 случаях отношение между колиподобными микробами и лактобактериями составляло 50—2000, у пяти человек 2001—4000 и лишь в одном случае было более высоким (4200). Из семнадцати больных дифиллоботриозом у одиннадцати упомянутое отношение достигало 4500, что соответствует пределу колебаний в контрольной группе. Однако у шести больных это отношение было значительно более высоким, достигая 41 700 (табл. 2).

Один из шести последних больных был госпитализирован с типичной дифиллоботриозной анемией. При фракционированном исследовании желудочного сока и у этого больного во всех фракциях было обнаружено отсутствие свободной соляной кислоты. Количество колиподобных бактерий на 1 мг кала составило при этом $1000 \cdot 10^7$ и лактобактерий

$25 \cdot 10^4$. Следовательно, отношение между обеими группами микробов было равно 40 000. При этом следует отметить, что у тех исследованных больных, у которых обнаружилось отсутствие желудочной секреции соляной кислоты и которые вследствие этого не были включены в контрольную группу, регулярно находили высокие величины отношения колиподобных микробов и лактобактерий.

Еще более высокое отношение (41 700) наблюдалось у больного, у которого, помимо дифиллоботриоза, нашли аскаридоз и трихоцефалоз. Один больной, у которого в процессе настоящего исследования отношение колиподобных микробов и лактобактерий составляло 7700, за год до этого лечился от дифиллоботриозной анемии.

Все шесть больных с высоким отношением колиподобных микробов и лактобактерий жаловались на явления, вызванные метеоризмом, на ощущение тяжести и неопределенные боли в животе. Подобные явления не были отмечены у больных дифиллоботриозом, у которых это отношение было низким.

Сравнение полученных в контрольной группе и при дифиллоботриозе отношений колиподобных микробов и лактобактерий было осуществлено при помощи теста Крускал-Уоллиса (Siegel, 1956). Выяснилось, что $\chi^2 = 13,4$, $p < 0,01$, а это показывает, что различие между рассматриваемыми группами является существенным.

После изгнания широкого лентеца у четырех больных из пяти отношение колиподобных микробов и лактобактерий оставалось в течение десяти дней более высоким, чем в контрольной группе. Так как количество исследованных больных в этой группе было весьма невелико и кал был взят по истечении различных сроков после удаления паразита, то на основании проведенных исследований нельзя сделать каких-либо определенных выводов (табл. 2).

Из приведенных данных следует, что примерно у $1/3$ больных дифиллоботриозом в микрофлоре кишечника наблюдаются отклонения от контроля. С этими отклонениями связаны метеоризм, чувство тяжести в животе и прочие диспептические нарушения, которые исчезают после изгнания паразита. Неразрешенным остается вопрос, почему широкий лентец у части больных вызывает изменения микрофлоры кишечника, у другой же части не вызывает. Причина этого явления может заключаться как в макроорганизме, так и в паразите. Оно может быть обусловлено, с одной стороны, образом жизни и питанием больного, с другой стороны, не исключена возможность, что жизнедеятельность отдельных экземпляров широкого лентеца в известной степени различна.

В настоящее время является общепризнанным мнение, что микро-

Таблица 2

Распределение исследованных на основании отношения колиподобных микробов (к) и лактобактерий (л)

| Отношение к/л | В контрольной группе | У больных с дифиллоботриозом | После изгнания паразита | Всего исследованных |
|---------------------|----------------------|------------------------------|-------------------------|---------------------|
| 50—4 500 | 31 | 11 | 1 | 43 |
| 4 501—9 000 | — | 3 | 2 | 5 |
| 9 001—13 500 | — | 1 | 1 | 2 |
| 27 001—31 500 | — | — | 1 | 1 |
| 36 001—40 500 | — | 1 | — | 1 |
| 40 501—45 000 | — | 1 | — | 1 |
| Всего исследованных | 31 | 17 | 5 | 53 |

флора кишечника играет важную роль в снабжении организма человека витаминами, и особенно витамином В₁₂. В известных условиях, например при наличии так называемой слепой петли тонкого кишечника, изменения микрофлоры могут вызвать обеднение макроорганизма витамином В₁₂ и развитие мегалобластической анемии. В настоящей работе установлено, что у части больных при дифиллоботриозе происходят существенные изменения микробного состава кишечника. Представляется возможным и то, что в результате жизнедеятельности широкого лентеца изменяется обмен веществ микробов, населяющих кишечник. Все это вместе взятое позволяет сделать вывод, что изменения в микрофлоре при дифиллоботриозе представляют собой один из возможных факторов, способствующих возникновению дефицита витамина В₁₂ в организме.

Выводы

1. Количество колиподобных микробов и лактобактерий в кале человека показывает большие колебания уже при нормальных условиях. Отношение количества этих микробов также варьирует. Однако особенно большие колебания этих величин наблюдаются при дифиллоботриозе.

2. Примерно у $\frac{1}{3}$ больных дифиллоботриозом отношение колиподобных микробов и лактобактерий в кале заметно повысилось. У этих же больных наблюдались и диспептические явления, которые отсутствуют в тех случаях, когда указанное отношение находится в пределах нормы.

3. Изменения в микрофлоре кишечника следует рассматривать как один из дополнительных факторов, способствующих возникновению дифиллоботриозной анемии.

Авторы настоящей работы выражают глубокую благодарность доценту Тартуского государственного университета Л. Выханду за ценные советы по вопросу о статистической обработке материала.

ЛИТЕРАТУРА

- К. П. Виллако, 1961. К патогенезу дифиллоботриозной анемии. Клинич. медицина, № 8, 25—29.
- К. П. Виллако, Л. А. Виллако, 1960. Расстройства питания и обмена веществ при дифиллоботриозе. Кн. Вопросы питания здорового и больного человека, стр. 99—106. Рига.
- К. П. Виллако, Л. А. Ханге, 1959. Антибиотическое действие экстрактов широкого лентеца. Тр. совещ. по пробл. физиол. и патологии пищеварения, 28. VI—2. VII 1957, стр. 190—192. Тарту.
- А. И. Улендеев, 1954. О методике выделения и подсчета ацидофильных бактерий. Сб. научн. тр. Ивановского с.-х. ин-та, № 12, 226—230.
- F. L. Carpenter, M. Fuiton, 1937. Escherichia-aerobacter intermediates from human feces. Amer. J. Public Health, 27, 8, 822—827.
- W. H. Ewing, 1949. The relationship of Shigella dispar to certain coliform bacteria. J. Bacteriol., 58, 4, 497—500.
- W. Herrmann, K. Hoffmann, 1959. Die Bedeutung der heutigen «Dysbakterie» — Forschung für die Diagnose von Erkrankungen des Verdauungsapparates. Med. Monatsschr., 13, 4, 203—207.
- M. Levine, R. H. Tanimoto, 1954. Antagonisms among enteric pathogens and coliform bacteria. J. Bacteriol., 67, 5, 537—541.
- S. Siegel, 1956. Nonparametric statistics. New York.
- O. B. Williams, I. D. English, 1950. Phenol production by coliform bacteria. J. Bacteriol., 60, 1, 101—102.

Тартуский государственный университет
Институт экспериментальной биологии
Академии наук Эстонской ССР

Поступила в редакцию
2. II 1962

ROOJA MIKROFLOORAST DIFÜLLOBOTRIOOSI KORRAL

K. Villako,
meditsiinikandidaatÜ. Pavel,
veterinaariakandidaat

Resümee

31 isikul, kel ei esinenud difüllobotrioosi, ja 17 difüllobotrioosihaiigel määrati 1 mg roojas koliformsete mikroobide ja laktobakterite hulk ning arvutati nende suhe. Saadud näitajaid kasutati rooja mikrofloora iseloomustamiseks.

Leiti, et koliformsete mikroobide ja laktobakterite hulk ning nende suhe kõikusid kontrollrühmas üsna suurtes piirides. Veelgi suuremaid kõikumisi esines difüllobotrioosi korral. Erinevus kontrollrühmast difüllobotrioosi puhul on statistiliselt oluline. Umbes ühel kolmandikul difüllobotrioosihaiigel oli see suhe märksa suurem kui neil, kel difüllobotrioosi ei esinenud. Samadel haigetel leiti düseptilisi häireid, mis puudusid koliformsete mikroobide ja laktobakterite madalama suhte korral. Sellest järeldatakse, et laius tekitab vähemalt osal haigeil soole mikroflooras muutusi. Viimaseid peetakse üheks difüllobotrioosse aneemia väljakujunemist soodustavaks faktoriks.

Tartu Riiklik Ülikool

Eesti NSV Teaduste Akadeemia
Eksperimentaalbioloogia InstituutSaabus toimetusse
2. II 1962

MICROFLORA OF FAECES IN DIPHYLLOBOTHRIASIS

K. Villako, Ü. Pavel

Summary

The number of coliform bacteria and lactobacteria was determined in 1 mg of faeces taken from 31 persons not suffering from diphylobotriasis and from 17 patients with diphylobotriasis; the ratio of these groups of bacteria was calculated. The values obtained were used as indicators to characterize the microflora of faeces.

It was found that the amount of coliform bacteria and of lactobacteria in the persons of the control group and their ratio fluctuate within considerable limits. In diphylobotriasis the fluctuations in the corresponding amounts were found to be still greater. The difference between the control group and the patients suffering from diphylobotriasis is statistically significant. About one-third of the patients with diphylobotriasis revealed a considerably larger ratio described above than those not infected with *Diphylobotrium latum*. It was also established that the same patients were suffering from dyspeptic disturbances which were lacking in the case of a lower ratio of coliform bacteria and lactobacteria. It is concluded from the above that the fish tapeworm causes changes in the intestinal microflora of at least one part of the patients. These changes are regarded as an additional factor promoting the development of diphylobotriosis anaemia.

Tartu State University

Academy of Sciences of the Estonian S.S.R.,
Institute of Experimental BiologyReceived
Febr. 2nd, 1962