Ходоодны хорт хавдартай өвчтөний ходоодны салстаас *Enterococcus*-ийн төрөл зүйлийг тогтоож судалсан дүн

Б.Идэрцэцэг[1], Н.Бира[1,2], Б.Галиндэв[3], Т.Хосбаяр[4,5], Д.Даваадорж[1,2], Х.Оюунцэцэг[2], Б.Гантуяа[1,2]

[1]АШУҮИС, АУС, Хоол боловсруулах эрхтэн судлалын тэнхим
[2]АШУҮИС, Монгол Япон эмнэлэг, Хоол боловсруулах эрхтэн судлалын тасаг
[3]АШУҮИС, Био анагаахын хүрээлэн,туршилтын амьтны лаборатори
[4]АШУҮИС, Клиник лабораторийн тэнхим
[5]АШУҮИС, Эмнэлзүйн молекул оношилгооны төв
Цахим шуудан: ikob579@gmail.com, Утас: 88612492

Түлхүүр үг:

Эдийн шинжилгээ
бактерийн өсгөвөр
Хоруу чанар
Тэжээлт орчин

Товч утга:

Үндэслэл: Ходоодны хорт хавдрын гол шалтгаан нь *H. pylori*–ийн халдвар гэж үздэг ч 16S рибосомын РНХ-ийн ампликон секвенсийн аргад үндэслэн хийсэн бидний сүүлийн үеийн судалгаагаар ходоодны хорт хавдартай өвчтөнүүдийн ходоодны салст бүрхүүлд *H. pylori*-аас гадна бусад төрлийн нянгийн бүрдлүүд байдаг болох нь тогтоогдсон. Эдгээрийн нэг нь *Enterococcus*-ийн төрөл байсан бөгөөд үүнийг цаашид зүйлийн түвшинд ялган дүйж нарийвчлан судлах шаардлага гарсан. **Зорилго:** Ходоодны хорт хавдартай өвчтөний ходоодны эдээс *Enterococcus*–ыг өсгөвөрлөн түүний төрөл зүйлийг ялган дүйх. **Арга, аргачлал:** Судалгааг туршилт судалгааны загвараар хийж гүйцэтгэсэн. Ходоодны хорт хавдартай, 16S рибосомийн РНХ-ийн ампликон секвенцийн аргаар *Enterococcus-ийн* халдвар илэрсэн өвчтөнүүдийг судалгаанд сонгон оруулсан. Ходоодны хорт хавдартай өвчтөнүүдээс авсан биопсийн сорьцыг бутлагчаар бутална, *Enterococcus spp* халдварыг 5-10%-ийн хүчилтөрөгчтэй, pH 7-10 орчинд, 37-45 хэмийн дулаантай хромаген агарт нэвчүүлсэн факультатив анаэроб орчинд бактерийг өсгөвөрлөв. Өсгөврийг грамын аргаар будаж, нянг ялган дүйх ажлыг VITEK® 2 COMPACT бүрэн автомат анализатор болон биохимийн арга ашиглан гүйцэтгэв. **Үр дүн:** Бид тэжээлт орчин ашиглан ходоодны хорт хавдартай өвчтөнөөс *Enterococcus spp*-ийг цэврээр өсгөвөрлөн авсан бөгөөд нянгийн таксономийн зүйлийн түвшинд *E.hirae* болохыг судалж тогтоолоо. **Дүгнэлт:** Ходоодны хорт хавдартай өвчтөний ходоодны эдэд *E.hirae* нян оршин байгааг илрүүллээ.

Үндэслэл: Монгол улс ходоодны хорт хавдрын өвчлөл, нас баралтаараа дэлхийд тэргүүлдэг[1-5]. Саяханыг болтол ходоодны хүчил ялгаруулдаг шинж чанараас үүдэн ходоодыг харьцангуй ариун эрхтэн гэж үзэж ирсэн бөгөөд зөвхөн *H. pylori* л ходоодны хүчиллэг орчинд амьдрах чадвартай хэмээн ойлгож ирсэн[6]. Сүүлийн үеийн судалгаагаар ходоодны салст бүрхүүлд ойролцоогоор 10^2–10^4 колон үүсгэх нэгж (КҮН)/мл бүхий микробиом байдаг болохыг тогтоосон[7]. Бик нарын 2006 онд ходоодны дурангийн шинжилгээгээр салст бүрхэвчийн биопси авч, биопсийн дээжинд ПГУ болон секвенсийн технологи ашиглан хийсэн судалгаагаар хүний ходоодонд 128 нэр төрлийн бактер оршиж буйг тогтоосон[8]. 16S рибосомын РНХ-ийн ампликон секвенсийн аргад үндэслэн хийсэн Б.Гантуяа нарын 2020 оны судалгаагаар ходоодны хорт хавдартай өвчтөнүүдэд *H. pylori*-аас гадна ходоодны хорт хавдрын хамааралтай хэд хэдэн кандидат нянгуудын төрлүүд тухайлбал: *Enterococcus, Lactobacilli, Fusobacter, Carnobacterium, Glutamicibacter, Parvimonas* нянгийн бүрдлүүд байдаг болох нь тогтоогдсон[9]. Эдгээрээс зарим ходоодны хорт хавдартай өвчтөнүүдийн дунд ихээр давамгайлан оршиж байсан нянгийн төрөл нь *Enterococcus*-ийн халдвар байсан нь уг судалгааг хийх үндэслэл болсон.

Зорилго: Ходоодны хорт хавдартай өвчтөний ходоодны эдээс *Enterococcus-ын* цэврээр өсгөвөрлөн түүний төрөл зүйлийг ялган дүйх зорилго тавин ажилласан.

Арга аргачлал: Судалгааг хийх ёс зүйн зөвшөөрлийг АШУҮИС-ийн судалгааны ёс зүйн хорооны 2021 оны 05 дугаар сарын 21-ний өдрийн хурлаар хэлэлцүүлэн судалгааны ажлыг эхлүүлэх ёс зүйн зөвшөөрөл авсан. (протокол №2021/3-06). Судалгааг туршилт судалгааны загвараар хийж гүйцэтгэсэн. Бид өмнөх судалгааны үр дүн дээрээ үндэслээд 16S рибосомийн РНХ-ийн ампликон секвенцийн аргаар нийт микробиомын 90%-иас дээш тохиолдолд *Enterococcus-ын* халдвар илэрсэн өвчтөнүүдийг энэхүү судалгаанд сонгон оруулсан.[4] Уг сонгогдсон ходоодны хорт хавдартай өвчтөнүүдээс авсан биопсийн сорьцыг бутлагчаар буталж, *Enterococcus spp*-ийн төрөл зүйлийг факултатив анаэроб нян 5-10% хүчилтөрөгчтэй орчин, pH=7-10 хүртэл 37°C температурт 24 цагийн турш CO_2-оор баяжуулсан орчинд хромаген агарт өсгөвөрлөсөн.

Нянгийн ялган дүйлтийг VITEK® 2 COMPACT бүрэн автомат машинаар тодорхойлсон. Тусгай тэжээлт орчин дээр тарьсан өсгөврөөс 1 колони тусгайлан 3мл физиологийн уусмалд 0.55 MacFarland тэнцэх булинга бэлтгэж грамм эерэг бактерийн төрлийг ялган дүйх ажлыг гүйцэтгэсэн.

Нянгийн төрөл зүйлийг ялган дүйх үүднээс нэмэлтээр биохимийн аргыг ашигласан. Шүвтэр илрүүлэх, индол илрүүлэх, хүхэрт устөрөгч илрүүлэх сорилийг гүйцэтгэж, пептоны ус, андредэгийн илрүүлэгч, исгэсэн махны усны шингэн орчныг бэлтгэж агааргүйтний чихэрлэг задлах идэвхийг тодорхойлсон.

Үр дүн: Бидний өмнөх судалгааны ажлын хүрээнд ходоодны хорт хавдартай өвчтөнд 16S рибосомийн РНХ-ын ампликон секвенсийн аргаар *Enterococcus*-ийн халдвар илэрсэн өвчтөнүүдийг энэхүү судалгаанд сонгон оруулсан бөгөөд өвчтөнөөс авсан эдийн шинжилгээ хийхэд салст бүрхүүлд кокк хэлбэрийн нянгийн халдвар оршин буй нь тогтоогдсон.

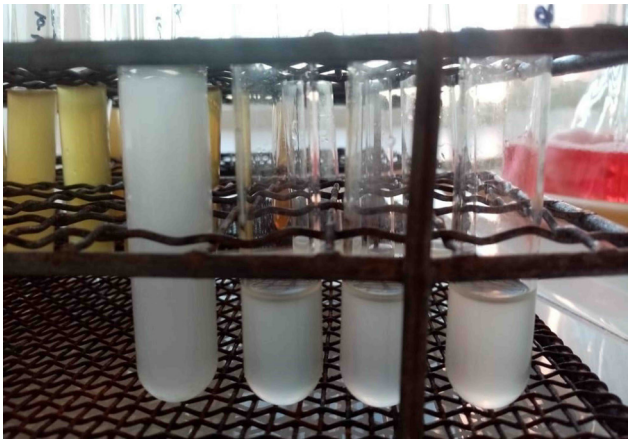
Бид энэхүү халдварыг цаашид нарийвчлан тогтоохын тулд сонгомол агар бүхий тэжээлт орчинд (Зураг 1) ба шингэн тэжээлт орчинд (Зураг 2) бактерийг өсгөвөрлөж, ургасан нянг грамын аргаар будаж харсан (Зураг 3).

Ходоодны хорт хавдартай өвчтөнөөс авсан хөлдөөж хадгалсан эдийг гэсгээж цустай агар бүхий тэжээлт орчинд өсгөвөрлөсөн. Колоны шинж чанар нь 24 цагийн ургалттай, бетта гемолиз буюу цайвар тунгалаг хүрээтэй цагаан өнгийн колони ургасан байдал (Зураг 1)



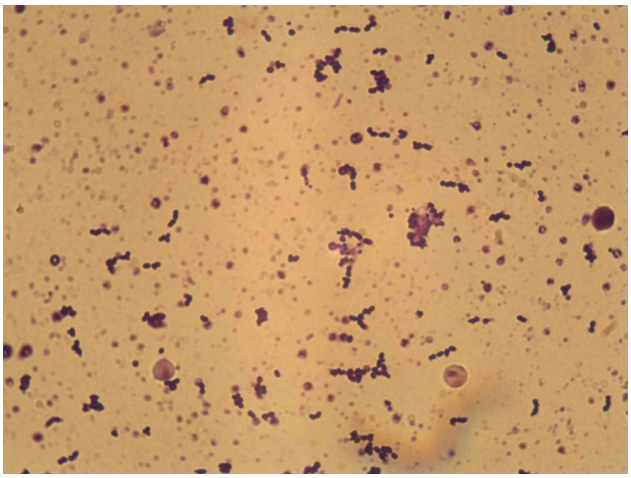
Зураг 1. Хромаген агарт *Enterococcus hirae* өсгөвөрлөсөн дүн

Энгийн мах пептоны шингэн тэжээлт орчинд *Enterococcus hirae* өсгөвөрлөхөд жигд булингар үүсч, хуруу шилний хананд өрөм цагираг үүсэж буйг зураг 2-т харуулсан.



Зураг 2. Энгийн мах пептоны шингэн орчинд өсгөвөрлөсөн байдал

Мах пептоны шөлнөөс дээж авч кристалвиолет будгаар будахад ихэвчлэн дангаараа ба хоёрлосон, гинжилсэн жижиг кокк илэрснийг зураг 3-т харууллаа.



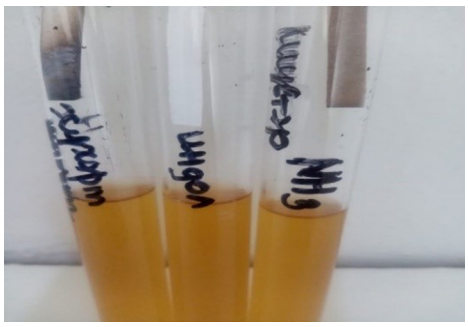
Зураг 3. Нянг грамын аргаар будсан байдал Өсгөлт 1300

Зураг 4-өөс харахад агааргүйтэн сахароз, глюкоз, фруктоз, галактоз, трехалоз, лактоз, мальтозыг задалж байсан бол рамноз, инулин, рафиноз, цардуул, сорбит, сорбоз, арабиноз, ксилоз, маннитыг задлаагүй.



Зураг 4. Агааргүйтний чихэрлэг задлах идэвхийг тодорхойлсон байдал

Enterococcus-ийн хүхэрт-устөрөгч ялгаруулж урвалжит цаас доод үзүүрээсээ эхлэн хар өнгөтэй болсон ба индол ба шүвтрийг ялгаруулаагүй (Зураг 5).



Зураг 5. Мак пептоны элэгтэй шөлөнд хүхэрт устөрөгч, индол, шүвтэрийн илрүүлэлт

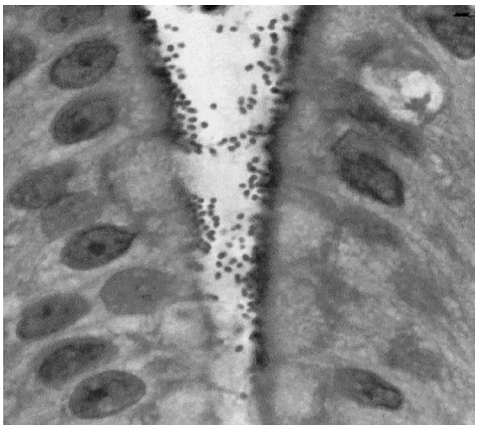
Цаашид ургасан нянд ялган дүйлт хийж нянгийн төрөл зүйлийг тодорхойлсон. Гялс лабораторийн VITEK® 2 COMPACT бүрэн автомат машинаар GP – грам эерэг кокк ба савханцар ялган дүйх cassette уншуулан *Enterococcus hirae* болохыг 95%-ийн магадлалтай тодорхойлсон.

Хүснэгт 1. *Enterococcus hirae*-ийг ялган дүйсэн байдал

Identification innformation	**Card:** GP	**Lot number:**2421467403	**Expires:**Dec2, 2021 12:00 CTS
	Completed: Feb 2,2021 16:50 CTS	**Status**:Final	**Analysis Time:**5,78 hours
Organism origin	Vitek 2		
Selected Organism	95% Probability ***Enterococcus hirae***		
	Bionumber:1366003365733671 **Confidence:** Very good identification		

Хэлцэмж: Дэлхий дахинд өнөөг хүртэл ходоодны хорт хавдрын шалтгааныг тогтоох судалгааны ажлууд хийгдсээр байна. Бид энэхүү судалгаагаар ходоодны хорт хавдартай өвчтөнд *H. Pylori*-аас гадна бусад нянгийн төрөл зүйл илэрч байгааг судлан тогтоолоо. 16S рибосомийн РНХ-ын ампликон секвенцийн аргад суурилсан бидний өмнөх судалгаанд ходоодны хорт хавдартай өвчтөнүүдэд хэд хэдэн кандидат нянгийн төрлүүдийг илрүүлсэн бөгөөд энэхүү судалгааны хүрээнд *Enterococcus* - ийн төрлийн тухайлсан нянг өсгөвөрлөж зүйлийн түвшинд ялган дүйлт хийж нарийвчлан тогтоолоо.

E.hirae цустай агар бүхий тэжээлт орчинд өсгөвөрлөхөд 24 цагийн ургалттай, цайвар тунгалаг хүрээтэй цагаан өнгийн колони ургасан. *Enterococcus* нь грам эерэг, факультатив агааргүй коккуудын комменсал бактери юм. *Enterococcus* мал амьтны өтгөнөөр ялгардаг ялангуяа сүүн тэжээлтэн амьтдын хоол боловсруулах замд оршдог. Эмнэлзүйн практикт *Enterococcus*-тай хамааралтай ходоодны үрэвсэл үүссэн талаар судалгааны баримт нотолгоо хэвлэгдсэн байдаг. Дурангийн шинжилгээгээр идэвхийтэй голомтот гастрит илэрсэн ба ходоодны салс бүрхүүлийн биопсийн сорьцонд грамм эерэг кокк бактер *E. hirae ба E. Durans-май* төстэй *Enterococcus*-ыг ургуулсан.



Зураг 6. Салст бүрхүүлийн гадаргуу дээр богиноссон урт гинж бүхий диплококк. (Карбол фуксин/Алцын хөх/гематоксилин эозин)

Kyoto дурангийн олон улсын ангиллаар Энтерококк-н шалтгаантай ходоодны үрэвслийг шинээр ангилалд оруулсан.[10]

Хүнд *E. hirae*–тай холбоотой ихэнх тохиолдолд цочмог пиелонефрит, нойр булчирхайн үрэвсэл, холангит, шээсний замын хүнд халдвар, спондилодисцит зэрэг өвчлөлүүдийг үүсгэж байгаа нь тогтоогджээ.[11]

Өнөөдрийг хүртэл *E. hirae*-ээс үүдэлтэй хүний эндокардит өвчний гурван тохиолдол бүртгэгдсэн байна.[11]

Чихрийн шижин өвчтэй 59 настай эрэгтэйд *Enterococcus*-тай холбоотой гастрит үүссэн тохиолдол бүртгэгдсэн бөгөөд[12] салст бүрхүүлийн биопсийн сорьцонд *H. pylori* байхгүй боловч хүнд хэлбэрийн идэвхтэй голомтот ходоодны үрэвслийн сорьцноос *E. hirae ба E. Durans-май* төстэй *Enterococcus*-ыг ургуулсан бол бидний судалгаагаар *E.hirae* –тай холбоотой ходоодны хорт хавдрын тохиолдлууд шинээр бүртгэгдэж байгаа нь дүйж байна.

Дүгнэлт: Ходоодны хорт хавдар бүхий Монгол өвчтөнд *E.hirae* нянгийн тохиолдлыг илрүүлж, төрөл зүйлийг нарийвчлан тодохойллоо.

Ном зүй:

1. *Globocan.com*
2. *Shin HR, Carlos MC, Varghese C. Cancer control in the Asia Pacific region: current status and concerns. Jpn J Clin Oncol. Oct 2012;42(10):867-81. doi:10.1093/jjco/hys077*
3. *Sung H, Ferlay J, Siegel RL, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. CA Cancer J Clin. May 2021;71(3):209-249. doi:10.3322/caac.21660*
4. *Nishino Y, Inoue M, Tsuji I, et al. Tobacco smoking and gastric cancer risk: an evaluation based on a systematic review of epidemiologic evidence among the Japanese population. Jpn J Clin Oncol. Dec 2006;36(12):800-7. doi:10.1093/jjco/hyl112*
5. *Montecucco C, Rappuoli R. Living dangerously: how Helicobacter pylori survives in the human stomach. Nat Rev Mol Cell Biol. Jun 2001;2(6):457-66. doi:10.1038/35073084*
6. *Yang J, Zhou X, Liu X, Ling Z, Ji F. Role of the Gastric Microbiome in Gastric Cancer: From Carcinogenesis to Treatment. Front Microbiol. 2021;12:641322. doi:10.3389/fmicb.2021.641322*
7. *Delgado S, Cabrera-Rubio R, Mira A, Suarez A, Mayo B. Microbiological survey of the human gastric ecosystem using culturing and pyrosequencing methods. Microb Ecol. Apr 2013;65(3):763-72. doi:10.1007/s00248-013-0192-5*
8. *Bik EM, Eckburg PB, Gill SR, et al. Molecular analysis of the bacterial microbiota in the human stomach. Proc Natl Acad Sci U S A. Jan 17 2006;103(3):732-7. doi:10.1073/pnas.0506655103*
9. *Gantuya B, El Serag HB, Matsumoto T, et al. Gastric mucosal microbiota in a Mongolian population with gastric cancer and precursor conditions. Aliment Pharmacol Ther. Apr 2020;51(8):770-780. doi:10.1111/apt.15675*
10. *Sugano K, Tack J, Kuipers EJ, et al. Kyoto global consensus report on Helicobacter pylori gastritis. Gut. Sep 2015;64(9):1353-67. doi:10.1136/gutjnl-2015-309252*
11. *Dolka B, Cisek AA, Szeleszczuk P. The application of the loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method for diagnosing Enterococcus hirae-associated endocarditis outbreaks in chickens. BMC Microbiol. 2019;19(1):48. Published 2019 Feb 21. doi:10.1186/s12866-019-1420-z*
12. *Ramchatesingh, H. e.-z. (October 2003). Enterococcus gastritis. Human Pathology, 34(9):944-5.*

Determination of *Enterococcus* species from patients with gastric cancer

Idertsetseg B[1], Bira N[1,2], Galindev B[3], Khosbayar T[4,5], Davaadorj D[1,2], Oyuntsetseg KH[2], Gantuya B[1,2]

[1]Department of Gastroenterology, School of Medicine, MNUMS
[2]Gastroenterology Unit, Mongolia Japan hospital of MNUMS
[3]Institute of Biomedicine, experimental animal laboratory, MNUMS
[4]Department of clinical laboratory, Mongolian National University of Medical Sciences
[5]Clinical molecular diagnostic center, Mongolian National University of Medical Sciences
E-mail: ikob579@gmail.com, Tel: 88612492

Background: Mongolia is the world leading country by in gastric cancer morbidity and mortality. The main cause of gastric cancer is *H. pylori* infection. A study fromB. Gantuya based on the amplicon sequencing method of 16S ribosomal RNA found that other types of bacteria were present in the stomach of patients with gastric cancer in addition to *H. pylori*. Among them *Enterococcus* infection was one of the most prevalent bacterial strains among patients with gastric cancer, was identified. Therefore, we conducted a study to differentiate the species by culturing *Enterococcus* infection from the stomach of a patient with gastric cancer.

Material and Methods: The study was conducted using a pilot study model. Patients with *enterococcus* infection were selected by amplicon sequencing of 16S ribosomal RNA in patients with gastric cancer. Biopsy specimens from patients with gastric cancer were homoginzed with a normal saline and cultured for *Enterococcus spp* infection in a facultative anaerobic environment with 5-10% oxygen, pH 7-10, and chromagen agar permeability at 37-45°C. Gram staining of cultures and bacteriological isolation.

Results: We cultured *Enterococcus spp* from a patient with gastric cancer using a culture medium and identified *E. hirae* at the bacterial taxonomic species level.

Conclusion: We found the presence of *E.hirae* in the gastric tissue of a patient with gastric cancer.

Keywords: biopsy, gastric cancer, bacterial culture