

УДК 616.926-008.87:612.33:579.

## ИССЛЕДОВАНИЕ ЭКОЛОГИЧЕСКИХ ОСОБЕННОСТЕЙ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ОСТРЫХ ДИАРЕЙНЫХ ИНФЕКЦИЙ

Малыш Н.Г., Холодило Е.Н., Чемич Н.Д.

Сумской государственной университет,  
г. Сумы, Украина

Микробиоценозы тела организма человека отличаются разнообразием входящих в них представителей микрофлоры [1, 2]. Нормофлора является одним из компонентов, определяющих колонизационную резистентность организма хозяина. При заселении биотопов макроорганизма между микробами складываются определенные взаимоотношения, которые отражаются на качественной и количественной характеристике того или иного микробного пейзажа [3].

В современных условиях, на фоне ухудшения экологической обстановки, вопросы формирования, сохранения и восстановления нормального микробиоценоза кишечника приобретают особую актуальность.

**Цель работы** – изучить экологические особенности взаимодействия микроорганизмов, выделенных из кишечника больных острыми кишечными инфекциями (ОКИ) и практически здоровых людей.

### Материалы и методы исследования

По материалам отраслевой статистической отчетности ГУ Госсанэпидслужбы, проведен ретроспективный эпидемиологический анализ заболеваемости ОКИ в Сумской области Украины в 2005 – 2014 гг.

У 93 больных ОКИ, госпитализированных в Сумскую областную клиническую инфекционную больницу и у 60 лиц контрольной группы (пациенты травматологического отделения Сумской городской клинической больницы №1), с целью исследования микрофлоры кишечника, проводился забор нативного материала в 1-2 сутки с момента их госпитализации [4]. Выделены 130 культур микроорганизмов (104 из клинического материала, отобранного от больных ОКИ и 26 из фекалий лиц группы сравнения), проведена их идентификация до вида общепринятыми методами. В работе использованы среды: Эндо, Плоскирева, Висмут-сульфит агар, Сабуро, желточно-солевой агар, питательный агар, агар с добавлением 5 % дефибринированной крови, среды для лактобактерий и бифидумбактерий. Для оценки биоценозов пользовались показателем постоянства  $C$  ( $C = (p/P) \times 100$  %, где  $C$  – показатель постоянства;  $p$  – число наблюдений, содержащих изучаемый вид;  $P$  – общее число наблюдений) [5]. При  $C > 50$  % изучаемые бактерии считали постоянными, при  $C = 25-50$  % – добавочными, при  $C < 25$  % –

случайными участниками микробиоценоза. Для характеристики частоты встречаемости данного вида возбудителя в качестве ассоциантов определяли коэффициент ассоциативности (КА), рассчитываемый как отношение абсолютного числа культур – ассоциантов определенного вида ( $E$ -сумма) к общему числу выделенных культур этого вида, приведенное к 100 и выраженное в %. Коэффициент ассоциативности ниже 50 % учитывался как низкий, 50-79 % средний, 80-100 % – высокий. Взаимоотношения между членами микробиоценозов исследовали, определяя степень сопряженности связей в ассоциациях, по коэффициенту Жаккарда ( $g$ ), рассчитываемый как отношение абсолютного числа выборок, содержащих оба вида микроорганизмов ( $c$ ), к сумме абсолютных чисел, выборка обеих видов и разницы выборок, содержащей оба вида, выраженное в % [6, 7]. В зависимости от величины коэффициента Жаккарда судили о наличии антагонистических, синергических или мутуалистических взаимодействий между микроорганизмами. Если  $g < 30$  % - отношения между видами антагонистические, т.е. не позволяют существовать обоим видам; при  $g$  до 70 % бактерии способны к сосуществованию, а их экологическая общность велика (синергизм); при  $g$  более 70 % возможно только совместное существование (мутуализм).

С целью установления роли вирусов в возникновении диарейных инфекций, используя методы иммунохроматографического анализа (ИХА) (экспресс-тесты «СITO TEST ROTA-ADENO» и «СITO TEST NORO – изготовитель ТОО «Фармаско», г. Киев, Украина, RIDA QUICK Аденовирус / Ротавирус и RIDA QUICK Норовирус – изготовитель R-Biopharm AG, Германия), исследовано 93 образца фекалий. Положительные результаты получены у 26 пациентов.

В работе использованы эпидемиологические и микробиологические методы исследования. Статистическую обработку полученных результатов проводили с применением общепринятых параметрических критериев статистики [8].

### Результаты и их обсуждение

В 2005-2014 гг. показатели заболеваемости ОКИ населения Сумской области находились в пределах 163,7 – 193,6 на 100 тыс. нас., без отчетливой тенденции к снижению (средний темп прироста ( $T_{пр.ср}$ ) составил +0,52 %) . ОКИ и пищевые токсикоинфекции, установленной этиологии (ОКИУЭ) доминировали в структуре диарейных инфекций (удельный вес колебался от 35,1 до 58,7 %). Среди возбудителей доминировали ( $p < 0,05$ ) были *K. pneumonia*, *S. aureus* и *E. cloacae*. Показатели заболеваемости диарейными инфекциями, вызванные клебсиеллами варьировали от 15,1 до 39,3; стафилококками от 15,7 до 20,5; энтеробактерами от 5,1 до 24,9 на 100 тыс. нас. На

рост показателей диарейных инфекций, вызванных УПМ, также указывали и другие исследователи и при этом связывали изменение этиологического спектра возбудителей ОКИ как с особенностями симбиотических взаимоотношений между бактериями, так и снижением иммунной реактивности организма в условиях ухудшения экологии и селективного воздействия антибактериальных препаратов [9, 10].

С целью изучения частоты встречаемости в современных условиях ОКИ, вызванных ассоциациями бактерий и вирусов, нами были исследованы испражнения больных ОКИ и было установлено, что в  $6,6 \pm 2,8$  % случаев из фекалий изолировали диареогенные эшерихии,  $7,9 \pm 3,1$  % - вирусы,  $14,5 \pm 3,9$  % - сальмонеллы,  $30,3 \pm 5,2$  % - УПМ в монокультуре,  $40,7 \pm 5,6$  % - ассоциации вирусов, УПМ, сальмонелл, грибов рода *Candida* (рис.1).

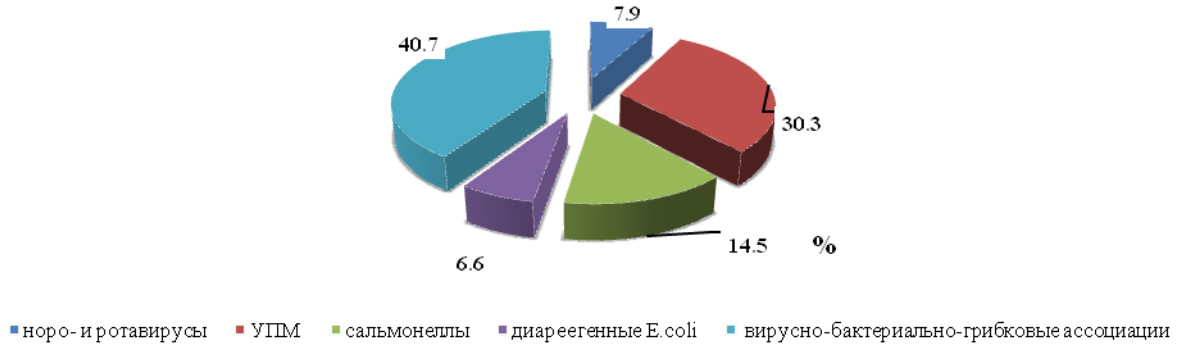


Рисунок 1. Этиологическая структура ОКИ

Особенностью современных ОКИ, является ассоциативный характер поражения. В фекалиях больных одновременно присутствовали несколько возбудителей, часто относящиеся к разным таксономическим группам. Нами было установлено, что норовирусы в ассоциациях с *K.pneumonia*, *S.aureus*, *S.typhimurium*, *K.pneumonia* и *P.aeruginosae*, изолировали в 21,1 % случаев, ротавирусы - с *S.aureus*, диареогенными *E.coli*, *S.enteritidis*, *C.albicans* - в 5,3 %, УПМ - с другими УПМ (*K.pneumonia* и *S.aureus*, *K.pneumonia* и *P.aeruginosae*) - в 3,9 %, *S.aureus* с *S.typhimurium*

и диареогенными *E.coli* - в 2,6 %. *C.albicans*, в ассоциациях с УПМ и *S.typhimurium* выделяли у 12,9 % обследованных больных ОКИ. Наиболее значимую роль в кишечном биоценозе больных ОКИ имели *K.pneumonia*, норовирусы, *S.aureus* и *C.albicans* которые выделяли, соответственно, в  $23,6 \pm 4,4$ ;  $21,6 \pm 4,3$  и  $19,4 \pm 4,1$  % случаев. *S.enteritidis* изолировали в  $10,8 \pm 3,2$  % исследованных образцов фекалий, *S.typhimurium* - в  $8,6 \pm 2,9$  %. Частота выделения *P.aeruginosae*, диареогенных *E.coli*, ротавирусов, была меньше и составляла  $8,6 \pm 2,9$  %;  $7,5 \pm 2,8$  %;  $6,5 \pm 2,6$  % (рис. 2).

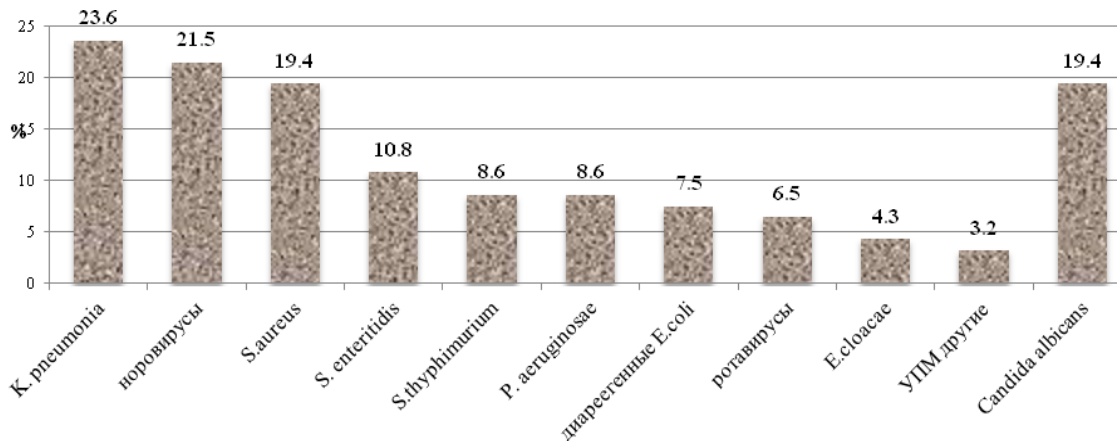
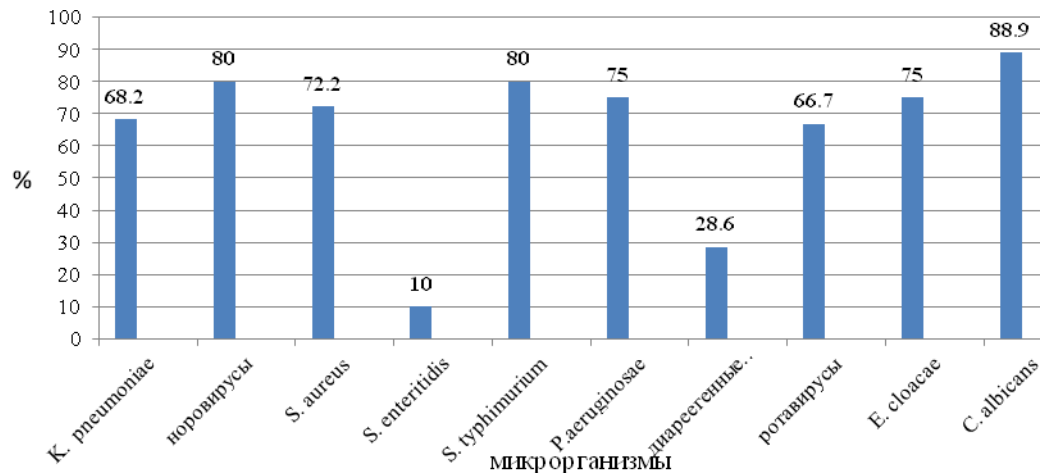


Рисунок 2. Коэффициент постоянства микроорганизмов кишечника у больных ОКИ

Оценка ассоциативности отдельных представителей микробиоценоза кишечника больных ОКИ показала, что норовирусы, *S.*

*typhimurium*, *C.albicans* имели высокий КА, *S.enteritidis*, диареогенные *E.coli* - низкий. Большинство исследованных микроорганизмов имели средние значения КА (рис. 3).



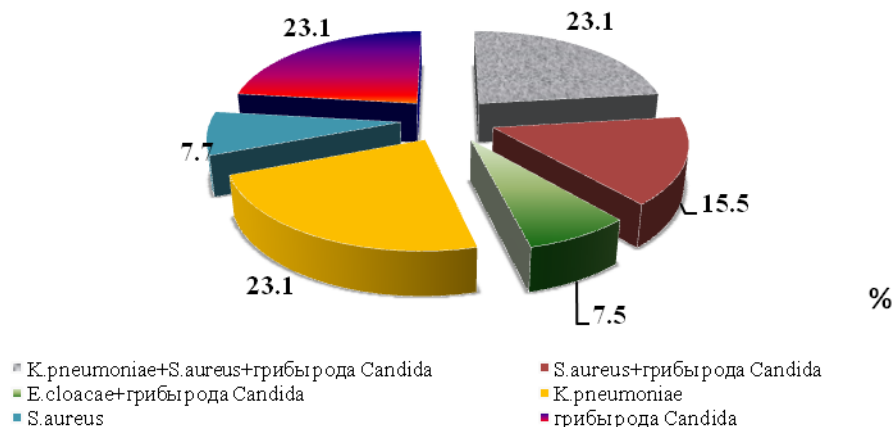
**Рисунок 3. Коэффициент ассоциативности микроорганизмов, выделенных из фекалий больных ОКИ**

Находясь в биотопе в составе сообщества, бактерии могут вступать между собой в те или иные взаимоотношения. Между норовирусами и *K. pneumoniae* (36,4 %), норовирусами и *S. typhimurium* (40,0 %), норовирусами и *P. aeruginosae* (40,0 %), нами были установлены синергидные взаимоотношения. Большинство микроорганизмов в кишечнике больных ОКИ взаимодействовали конкурентно. Коэффициент Жаккарда  $g$  для *K. pneumoniae* и *S. aureus*, *K. pneumoniae* и *P. aeruginosae*, *K. pneumoniae* и *C. albicans*, составил соответственно 9,5; 9,1 и 16,7 %, *S. aureus* и норовирусов, *C. albicans*, а также *S. typhimurium* и диареогенными *E. coli* - 18,2; 14,3 и 7,7 %. Кроме, того антагонистические взаимоотношения установлены между *C. albicans* и *S. typhimurium* (7,1 %), *C. albicans* и *P. aeruginosae* (5,3 %), *C. albicans* и *E. cloacae* (20,0 %).

Таким образом, исходя из вышеизложенного, можно сделать вывод о том, что микросимбиоз кишечника больных ОКИ характеризуется сложными связями в ассоциациях.

Исследуя фекалии лиц, без признаков диарейной инфекции, нами было установлено, что УПМ и грибы рода *Candida* в этиологически значимой степени обсеменения выделяли в  $43,3 \pm 6,4$  % случаев. При этом, *C. albicans*, а также *K. pneumoniae* и *S. aureus* изолировали в  $26,7 \pm 5,7$  % и  $20,0 \pm 5,2$  % случаев. Показатель постоянства *E. cloacae* составил  $3,3 \pm 2,3$  %.

УПМ, грибы рода *Candida*, *S. aureus* были выделены в ассоциациях в  $46,1 \pm 9,8$  % случаев. Штаммы *K. pneumoniae* в  $23,1 \pm 5,4$  % исследованных образцов нативного материала изолировали с *S. aureus* и *C. albicans*, *C. albicans*, соответственно в  $15,5 \pm 4,7$  и  $7,5 \pm 3,4$  % - с *S. aureus* и *E. cloacae* (рис. 4).



**Рисунок 4. Частота встречаемости ассоциаций бактерий в микробиоценозе кишечного биотопа лиц, без признаков ОКИ**

Коэффициент ассоциативности микроорганизмов в кишечных биотопах лиц контрольной группы составил для *K. pneumoniae* -

50 %, *S. aureus* - 83,3 %, *C. albicans* - 90,0 %. Антагонистических и мутуалистических взаимодействий, между микроорганизмами, колонизирующими кишечник лиц, без признаков

диарейной инфекции, мы не обнаружили. Наибольшую силу межмикробных связей установлено для культур *K. pneumonia* и *S. aureus* ( $g=42,9\%$ ), *S. aureus* и *C. albicans* ( $g=33,3\%$ ).

#### Выводы

1. В современных условиях в Сумской области в структуре зарегистрированных диарейных инфекций доминируют ОКИУЭ ( $p<0,05$ ). Среди возбудителей преобладают ( $p<0,05$ ) УПМ: *K. pneumonia*, *S. aureus* и *E. cloacae*.
2. В 35,5 % случаев в инфекционном процессе ОКИ участвуют ассоциации микроорганизмов ( $p<0,05$ ). Показатель постоянства *K. pneumonia*, норовирусов, *S. aureus* и *C. albicans* составляет, соответственно, 23,6 %, 21,6 и 19,4 %. Между микроорганизмами преобладают конкурентные взаимоотношения ( $p<0,05$ ).
3. Увеличение плотности грибов рода *Candida*, УПМ, выявлено в кишечном биотопе 43,3 % лиц, без признаков диарейной инфекции (в 20,0 % случаев микроорганизмы изолированы в ассоциациях). Коэффициент постоянства *C. albicans*, *K. pneumonia* и *S. aureus* составляет 26,7 и 20,0 %, соответственно. Между ассоциантами (*K. pneumonia* и *S. aureus*, *S. aureus* и *C. albicans*) установлен синергидный характер взаимодействий.
4. Микрoэкологические характеристики кишечных биоценозов больных ОКИ и лиц, без признаков диарейной инфекции, опосредованно, свидетельствуют о том, что микрофлора кишечного биотопа может быть потенциальным фактором риска развития инфекционно-воспалительного процесса. Дальнейшее изучение взаимоотношений между членами микробиоценозов, поможет расширить наше представление о механизмах взаимодействия между микроорганизмом и хозяином, и в дальнейшем способствовать разработке мероприятий, направленных на снижение заболеваемости ОКИ.

#### References

1. Bukharin O. V. Ecology microbial of human [Text] / O. V. Bukharin, A. V. Valyshev, F. G. Gilmutdinova // Ekaterinburg, Ural Branch of Russian Academy of Sciences, 2006.
2. Semenov A. V. Antagonism as a result of cross-species interaction [Text] / A. V. Semenov // Bulletin of the Orenburg scientific center UB RAS. - 2013. - N 31. - P.1-7.
3. Nesmeyanova N. N. Violation Endoecology mucous membranes of the upper respiratory tract as an indicator prenosological changes under the influence of a complex of toxic substances [Text] / N. N. Nesmeyanova // Bulletin ESSC SB RAMS. - 2005. - Vol. 2. - N. 40 - P. 66-70.
4. Order of the USSR Ministry of Health № 535 "On the unification of microbiological (bacteriological) methods of research used in clinical diagnostic laboratories of medical institutions." Moscow. 1985.

5. Baturo A. P. Nasopharyngeal microflora of patients with urticaria [Text] / A. P. Baturo, E. V. Davydova, M. A. Mokronosova // Clinical Laboratory Services. - 2001. - № 11. - P. 31.
6. Research associations microbiocenosis bacteria in nasal mucosa of healthy people [Text] / E. V. Belyaeva, G. B. Ermolina, V. V. Kichikova, V. A. Nikiforov // Bulletin of the Nizhny Novgorod University. Lobachevsky. - 2012. - Vol. 2. - N 3. - P. 20-24.
7. Zakharov E. A. Microecological characteristic of intestinal microbiota sickly children [Text] / E. A. Zakharov, J. S. Azizov // Zh. microbe. epidemiology. and immunol. - 2012. - N 2. - P. 63-68.
8. Epidemiological analysis. Methods of statistical processing of the material. Savilov E. D., Astafjevs V. A., Zhdanov S. N., Zarudneva E. A. Novosibirsk Science Center, 2011.-156 p.
9. Clinical study of acute childhood diarrhea caused by bacterial enteropatogens [Text] / V. K. Rathaur, M. Pathania, A. Jayara, N. Yadav // J Clin Diagn Res. - 2014. -Vol. 8. - N 5. - P. 1-5.
10. Etiological structure of acute infectious diarrhea in children and adults [Text] / S. V. Khaliullina, V. A. Anokhin, I. A. Gutor, G. R. Hasanov // Practical medicine. - 2012. - Vol. 1. - N 56. - P. 13-15.
11. Voronkina I. A. Some issues of acute intestinal infections and microecology [Text] Деякі питання гострих кишкових інфекцій та мікроекології / I. A. Voronkina // Annals of Mechnikov Institute - 2006. - N 3. -C. 56 - 60.

#### INVESTIGATION OF ECOLOGICAL FEATURES OF ACUTE DIARRHEAL INFECTION PATHOGENS

Malysh N.G., Holodilo E.N., Chemych N.D.

**Introduction.** Microbiocenosis of human body also differs in extreme multicomponents and diverse content of microflora representatives forming its part. According to the biotype of bacterial contamination certain inter-bacterial relations are formed, which is reflected in the qualitative and quantitative characteristics of appropriate microbial landscape. Analysis of numerous microbial association manifestations allows evaluating changes in the pathogen properties influenced by associative microbiota. **Work objective** - based on the study ecological features of microorganisms isolated from intestine of patients with acute intestinal infections and apparently healthy people, identify potential risk factors for diarrheal infections. **Materials & methods.** A retrospective epidemiological analysis of acute diarrheal infections incidence was conducted during 2004-2013, using the statistics of the Main Department of the State Sanitary and Epidemiological Service of Ukraine in Sumy region. The intestinal microflora of 93 patients with acute diarrheal infections and 60 persons of the control group (apparently healthy people). As the result 130 bacterial cultures were allocated. Permanence rate was used to estimate biocenosis. Relationships between microbiocenosis members were investigated by

determining degree of bond conjunction in associations, using Jaccard coefficient (g). **Results & discussion.** In 2005-2014 acute diarrheal infection incidence rates of Sumy region population were within 163.7 - 193.6 per 100 people without tendency to decrease. Acute intestinal infections and food toxicoinfections caused by opportunistic pathogens and viruses ( $p < 0.05$ ) dominated in nosological structure. In 35.5 % of cases diarrheal infections were of polyetiological nature. Noroviruses in associations with *Candida* bacteria and fungi most often occurred ( $p < 0.05$ ) in the intestinal biotypes. Permanence rate of *K. pneumonia*, noroviruses, *S. aureus*, *C. albicans* was the highest and was accordingly 23.6; 21.5; 19.4 and 19.4 %. *C. albicans* (88.9 %), noroviruses (80 %), *S. typhimurium* (80 %), *P. aeruginosae* (75 %), *E. cloacae* (75 %), *S. aureus* (72.2 %), *K. pneumonia* (68.2 %), rotaviruses (66.7 %) had average and high associativity coefficient values. The most part of associated causative agents ( $p < 0.05$ ) had antagonistic relations. Stable bacterial associations were formed between noroviruses and *K. pneumonia*, noroviruses and *S. typhimurium*, noroviruses and *P. aeruginosae* (g respectively 36.4; 40.0; 40.0 %). *C. albicans*, *K. pneumoniae*, *S. aureus*, *E. cloacae* were isolated from healthy people feces in diagnostically significant degree of contamination 43.3 % of cases. The permanence coefficient rated respectively 26.7; 20.0; 20.0; 3.3 %, as well as the associativity coefficient was 90.0; 50.0; 83.3; 100 %. *K. pneumoniae* and *S. aureus* (g=42.9 %), *S. aureus* and *C. albicans* (g=33.3 %) cultures showed the greatest strength of microbial relations. **Conclusion.** In the process of microorganism co-existence different kinds of relations are formed between them - competitive or cooperative, and as the result the specific microsymbiogenesis is formed according to them. Having established universal common factors of this microsymbiogenesis, you can find ways to protect body from infection.

**Keywords:** acute diarrheal infections, microorganism association, ecological features.