

ОРИГІНАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

2. Use of rainfall and sea surface temperature monitoring for malaria early warning in Botswana / M.C. Thomson, S.J. Mason, T. Phindela, S.J. Connor // *J. Trop. Med. Hyg.* – 2005. – Vol. 73, N 1. – P. 214-221.
3. Joshi G.P. A survey of species A and B of the *Anopheles gambiae* Giles complex in the Kisumu area of Kenya prior to insecticidal spraying with OMS-43 (fenitrothion) / G.P. Joshi, M.W. Service, G.D. Pradhan // *Trop. Med. Parasitol.* – 1975. – Vol. 69. – P. 91-103.
4. Annual *Plasmodium falciparum* entomological inoculation rates (EIR) across Africa: literature survey, internet access and review / S.I. Hay, D.J. Roger, J.F. Toomer, R.W. Snow // *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* – 2000. – Vol. 94. – P. 113-127.
5. Minakawa N. Influence of host and larval habitat distribution on the abundance of African malaria vectors in Western Kenya / N. Minakawa, P. Seda, G. Yan // *J. Trop. Med. Hyg.* – 2002. – Vol. 67, N 1. – P. 32-38.
6. Outdoor host seeking behaviour of *Anopheles gambiae* mosquitoes following initiation of malaria vector control on Bioko Island, Equatorial Guinea / [M.R. Reddy, H.J. Overgaard, S. Abaga et al.] // *J. Malaria.* – 2011. – Vol. 10. – P. 184.
7. Lindsay S.W. Mapping the ranges and relative abundance of the two principal African malaria vectors *Anopheles gambiae* sensu stricto and *An. arabiensis* using climate data / S.W. Lindsay, L. Parson, C.J. Thomas // *Proc. R. Soc. LondB Biol. Sci.* – 1998. – Vol. 265. – P. 847-854.
8. Characteristics of larval anopheline (Diptera: Culicidae) habitats in Western Kenya / J.E. Gimnig, M. Ombok, L. Kamau, W.A. Hawley // *J. Med. Entomol.* – 2001. – Vol. 38. – P. 282-288.
9. Seasonal density sporozoite rates and entomological inoculation rates of *Anopheles gambiae* and *Anopheles funestus* in a high-altitude sugar cane growing zone in Western Kenya / J.I. Shillu, W.A. Maier, H.M. Seitz, A.S. Orago // *Trop. Med. Int. Health.* – 1998. – Vol. 3. – P. 706-710.
10. High prevalence of asymptomatic plasmodium vivax and plasmodium falciparum infections in native Amazonian populations / [F.P. Alves, R.R. Durlacher, M.J. Menezes et al.] // *J. Trop. Med. Hyg.* – 2002. – Vol. 66, N 6. – P. 641-648.
11. Theander T.G. Unstable malaria in Sudan: the influence of the dry season. Malaria in areas of unstable and seasonal transmission. Lessons from Daraweesh / T.G. Theander // *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* – 1998. – Vol. 92. – P. 589-592.
12. The relationship between *Anopheles gambiae* density and rice cultivation in the savannah zone and forest zone of Cote d'Ivoire / [O.J. Briet, J. Dossou-Yovo, E. Akodo et al.] // *Trop. Med. Int. Health.* – 2003. – Vol. 8. – P. 439-448.
13. Major variations in malaria exposure of travellers in rural areas: an entomological cohort study in western Cote d'Ivoire / [E. Orlandi-Pradines, C. Rogier, B. Koffi et al.] // *J. Malaria.* – 2009. – Vol. 8. – P. 171.
14. Malaria in French soldiers in the Ivory Coast from 1998 to 2006 / [R. Migliani, L. Ollivier, O. Romand et al.] // *Bull. Epidemiol. Hebd.* – 2008. – Vol. 23-24. – P. 209-212.

SEASONAL ACTIVITY OF MOSQUITOES ANOPHELES AND THEIR INFLUENCE ON MALARIA MORBIDITY

V.I. Trykhlіb

SUMMARY. In the article data about a dependence on malaria morbidity from the season (to time) of year are cited. A literature review and information of analysis of medical document of peacekeepers is brought.

Key words: morbidity, malaria, peacekeepers.

Отримано 24.01.2013 р.

© Бурова Є.Д., Бурова Л.М., 2014
УДК 602.3:579.842.1/2:615.33:616-093/-098

Є.Д. Бурова, Л.М. Бурова

ЧУТЛИВІСТЬ КОЛІЦИНОГЕННИХ ШТАМІВ *ESCHERICHIA COLI* ДО ЛІКУВАЛЬНИХ БАКТЕРІОФАГІВ І ПРОБІОТИЧНИХ ПРЕПАРАТІВ

Львівський національний медичний університет ім. Данила Галицького

Представлено результати дослідження чутливості коліциногенних штамів *E. coli*, ізольованих із товстої кишки пацієнтів на дисбіоз, до біологічних препаратів: лікувальних бактеріофагів (інтесті-бактеріофагу, секстафагу), пробіотичних препаратів «Колібактерин»,

«Біоспорин-Біофарма». Виявлено «універсальний» індикаторний штам до коліциногенної дії клінічних ізолятів кишкової палички. Показано високу активність лікувальних бактеріофагів, ефективність використання пробіотичних препаратів і доцільність, в деяких

ОРИГІНАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

випадках, використання біологічних препаратів, виготовлених із власних штамів кишкової палички, виділених від хворих на дисбіоз, з метою корекції біоценозу кишечника.

Ключові слова: дисбіоз, *Escherichia coli*, коліциногенність, бактеріофаги, пробіотики.

Мікробіоценоз кишечника є динамічною екологічною системою, яка сприяє створенню однорідних умов для нормальної життєдіяльності автофлори і регулюванню численних функцій макроорганізму. Недолік чи надлишок того або іншого субстрату (метаболіту) є сигналом для посилення росту чи пригнічення відповідної ланки екосистеми. У процесі еволюції відбулася спеціалізація функцій постійних представників нормальної мікрофлори. Загалом існує складна багаторівнева система регуляції симбіотичних взаємин між мікробними популяціями і клітинами макроорганізму [1]. Доведено, що у спільнотах мікроорганізмів існує інформаційний обмін, що отримав назву *quorum senses* («почуття кворуму»), коли залежно від концентрації речовин мікробного походження (феромонів, бактеріоцинів або просто мікробних метаболітів) мікроорганізми отримують інформацію про мікробне оточення, чисельність мікроорганізмів і концентрації поживних речовин, що в підсумку визначає функціональну активність як окремих мікробних штамів, так і загалом мікробіоценозу як єдиної системи [2].

Кишкова паличка з повноцінними ферментативними властивостями є основним представником факультативно-анаеробної флори товстої кишки. Регуляторами росту бактерій в кишечнику є різні екзоензими і бактеріоцини. Коліцини є одним з кілерних факторів, які бактерія може використовувати для пригнічення конкурентних видів мікробів, відбувається конкуренція з умовно-патогенними бактеріями за джерело живлення [3]. Крім того, бактеріоцини вкрай важливі для формування нормальної мікрофлори [4] і є одним з найбільш важливих властивостей індигенних кишкових паличок, які обумовлюють швидку інвазію [5]. Також коліцини можуть виконувати подвійну роль і діяти як антибіотики щодо ентеробактерій-опортуністів і як пробіотики – сприяючи колонізації слизової оболонки кишечника нормальними симбіонтами [6].

При дисбіозі товстої кишки значно порушується баланс між облігатною, факультативною і транзитornoю мікрофлорою біотопу. Це супроводжується зниженням фізіологічної активності нормальної мікрофлори, що виражається у появі різноманітних дисфункцій кишечника. Із формуванням дисбіозу

насамперед зменшується концентрація у біотопі облігатних представників анаеробної цукролітичної флори (біфідобактерій, лактобацил тощо), і на цьому фоні спостерігається зростання рівня популяцій умовно-патогенних мікроорганізмів (ешерихій, ентерококів, клостридій та ін.) [2].

Сучасні методи корекції порушень у мікробній екосистемі людини базуються на використанні широкого спектру біологічних препаратів. Найбільш зважений підхід до терапії дисбіозів представлений В.Ф. Приворотським та співавт. (2005). Перший етап – ентеросорбція. Другий етап – мікробна деконтамінація (ерадикація): застосування антибіотиків та бактеріофагів. Третій етап – імплантація нормальної мікрофлори в кишечник, відновлення функціональної активності, з використанням пробіотиків [2]. Бактеріофаги – це віруси мікроорганізмів, які мають високу специфічність до відповідних умовно-патогенних мікроорганізмів. Вони діють вибірково на окремі види бактерій, не ушкоджуючи нормальну мікрофлору. Сьогодні встановлено, що віруси бактерій є важливою стабілізуючою ланкою еубіозу. Антибактерійний ефект препаратів бактеріофагів обумовлений внесенням геному фагу в бактерійну клітину з подальшим його розмноженням і лізисом інфікованої клітини, що дозволяє регулювати популяційний процес в кишечнику.

Пробіотичний препарат «Колібактерин» – одноштамовий препарат на основі ліофілізованої біомаси *E. coli M-17*. До мікроорганізмів-пробіотиків відносять бактерії, властиві нормальній мікрофлорі травного каналу (ТК) людини. До цього ряду також включають і мікроорганізми, яким не властиве постійне перебування в товстому кишечнику людини, але які проявляють позитивний вплив на функції ТК та ріст індигенної кишкової мікрофлори, наприклад деякі штами *B. subtilis*. «Біоспорин» – препарат нового покоління пробіотиків, до складу якого входить два види мікроорганізмів *B. subtilis* і *B. licheniformis*, які взаємно підсилюють лікувальний ефект один одного. В організмі людини пробіотики проявляють протимікробну активність по відношенню до патогенних мікроорганізмів і представників транзитornoї і облігатної мікрофлори, конкуруючи з ними за рецептори, субстрати, проявляючи імуномодулюючі властивості, та посилюють регенерацію пошкодженого епітелію [7]. Антимікробна дія пробіотиків може бути обумовлена найрізноманітнішими механізмами, але найбільш часто в основі антимікробної активності пробіотиків лежить їхня здатність синтезувати велику кількість антимікробних пептидів – бактеріоцинів. Отже, з одного боку, представники нормофлори, в нашому

ОРИГІНАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

випадку кишкова паличка, здатні продукувати коліцини, з іншого боку, пробіотичні штами також володіють даною бактеріоциногенною активністю. Тому метою роботи було вивчення чутливості коліциногенних штамів *E. coli*, ізольованих із товстої кишки пацієнтів на дисбіоз, до біологічних препаратів: лікувальних бактеріофагів (інтесті-бактеріофагу, секстафагу), пробіотичних препаратів «Колібактерин», «Біоспорин-Біофарма».

Матеріали і методи

Штами *E. coli* виділяли з випорожнень 100 пацієнтів різного віку, які мали порушений мікробіоценоз кишечника. Ідентифікацію мікроорганізмів проводили за морфо-тинкторіальними, культуральними властивостями. Біохімічні тести включали: індолоутворення, декарбоксілювання лізину, наявність галактозидази, відсутність утилізації цитратів. Цукролітичну активність визначали на середовищі Гіса [8].

Здатність *E. coli* синтезувати коліцини встановлювали методом [9]. Для цього штами кишкової палички вирощували 24 год при 37 °С до окремих макроколоній на тестових чашках Петрі з 2 % МПА. Безпосередньо перед використанням бульйонні суспензії індикаторних штамів підросували 6 год в МПБ при 37 °С. Чашки із макроколоніями досліджуваних культур обробляли парами хлороформу протягом 50 хв. Наступні 2,5 год їх підсушували на повітрі під ультрафіолетом. Свіжі бульйонні культури індикаторних штамів об'ємом 0,1 мл змішували з 5 мл 0,7 % розплавленого і потім охолодженого до 48 °С МПА. Цією сумішшю заливали попередньо підготовлені тестові чашки. Облік результатів проводили після інкубації чашок при 37 °С 24 год. Якщо навколо макроколонії спостерігали помітну зону інгібування індикатора, даний штам розглядався як продуцент коліцина. Як індикаторні культури використовували лабораторні штами *E. coli*: K-12, C 600, BE, C1a. Індикаторний штам *E. coli* M-17 виділили з пробіотику «Колібактерин» виробництва ВАТ «Біофарма», Україна. Для вираження рівня кілерної активності коліцинів застосовували умовні показники – від одного до чотирьох плюсів («+» до «++++»). Коліцинна активність низького рівня, коли на газоні індикатора утворювались зони діаметром від 7 до 16 мм, була виражена показником «+». Середній і високий рівень активності позначали «++» і «+++», їх характеризували зони пригнічення з діаметрами 17-26 мм і 27-36 мм відповідно. Дуже високий рівень – «++++» – зони розміром від 37 до 46 мм.

Чутливість до лікувальних бактеріофагів російського виробництва: інтесті-бактеріофагу (Биофаг ДП Иммунопрепарат НПО ГУП) та секстафагу (ФГУП Биомед Пермское НПО) визначали нанесенням 5 мкл відповід-

ного фагу на газон з досліджуваним штамом. Результати оцінювали за зливним лізисом індикаторної культури бактерій та негативними колоніями фагів.

Для визначення антагоністичної активності препарату «Біоспорин-Біофарма» (ЗАТ «Біофарма» Київ, Україна) вміст ампули розчиняли в 0,85 % розчині натрію хлориду з розрахунку 1 мл на 1 дозу препарату пробіотику. Отриману суспензію висівали штрихом по діаметру на чашці Петрі з середовищем Гаузе-2. Посіви культивували при t 37 °С протягом 73 год. У подальшому до колоній підсівали перпендикулярним штрихом матеріал тест-штамів. Визначення результатів проводили через 18 год інкубації в термостаті при t 37 °С за величиною зон пригнічення росту тест-культур. Для вираження рівня антагоністичної активності коліцинів застосовували умовні показники: «+» – антагоністична активність низького рівня, зона пригнічення росту тест-культури становила 3-4 мм; «++» – зона пригнічення росту тест-культури становила 5-6 мм, 7 мм і більше – «+++».

Результати досліджень та їх обговорення

У всіх обстежених 100 пацієнтів спостерігали зміни еубіозу товстої кишки. Виявляли зменшення біфідум- і лактобактерій, а також кількісні та якісні зміни в спектрі умовно-патогенних ентеробактерій, стафілококів, ентерококів і грибів роду *Candida*. Для того, щоб встановити основні особливості коліциногенності *E. coli* при дисбіозах, були вивчені рівні кілерної активності коліцинів і характер їхньої дії на всіх п'яти індикаторних штаммах (табл. 1). Скринінг бактерій на наявність синтезу активних коліцинів показав, що 31 із 100 досліджуваних штамів *E. coli* є бактеріоциногенними, що становило 31 %. 10 (32 %) штамів із 31 досліджуваного були виявлені у дітей до 1 року, 8 (25 %) – у дітей до 15 років, 13 (43 %) – у дорослих пацієнтів.

З урахуванням загальної кількості пацієнтів у кожній з трьох вікових груп спостерігається тенденція збільшення кількості коліциногенних штамів із збільшенням віку. 27 досліджуваних ізолятів виявили антагоністичну активність відносно індикаторного штаму *E. coli* C 600, 22 ізоляти до *E. coli* K-12, 20 ізолятів до *E. coli* BE та 15 ізолятів до *E. coli* C1a.

В подальших дослідженнях використані лише *E. coli* Col+ штами (n=31).

Високою виявилась антагоністична активність коліциногенних штамів кишкової палички до пробіотичного штаму *E. coli* M-17, що становила 65 %. Виходячи з цього, лише в 35 % пробіотичний штам здатний протистояти дії мікроорганізмів – клінічних Col+ ізолятів кишкової палички, тобто пробіотичний штам, у визначеній мірі, втратив антагоністичну активність.

ОРИГІНАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

Таблиця 1

Чутливість колициногенних штамів *E. coli* до біологічних препаратів

№ Col-штаму	Вік пацієнта (роки)	Індикаторний штам <i>E. coli</i>					Чутливість до		Антагоністична активність біоспорину
		K 12	M 17	C600	BE	C-la	інцесті-бактеріофагу	секстафагу	
19	2 тижні	++++	++	++++	++++	+	л	л	--
43	1 міс.	++	+	++	-	-	л	л	--
30	1,5 міс.	++	-	++	-	-	л	-	--
1	2 міс.	++	+	++	+	++	л	л	--
97	2 міс.	+++	+	++	++	+++	ф.б	-	--
37	3 міс.	-	+	+++	-	+	л	л	--
47	3 міс.	+	+	+++	++	+++	л	л	--
27	4 міс.	-	+	-	++	-	ф.б	л	--
21	6 міс.	++++	-	+++	-	++	л	л	+
22	11 міс.	-	-	++	-	-	л	л	+
14	1	-	-	+	++	-	-	л	+
76	2	-	+	++	+	-	ф.б	ф.б	+
38	2	+++	++	+++	+++	++	л	л	++
32	3	+++	+	-	+	-	л	-	++
70	3	-	++	+++	+++	+	л	л	+
40	7	+++	++	++++	+++	+++	ф.б	л	+
12	11	-	+	+	++	+	-	л	+
77	15	+++	+	++++	++++	++	л	л	++
58	20	+	+	+	+	-	-	-	+
69	21	++	-	++	+	-	-	-	0
20	22	+	-	+	-	-	л	л	0
33	23	-	-	-	+	-	л	л	+++
28	24	+++	-	++	+	-	-	л	+
53	31	++	+	++	-	-	-	-	+
100	31	+++	++++	+++	++++	++++	л	л	+
71	35	+	-	++	-	-	л	л	+
11	38	+	-	++	-	++	ф.б	ф.б	+
98	38	+	+++	++	+++	++	л	ф.б	+
99	40	-	-	+	-	-	-	л	+
42	51	+	+	+	++	++	ф.б	л	++
31	55	+	+	-	-	-	л	-	+

Примітки: «-» – активність колицинів не виявлена; «-» – дослідження не проводилось; «л» – лізис; «ф.б.» – фагові бляшки (негативні колонії фагів).

При визначенні антагонізму пробіотичного препарату «Біоспорин» використали 23 досліджуваних штами *E. coli* Col+, решта 8 Col+ штамів *E. coli*, ізольовані від дітей до 6 місяців, в цій частині роботи не використовувались, оскільки дітям такої вікової категорії препарат «Біоспорин» не призначається. Проведене дослідження показало високу антагоністичну активність штамів *B. subtilis* і *B. licheniformis*, які входять в склад препарату, до досліджуваних ізолятів. Антагонізм виявився у 91 %, тобто чутливими були 21 штам серед 23 досліджуваних. Зона пригнічення росту клінічних ізолятів кишкової палички становила від 3 до 7 мм. Два штами *E. coli* 20, *E. coli* 69, які

виявили стійкість до препарату «Біоспорин», при цьому були чутливими до пробіотичного штаму *E. coli* M-17.

Інша група препаратів цілеспрямованої дії, які використовуються при корекції еубіозу – бактеріофаги. В цій частині роботи визначили чутливість до інтесті-бактеріофагу та секстафагу. Чутливість в обох випадках становила 77 %, 24 чутливі колициногенні штами серед 31 обстежуваного. При цьому лише 3 штами, а саме *E. coli* 53, *E. coli* 58, *E. coli* 69 виявили стійкість до двох лікувальних препаратів бактеріофагів. Отже, необхідно враховувати специфічність бактеріофагів: кожен вид фагу розпізнає як мішень

ОРИГІНАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

лише ті варіанти або штами бактерій, які мають визначені фагоспецифічні рецептори (фаготипи). Тому призначати бактеріофаги, як і пробіотичні препарати, доцільно на основі результатів бактеріологічної діагностики та під контролем чутливості до них певного збудника.

Висновки

Частота виявлення колициногенних штамів *E. coli* становила 31 %. Індикаторний штам *E. coli* C 600 може бути визначений як «універсальний» штам, який виявився чутливим до дії продуктів антагоністичної активності 27 досліджених ізолятів *E. coli* Col+. Досліджені колициногенні штами виявили високу чутливість (77 %) до лікувальних бактеріофагів (інтести- та секстафагу), що свідчить про доцільність використання бактеріофагів у лікувальній практиці. Порівняльне вивчення чутливості досліджених ізолятів до пробіотичних препаратів показало високу антагоністичну активність (91 %) до препарату «Біоспорин-Біофарма» та посередню (35 %) до препарату «Колібактерин». Отже, пробіотичні штами здатні протистояти дії мікроорганізмів, які входять до складу мікробіоти, але в деяких випадках доцільно використовувати біологічний препарат, виготовлений із власних штамів кишкової палички, виділених від хворих на дисбіоз, з метою корекції біоценозу кишечника.

Література

1. Host-bacterial symbiosis in health and disease / [J. Chow, S.M. Lee, Y. Shen et al.] // *Adv. Immunol.* – 2010. – Vol. 107. – P. 243-274.
2. Дисбіоз кишечника: Руководство по диагностике и лечению / Под ред. Е.И. Ткаченко, А.Н. Суворова. – СПб: ИнформМед, 2009. – 276 с.
3. Colicin biology / [E. Cascales, S.K. Buchanan, D. Duche et al.] // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* – 2007. – Vol. 71, N.1. – P. 158-229.
4. Filichkin S.E. The appearance of antagonism between colicinogenic banal and enteropathogenic *Escherichia coli* isolated from children with colenteritis / S.E. Filichkin, G.D. Mikheeva // *Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol.* – 1967. – Vol. 44, N 1. – P. 134-135.
5. Tan Y. Rapid invasion by colicinogenic *Escherichia coli* with novel immunity functions / Y. Tan, M.A. Riley // *Microbiology.* – 1996. – Vol. 142, N 8. – P. 2175-2180.
6. Gillor O. The dual role of bacteriocins as anti- and probiotics / O. Gillor, A. Etzion, M.A. Riley // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2008. – Vol. 81, N 4. – P. 591-606.
7. Блат С.Ф. Микробиоценоз кишечника и иммунитет / С.Ф. Блат, А.И. Хавкин // *Рос. вестник перинат. и педиатрии.* – 2011. – Т. 56, № 1. – С. 70.
8. Клиническая лабораторная аналитика // Под ред. В.В. Меньшикова. – М.: Агат-Мед, 2003. – Т. IV. – 815 с.
9. Колтукова Н.В. Колициногенна активність та чутливість до антибіотиків колекційних і свіжовиділених штамів *Shigella flexneri* та *Shigella sonnei* / Н.В. Колтукова, Т.Л. Серебрякова, В.В. Яновська // *Микробиол. журн.* – 2005. – Т. 67, № 5. – С. 69-79.

SENSITIVITY OF THE COLICINOGEN STRAINS *ESCHERICHIA COLI* TO MEDICAL BACTERIOPHAGES AND PROBIOTICS PREPARATION

Ye.D. Burova, L.M. Burova

SUMMARY. *The results of the sensitivity study of the colicinogen E.soli strains isolated from patients on bowel dysbiosis, to biological agents: therapeutic bacteriophages (intesti-bacteriophag, sextaphag), probiotic preparations "Colibacterin", and "Biosporin-Biopharma". We found the "universal" indicator strain to colicinogen of clinical isolates of Escherichia coli. There was shown the high activity of therapeutic bacteriophages, the effectiveness of probiotic preparations and feasibility, in some cases, the use of biological products made from their own strains of Escherichia coli isolated from patients with dysbiosis to correct intestinal biocenosis.*

Key words: *dysbiosis, Escherichia coli, colicinogeny, bacteriophages, probiotic preparations.*

Отримано 28.03.2014 р.