

1.2 Епідеміологічні аспекти сучасної клебсієльозної сапронозної інфекції на Закарпатті

За останні роки значно зросла роль клебсієл як опортуністичних патогенів, що викликають важкі госпітальні інфекції, такі як септицемії, пневмонії, захворювання сечостатевого тракту та багато інших чисельних нозологічних форм у відділеннях терапії, хірургії, педіатрії, урології, оториноларингології, онкології [43]. Збудниками цих інфекцій є насамперед бактерії *K. pneumoniae subsp. pneumoniae*, в меншій мірі *K. oxytoca*. Разом з тим, в регіонах, до яких відноситься і Закарпаття і які є ендемічними для хронічних клебсієльозів (склероми і озени), зумовлених *K. pneumoniae* – *K. pneumoniae subsp. rhinoscleromatis* і *K. pneumoniae subsp. ozaenae*, постійною є загроза їх виникнення [44]. Пошук осередків збудників цих захворювань у навколишньому середовищі представляє неабиякий практичний інтерес для клініки і епідеміології цих хвороб. Однак виділення та вивчення збудників риносклероми та озени у світі вкрай обмежені із-за їх локального розповсюдження.

Для успішної боротьби із клебсієльозною інфекцією достатнім є рутинний рівень знань біології її збудників (патогенність, особливості метаболізму, відношення до антибактеріальних препаратів). При цьому важливим завданням є дослідження значної кількості щойно виділених від хворих штамів, що дає можливість виявляти відмінності прояву тих чи інших властивостей, а також визначати найбільш розповсюджені фенотипи клебсієл. Для вивчення біологічних особливостей збудників риносклероми і озени необхідним є виявлення осередків їх локалізації та встановлення зв'язку між екологічними чинниками і виживанням останніх у навколишньому природному середовищі [45].

Сучасні ідентифікаційні методи, підходи і прийоми вносять суттєві зміни в філогенію та таксономію бактерій. Зокрема класифікація клебсієл і сьогодні є незавершеною. Так, недавно запропоновано за даними секвенування генів 16S

РНК і гена *gro B*, розділити рід клебсієл на 2 роди: *Klebsiella* і *Raoultella*. Перший включає вид *K. pneumoniae* з трьома підвидами, другий – *K. planticola*, *K. terrigena* і *K. ornitholitica*. *Klebsiella oxytoca* віднесена в окрему геногрупу [46]. Однак в цих дослідженнях, як і в багатьох інших, для ідентифікації використовували лише типові штами підвидів (*K. pneumoniae subsp. rhinoscleromatis* і *K. pneumoniae subsp. ozaenae*), тобто по одному штаму від кожного підвиду. Відомо однак, що окремим таксономічним групам клебсієл властива генетична гетерогенність. Так, підвиди *K. pneumoniae subsp. pneumoniae* і *Klebsiella oxytoca* характеризуються значною філогенетичною різноманітністю. Генетична гетерогенність цих таксонів була показана при вивченні 120 щойно виділених штамів клебсієл, які отримали із лікарень 13 європейських країн. Штами *K. pneumoniae subsp. pneumoniae* утворили 3 кластери, *Klebsiella oxytoca* – два. Дві генетичні групи *Klebsiella oxytoca* виявив також Graniez із співавторами при застосуванні інших генетичних методів [47].

Бактерії підвидів *K. pneumoniae subsp. rhinoscleromatis* і *K. pneumoniae subsp. ozaenae* залишаються найменш вивченими з генетичної точки зору. Також недостатньо вивчений їх філогенетичний зв'язок як всередині роду *Klebsiella*, так і в родині *Enterobacteriaceae*.

Загально-біологічний інтерес в плані дослідження генетичної спорідненості живих об'єктів, які належать до різних систематичних груп, представляє явище полібіотрофії бактерій, що передбачає взаємодію патогенних для людини мікроорганізмів з представниками царства *Planta* і *Insecta*. Крім цього, явище полібіотрофії відносять до категорії епідеміологічної екології мікроорганізмів, яка вивчає аспекти існування бактеріальних популяцій в навколишньому середовищі, що визначають рівень, форму та механізм епідемічного прояву інфекційних захворювань людини. Глибоке екологічне підґрунтя інфекційної патології до цих пір не привертає належної уваги науковців та клініцистів, залишаючись все ще мало вивченим.

На сьогоднішній день досить очевидними є зміни в спектрі сучасної інфекційної патології. Класичні патогени (паразити людини і тварин) зараз часто

витіснені так званими умовно-патогенними бактеріями, до яких відносять бактерії роду *Klebsiella*.

Раніше у визначенні природних вогнищ збудників клебсієльозів, проведених зарубіжними та вітчизняними вченими [46,47], керувались діючим в клінічній практиці поділом інфекційних хвороб на антропонозні та зоонозні. До тепер не виявлено шляхів передачі клебсієльозної інфекції від хворої людини до здорової. Більше того, не було виявлено випадків носійства клебсієл риносклероми, озени і їх нормальної персистенції у диких та домашніх тварин, птахів та риб [48].

Нові спроби дослідження даної проблеми, а саме встановлення можливих природних осередків збудників риносклероми і озени на рослинних об'єктах, з'явилися після наукових публікацій Р. І. Гвоздяка, який відкрив феномен полібіотрофії для фітопатогенних бактерій роду *Erwinia*, довівши їх патогенність для тварин і комах.

В ряді робіт продемонстрована наявність полібіотрофних властивостей у бактерій роду *Klebsiella* шляхом відтворення експериментального інфекційного процесу у рослин за допомогою штамів клебсієл риносклероми, озени та пневмонії, виділених від хворих людей [49]. Епікутанне введення суспензії вказаних бактерій в листову пластинку ряду овочевих культур викликало інфекційний процес, що проявлявся некрозом рослинної тканини. Внаслідок такого їх впливу встановлено прискорення процесів регенерації та органогенезу у культур тканин тютюну та пшениці. До потенційного арсеналу засобів дії клебсієл на вищі рослини входить їх здатність до фіксації атмосферного азоту та продукування гормонів росту рослин. За допомогою методів біолюмінесценції та електронної мікроскопії була доведена локалізація клебсієл на поверхні та в середині рослинних тканин.

Докази існування природних осередків збудників риносклероми, озени а також *K. pneumoniae*, дає можливість віднести ці хвороби до групи сапронозів. Унікальна здатність бактерій роду *Klebsiella* до полібіотрофії, що проявляється насамперед у їх здатності як до сапрофітного, так і паразитичного способу

існування в мікробних ценозах тваринного і рослинного світу, зумовлює важливість дослідження механізмів цього феномену та пошуку сучасних методів профілактики, терапії клебсієльозів людини. Такі дослідження становлять науковий і практичний інтерес для медичної мікробіології.

На даний час відзначається значна зміна етіологічної структури інфекційної захворюваності, пов'язаної з активацією умовно-патогенних бактерій. Нашу увагу привернули капсульні ентеробактерії, зокрема клебсієли. Вони виявляються як при гострих кишкових, так і при ряді парантеральних інфекцій: урологічних, менінгіальних, токсикосептичних.

Клінічні прояви патологічних процесів різноманітні. Клебсієльоз можна охарактеризувати як захворювання, що перебігає в різних клінічних формах, при яких клебсієли є етіологічним агентом [49,50].

Клебсієли, як і інші умовно-патогенні мікроорганізми, вражають, як правило, людей зі зниженою природною резистентністю організму (первинні і вторинні імунodefіцити). Найчастіше це новонароджені і діти першого року життя, вагітні жінки, постопераційні, посттравматичні і онкологічні хворі, пацієнти, з пошкодженнями шкірних покривів і слизових оболонок. В результаті розвивається локальний або генералізований інфекційний процес. У деяких випадках клебсієльозна інфекція протікає вкрай важко і закінчується сепсисом з летальністю до 60%, особливо у новонароджених і дітей першого року життя.

Досить часто клебсієли є збудниками внутрішньо-лікарняних інфекцій (ВЛІ), які реєструють з частотою 100-180 випадків на 100 тис. новонароджених, 60-80 випадків на 100 тис. госпіталізованих. Причиною цього є застосування антибіотиків, використання імунODEPRESANTІВ, часті випадки хірургічних втручань. Також виникненню внутрішньо-лікарняних інфекцій клебсієльозної етіології сприяє циркуляція цих бактерій в пологових будинках, у відділеннях для новонароджених, у відділеннях соматичних стаціонарів [51].

До теперішнього часу у клебсієл вивчено невелике число факторів патогенності. Відомі фімбріальні структури і білки зовнішньої мембрани, адгезини, полісахаридна капсула, яка захищає мікробну клітину від лізуючої дії

комплементу і фагоцитів, токсини (термостабільний-ST і термолабільний -LT ентеротоксини, тіолзалежний гемолізін), речовини, які інактивують лізоцим, бактерицидний компонент інтерферону, секреторний імуноглобулін А [52].

Виходячи з того, що клінічні прояви клебсієльозів різноманітні, а спектр вивчених факторів патогенності клебсієл залишається вузьким, актуальною є проблема пошуку нових патогенетичних властивостей, зокрема факторів патогенності, відомих для інших ентеробактерій. Встановлено, що родинні види можуть володіти подібними властивостями. Так, доведено, що ентеротоксини, які продукуються штамми *K.pneumoniae*, високо гомологічні ентеротоксини *E. coli*. Показана гомологія фімбріальних адгезинів клебсієл і ешерихій [52].

Нами встановлено поширення клебсієл та інших мікроорганізмів в місті Ужгороді та на транскордонних територіях. Детальний мікробіологічний аналіз всіх варіантів зразків, взятих з кормів, повітря, вод та фекалій, хворих і здорових тварин дозволив нам отримати, з одного боку, значну кількість бактеріальних ізолятів у вигляді чистих культур штамів *Klebsiella spp*, а з іншого боку, виявити корелятивну залежність між кількісним і якісним складом мікрофлори дослідних об'єктів та місцем їх ізоляції.

Для встановлення спектру домінуючих збудників нозокоміальної інфекції проведено періодичне бактеріологічне обстеження хірургічного, реанімаційного, судинного, гастроентерологічного та ЛОР відділення обласної клінічної лікарні, хірургічного та променевого відділення обласної онкологічної лікарні, дитяче і загальне відділення обласної інфекційної лікарні.

Всього було ізольовано 1349 бактеріальних штамів різних родів ентеробактерій. В результаті бактеріологічного обстеження різних відділень лікарняних закладів встановлено, що в повітрі гастроентерологічного та інфекційного відділення переважали *S. aureus* з гемолітичною активністю $30 \pm 2,4$ % і *S. pneumoniae* ($45 \pm 2,7$ %). Частка бацил становила $10 \pm 1,5$ %, а *Sarcina spp.* – $15 \pm 1,5$ %. З вмісту шлунково-кишкового тракту і пацієнтів висівалися *K. pneumoniae* у $17,0 \pm 1,5$ %, лактозонегативні і лактозопозитивні штами *E. coli* ($23,5 \pm 1,9$ %), *K. oxytoca* ($17,6 \pm 1,5$ %), *Enterobacter cloacae* ($5,9 \pm 1,3$ %), *Citrobacter*

braakii ($5,9 \pm 1,3$ %). Мікробіота ротоглотки пацієнтів і медсестер була представлена гемолітичними штамами стафілококів і стрептококів, а на їх шкірі в більшості випадків виявляли мікрофлору, аналогічну до збудників гострих шлунково-кишкових інфекцій у пацієнтів (*K. oxytoca*, *K. pneumoniae*, *E. cloacae*, *E. coli*).

До числа циркулюючих видів слід віднести у хірургічному відділенні *K. pneumoniae* ($12 \pm 1,3\%$), *K. oxytoca* ($5 \pm 1,1\%$), *P. aeruginosa* ($8 \pm 1,4\%$), *P. mirabilis* ($9,1 \pm 1,4\%$), *Enterococcus faecalis* ($6 \pm 1,2\%$) відповідно. Окрім зазначених клінічних культур, із відділення госпітальної хірургії виділено також *Chryseobacterium meningosepticum* ($2 \pm 0,3\%$) гній, *Serratia odorifera* ($3 \pm 0,3\%$) носоглотка пацієнтів, *B. subtilis* (мікрофлора рук пацієнтів та медичного персоналу).

Домінуючими видами умовно патогенних бактерій, що були ізольовані у ЛОР відділенні обласної клінічної лікарні та онкодиспансеру були *K. pneumoniae* ($30 \pm 2,3\%$), *K. oxytoca* ($2 \pm 0,3\%$), *E. cloacae* ($7,2 \pm 1,3\%$), *Staphylococcus spp.* (переважно виду *hominis*) – ($26,7 \pm 1,9$) %.

Таким чином, знайдено кореляційну залежність між частотою виникнення і складністю перебігу нозокоміальних інфекцій з одного боку та станом довкілля з іншого. Показано наявність суттєвих відмінностей у спектрі (видовому складі) потенційних збудників нозокоміальної інфекції, їх кількості (загальне число ізолятів) та місцем локалізації клініки. Дана тенденція особливо простежується при загальному порівнянні ізолятів клінік, розміщених на території Угорщини (Дебрецен, Кішварда і Ніредьгаза) домінування невеликої кількості штамів *S. aureus* (MRSA) та *C. albicans*, повної відсутності ентеробактерій, в тому числі і клебсієл та наявності значної кількості штамів цілого спектру потенційно небезпечних збудників госпітальної інфекції у клінічних відділеннях на території України (Ужгород, Берегово, Хуст) з переважанням ентеробактерій та інших типових агентів внутрішньої лікарняної інфекції *K. pneumoniae*, *Enterobacter cloacae*, *Enterococcus faecalis*, *Proteus morganii*, *Acinetobacter spp.*, *Pseudomonas aeruginosa*, і *Staphylococcus aureus*.

Нами встановлено відмінності відсоткового вмісту культур бактерій роду *Klebsiella*, що продукують бактеріоцини і бактеріофаги в залежності від джерела виділення клебсієл. Вищий рівень внутривидової продукції антибактеріальних факторів був виявлений у культур, ізольованих із поверхні рослин у порівнянні з клінічними штамами. Синтез клебоцинів у культур рослинного походження залежно від виду бактерій становив (в %) від 8,3 до 10,2; бактеріофагів – від 4,1 до 5,8. Для культур клінічного і рослинного походження ці показники коливались відповідно від 4,5 до 7,7 і від 2,9 до 3,2.

Протимікробний спектр індукцйельних антимікробних факторів *Klebsiella* не обмежувався рамками роду. Бактеріоцини і фаги культур клебсієл, виділених із різних джерел, були активними також як по відношенню до деяких штамів зоопатогенних бактерій родів *Citrobacter*, *Escherichia*, *Shigella*, *Enterobacter*, *Proteus*, так і фітопатогенних представників родів *Erwinia* і *Pseudomonas*.

Перевірено чутливість бактеріоцинів із клебсієл клінічного і рослинного походження до протеолітичних ферментів, лізоциму, рибонуклеази і дезоксирибонуклеази. Їх молекулярна маса визначена методом дифузії через ультрафільтраційні мембрани знаходилась у межах $> 30\ 000$ і $< 50\ 000$ дальтон.

Підсумовуючи в цілому рівень продукції бактеріофагів клінічними культурами бактерій роду *Klebsiella*, слід відмітити, що для *K. pneumoniae* і *K. rhinoscleromatis* було характерне фагоутворення у 2,9 % штамів від загального їх числа; для *K. ozaenae* цей показник становив 3,2 %. Порівняння продуктивності фагоутворення клінічними штамами із культурами клебсієл рослинного походження показало наявність більшої кількості бактерій – фагопродуцентів із числа останніх – для *K. pneumoniae* - 5,8 %, *K. rhinoscleromatis* – 5,1 % і *K. ozaenae* – 4,1%. Показано, що найбільшою була кількість продукуючих культур серед мікроорганізмів одного і того ж виду, а найменшою – при гетерологічній бактеріоциногенії і фагопродукції. Виявлений нами факт узгоджується із відомим положенням про специфічність дії як бактеріоцинів, так і фагів насамперед стосовно близькоспоріднених (родинних) бактерій [53].

Фітонциди досліджених хвойних порід рослин: туї західної, кипарисовика

Лавсона, кипарису Арізонського, сосни кримської і сосни гірської виявляли однакову бактерицидну дію як на культури клебсієл, що ізольовані з клінічного матеріалу, так і ті, які виділені з поверхні зелених частин рослин. Стійкість тестованих культур клебсієл до фітонцидів була значно вищою, ніж у штамів *Escherichia coli* і *Shigella dysenteriae*. Клебсієли різного походження не відрізнялись також за стійкістю до дії ефірних масел сосни гірської і сосни кримської. Сік подорожника характеризувався наявністю бактерицидної дії стосовно клінічних і рослинних штамів клебсієл як в дослідях *in vitro*, так і в умовах його лабораторного клінічного випробування.

Експериментальну клебсієльозну інфекцію у білих мишей ми відтворювали шляхом парентерального введення їм рівних інфікуючих доз штамів *K. pneumoniae* 1008, джерелом виділення якого була хвора людина, і *K. pneumoniae* 16 II, ізольованого з епіфітної фази рослин. Терапевтичне застосування спиртового екстракту як листя горіха грецького, так і його зелених плодів за цих умов викликало однотипні зміни показників фагоцитозу і аутоімунного бляшкоутворення у дослідних тварин.

Дані, отримані в умовах наших експериментів, можна вважати переконливим свідченням на користь гіпотези про наявність неспецифічної дії протибактеріальних факторів клебсієл [54, 55, 56], що підтверджується широким спектром їх активності незалежно від місця виділення по відношенню до представників різних видів зоо-, фіто- і ентомопатогенних бактерій. У зв'язку з цим, клебоцини і фаги можна розглядати в якості важливих селективних факторів, які забезпечують персистування бактерій роду *Klebsiella* як у тваринних, так і рослинних об'єктах.

Нами також вивчено дію антибіотичних препаратів та антисептиків на представники бактерій роду *Klebsiella*. Такі експерименти було проведено з метою з'ясування наявності можливих особливостей впливу антибіотиків і дезінфікуючих речовин на клебсієли у залежності від джерела їх виділення. Тестовані антибіотики характеризувалися подібним спектром їх дії стосовно клінічних і рослинних культур у межах одного виду клебсієл. Разом з тим, поряд

з індивідуальною чутливістю кожного бактеріального штаму до антибіотичних препаратів, виявлено загальну залежність рівня сенситивності бактерій від місця їх локалізації, тобто клебсієли, що ізольовані з зелених частин рослин, виявляли більшу чутливість порівняно із культурами, джерелом виділення яких були хворі люди[57,58,59]. Підсумовуючи одержані результати, слід підкреслити, що відмінності штамів бактерій роду *Klebsiella*, виділених з клінічних і рослинних джерел, проявлялись лише у їх чутливості по відношенню до дії антибіотичних препаратів. Кількість антибіотико чутливих культур, виділених з епіфітної фази рослин, була значно більшою, ніж культур, ізольованих із клінічного матеріалу.

При вивченні впливу антисептиків на клебсієли, слід відзначити, що бактерицидну дію на бактерії роду *Klebsiella* різного походження досліджувані дезінфектанти виявляли у концентраціях, які у 3-10 разів перевищують рекомендовані згідно до інструкцій їх застосування для знезараження патогенних бактерій, в тому числі і до інших представників родини *Enterobacteriaceae*. Таку стійкість клебсієл до тестованих дезінфікантів можна пояснити їх морфологічними особливостями, а саме наявністю у них щільної слизової капсули. Таким чином, проведені дослідження не виявили відмінностей в стійкості до антисептичних засобів у бактерій роду *Klebsiella*, ізольованих із різних джерел. Спільною їх ознакою є низька чутливість до дії останніх. Одержані дані можна розглядати як пояснення стійкості клебсієл клінічного і епіфітного походження в навколишньому середовищі.

Показана здатність до галотолерантності у представників окремих видів бактерій роду *Klebsiella* – *K. pneumoniae*, *K. rhinoscleromatis*, *K. ozaenae*, *K. planticola* і *K. terrigena*, які були ізольовані із клінічного матеріалу та рослинних об'єктів. Функціональна життєздатність цих бактерій у рідкому середовищі зберігалась протягом 8-10 днів при концентрації у ньому хлориду натрію до 10-15%. Додавання білку до рідкого поживного середовища призводило до зростання стійкості штамів клебсієл при вмісті солі до 20%.

Аналіз результатів показав високий рівень стійкості до солей у бактерій роду *Klebsiella* незалежно від джерела їх виділення. Загальною тенденцією для

штамів із обох досліджуваних груп є також незначне зменшення величини їх толерантності до хлориду натрію в динаміці і збільшення цього показника за умови додавання в поживне середовище білка. Виходячи з цього, одержані результати можна трактувати як подібність за зазначеними вище ознаками для бактерій роду *Klebsiella*, які відрізняються за джерелом їх виділення, і вважати одним із опосередкованих механізмів реалізації їх полібіотрофії [60, 61].

Бактеріостатична дія глюкози стосовно клебсієл, ізольованих із різних джерел, була однаковою і реєструвалась при її концентрації у воді в межах від 10 до 20 відсотків. Культури бактерій роду *Klebsiella*, виділені із різних джерел, не відрізнялись також за чутливістю до ряду антисептиків, що використовують для дезінфекції в медичній практиці. При цьому їх бактерицидна доза (мінімальна пригнічуюча концентрація, МПК) для клебсієл була в 3-10 разів вищою порівняно з іншими бактеріями – представниками родини *Enterobacteriaceae* – і становила відповідно: для хлораміну – 5%, гіпохлориду кальцію – 5%, хлорного вапна – 3%, ДП – 3%, хлоргексидину – 1%, карбофосу – 0.5%.

Нами проведено порівняльне вивчення рівня чутливості до важких металів (ВМ) двох груп клебсієл, що відрізнялись за джерелом виділення. Першу групу становили штами *K. pneumoniae*, *K. rhinoscleromatis*, і *K. ozaenae* (клінічні ізоляти), другу представляли ці ж види, але виділені ґрунту і води. Окремою групою виділяли представників сапрофітної мікрофлори – *K. terrigena*, *K. planticola*.

Проведені дослідження дозволили виявити як наявність спільних властивостей у клебсієл, виділених із різних джерел, так і деякі особливості їх реакції на присутність ВМ у поживному середовищі.

В умовах *in vitro* вивчено штамову та видову чутливість різних систематичних груп клебсієл до солей ВМ – міді, кадмію, цинку і свинцю в градієнті їх концентрацій від 0.5 до 30 ПДК/л. За зменшенням ефективності токсичної дії зазначених ВМ на досліджувані види клебсієл їх можна розмістити у такому порядку: Pb, Cd, Cu, Zn. У кожній із систематичних груп клебсієл було виявлено штами стійкі до дії солей ВМ при їх концентраціях від 15 до 25 ПДК/л.

Беручи до уваги показану іншими авторами азотфіксуючу активність бактерій роду *Klebsiella*, культури, резистентні до дії солей ВМ, можна вважати перспективними у плані створення на їх основі біопрепаратів для очистки і відновлення забруднених ґрунтів.

Майже однаковий характер реакції на присутність в поживному середовищі ВМ у представників сапрофітних і патогенних (умовно-патогенних) бактерій роду *Klebsiella*, ізольованих із різних джерел – свідчить про їх спорідненість у плані наявності визначеного і усталеного ланцюга обміну речовин, що забезпечує їх убіквітарне розповсюдження в навколишньому середовищі.

Виявлено високий рівень стійкості у досліджуваних бактерій роду *Klebsiella* до тестованих пестицидів, що характеризуються виразними фунгіцидними та бактерицидними властивостями, а саме по відношенню до вітаваксу-200, вітатіураму, байтран-універсаму, децису, рідаміну і мідного купоросу. Окремі штами капсульних бактерій, ізольованих як із клінічного матеріалу, так і з епіфітної фази рослин, здатні до росту і розмноження в середовищі, де концентрації вказаних пестицидів перевищують 1-2 робочі дози (РД). В цілому, оцінюючи бактерицидний ефект досліджуваних нами пестицидів стосовно клінічних ізолятів клебсієл, слід відмітити досить високий рівень резистентності останніх. Концентрація вітаваксу і вітатіураму 1 РД, що використовується в сільськогосподарській практиці, зумовлювала загибель в середньому лише 51% тестованих бактеріальних культур. Ще більш слабкою була бактерицидна дія байтран-універсалу - 34.4% чутливих штамів клінічних ізолятів клебсієл та децису – 6.6%. Зазначена доза рідаміну взагалі не викликала пригнічення росту даних бактеріальних культур.

Виявлено здатність представників досліджуваних систематичних груп умовно-патогенних і сапрофітних клебсієл до деструкції таких високотоксичних сполук, як солей роданистої кислоти – роданідів. Її інтенсивність більшою мірою залежала від умов культивування, ніж від виду і джерела виділення бактерій. Так, наприклад, при вихідній концентрації роданіду калію 50мг/л його залишкова

кількість через 36 год. росту штаму *K.rhinoscleromatis* клінічного походження без додаткової аерації становила 47мг/л, через 48 год. – 45 і через 60 год. – 42 мг/л. Ріст цієї ж бактерії в середовищі №2 з підвищеним вмістом глюкози викликав деструкцію роданіду калію в ті ж терміни відповідно до 41, 36 і 29мг/л його залишку. Аналогічну тенденцію збільшення рівня деструкції даного ксенобіотику в умовах більш високого вмісту в середовищі глюкози спостерігали також і внаслідок дії інших тестованих клінічних і епіфіт них ізолятів *K.ozanae* і *K.pneumoniae*.

Значне посилення біодеструктивного потенціалу клебсієл різного походження спостерігали за умов більш інтенсивної аерації поживного середовища. Вивчали також вплив на процес деградації роданіду калію посівної дози досліджуваних бактерій. Більшість тестованих штамів бактерій роду *Klebsiella* характеризувались властивостями розщеплювати роданіди при їх вихідній концентрації від 10 до 150 мг/л.

Експериментально встановлено, що основними факторами, які визначають ефективність бактеріальної деструкції роданідів, є титр внесеного інокулюму, вміст в середовищі глюкози і хлориду натрію та інтенсивність аерації.

Але, не дивлячись на деякі наявні штамові відмінності у здатності досліджуваних бактерій до деструкції токсиканту, у цілому нами не виявлено залежності між їх активністю та їх походженням. На інтенсивність процесу бактеріальної деградації роданіду калію більшою мірою впливали (1) умови вирощування та (2) величина внесеної дози клебсієл, виділених із різних джерел.

Для виділення бактеріальних фракцій клебсієл та детального дослідження їх фізико-хімічних та біологічних властивостей використовували 4 штами *K. pneumoniae* і *K. rhinoscleromatis*, ізольованих від хворих людей та з поверхні хлорофіл вмісних частин рослин. Із бактеріальної біомаси виділяли ДНК, ДНП, білок та білково-полісахаридний комплекс (БПК). Проведені дослідження показали, що фізико-хімічні характеристики ізольованих взірців ДНК і ДНП більшою мірою залежали від способу їх одержання, ніж від штамової, видової належності культури. Величини LD50, що визначають токсичність фракцій ДНК

і ДНП клінічних штамів *K. pneumoniae* і *K. rhinoscleromatis* становили відповідно 32.5 і 36.0 мг/кг. Для тих же фракцій, виділених із клебсієл рослинного походження вони були рівні 24.0 і 42.0 мг/кг. Таким чином, не виявлено кореляції між джерелом виділення зазначених бактеріальних фракцій і рівнем їх токсичності для білих нелінійних мишей. Однаковою була також токсичність ДНК і ДНП стосовно тестованих рослин. Епікутанне введення їх розчинів у листову поверхню капусти в обох випадках призводило до утворення некротичних зон.

Із усіх досліджених фракцій бактерій роду *Klebsiella* найбільшою антигенною специфічністю володіли ДНП і БПК. Доведено можливість їх використання у якості сенситину для виготовлення еритроцитарного діагностикуму в РНГА і антигену в реакції зв'язування комплементу (РЗК). За допомогою внутрішньо-шкірної проби на сенсibiliзованих морських свинках у цих фракцій виявлено алергенні властивості.

У групи бактерій роду *Klebsiella* клінічного і рослинного походження, що відрізняються високою мірою стійкості до таких важких металів, як свинець, кадмій, цинк, мідь (до 15 гранично допустимих концентрацій на літр поживного середовища), було виявлено плазмідні. У представників різних видів клебсієл, ізолюваних із тих же джерел, але які були чутливими до дії важких металів, плазмідні геноми не виявлено. Фізико-хімічний аналіз виділеної плазмідної ДНК показав, що кількість різних плазмід у досліджуваних культур клебсієл дорівнював одному або трьом геномам. Вміст плазмідної ДНК від хромосомної складав від 3 до 5,5 відсотків. На кожному хромосому досліджуваних бактерій припадало від однієї до п'яти копій плазмідної ДНК. Молекулярна маса плазмід цих культур знаходилась у межах від $30 \cdot 10^6$ до $110 \cdot 10^6$ дальтон. Культура *K. rhinoscleromatis* 1128 лз, яка володіла стійкістю одночасно до двох важких металів – кадмію і цинку, мала три різних плазмідних геноми з молекулярною масою $10 \cdot 10^6$, $40 \cdot 10^6$ і $60 \cdot 10^6$ дальтон.

Три штами клебсієл риносклероми і озени, що відрізнялись високою стійкістю до міді, містили плазмідний геном з однаковою молекулярною масою

– $90 \cdot 10^6$ дальтон. Ідентичність плазмід із загальною молекулярною масою $90 \cdot 10^6$ дальтон підтверджувалась рестрикційним аналізом за ендонуклеазою *E coR 1* тих штамів, де був встановлений однотипний набір рестракційних фрагментів плазмідних ДНК. Це однозначно і прямо доводить гомологічність їх нуклеотидних послідовностей. Отримані дані дозволили зв'язувати механізм стійкості клінічних і рослинних штамів бактерій роду *Klebsiella* до важких металів із вмістом та експресією плазмідних генів. Проведені дослідження дають можливість розглядати стійкість клебсієл до важких металів в якості фактору, що забезпечує їх виживання в екстремальних умовах навколишнього середовища і сприяє їх полібіотрофності.

Розвиток методу полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) суттєво розширив межі його застосування в фундаментальних та прикладних дослідженнях. Безсумнівний інтерес викликає можливість швидкої і точної видової ідентифікації мікроорганізмів за допомогою ПЛР на якісно новому рівні. Особливо актуальним є застосування даного методу з метою встановлення спорідненості виділених бактеріальних культур із різних еконіш для їхнього контрольного типування. При використанні REP-ПЛР-опосередкованого ДНК-фінгерпринтного аналізу для біотипування клебсієл виявлено суттєву варіабельність у складі їхніх ПЛР-продуктів. Абсолютна ідентичність мала місце лише для двох культур: *K. pneumoniae* 285 і типового штаму *K. ozaenae* 5051. Поки що залишається нез'ясованим наскільки закономірним є виявлене нами співпадання в REP-ПЛР-профілях *K. pneumoniae* 285 і *K. ozaenae* 5051. Характерно, що за загальним “мотивом” складу фрагментів до близькоспоріднених до вищезгаданих двох штамів можна віднести також і *K. pneumoniae* 3785 (рис. 5.3, доріжка 3). Ще два штами, *K. pneumoniae* 4622 і *K. planticola* 33531, мали певну подібність в загальному «мотиві» ПЛР-продуктів: мажорний фрагмент 700 н.п., три мінорних фрагменти з розмірами близько 1000, 1400 и 1600 н.п. при незначній гетерогенності області ПЛР-продуктів з розміром менше 500 н.п. (рис. 5.4 , доріжки 2 і 12). Інші штами клебсієл, як відмічалось, характеризувались значною варіабельністю складу ПЛР-продуктів, що свідчила

про між- і внутрішньовидову гетерогенність їх геномів. Штам *K. oxytoca* 13183, що займає відособлене положення в таксономії клебсієл, за результатами REP-ПЛР аналізу теж виявляв свою неподібність, відрізняючись від інших культур наявністю незначної кількості фрагментів малих розмірів і слабкої інтенсивності (рис.1).

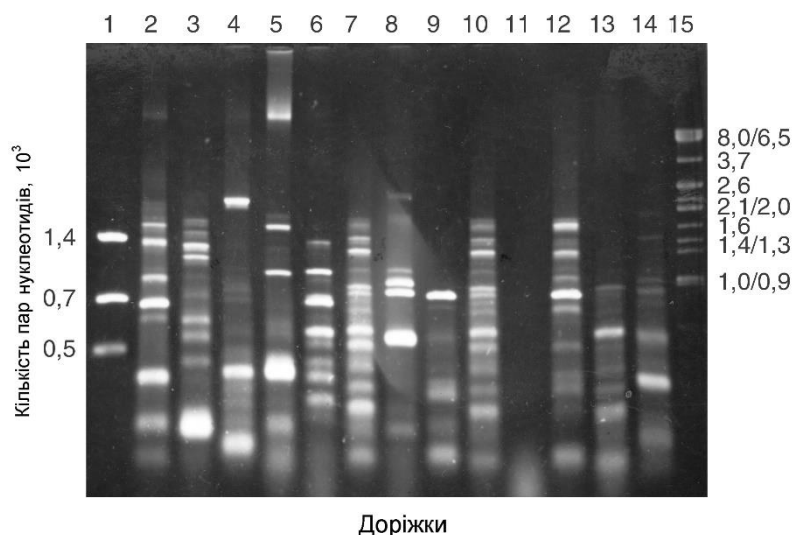


Рис.1. Електрофоретичний аналіз REP-ПЛР- продуктів штамів клебсієл: доріжки: 2-7 – штами *K. pneumoniae* 4622на, 3785, 4622з, 4631нпл, 5054, 285; 8,9 – *K. rhinoscleromatis* 230, 1250н; 10,11 – *K. ozaenae* NN 5051, 5052; 12,13 – *K. planticola* 33531, 33558; 14 – *K. oxytoca* 13183. Доріжки 1 і 15 – маркери молекулярної маси, доріжка 1 - маркер молекулярної маси, рUC, рестрикційна Taq 1, доріжка 15 – маркер молекулярної маси, фаг лямбда, рестрикований Ava II.

Таким чином, одержані результати по ідентифікації клебсієл показали, що, з одного боку, REP-ПЛР аналіз різних штамів характеризувався деяким загальним набором продуктів (“мотивом”), що свідчив про їх безперечну родову близькість (особливо для штамів *K. rhinoscleromatis*), а, з другого боку, певною варіабельністю, що відповідала їх генетичній гетерогенності. При використанні REP-ПЛР-опосередкованого ДНК-фінгерпринтного аналізу для біотипування клебсієл спостерігали суттєву варіабельність у складі ПЛР-продуктів. Отже, даний метод, очевидно, не може бути застосований для остаточної ідентифікації

штамів бактерій різних видів клебсієл і повинен бути доповнений даними блот-гібридизації.

Нами експериментально доведено, що використання гіалуронату натрію в якості ад'юванту при імунізації кролів дає можливість отримати високоактивні імунні сироватки для серологічної ідентифікації клебсієл клінічного і рослинного походження. Практична цінність даних досліджень полягає насамперед в уточненні епідеміологічної картини хронічних клебсієльозів (риносклерома, озена), що є ендемічними для Західних областей України, шляхом виявлення можливих осередків їх збудників на Закарпатті.

При відтворенні різних експериментальних моделей склеромної інфекції на лабораторних тваринах відзначена чітка залежність величини використаної інфекційної дози від способу введення інфекту. Парантеральне та інтраназальне введення як *Klebsiella rhinoscleromatis*, так і *Klebsiella pneumoniae* веде до появи клебсієл вже через 6 годин у крові, кістковому мозку, серці, в той час, коли пероральна інокуляція забезпечує наявність збудника у перерахованих органах тільки наприкінці першої доби. Парантеральне зараження призводить до тотального заселення всіх внутрішніх органів лабораторних тварин клебсієлами, а також до появи їх у значній кількості в крові і кістковому мозку, тому клінічні прояви хвороби обумовлені, насамперед, загальною інтоксикацією організму і виявлялись у вигляді адинамії, прискороного дихання, іноді конвульсій. При інтраназальному та пероральному введенні *K. rhinoscleromatis* спостерігається переважна локалізація патогену в легенях та нирках, селезінці. Інтраназальне введення інфекту, а саме *Klebsiella rhinoscleromatis*, при відтворенні легенової моделі склеромної інфекції показує його максимальну концентрацію у легенях. При інтраназальній та парантеральній інокуляції *K. pneumoniae* максимальною заселеністю інфектом характеризується кишечник, легені та селезінка. Аналізуючи дисемінацію патогену при кишковій формі експериментальної пневмонії відзначено максимальну його локалізацію у травному тракті лабораторних тварин. На моделях гострої та хронічних (локальних) форм клебсієльозів, зумовлених *K. pneumoniae* і *K. rhinoscleromatis* було показано, що:

K. rhinoscleromatis і *K. pneumoniae* (LD100; LD50) при парантеральному способі їх введення зумовлювали перебіг експериментального захворювання по типу сепсису з появою збудника в значних кількостях в усіх органах лабораторних тварин і крові.

Одержані дані патоморфологічних досліджень дають можливість стверджувати, що найбільш вдалим для відтворення експериментальної склероми та пневмонії є відповідно легенева та кишкова форми інфекції. Дані моделі характеризувались локалізацією інфекційного процесу, значною тривалістю перебігу захворювання, типовими ознаками патогенезу. При вивченні патогенезу та ефективності профілактичного і лікувального застосування відібраних штамів бацил дані наших експериментів дозволять встановити, науково обґрунтувати і продемонструвати протективні і терапевтичні властивості відібраних бацил по відношенню до збудників клебсієльозних інфекцій. Найбільш високу профілактичну ефективність як на легеневій та гостросептичній моделі пневмонії виявив штам *B. subtilis* 090, а проти склеромній штам *B. subtilis* 1119 (091). Відсоток збереження лабораторних тварин при цьому становив 86.7-93.3% проти 53% при використанні інших штамів бацил. Відсоток схоронності контрольних тварин не перевищував 6.7%. Введення *B. subtilis* 090 і/чи лабораторним тваринам у вказаних дозах і зазначеними способами не призводило до появи у них будь-яких ознак патологічного процесу.

Реальною оцінкою дієвості досліджуваних пробіотичних бактерій буде апробація їх застосування на хворих-добровольцях клінічної бази кафедри.

Також нами вивчена антагоністична і імуномодуляторна активність бацил, капсульного S і безкапсульного штаму клебсієл R., тобто спектр індукції найважливіших цитокінів та експресії генів молекул, що максимально задіяні в регулюванні про- і анти-запальних процесів вродженої імунної відповіді організму шляхом часово-залежної експозиції відібраних бактерій з дендритними клітинами людини.

Показано, що авірулентний мутантний штам *K. pneumoniae* R – здатний до секреції прозапального цитокіну IL-6 (до 300 нг/мл) і TNF- α (100-200 нг/мл). Відомо, що саме TNF- α є цитокіном здатним стимулювати системне запалення: він відноситься до родини цитокінів, що стимулюють виникнення реакції гострої фази, що є очевидним механізмом і поясненням його виразної ефективності при лікуванні хронічної клебсієльозної інфекції. Цей же штам відрізнявся від дикого – вихідного, вірулентного штаму *K. pneumoniae* S, який стимулював експресію генів caspase-5 (аналог прозапальної каспази 1) ДК людини, що в свою чергу ініціює синтез прекурсору IL-1 β , вивільнення якого і призводить до сильної локальної запальної реакції. Оскільки мутантний штам володіє скоріше здатністю ініціювати системну імунну відповідь, ніж локальну, він може бути надалі рекомендований як перспективний протиклебсієльозний вакцинний препарат. Проведені нами експерименти свідчать про перспективність використання відібраного штаму *B. subtilis* 1119 як біопрепарату або його складового компоненту.

Таким чином, результати виконаної роботи дозволили сформулювати основні стратегічні напрямки створення нових ефективних протиклебсієльозних препаратів, пробіотиків і таргетних вакцин для подальшої розробки і впровадження їх у клінічну практику як альтернативних засобів протимікробної терапії.

В цілому результати досліджень по новому висвітлюють підхід до наявної класифікації інфекційних хвороб, обґрунтовують необхідність виділення полібіотрофних клебсієльозів в окрему групу сапронозних захворювань поряд із антропонозами і зоонозами.