

ОРИГІНАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

Література

1. Міроненко А.П. Методичні підходи до виділення вірусів грипу та реалізація їх в Україні // Лабор. діагностика. – 2001. – № 4. – С. 42-44.
2. Бурцева Е.И., Иванова В.Т., Оскерко Т.А., Слепушкин А.Н. Свойства вирусов гриппа А и В, выделенных на куриных эмбрионах и в культуре клеток MDCK // Вопросы вирусологии. – 2001. – № 1. – С. 29-33.
3. Вороненко С.Г. Віруси грипу // Посібник з медичної вірусології. – Київ: Здоров'я, 1995. – 332 с.
4. Беляев А.Л., Слепушкин А.Н. Грипп вчера, сегодня, завтра // Медицинская сестра. – 2002. – № 6. – С. 32-35.
5. Коваленко С.М., Коробка Н.Я. Выделение вирусов гриппа на культуре клеток // Проблемы епідеміології, екології та гігієни. – Дніпропетровськ: Пороги, 2001. – С. 78-79.
6. Методи лабораторної діагностики грипу та гострих респіраторних інфекцій: Методичні рекомендації, затверджені Наказом МОЗ України від 09.02.1998 р. №30. – С. 28-31.

7. Голубева Л.И., Клевцова Г.А., Иванова В.Т. и др. Выделение вирусов гриппа в Новгороде в 1990-1991 гг. // Вопросы вирусологии. – 1993. – №1. – С. 7-8.

8. Иванова В.Т., Бурцева Е.И., Слепушкин А.Н. и др. Распространение и свойства эпидемических штаммов вирусов гриппа А и В, вызвавших подъемы заболеваемости в России в 1999-2002 гг. // Там же. – 2003. – № 4. – С. 11-15.

EXPERIENCE OF MDCK CELL CULTURE USAGE FOR INFLUENZA VIRUSES ISOLATING

S.M. Kovalenko, O.V. Demikhovska, S.A. Ryzhenko, O.H. Radchenko

SUMMARY. The article presents the results of the first Ukrainian experience of implementation of influenza virus isolating method using MDCK cells into the work of virusologic laboratory. Usage of cultural methods during 3 epidemic seasons made it possible to improve the results of influenza virusologic inspection and to save time and material resources.

© Колектив авторів, 2004
УДК 619:579,842.14:616-076:636.5

А.Г. Дяченко, О.М. Савінова, В.В. Липовська, А.Ю. Волянський, І.Ю. Кучма

ФАКТОРФЕРТИЛЬНОСТІ (F) ЕНТЕРОБАКТЕРІЙ ЯК ЕПІДЕМІОЛОГІЧНИЙ МАРКЕР

Сумський державний університет, Інститут мікробіології та імунології ім. І.І. Мечникова, м. Харків

Проведені дослідження циркулюючих ентеропатогенних штамів ешерихій, шигел і сальмонел наявність фактора кон'югативності. Встановлено, що 85 % циркулюючих штамів S. flexneri 2a мають донорську активність відносно F-фактора. Серед ентеропатогенних E. coli (EPEC) різних сероварів кількість таких штамів становить 63 %, у S. enteritidis – 15 %. Оскільки 63 % штамів ентеропатогенних ешерихій мають гемолітичну активність і F-плазмиду кон'югативності, можна вважати визначальними селективними ознаками патогенних ешерихій одночасну присутність гемолітичної та донорської активності відносно F-фактора. Наявність плазмід кон'югативності є важливим епідеміологічним маркером. Згідно з одержаними даними, можна припустити збереження основних сероварів серед циркулюючих штамів ентеробактерій в наступному році. В той же час можна очікувати зниження частки серовару S. enteritidis серед інших збудників сальмонельозної інфекції.

В умовах повсюдного поширення і багаторічної тенденції до росту захворюваності кишковими інфекціями особливу значимість мають прості, інформативні методи діагностики таких ентеробактерій, як ентеропатогенні ешерихії, шигели, сальмонели.

Патогенні ентеробактерії характеризуються поліетіологічністю, значною варіабельністю антигенного складу, різною роллю мікробів та їх токсинів у патогенезі інфекційних захворювань, можливістю зміни збудника [1].

Оцінка епідеміологічної значимості культур, що виділяються від хворих, може ґрунтуватися не тільки на вивченні класичних морфологічних, культуральних, біохімічних і антигенних властивостей, але й на чіткому визначенні маркерів, що забезпечують селективні переваги збудника [2-4].

Поряд з маркерами бактерійної персистенції: антилізабельна, антикомплементарна активність, здатність до інактивації бактерійного складового

ОРИГІНАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

препарату інтерферону, адгезивність [5], дуже показові ознаки бактерій, зумовлені кон'югативними плазмідами, серед яких найбільше вивченими є плазміди резистентності і коліциногенності. Оскільки про F- і F'-подібні кон'югативні плазміди, у тому числі й про Fd-плазмиду шигел, є лише поодинокі відомості [6], метою дослідження було вивчення циркуляції F- і F'-факторів кон'югативності в клітинах ентеропатогенних ешерихій, шигел і сальмонел, а також можливість використання цього фактора як епідеміологічного маркера.

Матеріали і методи

Вивчено 98 штамів ЕРЕС різних сероварів, 120 штамів серовару *S. flexneri* 2a, що є головним збудником серед виду *S. flexneri*, і 78 штамів *S. enteritidis*.

Дослідження проведені на кафедрі клінічної імунології і мікробіології Харківської медичної академії післядипломної освіти. Культури були отримані з бактеріологічних лабораторій м. Суми і Харків.

Донорську активність культур за F-фактором вивчали й оцінювали відповідно до методики, запропонованої для типування дизентерійних бактерій за допомогою нового класу бактеріофагів – донороспецифічних [7].

Для упізнання F-плазмиди ешерихій використовували еталонні бактеріофаги *E. coli* MS2 і ф-П, для індикації Fd-плазмиди шигел – фаги Fd-92 і Fd-9T і для виявлення F'-подібних плазмід сальмонел – донороспецифічний фаг *S. enteritidis* F'-5, отриманий О.В. Обуховською [8] за способом, розробленим Е.М. Савиногою із співавт. [9], зі штамів *S. enteritidis* 5. У якості контрольних штамів використовували еталонні культури *E. coli* CA 8213 /F+/, *E. coli* C-600 /F-/, *S. flexneri* 2a штам 112, /F+/, *S. sonnei* 864-9 /F-/, *S. enteritidis* 5 /F+/.

Результати досліджень та їх обговорення

Для проведення досліджень з ідентифікації донорських штамів ентеробактерій за F-фактором нами були отримані серії бактеріофагів на м'ясопептонному бульйоні при рН середовища 7,2-7,4.

Отримані результати дозволяють зробити висновок про те, що експресія фагів має циклічний характер і, очевидно, пов'язана з біоритмами життєдіяльності клітин, тому що найвищі титри бактеріофагів відзначені при їх одержанні у весняні місяці (кінець лютого, березень, квітень). При цьому для кожного бактеріофага визначені свої максимальні титри, що не враховують можливу подальшу їх концентрацію.

Найбільш концентровані серії виявлені в бактеріофага Fd-92 (фаги без додаткового концентрування мали титр 10^8 - 10^{11}), потім у фага Fd-9T (титр 10^7 - 10^{10}). Досить невисокі титри були у фагів ешерихій – до 10^6 . У донороспецифічного фагу *S. enteritidis* F'-5 не вдалося одержати титри, що перевищують 10^4 - 10^5 .

Результати досліджень донороспецифічної активності патогенних ентеробактерій наведені в таблиці 1.

При ідентифікації донорських властивостей найчіткіші результати отримані серед *S. flexneri* 2a. Всі штами були диференційовані на донорські та реципієнтні, з них 85 % були донорськими.

Донорська активність шигел зумовлена присутністю в клітині фактора генетичного переносу Fd, що і детермінує чутливість цих клітин до фага Fd-92.

Відомо, якщо в мікробній популяції кількість донорських клітин складає 80 % і більше, такий штам має селективні переваги [6, 10]. Очевидно, присутність кон'югативної плазмиди Fd і є одним з факторів, що пояснюють перевагу того або іншого серовару шигел.

Серед штамів ентеропатогенних ешерихій, виділених від хворих після проведеного курсу антибіотикотерапії, виявлено, що 63,27 % бактерій лізувалися донороспецифічним бактеріофагом MS2, що свідчило про присутність у геномі цих клітин F-плазмиди ешерихій, тобто вказувало на донорську активність штамів. Усі вивчені штами ентеропатогенних ешерихій володіли і гемолітичною активністю, що є одним з факторів патогенності культури ешерихій.

У досліджених регіонах зареєстровано 12 сероварів ЕРЕС. Зазначене визначення донорської активності ЕРЕС за допомогою донороспецифічного фага MS2 показало, що у 9 сероварів вияв-

Таблиця 1

Донороспецифічна активність за F-фактором провідних збудників ГКІ, циркулюючих в 2001-2003 рр. в м. Суми і м. Харків

Культура	Кількість штамів	Лізіс фагом																			
		MS2 (PF ⁺)		ф2 (pF ⁺)		Не лізуються		Полілізабельні		Fd-92 (pFd ⁺)		Fd-9T (pFd ⁺)		Не лізуються		Полілізабельні		F-5 (pF ⁺)			
		абс.	%	абс.	%	абс.	%	абс.	%	абс.	%	абс.	%	абс.	%	абс.	%	абс.	%	Нелізабельні	%
<i>S. enteritidis</i>	78	1	1,3	19	24,3	58	74,4	-	-	-	-	18	23,1	60	76,9	-	-	12	15,4	66	84,6
<i>S. flexneri</i> 2a	120	-	-	-	-	-	-	-	-	102	85,0	18	15,0	-	-	-	-	-	-	-	-
ЕРЕС	98	62	63,3	30	30,6	6	6,1	-	-	-	-	30	30,6	68	69,4	-	-	-	-	-	-

Примітки: ЕРЕС – ентеропатогенні ешерихії *coli*; pF⁺ – наявність плазмиди в клітині; pF⁻ – відсутність плазмиди в клітині.

ОРИГІНАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

лені донорські властивості. Донорською активністю за F-фактором володіли всі виділені культури серовару 408, частка яких у популяції всіх штамів ешерихій, що лізувались фагом MS2, склала 42 %. На другому місці за донорською активністю були культури серовару 075. Вони склали 24,2 % від загальної кількості лізованих штамів. Виходячи з цього, можна прогнозувати, що в наступні роки, можливо, зросте кількість захворювань, зумовлених сероварами 408 і 075, хоча вони ще не набрали в популяції критичної маси, яка забезпечує реалізацію їх селективних переваг. Тому поряд з вищевказаними сероварами будуть реєструватися й інші.

Матеріали стосовно донорської активності штамів *S. enteritidis*, а серед них виявлено тільки 12 % донорських штамів, свідчать про те, що цей серовар сальмонел в наступні роки матиме вже меншу епідеміологічну значущість і втратить провідну роль серед збудників сальмонельозної інфекції.

Висновки

1. Серед циркулюючих штамів патогенних ентеробактерій донорська активність за F-фактором у 85 % виявлена у *S. flexneri* 2a, в 63,2 % – у EPEC різних сероварів, виділених від хворих після проведеної антибіотикотерапії, і в 15,4 % – у сероварів анта *S. enteritidis*.

2. Наявність гемолітичної активності у EPEC в 63,2 % збігалася з присутністю F-плазмиди кон'югативності ешерихії, що дає можливість вважати визначальними селективними ознаками для патогенних ешерихій поєднане виявлення гемолітичної і донорської активності за F-фактором. Ці ознаки можуть бути надзвичайно корисні для ідентифікації збудника у випадку неможливості проведення серологічної ідентифікації культури через інаглютинабельність, поліаглютинабельність чи за технічними причинами (відсутність специфічних сироваток в районних баклабораторіях).

3. На підставі проведених досліджень можна з великою імовірністю припустити, що в наступному році драматичних змін серед циркулюючих збудників ентеробактерій не буде. Провідним сероваром серед *S. flexneri* залишиться *S. flexneri* 2a. У той же час відсоток циркулюючих штамів серовару *S. enteritidis* буде знижуватись.

Література

1. Покровский В.И. Энтеробактерии. – М.: Медицина, 1985. – 121 с.

2. Бондаренко В.М. Изучение факторов патогенности шигелл, как основы конструирования диагностических и профилактических препаратов // Журн. микробиол. – 1996. – № 3. – С. 29-34.

3. Солодовников Ю.П., Марков В.Ю., Минаев В.А. Эпидемиологические детерминанты неравномерного территориального распространения дизентерии Зонне // Там же. – 1996. – № 1. – С. 34-37.

4. Ставицкая Е.Л., Нарвская О.В., Мокроусов И.В. Генотипирование штаммов *Shigella flexneri* 2a, выделенных от больных острой дизентерией в С.-Петербурге // Там же. – 1998. – № 3. – С. 63-67.

5. Ляшенко И.Э., Гриценко В.А. Использование биопробиотика эшерихий для эпидемиологического маркирования // Там же. – 1996. – № 3. – С. 110-114.

6. Савинова Е.М., Кособуцкий Л.А., Чернявский В.И. Fd-подобные конъюгативные плазмиды шигелл и фаги, специфичные в отношении донорских и реципиентных клеток // Сб. матер. науч.-практ. конф. – Харьков, 1993. – С. 94.

7. Идентификация дизентерийных культур при помощи фагов, специфичных в отношении донорских и реципиентных штаммов: Информ. письмо / Савинова Е.М., Китченко А.В., Пехов А.П. – Киев, 1982. – С. 2.

8. Обуховская О.В. Здобуття бактеріофагів з епізоотичних штамів *Salmonella enteritidis* і *Salmonella pulorum-galinarum* // Ветер. мед. – Харків, 1997. – Вип. 71. – С. 88-93.

9. А. с. № 847578 от 15.03.1981. Савинова Е.М., Пехов А.П., Китченко А.В. Способ получения умеренных активных бактериофагов. – Бюл. № 8.

10. Мейнел Г. Бактериальные плазмиды. – М.: Мир, 1976. – 237 с.

ENTEROBACTERIAE FERTILITY FACTOR (F) AS EPIDEMIOLOGICAL MARKER

A.H. Dyachenko, O.M. Savinova, V.V. Lypovska, A.Yu. Volyansky, I.Yu. Kuchma

SUMMARY. *The circulating strains of enteropathogenic E. coli, Shigella and Salmonella are researched for availability of F-factor of conjugation. 85 % circulating strains of S. flexneri 2a have the donor activity for F-factor. Among enteropathogenic E.coli of various serovars the number of such strains is 63 % and in S.enteritidis it is 15 %. As 63 % of EPEC strains have hemolytic activity and F-conjugative plasmid, the simultaneous availability of hemolytic and donor activity for F-factor should be considered as decisive selective signs of pathogenic E.coli. There are especially useful for identification of microorganisms. Conjugative plasmids are important epidemiological markers. Proceed from our research very likely preservation of main variant among circulate enterobacteria at next year fnd probably reducing S.enteritidis among another agents of salmonella infection.*