

**НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ  
ІНСТИТУТ МІКРОБІОЛОГІЇ І ВІРУСОЛОГІЇ ім. Д.К.ЗАБОЛОТНОГО**

**Липовська Вікторія Вікторівна**

УДК 578. 835. 11: 579. 252. 5 + 612. 017. 1: 616. 926: 578. 835. 11

**СЕЛЕКТИВНІ ОЗНАКИ ПАТОГЕННИХ ЕНТЕРОБАКТЕРІЙ, ЇХ ВПЛИВ НА  
МІКРОБІОЦЕНОЗ КИШЕЧНИКУ ТА ІМУННИЙ СТАТУС ОРГАНІЗМУ ЛЮДИНИ**

03.00.07 – мікробіологія

Автореферат  
дисертації на здобуття наукового ступеня  
кандидата біологічних наук

**КИЇВ – 2002**

Дисертацією є рукопис

Робота виконана у Сумському державному університеті Міністерства освіти і науки України

**Науковий керівник:** доктор медичних наук, професор  
**Савінова Олена Михайлівна,**  
Харківська медична академія  
післядипломної світи МОЗ України,  
професор кафедри клінічної імунології та мікробіології

**Офіційні опоненти:**

доктор біологічних наук, член-кореспондент НАН України, професор  
**Коваленко Надія Костянтинівна,** Інститут мікробіології і вірусології  
ім. Д.К.Заболотного НАН України, провідний науковий співробітник відділу фізіології  
промислових мікроорганізмів;

доктор медичних наук **Поліщук Олена Іванівна,** Інститут епідеміології та інфекційних хвороб ім.  
Л.В.Громашевського АМН України, завідувач лабораторії загальної мікробіології

**Провідна установа:**

Науково-дослідний Інститут урології та нефрології АМН України, м. Київ

Захист дисертації відбудеться 17 квітня 2002 р. о 10<sup>00</sup> годині на засіданні спеціалізованої  
вченої ради Д 26. 233.01 при Інституті мікробіології і вірусології ім. Д.К.Заболотного НАН України  
за адресою:

03143, м. Київ, вул. Заболотного, 154.

З дисертацією можна ознайомитися у бібліотеці Інституту мікробіології і вірусології ім.

Д.К.Заболотного НАН України за адресою:

03143, м. Київ, вул. Заболотного, 154

Автореферат розісланий “ 15 ” березня 2002 року.

Вчений секретар

спеціалізованої вченої ради,

кандидат біологічних наук

Пуріш Л.М.

## ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

**Актуальність теми.** На початку XXI сторіччя у нових соціальних умовах при наявності інтенсивних міграційних процесів гострі кишкові інфекції (ГКІ) займають значне місце в інфекційній патології [Т.Ф.Михайленко та співавт., 2000, Т.Г.Глушкевич, 2000].

Епідемічна ситуація по захворюваності на ГКІ в Україні за 1995-2000 рр. була напруженою. Інтенсивні показники за цей період коливалися в межах від 162,0 до 328,8 випадків на 100000 населення [А.М.Зарицький, 2000]. У північно-східному регіоні України у цей період основними збудниками ГКІ були патогенні ентеробактерії (ЕРЕС, *S. flexneri* 2a, *S. enteritidis*). Захворюваність на ці інфекції характеризувалась високим і мінливим рівнем, на який істотно впливали чисельні соціально-економічні, екологічні та епідеміологічні фактори, тому залишаються актуальними питання епідеміологічного моніторингу, які включали б не тільки спостереження за циркуляцією збудників кишкових інфекцій, вивчення змін їх біологічних, культуральних, серологічних та лізабельних властивостей, але і визначення маркерів, що детермінують селективні переваги збудника. Це дало б можливість прогнозувати епідемічну ситуацію не тільки на найближчий період, але й на більш віддалену перспективу.

Поряд з маркерами бактеріальної персистенції показовими є ознаки бактерій, зумовлені кон'югативними плазмідами [І.Е.Ляшенко, В.О.Гриценко, 1996]. У літературі майже відсутні дані про значимість плазміди  $F_d$  і  $F'$ -фактора. Роль фактора кон'югативності у ЕРЕС вивчена недостатньо. Стосовно  $F_d$ -плазміди встановлено тільки те, що вона циркулює у клітинах усіх видів роду *Shigella* і обумовлює донорську активність бактерій [О.М.Савінова та співавт., 1993]. Відсутні повідомлення про частоту поширення  $F$ - та  $F_d$ -плазмід серед інших патогенних ентеробактерій, які є провідними збудниками ГКІ. Немає в літературі даних і про практичну значимість  $F$ - і  $F_d$ - факторів генетичного переносу.

Підлягають подальшому дослідженню зміни мікробіоценозу товстої кишки в осіб, які отримували антибіотикотерапію з приводу ГКІ, підтверджених бактеріологічним виділенням донорських штамів патогенних ентеробактерій за  $F$ -фактором.

Взаємовідносини патогенних ентеробактерій з організмом хазяїна, що призводять до розвитку ГКІ, відрізняються особливою складністю, пов'язані зі здатністю цих збудників колонізувати кишковий тракт і проникати в ентеро- та колоноцити [S.H.E.Kaufmann, 1997, О.О. Федоровська та співавт., 1999]. Все це вимагає ретельного вивчення реакції імунної системи. Численні дослідження в цій галузі стосуються неспецифічних ланок захисної реакції організму. Залишаються мало вивченими реакції клітинної ланки імунітету, питання міжклітинної взаємодії.

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.** Дисертаційна робота пов'язана з плановою науковою тематикою Харківського науково-дослідного інституту ім.

І.І.Мечникова АМН України: “Клініко-лабораторні критерії етіологічного діагнозу поєднаних бактерійно-вірусних кишкових інфекцій у регіонах техногенно-екологічних ускладнень” (шифр СФ.7.4.96., № держреєстрації 0197U014385), “Розробка методів і засобів лабораторної діагностики захворювань, збуджуваних новими видами ентеробактерій” (шифр СФ.7.1.96., № держреєстрації 0197U014384), “Розробка нових методів епідеміологічного типування збудників інфекційних захворювань” (шифр СФ.4. 29. 99., № держреєстрації 0199U003175). Дисертант – виконавець перелічених тем.

**Мета дослідження.** На підставі вивчення селективних ознак патогенних ентеробактерій та вивчення впливу ЕРЕС, *S.flexneri* 2a, *S.enteritidis* на мікробіоценоз кишечника та імунний статус хворих, удосконалити епідеміологічний моніторинг за провідними збудниками ГКІ у північно-східному регіоні України.

**Задачі дослідження:**

1. Визначити селективні ознаки провідних збудників кишкових інфекцій (*S.enteritidis*, *S.flexneri* 2a, ЕРЕС).
2. Виявити донорські штами за F-фактором серед *S.enteritidis*, *S.flexneri* 2a, ЕРЕС.
3. Провести аналіз мікроекологічних порушень мікрофлори товстої кишки після перенесених захворювань, зумовлених *S.enteritidis*, *S.flexneri* 2a, ЕРЕС на тлі стандартної антибіотикотерапії.
4. Визначити характер розподілу імунокомпетентних клітин за окремими субпопуляціями і цитокіновий профіль у хворих на ГКІ .
5. Удосконалити метод типування патогенних ентеробактерій у біологічному матеріалі та в об’єктах зовнішнього середовища за допомогою донорспецифічних бактеріофагів у реакції нарощування титру фага (РНФ).

**Об’єкт дослідження:** патогенні ентеробактерії, дистальний відділ кишечника, бактеріофаги, кров.

**Предмет дослідження:** здорові діти, дорослі та діти різних вікових груп, хворі на ГКІ, реконвалесценти, імунна система, харчові продукти, свійські тварини, культури: *E.coli*, *Shigella* sp., *Salmonella* sp.

**Методи дослідження:** *мікробіологічні* – для ідентифікації ЕРЕС, *S.flexneri* 2a, *S.enteritidis* та вивчення їх біологічних властивостей: терморезистентності, антибіотикорезистентності, гемолітичної активності, літичної активності стосовно донорспецифічних бактеріофагів; вивчення мікрофлори товстої кишки хворих на ГКІ; визначення титрів бактеріофагів; *імунологічні* – для оцінки імунореактивності організму хворих на ГКІ; *генетичні* – для визначення стану плазмід у клітині; *епідеміологічні* – для оцінки захворюваності на ГКІ, що викликались ЕРЕС, *S.flexneri* 2a, *S.enteritidis* у досліджуваному регіоні; *статистичні* – для встановлення достовірності отриманих даних, вірогідності зв’язків між окремими показниками.

### **Наукова новизна одержаних результатів**

- Уперше проведено комплексне вивчення біологічних властивостей патогенних ентеробактерій (EPEC, *S.flexneri* 2a, *S.enteritidis*), які є провідними збудниками ГКІ, та визначено, що найбільш важливими селективними ознаками є терморезистентність, антибіотикорезистентність та донорська активність за F-фактором.
- Встановлено, що досліджені патогенні ентеробактерії були множинно-резистентними до антибіотиків, які частіше використовують для базисної терапії ГКІ. Проведені дослідження переконують, що для лікування захворювань, викликаних EPEC, *S.flexneri* 2a, *S.enteritidis*, доцільно використовувати фурадонін, норфлуксацин, а в деяких випадках – абактал або цифран.
- Уперше встановлено, що експресія бактеріофагів, які були використані для виявлення донорської активності за F- та F<sub>d</sub>-факторами, носить циклічний характер. Визначення донорської активності, вперше проведене серед штамів патогенних ентеробактерій, що циркулюють у північно-східному регіоні України, має епідеміологічне значення і може бути використана як селективна ознака при епідеміологічному моніторингу та прогнозуванні епідемічної ситуації з зазначених інфекцій.
- Визначені закономірності порушення мікробіоценозу товстої кишки у хворих на сальмонельоз, шигельоз та кишковий ешерихіоз при застосуванні антибіотико-терапії.
- Встановлено, що найбільш сприйнятливими контингентами для патогенних ентеробактерій є діти у віковій групі від 2 місяців до 3-х років, а штами *S.flexneri* 2a спричиняли захворювання лише серед дітей старших за 1 рік.
- Уперше у реконвалесцентів ГКІ встановлено істотну зміну цитокінового профілю з вираженою перевагою і тривалим збереженням на високому рівні імунорегуляторних молекул, притаманних Т-хелперам 1 типу.
- Науково обґрунтована та створена авторська колекція донорських штамів патогенних ентеробактерій і специфічних бактеріофагів, яка є основою для методу типування патогенних ентеробактерій.

### **Практичне значення одержаних результатів**

- Удосконалено лабораторну діагностику вивчення мікробіоценозу товстої кишки.
- Удосконалено метод типування патогенних ентеробактерій у біологічному матеріалі та в об'єктах зовнішнього середовища за допомогою донорспецифічних бактеріофагів у РНФ.
- Підготовлена Інструкція по виготовленню діагностичних дизентерійних бактеріофагів F<sub>d</sub>-92, F<sub>d</sub>-9Т, специфічних щодо донорських та реципієнтних штамів шигел, що дає можливість проводити дослідження з генетики патогенних ентеро-бактерій.

**Особистий внесок здобувача.** Автором самостійно виконані планування експерименту, мікробіологічні, імунологічні дослідження, статистичне опрацювання отриманих результатів і оформлення роботи. Також самостійно здійснено літературний пошук та аналіз літературних джерел

за темою дисертації. Порівняння отриманих результатів з літературними матеріалами та висновки по роботі належать авторові. Автором самостійно написано 1 роботу і 8 робіт – у співавторстві, в яких частка автора в загальному обсязі проведених робіт складає від 60 до 80%. Особистий внесок здобувача полягає й у представленні результатів досліджень на наукових конференціях.

Здобувачем разом з науковими співробітниками кафедри клінічної імунології та мікробіології ХМАПО удосконалено метод типування патогенних ентеробактерій у біологічному матеріалі та в об'єктах зовнішнього середовища за допомогою донорспецифічних бактеріофагів у РНФ.

Автором модифіковано метод по виділенню молочнокислих бактерій при дослідженні фекалій з метою вдосконалення лабораторної діагностики дисбактеріозу кишечника. Розроблено Інструкцію по виготовленню діагностичних дизентерійних бактеріофагів F<sub>d</sub> – 92 та F<sub>d</sub> –9Т, специфічних щодо донорських і реципієнтних штамів шигел. Зібрано авторську колекцію “індикаторних” бактеріофагів, “еталонних” та “індикаторних” культур, які можуть бути застосовані у РНФ та при типуванні ізолятів, що виділені від хворих на ГКІ, з метою виявлення штамів, яким притаманні донорські властивості.

**Впровадження в практику.** Метод типування патогенних ентеробактерій у біологічному матеріалі і в об'єктах зовнішнього середовища за допомогою донорспецифічних бактеріофагів у РНФ впроваджено в роботу Полтавської, Дніпропетровської, Сумської обласних (міських) санітарно-епідеміологічних станцій та у навчальний процес кафедри епідеміології Харківської медичної академії післядипломної освіти МОЗ України.

**Апробація результатів дисертації.** Основні положення дисертації були повідомлені та обговорені на IV Українській науково-практичній конференції з актуальних питань алергології, клінічної та лабораторної імунології (Київ, листопад 1999 р.), на Міжнародній конференції “Микробиология и биотехнология на рубеже XXI столетия” (Мінськ, червень 2000 р.), на III з'їзді імунологів та алергологів СНД (Сочі – Дагомис, вересень 2000 р.), на щорічних наукових конференціях медичного факультету СумДУ (1997-2000 рр.), на засіданні вченої ради медичного факультету СумДУ (Суми, листопад 2000 р.).

**Публікації.** За темою дисертації опубліковано 9 наукових праць, з яких 6 статей у провідних фахових виданнях, визначених ВАК України.

**Обсяг і структура дисертації.** Дисертаційна робота викладена на 134 сторінках основного тексту. Робота містить перелік умовних скорочень, вступ, огляд літератури, розділ матеріалів та методів дослідження, 4 розділи власних досліджень та їх обговорення, висновки, список використаних джерел та 4 додатки. Список використаних джерел включає 267 найменувань. Матеріали дисертації ілюстровано 13 рисунками та 30 таблицями.

## ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

**Матеріали та методи дослідження.** З метою реалізації поставлених у роботі задач у період з 1996 по 2000 роки бактеріологічно обстежено 45 здорових людей та 10820 дітей та дорослих, хворих на ГКІ, серед них у 520 обстежених були виділені патогенні ентеробактерії. Для досліджень було відібрано 314 культур, що були виділені від дітей та дорослих, хворих на ГКІ. Досліджено харчові продукти, свіжі фекалії курей та внутрішні органи падижних курей, 187 серій бактеріофагів. Усього об'єктом дослідження були 1378 штамів патогенних ентеробактерій, мікроорганізми, що утворювали мікробіоценоз товстої кишки у 223 хворих на ГКІ, кров 48 хворих на ГКІ та 45 здорових людей.

Виділення патогенних ентеробактерій з досліджуваного біологічного матеріалу проводили на живильних середовищах відповідно до методичних рекомендацій (1986). При ідентифікації виділених культур вивчали культуральні, морфологічні, біохімічні та антигенні властивості на класичних диференційно-діагностичних середовищах. Серовар патогенних ентеробактерій визначали у реакції аглютинації із комерційними специфічними адсорбованими сироватками (РАО "Біопрепарат", С.-Петербург). При ідентифікації виділених мікроорганізмів дотримувались даних Визначника бактерій Берджі (1997).

Терморезистентність ЕРЕС, *S. flexneri* 2a та *S. enteritidis* вивчали за методикою Ю.В.Круглова (1983). Рівень терморезистентності оцінювали за тривалістю виживання культури за умов впливу  $t=70^{\circ}\text{C}$ .

Чутливість мікроорганізмів до антибіотиків вивчали на середовищі АГВ методом дифузії в агар з використанням комерційних дисків (ООО "Аспект", м.Київ) до 20 антибактеріальних препаратів. Штами залежно від розміру зон затримки росту культури відносили до чутливих (S), помірно стійких (I) або резистентних (R) згідно вимог National Commitec of Clinical Laboratory Standart (NCCLS) (1994).

Донорську активність за F-фактором у *S. enteritidis*, *S. flexneri* 2a та ЕРЕС, що були виділені від хворих на ГКІ, вивчали за допомогою донорспецифічних "індикаторних" бактеріофагів сальмонел *S. enteritidis* F<sup>-</sup>5, шигел - F<sub>d</sub>-92, "еталонного" бактеріофага ешерихій MS2 і відповідних їм "індикаторних" культур: *S. enteritidis* шт. 4133 (F<sup>+</sup>), *S. flexneri* 2a шт.140 (F<sup>+</sup>) і "еталонної" культури *E. coli* CA-8213 (F<sup>+</sup>). У досліді вводили "еталонний" бактеріофаг Ø-II та "індикаторний" бактеріофаг F<sub>d</sub>-9T, специфічні щодо реципієнтних клітин, і відповідні їм "еталонну" культуру *E. coli* AB-1157 (F) і "індикаторну" культуру *S. sonnei* шт.864-9 (F). "Еталонні" бактеріофаги та "еталонні" культури *E. coli* отримано з музею кафедри біології та загальної генетики Університету Дружби Народів (м. Москва). "Індикаторні" бактеріофаги, "індикаторні" культури шигел та сальмонел, що були використані для проведення досліджень, отримані на кафедрі клінічної імунології та мікробіології

ХМАПО. Донорську активність патогенних ентеробактерій за F-фактором вивчали й оцінювали за методикою О.М.Савінової (1982).

Одержання нових серій бактеріофагів (MS2, Ø-II, Fd-92, Fd-9T, S.enteritidis F<sup>-</sup>-5), їх очищення проводили за методом Альбертсона (Москва, 1974).

Елімінацію плазмід антибіотикорезистентності з бактеріальної клітини проводили акридіном жовтогарячим у дозі 50 мкг/мл. Контрольною тест-культурою була E.coli 200 PS (F<sup>+</sup> - lac<sup>+</sup>) (О.П.Пехов, 1977).

Мікрофлору кишкових випорожнень досліджували відповідно до методичних рекомендацій “Микробиологическая диагностика дисбактериозов”(В.О.Знаменський і співавт., 1986). Питомий вміст кожної групи мікроорганізмів виражали кількістю колонієутворюючих одиниць (КУО) в 1г фекалій з розрахунком  $M \pm m$ . У процесі виконання роботи, враховуючи 3-х кратне обстеження дітей, проведено 650 аналізів.

Імунологічні дослідження проводили відповідно до Меморандуму ВООЗ (1988) і рекомендацій Є.У.Пастер і співавт.(1989) і В.Г.Передерій і співавт.(1995), які включали кількісну оцінку Т- і В-ланок системи імунітету за допомогою моноклональних антитіл (“Сорбент”, Росія), визначення рівня інтерлейкінів IL1 $\beta$ , IL2, IL4, IL10, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  за імуноферментним методом (“Проконтур”, Росія, “Amersham”, Англія). Визначення концентрацій IgA, IgG, IgM проводили імунотурбідиметричним мікрометодом. Деякі фракції комплементу визначали методом радіальної імунодифузії за Манчіні.

Статистичну обробку отриманих даних проводили за допомогою програми Microsoft Excel 95 з пакету Microsoft Office.

### **Біологічні властивості патогенних ентеробактерій.**

Проведено моніторинг біологічних властивостей у збудників ГКІ, що циркулювали у північно-східному регіоні України за період з 1996 по 2000 роки.

Вивчено селективні ознаки у 96 штамів S.enteritidis, виділених від дітей і дорослих хворих на сальмонельоз, 38 штамів різних сероварів сальмонел, виділених із харчових продуктів та 80 штамів S.enteritidis, виділених зі свіжих фекалій курей та внутрішніх органів падіжних курей на птахофабриці м.Харкова. Вивчено також селективні ознаки у 120 штамів S.flexneri 2a, виділених від дітей, хворих на бактеріальну дизентерію, та у 98 штамів ЕРЕС, виділених від дітей, хворих на кишковий ешерихіоз.

За біохімічними властивостями досліджені штами патогенних ентеробактерій, були типовими представниками родів Escherichia, Shigella та Salmonella.

У досліджуваних культур були визначені біовари, які мають епідеміологічне значення. Встановлено, що в досліджуваний період у північно-східному регіоні України, циркулюючим біоваром сальмонел був біовар S.enteritidis var.jena. Серед збудників бактеріальної дизентерії



домінував біовар 4, який складав 81,7% вивчених штамів *S.flexneri* 2a. Лише 10% штамів цього серовара були представлені біоваром 6, а 8,3% штамів – біоваром 12. Серологічний пейзаж ЕРЕС характеризувався присутністю 14 сероварів, серед яких частіше циркулювали серовари “408” (26,5%), O75: K-: H7 (16,3%) та O143: K- (12,2%). Встановлено, що серовар O124: K72 був представлений біоварами 1 та 2, серовар O142: K86 – біоварами 3 та 4, а серовар O144: K: H4 – біоваром 2.

Вивчення терморезистентності, антибіотикорезистентності, гемолітичної та донорської активності за F-фактором показало, що серед штамів сальмонел різного походження переважали терморезистентні культури, які склали 80,3%. Штами *S.enteritidis*, виділені від хворих, були також терморезистентними (93,8%). Лише всі штами *S.java* відрізнялися високою чутливістю до температурного фактора. Штами *S.typhimurium*, *S.heidelberg*, *S.senfetnberg*, *S.haifa*, *S.amersfoort*, *S.colindale* були середньочутливими. Штами *S.enteritidis* (100%), що були виділені зі свіжих фекалій курей та внутрішніх органів падіжних птахів, були виключно терморезистентними. Всі штами ЕРЕС за терморезистентністю були середньочутливими, а серед *S.flexneri* 2a переважали (81,7%) середньочутливі ізоляти.

Аналіз чутливості до антибіотиків у 96 штамів *S.enteritidis*, виділених від хворих людей, показав, що штами були чутливими до абакталу (98,2%), цифрану (82%), які відносяться до групи фторхінолонів, та до фурагіну (88%), який є антибіотиком групи нітрофуранових препаратів. Штами *S.enteritidis* були стійкими до тетрацикліну, поліміксину та роваміцину. В цілому, серед штамів *S.enteritidis* переважали полірезистентні ізоляти, які склали 62,6% від загальної кількості культур, виділених від хворих. Стійкість *S.enteritidis* до роваміцину асоційована з геномом бактерій, тоді як плазміди, що обумовлюють стійкість до інших препаратів знаходились в автономному стані. Отже чутливість сальмонел до хіміотерапевтичних препаратів доцільно використовувати як епідеміологічний маркер циркулюючих штамів.

Штами *S.flexneri* 2a проявляли чутливість до абакталу, норфлораксацину, цифрану (100%), 68% - до левоміцетину та 48% - до гентаміцину. Чутливість штамів шигел до фурадоніну складала 82%, а до фуразолідону - 80%. Серед чутливих штамів переважали шигели біовару 4 (81,6%). У 75% випадків культури були стійкими до поліміксину. Серовар *S.flexneri* 2a виявляв високий відсоток (>50%) штамів стійких до гентаміцину, поліміксину, до яких у 1992-1994 роки спостерігалася чутливість у 100% випадків. Важливим є те, що полірезистентними були штами біовару 4. Дані антибіотикочутливості використовувалися при лікуванні хворих на бактеріальну дизентерію Обласною дитячою інфекційною лікарнею м.Харкова. Позитивний ефект клініцисти спостерігали після лікування шигельозних хворих фурадоніном і норфлораксацином.

Найбільш високу чутливість ізоляти ЕРЕС (98 штамів) виявляли до норфлораксацину, абакталу, цифрану. Серед них 98% були чутливими до роваміцину, 22% - до гентаміцину. Помірно

стійкими штами ЕРЕС були до цефазоліну та цефрадину відповідно в 36,2 і 18% ізолятів. До клафорану чутливість виявляли 44% ешерихій. До фуразолідону, фурагіну, фурадоніну резистентність виявлена лише відповідно в 20%, 10% і 5% штамів ЕРЕС. Всі штами ЕРЕС були резистентні до ампіциліну, цефалексину. Стійкими до нітрофуранів частіше були серовари ЕРЕС O85a:K61, O143:K-, O125:K70 і всі штами серовара “408”.

Підсумовуючи дані чутливості патогенних ентеробактерій до антибактеріальних препаратів, встановлено, що в сучасний період для проведення антибіотикотерапії колієнтеритів доцільно використовувати фторхінолові препарати (норфлоксацин, абактал, цифран, інші) та нітрофуранові препарати (фурадонін).

За нашими даними, найбільш сприйнятливою групою населення серед хворих на ешерихіози є діти раннього віку, що пояснюється фізіолого-анатомічними особливостями кишечника, недосконалістю нейрогуморальної регуляції, імунологічною нестійкістю. Рефрактерність організму до збудника підвищується з віком.

При мікробіологічному дослідженні сероварів ЕРЕС було показано, що всі ізоляти мали гемолітичну активність.

#### **Діагностична та епідеміологічна значимість донорської активності за F-фактором у штамів патогенних ентеробактерій.**

Вивчено циркуляцію F- і F'-подібних факторів генетичного переносу в клітинах 98 штамів ЕРЕС, 120 штамів *S.flexneri* серовара 2a та 78 штамів *S.enteritidis*, виділених від хворих на ГКІ, з метою визначення можливості використання їх як епідеміологічних маркерів.

Для проведення досліджень по ідентифікації донорських штамів патогенних ентеробактерій за F-фактором було отримано 66 серій “еталонних” бактеріофагів, 121 серію “індикаторних” бактеріофагів та виявлено динаміку титрів бактеріофагів з обліком щомісячного їх одержання. Встановлено, що експресія бактеріофагів має циклічний характер.

Для кожного бактеріофага були визначені максимальні титри, що не враховують можливу подальшу їх концентрацію. Найбільш концентровані серії були виявлені у бактеріофага F<sub>d</sub>-92 (фаги без додаткового концентрування). Вони мали титри  $1,3 \times 10^7$  -  $4,4 \times 10^{11}$ . У бактеріофага F<sub>d</sub>-9T отримані серії мали титри  $2,6 \times 10^6$  –  $1,6 \times 10^{10}$ . Досить невисокі титри були у бактеріофагів ешерихій MS2 та Ø-II - до  $1,8 \times 10^6$ . У донорспецифічного бактеріофага сальмонел *S.enteritidis* F'-5 не вдалося одержати титри, вищі за  $1,2 \times 10^4$  –  $2,1 \times 10^6$ .

Вивчення донорської активності за F-фактором у патогенних ентеробактерій, які спричинили захворюваність на ГКІ, показало, що при ідентифікації донорських властивостей найбільш чіткі результати отримані у штамів *S.flexneri* 2a. Всі ізоляти були диференційовані на донорські та реципієнтні, причому 85% з них були донорськими (табл.1). Донорська активність дизентерійних

бактерій визначається присутністю у клітині фактора генетичного переносу - F<sub>d</sub>, який і детермінує чутливість клітин шигел до фага F<sub>d</sub>-92.

Таблиця 1

**Донорська активність за F-фактором у провідних збудників ГКІ, що циркулювали в 1996-2000 рр. у північно-східному регіоні України**

Варіант	S.enteritidis, n=78		S.flexneri 2a, n=120		EPEC, n=98	
	абс.	%	абс.	%	абс.	%
Лізис бактеріофагом MS2 (F <sup>+</sup> )	1	1,28	-	-	62	63,27
Лізис бактеріофагом Ø-II (F <sup>-</sup> )	19	24,34	-	-	30	30,61
Не піддаються лізису	58	74,36	-	-	6	6,12
Полілізабельні	-	-	-	-	-	-
Лізис бактеріофагом F <sub>d</sub> -92 (F <sup>+</sup> )	-	-	102	85	-	-
Лізис бактеріофагом F <sub>d</sub> -9T (F <sup>-</sup> )	18	23,08	18	15	30	30,61
Не піддаються лізису	60	76,92	-	-	68	69,39
Полілізабельні	-	-	-	-	-	-
Лізис фагом F <sup>-</sup> 5 (F <sup>+</sup> )	12	15,4	-	-	-	-
Не піддаються лізису	66	84,6	-	-	-	-

**Примітка:** (F<sup>+</sup>) – наявність плазміди у клітині; (F<sup>-</sup>) – відсутність плазміди у клітині.

Визнано, якщо в мікробній популяції кількість донорських клітин складає 80% і більше, то такий серовар має селективні переваги (П.Брода, 1982). Присутність F<sub>d</sub>-плазміди у переважній кількості штамів S.flexneri 2a і є одним із факторів, завдяки якому пояснюють селективну перевагу для розповсюдження цього серовара шигел у досліджуваний період.

При типуванні штамів EPEC, виділених від хворих після проведеного курсу антибіотикотерапії, виявлено, що 63,27% бактерій, піддавалися лізису донорспеци-фічним бактеріофагом MS2. Це свідчило про наявність у геномі цих клітин F-плазміди ешерихій.

При дослідженні ізолятів EPEC встановлено, що 9 сероварів володіють донорськими властивостями. Донорська активність за F-фактором була притаманна всім виділеним культурам серовара “408”, склавши у популяції 42%. Культури серовара O75:K- склали у популяції 24,2% від загальної кількості штамів, що піддавалися лізису. Виходячи з цих даних, нами спрогнозовано, що в наступні роки чекається зростання числа захворювань, зумовлених сероваром “408” та O75:K-, хоча вони ще не набрали у популяції критичної маси, що забезпечувало б реалізацію їх селективних переваг. Тому поряд з вищевказаними сероварами при ГКІ, будуть реєструватися й інші серовари.

Дані донорської активності штамів S.enteritidis (15,4% донорських штамів), свідчать про те, що цей серовар сальмонел у наступні роки буде мати меншу епідемічну значимість і втратить провідну роль серед збудників сальмонельозної інфекції.

Проведені дослідження дають можливість стверджувати, що селективними ознаками для патогенних ентеробактерій є поєднання терморезистентності, антибіотикорезистентності та

донорської активності за F-фактором, а для ЕРЕС визначними селективними ознаками слід вважати одночасне поєднання гемолітичної та донорської активності за F-фактором.

Нами розроблено метод типування ешерихій, шигел та сальмонел у РНФ з метою прискореного виявлення збудників кишкових інфекцій у біологічному матеріалі та в об'єктах зовнішнього середовища за допомогою донорспецифічних бактеріофагів. Наявність бактеріофагів, специфічних щодо донорських та реципієнтних клітин ешерихій, шигел та сальмонел по F-фактору дозволили запропонувати для бактеріологів обласних (міських) СЕС та лікувально-профілактичних закладів метод, заснований на можливості “індикаторного” бактеріофага розмножуватися тільки при контакті з гомологічними бактеріальними клітинами. Дослід залежно від мети ставиться з використанням “еталонних” (MS2, ØП) та “індикаторних” (F<sub>d</sub>-92, F<sub>d</sub>-9Т, S.enteritidis F<sup>-</sup>5) бактеріофагів.

### **Вплив донорських штамів за F-фактором ЕРЕС, S.flexneri 2a, S.enteritidis та антибіотикотерапії на мікробіоценоз товстої кишки хворих на ГКІ.**

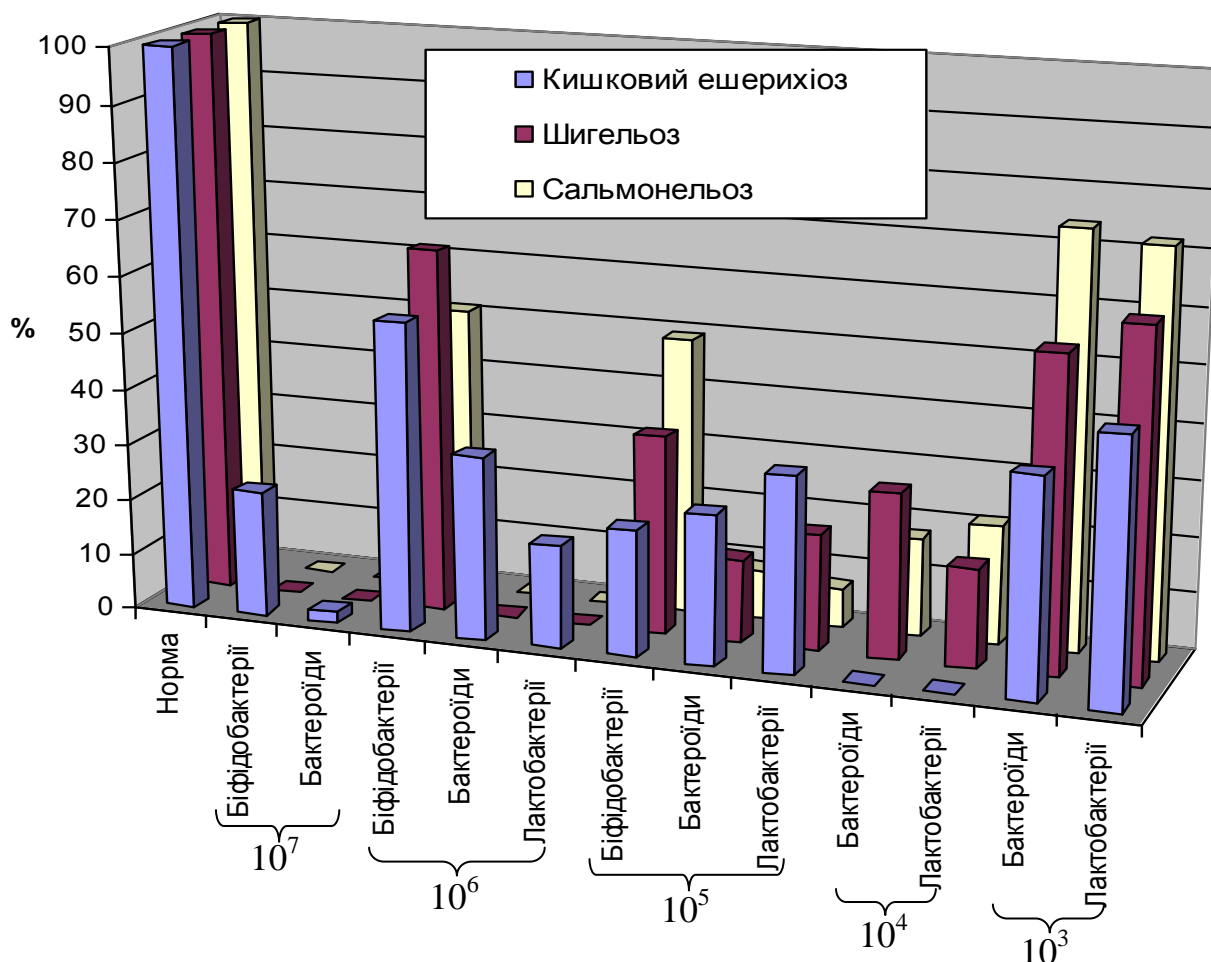
Вивчено закономірності порушення мікробіоценозу товстої кишки під впливом антибіотикотерапії у 223 дітей хворих на шигельоз, сальмонельоз та кишковий ешерихіоз. Дані підтверджені бактеріологічним виділенням донорських штамів бактерій за F-фактором.

Показано, що при всіх формах і в усіх випадках ГКІ, викликаних патогенними ентеробактеріями, спостерігались значні статистично достовірні кількісні зміни мікроорганізмів у дистальному відділі кишечника. Згідно даних рис.1, при сальмонельозі і шигельозі кількість біфідобактерій була зниженою і не перевищувала показника  $10^6$  КУО/г фекалій. Тільки при кишковому ешерихіозі в 22,4% випадків кількість біфідобактерій досягала  $10^7$  КУО/г фекалій.

Значними були кількісні зміни лактобактерій. У 46,9% випадків кишкового ешерихіозу концентрація лактобактерій складала  $10^3$  КУО/г фекалій і в 34,7% випадків -  $10^5$  КУО/г фекалій. При сальмонельозній інфекції у 71,9% хворих та при шигельозній інфекції у 61,8% хворих кількість лактобактерій не перевищувала  $10^3$  КУО/г фекалій.

Кількість бактероїдів була дещо вищою при кишковому ешерихіозі на відміну від інших нозологічних форм захворювань.

Як показано в табл.2, при сальмонельозній інфекції у 66,7% випадків кількість E.faecalis різко знижувалася до показника  $10^3$  КУО/г фекалій і в 33,3% випадків - до  $10^4$  КУО/г фекалій відповідно. Кількість ентерококів при шигельозі залишалася в межах припустимої норми ( $10^7$ – $10^8$  КУО/г фекалій).



**Рис. 1. Кількісний склад біфідобактерій, бактероїдів та лактобактерій у мікробіоценозі товстої кишки хворих на ГКІ**

Зміни також спостерігалися як у кількісному, так і в якісному складі аеробної та факультативно-анаеробної мікрофлори. Насамперед, це стосувалося кількісних змін повноцінної у ферментативному відношенні кишкової палички та її гемолітичних форм. Встановлено, що при шигельозі у 61,8% випадків при концентрації  $10^4$  КУО/ г фекалій та сальмонельозі у 26,3% випадків при концентрації  $10^7$  КУО/ г фекалій визначалися ешерихії зі зниженою ферментативною активністю. Гемолітичних форм ешерихій при цих захворюваннях виявлено не було. Найбільші кількісні й особливо якісні зміни кишкової мікрофлори спостерігалися при ГКІ, індукованій ЕРЕС. При кишковому ешерихіозі різко пригнічувалась індигенна непатогенна мікрофлора. У 28,6% хворих виявлялися лактозонегативні й у 42,9% хворих - біовари ешерихій зі зниженою ферментативною активністю. Всі штами ЕРЕС мали гемолітичну активність, а 68% штамів різних сероварів піддавалися лізису донорспецифічним бактеріофагом MS2.

Концентрація *S.aureus* вища  $10^4$  КУО/г фекалій спостерігалась у 14,3% хворих на кишковий ешерихіоз та в 36,8% хворих на сальмонельоз.

В усіх групах хворих висівалися дріжджеподібні гриби роду *Candida*. Переважаючим був вид *C.albicans* і у 4 хворих на кишковий ешерихіоз було ідентифіковано *C.crusei*.

## Мікробний пейзаж аеробної та анаеробної мікрофлори товстої кишки у хворих на ГКІ

Найменування мікроорганізмів	Кишковий ешерихіоз		Бактеріальна дизентерія		Сальмонельоз	
	Кількість КУО в г фекалій	Кількість хворих (у дужках - $M \pm m$ )	Кількість КУО в г фекалій	Кількість хворих (у дужках - $M \pm m$ )	Кількість КУО в г фекалій	Кількість хворих (у дужках - $M \pm m$ )
<b>Ентерококи</b> <i>E. faecalis</i>	$10^5$	41 (41,8±4,98)*	$10^7$	2 (2,9±2,03) *	$10^3$	38 (66,7±6,2)*
	$10^6$	51 (52,04±5,05)*	$10^8$	66 (97,1±2,03)**	$10^4$	19 (33,3±6,24)*
	$10^7$	6 (6,12±2,42)*				
<b>Ешерихії</b> Повноцінні у ферментативному відношенні	$10^6$	24 (24,5±4,34)*	$10^6$	38 (55,9±6,02)*	$10^7$	42 (73,7±5,83)*
	$10^7$	4 (4,08±2,0)*	$10^7$	12 (17,6±4,6)*		
			$10^8$	18 (26,5±5,35)*		
Зі зниженою ферментативною активністю	$10^5$	38 (38,8±4,9)*	$10^4$	42 (61,8±5,89)*	$10^7$	15 (26,3±5,83)*
	$10^6$	4 (4,08±2,0)*	$10^5$	26 (38,2±5,89)*		
Гемолітичні		100 %	–	–	–	–
Лактозонегативні	$10^7$	28 (28,6±4,56)*	–	–	–	–
<b>Стафілококи</b> <i>S. aureus</i>	$10^4$	22 (22,4±4,21)*	$10^3$	12 (17,6±4,62)*	$10^5$	19 (33,3±6,24)*
	$10^5$	6 (6,12±2,42)*			$10^6$	2 (3,5±2,43) *
	$10^6$	8 (8,16±2,77)*				
	$10^3$	18 (18,37±3,9)*	–	–	$10^3$	6 (10,5±4,6)*
	$10^4$	3 (3,06±1,74)*			$10^4$	2 (3,5±2,43)*
<i>S. epidermidis</i>	$10^2$	4 (4,08±2,0)*	–	–	–	–
<b>Дріжджеподібні гриби</b> <i>C. albicans</i>	$10^4$	28 (28,57±4,56)*	$10^3$	14 (20,6±4,9)*	$10^4$	18 (31,6±6,16)*
	$10^5$	18 (18,37±3,9)*	$10^5$	12 (17,6±4,62)*	$10^5$	2 (3,5±2,43)*
			$10^6$	4 (5,9±2,86)*		
<i>C. crusei</i>		4 (4,08±2,0)*	–	–	–	–
<b>Умовно патогенні ентеробактерії</b> <i>H. alvei</i>	$10^6$	8 (8,16±2,77)*	–	–	10,6	8 (14,0±4,6)*
	$10^7$	4 (4,08±2,0)*				
	$10^6$	2 (2,04±1,43)*	–	–	$10^6$	6 (10,5±4,06)*
	$10^5$	18 (18,37±3,9)*	$10^6$	12 (17,6±4,62)*	$10^6$	24 (42,1±7,02)*
	$10^6$	4 (4,08±2,0)*	$10^7$	8 (11,8±3,91)*	$10^7$	2 (3,5±2,43)*
	$10^7$	1 (1,02±1,01)*				
	$10^7$	8 (8,16±2,77)*	–	–	$10^6$	2 (3,5±2,43)*
	$10^5$	4 (4,08±2,0)*	–	–	–	–
	$10^6$	12 (12,24±3,31)*	$10^7$	16 (23,5±5,14)*	$10^7$	8 (14,0±4,6)*
	$10^7$	2 (2,04±1,43)*	$10^7$	10 (14,7±4,29)*	–	–
	$10^7$	4 (4,08±2,0)*	–	–	–	–
	$10^5$	12 (12,24±3,31)*	–	–	$10^6$	4 (7,0±3,38)*
	$10^7$	2 (2,04±1,43)*			$10^7$	2 (3,5±2,43)*

Примітка: вірогідність відміни показника від норми: \* -  $p < 0,001$ ; \*\* -  $p > 0,05$

Серед умовно патогенних бактерій виділялися також *K.pneumoniae*, *K.ozaenae*, *K.oxytosa*, *E.aerogenes*, *H.alvei*, *C.diversus*, *C.freundii*, *P.mirabilis*, *P.vulgaris*. Вони частіше виявлялися при кишковому ешерихіозі.

Спороутворюючі бактерії (клостридії) виявлено у 42% хворих на сальмонельоз.

Проведені дослідження, дозволили виявити зміни мікробіоценозу товстої кишки у дітей, які отримували стандартну антибіотикотерапію з приводу ГКІ, яка включала левоміцетин, гентаміцин, поліміксин, норфлуксацин, фуразолідон, фурагін, фурадонін і вказують на шляхи корекції дисбактеріозу.

При вивченні мікрофлори товстої кишки у хворих з урахуванням етіологічного фактору ГКІ і віку встановлено, що найбільш сприйнятливими контингентами для патогенних ентеробактерій є діти у віковій групі від 2 місяців до 3 років, а штами *S.flexneri* 2a спричиняли захворювання лише серед дітей старших за 1 рік.

Отримані дані свідчать про те, що через місяць від початку захворювання при кишковому ешерихіозі бактеріовиділення було виявлено у 100% випадків, у 38% випадків воно підтверджувалося через 2 місяці й у 8% випадків - через 3 місяці від початку захворювання. У хворих на сальмонельоз бактеріоносійство виявлено в 21% реконвалесцентів. Показана повна елімінація шигельозної інфекції після проведеної антибіотикотерапії, яка, на нашу думку, пояснюється адекватною антибактеріальною терапією. Однак у значній мірі це пов'язано також з особливостями біологічних властивостей збудника, які визначають характер патологічного процесу. На це вказує хоча б та обставина, що при дизентерії дисбіотичні явища у кишечнику були виражені найменше.

### **Імунна відповідь при ГКІ, що викликані патогенними ентеробактеріями.**

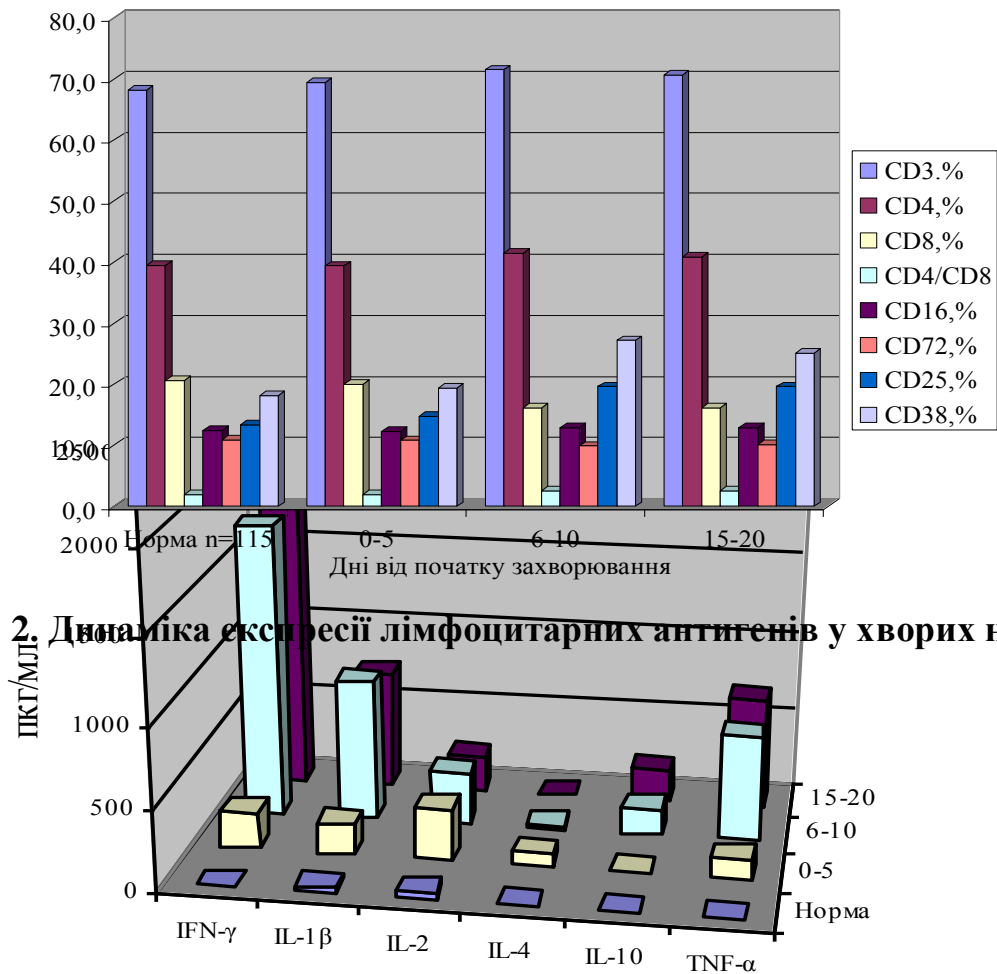
У хворих на ГКІ на початку захворювання не було виявлено істотних змін у концентраціях імуноглобулінів, комплементу та ЦІК. Але на 6-10 день захворювання спостерігалось вірогідне підвищення загального титру комплементу (45,2 проти 37,6 у здорових дітей) та концентрації фракції  $C_3$  (0,86 проти 0,78). Паралельно значно підвищувався рівень ЦІК (4,45 г/л) та концентрація IgG (14,9, проти 11.3 г/л). Дещо знижувався вміст IgA та IgM (1,65 г/л та 0,89 г/л проти 1,84 г/л та 1,04 г/л відповідно). Високий рівень IgG, на відміну від інших показників, зберігався весь період дослідження.

Вивчення субпопуляційного складу Т-лімфоцитів виявило значний дисбаланс у системі Т-хелпери/Т-супресори за рахунок зниження числа Т-супресорів у 80% хворих. Це призводило до зростання імунорегуляторного індексу і свідчило про формування відносного гіпосупресорного варіанта вторинного імунодефіциту. Вміст природних кілерних клітин практично не змінювався. Не одержано достовірних доказів змін вмісту клітин, експресуючих маркер CD72. Різко зростала в



популяції лімфоцитів і зберігалася весь період дослідження пропорція клітин, які експресують активаційні антигени CD25 та CD38 (рис.2).

Активация лімфоцитів змінювала відносний розподіл Т-, В- та NK-субпопуляцій та була водночас причиною і наслідком експресії ряду цитокінів. Одразу після інфекції концентрації IL-2 і IFN- $\gamma$  (Th1-цитокіни) підвищувалися багаторазово і зберігалися стабільно високими весь період дослідження (рис. 3).



**Рис. 2. Динаміка експресії лімфоцитарних антигенів у хворих на ГКІ**

**Рис. 3. Уміст цитокінів у крові хворих на ГКІ (пкг/мл)**

Висока експресія IL-2 корелювала зі збільшенням числа CD25<sup>+</sup> лімфоцитів. Зв'язування IL-2 з його рецептором веде до активації і проліферації Т-клітин. IFN- $\gamma$ , як відомо, індукує підвищену мікробіцидну активність через активацію макрофагів. Паралельно активується диференціювання Т- та В-лімфоцитів у ефекторні клітини. Синхронно Th1-цитокінам бурхливо зростала на початку захворювання концентрація прозапальних цитокінів (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ ) і залишалася високою тривалий час. Важливим є й те, що зазначені цитокіни можуть виявляти синергічний ефект із бактеріальними ендотоксинами. При захворюваннях на ГКІ протизапальний цитокін IL-4 виявлявся незабаром після початку захворювання. Потім його концентрація швидко падала. IL-10 з'являвся у сироватці на 6-10 день хвороби і зберігався на досить високому рівні до кінця дослідження.

Таким чином, на підставі проведених досліджень встановлено істотну зміну цитокінового профілю при ГКІ, які були викликані патогенними ентеробактеріями, з вираженою перевагою і тривалим збереженням на високому рівні імунорегуляторних молекул Т-херперів 1 типу ( $T_{H1}$ ) на тлі повної реконвалесценції.

## **ВИСНОВКИ**

1. Аналіз захворюваності осіб різного віку на кишкові інфекції в зазначений період засвідчує необхідність удосконалення системи епідеміологічного нагляду за кишковими інфекціями на основі вивчення біологічних властивостей основних збудників ГКІ (EPEC, *S.flexneri*2a, *S.enteritidis*).

2. Встановлено, що селективними ознаками патогенних ентеробактерій, що циркулювали у північно-східному регіоні України, є поєднання терморезистентності, антибіотикорезистентності та донорської активності за F-фактором.

3. Доведено, що всі штами EPEC та 81,7% штамів *S.flexneri* 2a за температурним фактором були середньочутливими, а штами *S.enteritidis*, виділені від хворих, були переважно терморезистентними (93,8%).

4. Визначено, що для лікування захворювань, викликаних EPEC, *S.flexneri* 2a, *S.enteritidis*, в найближчий період доцільно використовувати препарати нітрофуранової групи (фурадонін), або фторхінолони (абактал, цифран, норфлоксацин).

5. Визначено, що донорська активність за F-фактором у штамів патогенних ентеробактерій може бути використана як селективна ознака при епідеміологічному моніторингу.

6. Виявлено закономірності порушення мікробіоценозу товстої кишки у хворих на сальмонельоз, шигельоз та кишковий ешерихіоз при застосуванні антибіотикотерапії, які спостерігалися як у кількісному, так і в якісному складі аеробної, анаеробної та факультативно-анаеробної мікрофлори.

7. Встановлено, що найбільш чутливими контингентами для патогенних ентеробактерій були діти у віковій групі від 2-х місяців до 3-х років, а штами *S.flexneri* 2a спричиняли захворювання лише серед дітей старших за 1 рік.

8. Встановлено істотну зміну цитокінового профілю при ГКІ з вираженою перевагою і тривалим збереженням на високому рівні імунорегуляторних молекул, притаманих Т-херперам 1 типу, на тлі повної реконвалесценції.

9. Визначено, що метод типування патогенних ентеробактерій у біологічному матеріалі та в об'єктах зовнішнього середовища ефективно здійснювати за допомогою донорспецифічних бактеріофагів у РНФ за удосконаленою методикою.

## **ПЕРЕЛІК ПРАЦЬ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ**

1. Липовская В.В. Селективные признаки штаммов *S. enteritidis*, циркулирующих в 1996-1998 гг. в городах Сумы и Харькове // Вісник проблем біології і медицини. – 1999. - №6. – С. 63-67.
2. Липовская В.В., Савинова Е.М., Дьяченко А.Г. Селективные свойства патогенных энтеробактерий и их значимость как эпидемиологических маркеров // Доповіді Національної академії наук України. – 2000. - №6. – С. 176-180.
3. Липовская В.В., Савинова Е.М., Дьяченко А.Г. Микробиоценоз кишечника при острых кишечных инфекциях // Доповіді Національної академії наук України. – 2000. - №8. – С. 161-165.
4. Клеточный иммунитет и цитокиновый профиль при острых кишечных инфекциях /Ю.Л.Волянский, В.В.Липовская, Н.И.Хомулянская, И.Ю.Кучма // Проблеми екологічної та медичної генетики і клінічної імунології: Зб. наук. пр. – Київ –Луганськ – Харків, 2000. – С. 75-81.
5. Дьяченко А.Г., Липовская В.В., Дьяченко П.А. Особенности иммунного ответа при острых кишечных инфекциях // Імунологія та алергологія. – 2000. - №1. – С. 112-119.
6. Липовская В.В., Савинова Е.М., Дьяченко А.Г. Диагностическая и эпидемиологическая значимость F-донорской активности штаммов энтеробактерий // Журн. микробиол. – 2001. - №2. – С.81-82.
7. Липовская В.В., Дьяченко А.Г. Особенности иммунного статуса при острых кишечных заболеваниях, вызванных патогенными энтеробактериями // Імунологія та алергологія. IV Українська науково-практична конференція з актуальних питань алергології та клінічної імунології. – 1999. - №3. – С.87-88.
8. Липовская В.В., Савинова Е.М., Дьяченко А.Г. Экология микроорганизмов кишечника при острых кишечных инфекциях, вызванных патогенными энтеробактериями // Микробиология и биотехнология на рубеже XXI столетия. Материалы международной конференции. – Минск, 2000. – С. 179-180.
9. Липовская В.В., Дьяченко А.Г. Характеристика иммунного ответа при острых кишечных инфекциях, вызванных патогенными энтеробактериями // Аллергология и иммунология. Материалы III Съезда иммунологов и аллергологов СНГ. – 2000. – Т.1, №2. – С. 135.

## **АНОТАЦІЯ**

**Липовська В.В. Селективні ознаки патогенних ентеробактерій, їх вплив на мікробиоценоз кишечника та імунний статус організму людини. – Рукопис.**

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.07 – мікробіологія. – Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України, Київ, 2002.

У дисертації наведено теоретичне узагальнення і нове вирішення наукової задачі, що полягає в обґрунтуванні дослідження селективних ознак патогенних ентеробактерій (*EPEC*, *S.flexneri* 2a,

*S. enteritidis*), мікроекологічних порушень товстої кишки та показників клітинного імунітету у хворих на ГКІ, які викликані патогенними ентеробактеріями з метою удосконалення епіднагляду з зазначених інфекцій.

У дослідженнях виявлено донорські штами за F-фактором серед EPEC, *S. flexneri* 2a, *S. enteritidis*, вивчено біологічні властивості провідних збудників кишкових інфекцій. Селективними ознаками патогенних ентеробактерій є поєднання донорської активності за F-фактором, терморезистентності та антибіотикорезистентності. Донорська активність патогенних ентеробактерій має прогностичне значення і забезпечить більш надійний прогноз епідемічної ситуації на найближчу перспективу.

Проведено аналіз мікроекологічних порушень мікрофлори товстої кишки під впливом антибіотикотерапії у хворих на кишковий ешерихіоз, бактеріальну дизентерію та сальмонельоз, підтверджених бактеріологічним виділенням донорських штамів бактерій за F-фактором. Вивчені показники клітинної ланки імунітету та цитокиновий профіль при ГКІ. Удосконалено метод типування патогенних ентеробактерій у біологічному матеріалі та в об'єктах зовнішнього середовища за допомогою донорспецифічних бактеріофагів у РНФ.

**Ключові слова:** патогенні ентеробактерії, EPEC, *S. flexneri* 2a, *S. enteritidis*, селективні ознаки, терморезистентність, антибіотикорезистентність, донорспецифічні бактеріофаги, дисбактеріоз, клітинний імунітет, цитокиновий профіль.

## АННОТАЦІЯ

**Липовская В.В. Селективные признаки патогенных энтеробактерий, их влияние на микробиоценоз кишечника и иммунный статус организма человека. – Рукопись.**

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.07 – микробиология. – Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины, Киев, 2002.

Диссертация посвящена определению маркеров, детерминирующих селективные преимущества патогенных энтеробактерий (EPEC, *S. flexneri* 2a, *S. enteritidis*), которые являются ведущими возбудителями острых кишечных инфекций. Выявлены изменения микробного пейзажа толстой кишки и иммунного статуса больных ОКИ.

Как эпидемиологические маркеры изучены терморезистентность, антибиотикорезистентность и донорская активность по F-фактору. Исследованиями установлено, что все штаммы EPEC, циркулировавшие в изученном регионе, были среднечувствительными к температурному фактору. Среди *S. flexneri* 2a также преобладали среднечувствительные изоляты, а штаммы *S. enteritidis*, выделенные от больных, были преимущественно терморезистентными (93,8%). Изучая чувствительность к антибиотикам, установлено, что в целом среди штаммов *S. enteritidis* преобладали

полирезистентные изоляты (62,6%). Серовар *S.flexneri* 2a выявлял высокий процент (>50%) антибиотикорезистентных штаммов. Среди ЕРЕС также преобладали антибиотикорезистентные штаммы. Выявлены донорские штаммы по F-фактору среди ЕРЕС, *S.flexneri* 2a, *S.enteritidis*, и впервые показано, что среди циркулирующих штаммов донорской активностью обладали 85% штаммов *S.flexneri* 2a, 63,27% ЕРЕС различных сероваров. На основании полученных данных впервые показано, что селективными признаками патогенных энтеробактерий является объединение терморезистентности, антибиотикорезистентности и донорской активности по F-фактору.

Исследованиями установлено, что патогенные энтеробактерии и антибиотикотерапия вызывают изменения микробиоценоза толстой кишки больных. Во всех исследованных группах больных наблюдалось значительное статистически достоверное снижение содержания бифидо- и лактобактерий. У больных кишечным эшерихиозом дисбиотические изменения характеризовались наличием гемолитической активности у всех изолятов эшерихий и снижением общего количества эшерихий полноценных в ферментативном отношении, а 68% штаммов различных сероваров ЕРЕС лизировались донорспецифическим фагом MS2. Наличие гемолитической активности у ЕРЕС совпадало с присутствием в клетках F-плазмиды конъюгативности. Это дает возможность считать определяющими селективными признаками для ЕРЕС одновременное проявление гемолитической и донорской активности по F-фактору.

У больных, перенесших ОКИ, наблюдались значительные изменения иммунного статуса. Концентрация IL-2 и IFN- $\gamma$  возрастала многократно сразу после начала заболевания и сохранялась стабильно высокой весь период исследования. Наблюдалось также значительное увеличение уровня провоспалительных цитокинов IL-1 $\beta$  и TNF- $\alpha$ . Концентрация противовоспалительного цитокина IL-10 возрастала со второй недели заболевания.

Усовершенствован метод типирования патогенных энтеробактерий в биологическом материале и в объектах внешней среды при помощи донорспецифических бактериофагов в РФ.

**Ключевые слова:** патогенные энтеробактерии, селективные признаки, терморезистентность, антибиотикорезистентность, донорспецифические бактериофаги, плаزمиды, дисбактериоз, клеточный иммунитет, цитокиновый профиль.

## ANNOTATION

**Lipovskaya V.V. Selective Signs of Pathogenic Enterobacteria, it's influence on the microbiocenosis in the intestine and immune status of the individual's organism. – Manuscript.**

Dissertation on the academic degree of candidate of Biological Sciences on the speciality 03.00.07. – microbiology. – The Institute of Microbiology and Virusology named after D.K.Zabolotnij, the National Academy of Sciences of Ukraine, Kiyv, 2002.

In the dissertation submits theoretical generalization and new answer to a scientific problem, that lies in a grounding of selection signs of pathogenic enterobacteria (EPEC, *S.flexneria* 2a, *S.enteritidis*), microecological disturbances in a large intestine and the rate of cellular immune among patients with Acute Intestinal Infection (AII), which is caused by pathogenic enterobacteria.

The investigation reveals donor activity according to  $F_d$ -factors among EPEC, *S.flexneria* 2a, *S.enteritidis*, learned biological properties of the leading infections agents. Selection signs of pathogenic enterobacteria are the unification of donor activity thermoresistance and antibioticresistance. Donor activity of pathogenic enterobacteria have a significance and provides more reliable prognosis for nearest epidemiologic situation.

The analysis microecological disturbances of microflora in large intestine was conducted among the patients who took antibiotic treatment because of intestine escherichiosis, bacterial dysentery and salmonellosis, under gone by bacterial discharge of donor strain of bacteria according to  $F_d$ -factors. Learned the rate of cellular link of immunity and cytokyn type by AII. The method of typical pathogenic enterobacteria in the environment with the help donorspecific bacteriophage in the Reaction of Increasing of Bacteriophage (RIB) was improved.

**Key words:** pathogenic enterobacteria, EPEC, *S.flexneria*2a, *S.enteritidis*, selection signs, thermoresistance, antibioticresistance, donorspecific bacteriophage, disbacteriose, cellular immune, cytokyn type.

Підписано до друку 11.03.2002

Папір друк. №1.

Умовн.фарбовідб.1,18

Наклад 100 прим.

Формат 60×80<sup>1</sup>/<sub>16</sub>

Умовн.друк.арк.1,02

Обл.-вид.арк. 1,03

Зам.№

---

“Ризоцентр” СумДУ

40007, Суми, вул. Римського-Корсакова,2