

Федеральное бюджетное учреждение науки
«Тюменский научно-исследовательский институт
краевой инфекционной патологии»
Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и
благополучия человека

На правах рукописи

Катаева Любовь Владимировна

**МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ МИКРОПАРАЗИТОЦЕНОЗА ПРИ
ИНФЕКЦИОННО-ИНВАЗИОННОМ ПРОЦЕССЕ**

03.02.03 - микробиология

03.02.11 - паразитология

Диссертация на соискание ученой степени

доктора медицинских наук

Научный консультант:

**Степанова Татьяна Федоровна,
доктор медицинских наук, профессор**

Тюмень - 2020

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
Актуальность темы исследования.....	4
Степень разработанности темы исследования.....	6
Цель исследования.....	8
Задачи исследования	8
Научная новизна	9
Теоретическая и практическая значимость работы	11
Методология и методы исследования	15
Предмет изучения	16
Материал исследования	16
Микробиологические методы исследования	18
Молекулярно-генетические методы исследования.....	22
Паразитологические методы исследования	24
Статистические методы исследования	27
Личное участие автора в получении результатов	28
Положения, выносимые на защиту.....	29
Степень достоверности и апробация результатов.....	29
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	32
1.1. Структура, свойства и функции микробиоты толстой кишки.....	32
1.1.1. Физиологическое значение микробиоты для макроорганизма	32
1.1.2. Этиология нарушений микробиоценоза кишечника	42
1.1.2.1. Патотипы и серотипы <i>Escherichia coli</i>	46
1.1.2.2. Гены вирулентности <i>Escherichia coli</i>	50
1.2. Паразитоценоз и паразитарная система	57
1.2.1. Микробиологические аспекты паразитоценологии.....	60
1.2.2. Паразитоценолотические аспекты при инфекционно-инвазионном процессе.....	62
1.2.3. <i>Opisthorchis felineus</i> – элемент паразитоценоза	71
РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	83
ГЛАВА 2. ВИДОВОЙ СОСТАВ И СТРУКТУРА МИКРОБИОЦЕНОЗА ТОЛСТОЙ КИШКИ ПРИ ПАРАЗИТАРНЫХ ИНВАЗИЯХ.....	83
2.1. Характеристика микробиоценоза при описторхозе	84
2.2. Характеристика микробиоценоза при лямблиозе	90
2.2.1. Сравнительная характеристика микробиоценоза пациентов с лямблиозой инвазией и воспалительными заболеваниями ЖКТ	96
2.3. Характеристика микробиоценоза при токсоплазмозе	100
2.4. Характеристика микробиоценоза при токсокарозе.....	102
2.5. Характеристика микробиоценоза при иксодовом клещевом боррелиозе (ИКБ).....	105
2.6. Сравнительная характеристика микрoэкологической системы толстой кишки при паразитарных инвазиях.....	107
2.6.1. Сиквенс серогруппы штаммов <i>Escherichia coli</i>	112
2.6.2. Комплексы генов вирулентности <i>Escherichia coli</i>	120

ГЛАВА 3. МЕЖПОПУЛЯЦИОННЫЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ СОЧЛЕНОВ МИКРОПАРАЗИТОЦЕНОЗА	129
3.1. Паразитоценотические отношения в микропопуляциях условно патогенных бактерий и марит <i>Opisthorchis felineus</i>	129
ГЛАВА 4. МИКРОБИОЦЕНОЗ МОЛЛЮСКОВ СЕМЕЙСТВА <i>VITHYNIDAE</i> КАК ОСНОВА ФОРМИРОВАНИЯ СИМБИОТИЧЕСКИХ ОТНОШЕНИЙ В СИСТЕМЕ «ПАРАЗИТ-ХОЗЯИН» ПРИ ОПИСТОРХОЗЕ	138
4.1. Бактерии рода <i>Aeromonas</i> , основные представители микробиоты первого промежуточного хозяина <i>O. felineus</i>	138
4.2. Неферментирующие грамотрицательные бактерии – сочлены микробиоценоза первых промежуточных хозяев <i>Opisthorchis felineus</i>	143
4.3. Спорообразующие грамположительные бактерии семейства <i>Bacillaceae</i> , представители микробиоты моллюсков битиниид	151
4.4. Бактерии семейства <i>Enterobacteriaceae</i>	154
4.5. Сезонная динамика структуры микробиоты моллюсков битиниид – первых промежуточных хозяев <i>O. felineus</i>	163
ГЛАВА 5. РАСПРОСТРАНЕННОСТЬ БАКТЕРИИ РОДА <i>AEROMONAS</i>... 170	170
5.1. Распространенность бактерий рода <i>Aeromonas</i> в объектах окружающей среды	171
5.2. Частота обнаружения бактерий рода <i>Aeromonas</i> в клиническом материале	173
5.3. Протеомный анализ штаммов бактерий рода <i>Aeromonas</i> , изолированных из объектов окружающей среды и клинического материала	179
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	187
ВЫВОДЫ	213
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ	215
ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ	216
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	217
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	219
ПРИЛОЖЕНИЕ 1	255
ПРИЛОЖЕНИЕ 2	256

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Кишечная микрoэкологическая система - одна из основных гомеостатических систем организма, дисбаланс которой становится патогенетическим звеном многих соматических и инфекционных заболеваний. При этом кишечный гомеостаз непосредственно зависит от качественного и количественного содержания нормальной микрофлоры, имеющей большое функциональное значение [4, 52, 96, 97]. Паразитирование гельминтов в организме хозяина вызывает патологические изменения тканей и органов, которые проявляются воспалительной реакцией и нарушением микробиоценоза кишечника, причем, при большей интенсивности инвазии отмечена более высокая степень дисбиоза [37, 114, 165]. Изменения нормофлоры в структуре микробиоценоза толстой кишки, отягощающая роль отдельных групп условно-патогенных микроорганизмов, их значение в патогенезе паразитарных инвазий не определены, вместе с тем эти сведения важны при лечении и дальнейшей реабилитации пациентов.

В настоящее время не исследованными остаются взаимоотношения условно-патогенных бактерий и гельминтов в организме окончательного хозяина, что актуализирует необходимость исследования влияния микропаразитоценоза на формирование дисбиоза толстой кишки при инфекционно-инвазионном процессе.

Микробиоценоз основных промежуточных хозяев *Opisthorchis felineus* – переднежаберных моллюсков семейства *Bithyniidae* практически не исследовался. Существуют единичные сведения о количестве и распределении некоторых групп бактерий в пищеварительном тракте моллюсков, а также об их способности накапливать в своем кишечнике микроорганизмы, часть из которых являются возбудителями заболеваний животных и человека [187]. Исследования с позиций изучения закономерностей функционирования микропаразитоценоза позволят глубже понять патогенетические механизмы воздействия паразита на организм хозяина.

Не выявлена роль и участие персистентного потенциала, антагонистической активности и биопленкообразования микросимбионтов (индигенных и условно патогенных микроорганизмов) в качестве одного из возможных механизмов формирования микропаразитоценоза. Исследование современного состояния микропаразитоценоза с позиций молекулярно-генетических исследований в разрезе микробиологических аспектов важно для определения генов, ассоциированных с патогенностью, микробиоты промежуточных и окончательных хозяев при паразитарной инвазии.

Решение проблемы обеспечения населения безопасной в эпидемическом отношении доброкачественной водой является одной из важных задач в системе микробиологического мониторинга, что связано с нарастающим влиянием антропогенных факторов контаминации объектов окружающей среды возбудителями кишечных инфекций. Около 80% всех острых кишечных инфекций у взрослых и детей в мире обусловлено контактом с инфицированными микроорганизмами объектами окружающей среды или нарушением санитарно-гигиенических норм при их использовании [139]. Основными мероприятиями, направленными на снижение риска передачи кишечных патогенов, являются своевременные профилактические мероприятия, основанные на оценке качества воды и пищевой, в том числе рыбной, продукции по микробиологическим и паразитологическим показателям. Совершенствование методов исследований объектов окружающей среды будет способствовать минимизации риска заболеваемости населения острыми кишечными инфекциями.

Для оптимизации биологической безопасности водных биотопов необходимы знания структурно-функциональных особенностей их микробиоценоза, в частности циркуляции бактерий рода *Aeromonas*, патогенных свойствах, антибиотикорезистентности, сезонных колебаниях в структуре микробного пейзажа. В развитии инфекции, связанной с бактериями рода *Aeromonas*, может играть роль не только водный фактор, но и алиментарный. Особую опасность для человека представляют контаминированные аэромонадами морепродукты, продукты растительного происхождения, а также мясные, рыбные

и молочные продукты [78, 79, 239]. Это обусловило направление исследований по обоснованию значимости бактерий рода *Aeromonas* как санитарно-показательных микроорганизмов.

Все выше изложенное предопределило тематическую направленность исследований, расширяющих представление о механизмах межмикробного взаимодействия нормофлоры с условно-патогенными микроорганизмами толстого кишечника при паразитарных инвазиях, и позволило установить подходы к дальнейшим исследованиям по снижению рисков развития осложнений воспалительного характера после дегельминтизации пациентов. Вместе с тем, изучение микропаразитоценоза сочленов жизненного цикла *O. felinus* предоставит возможность определить его функциональные особенности, структуру и свойства для решения проблем инфекционно-инвазионных заболеваний.

Степень разработанности темы исследования

Большой вклад в исследования о взаимодействии патогенных бактерий и их влиянии на организм хозяина внесли работы И. И. Мечникова (1908). Ему принадлежат исследования по взаимодействию микробов между собой и с организмом хозяина, об антагонизме паразитов и других симбионтов, а также о синергическом влиянии кишечной инфекции на микрофлору кожи, о роли гельминтов в качестве агентов, «открывающих ворота» патогенным микроорганизмам в ткани хозяина [25].

Понятие «паразитоценоз» сформулировал Е. Н. Павловский (1946), определяя его как совокупность живых существ и бактериальных организмов, обитающих в организме хозяина. Он указал, что теорию паразитоценозов следует применять не только в клинике для уточнения диагноза и причин индивидуального течения болезни, но при паразитолого-экологическом исследовании путей циркуляции возбудителей болезни в ее очаге. Таким образом, Е. Н. Павловским (1965) было сформулировано новое научное направление — экологическая и краевая паразитология и разработано учение о природной

очаговости болезней [145, 146, 147]. Позднее В. Н. Беклемишевым (1970) обоснована самостоятельная дисциплина - медицинская паразитология [13]. Наиболее четко экологическое понимание сущности паразитизма было сформулировано В. А. Догелем (1947,1962) и К. Кеннеди (1978), которые в рамках экологической паразитологии, установили зависимость инвазированности животных от условий окружающей среды и физиологического состояния организма хозяев [65].

Развивая общую концепцию паразитизма, А. П. Маркевич предложил новую дисциплину общепаразитологического уровня – паразитоценологию и определил ее как науку об объективных закономерностях существования экопаразитарных систем, а также популяций свободных стадий паразитов и других симбионтов, входящих в состав конкретного биогеоценоза или биосферы в целом. Совокупность патогенных возбудителей в одной особи хозяина А. П. Маркевич определил как микропаразитоценоз [113].

Онтогенез гельминтов, происходящий в организме как промежуточных, так и окончательных хозяев - это комплексный процесс, зависящий в значительной мере от структуры микробиоценоза (микропаразитоценоза). Первые исследования в области микропаразитоценоза при описторхозной инвазии проведены в Тюменском научно-исследовательском институте краевой инфекционной патологии под руководством Г. В. Кондинского. Изучены взаимовлияния марит *O. felineus* и бактерий *Salmonella typhi* при их совместном культивировании. Исходя из положений теории симбиогенеза, высказано предположение о наличие симбионтных микроорганизмов у марит *O. felineus*. Г. В. Кондинский с соавторами исследовали микрофлору марит и метацеркарий *O. felineus* [85, 86, 87]. В дальнейшем изучалось распределение микрофлоры в желчи и кишечном содержимом у больных при различных формах описторхозной инвазии. Т. Ф. Степанова с соавторами показала существенную роль микрофлоры желчевыводящих путей и толстого кишечника при разных формах инвазионного процесса при описторхозе [168, 169, 170]. При обследовании пациентов,

страдающих паразитозами, предложено бактериологические методы включить в комплекс клинических, биохимических и иммунологических тестов.

Известно, что гельминты как сочлены микропаразитоценоза играют значимую роль в экологических системах, и эта роль достаточно полно пока не раскрыта. Без глубокого понимания взаимоотношений паразитов и симбионтов на хозяев и объекты окружающей среды представление о явлениях паразитизма, патогенности микроорганизмов и защитных реакциях их хозяев является недостаточным. Полученные результаты могут быть использованы в микробиологической практике с целью разработки критериев и оценки качества воды открытых водоемов и рыбной продукции.

Для многих стран Европы и Азии аэромонадная инфекция, возбудителем которой являются бактерии рода *Aeromonas*, представляет серьезную проблему. Так, в структуре острых кишечных заболеваний аэромонады составляют от 1 до 13% у взрослых и до 50% у детей, кроме того, бактерии этого рода выделяются и из водных объектов [78, 79, 104].

В наших исследованиях структура микробиоценоза как организма человека, так и промежуточных хозяев жизненного цикла *O. felineus* рассматривается с позиции микропаразитологии.

Цель исследования

Установление микробиологических закономерностей функционирования микропаразитоценоза при инфекционно-инвазионном процессе на модели изучения межпопуляционных взаимодействий условно-патогенных бактерий и сочленов жизненного цикла *O. felineus*.

Задачи исследования

1. Изучить микробиоценоз толстой кишки пациентов при инфекционно-инвазионном процессе, оценить комплексы генов вирулентности и кластеры O-антигенов штаммов *Escherichia coli*, изолированных от больных паразитарными и воспалительными заболеваниями желудочно-кишечного тракта.

2. Исследовать межпопуляционные взаимодействия бактерий *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* с маритами *O. felineus* при сокультивировании их в искусственной среде (*in vitro*).

3. Определить структуру и установить сезонную динамику микробиоценоза первых промежуточных хозяев *O. felineus* - моллюсков семейства *Bithyniidae*.

4. Изучить персистентные свойства и факторы патогенности бактерий, составляющих микробиоценоз моллюсков семейства *Bithyniidae* и мест их обитания (вода водоемов, придонный грунт).

5. Оценить результаты микробиологического исследования рыб семейства *Cyprinidae* (карповых) – второго промежуточного хозяина *O. felineus*, инвазированных его личинками.

6. Обосновать роль бактерий рода *Aeromonas*, изолированных из водных объектов и мест обитания промежуточных хозяев *O. felineus*, в этиологии бактериальных инфекций человека.

Научная новизна

Установлены особенности кишечного микробиоценоза пациентов с паразитарными инвазиями и инфекциями (описторхоз, лямблиоз, токсокароз, токсоплазмоз, иксодовый клещевой боррелиоз): при лямблиозе, токсоплазмозе, токсокарозе и иксодовом клещевом боррелиозе - выраженный дефицит бактерий рода *Lactobacillus*; при описторхозе – *Bifidobacterium spp.* Определены условно-патогенные бактерии, вызывающие снижение функции колонизационной резистентности нормофлоры толстой кишки: при описторхозе, лямблиозе, токсоплазмозе и токсокарозе - бактерии рода *Klebsiella*, при иксодовом клещевом боррелиозе - бактерии рода *Proteus*. Вторые позиции принадлежали бактериям *S. aureus* и грибам рода *Candida*.

Выявлены комплексы генов вирулентности и кластеры O- и H-антигенов штаммов *E. coli*, изолированных из содержимого толстой кишки при инфекционно-инвазионном процессе, в зависимости от нозоформы. Показано влияние описторхозной инвазии на колонизацию организма человека штаммами

E. coli - носителями кластеров генов, ассоциированных с вирулентностью, что возможно связано с нарушением иммунитета и выраженным влиянием метаболитов *O. felineus*.

Разработана новая система мониторинга патогенного потенциала энтеробактерий, позволяющая определять наличие генетических детерминант штаммов: аэробактин *iuc*, гемолизин *hly*, колибактин *clb*, способствующих вероятности возникновения и развития инфекционных заболеваний (патент на изобретение РФ № 2662930 от 31.07.2018 «Система мониторинга патогенного потенциала энтеробактерий методом полимеразной цепной реакции»).

Установлено, что обнаружение бактерий рода *Aeromonas* в клиническом материале, видовое разнообразие, выделение в монокультуре и ассоциациях, резистентность к антибиотикам доказывает их этиологическую значимость в инфекционном процессе. Филогенетический сравнительный анализ белковых спектров клинических штаммов *A. hydrophila*, *A. salmonicida*, *A. veronii* с дендрограммами штаммов аналогичных видов, выделенных из объектов окружающей среды (вода, рыба), указывает на высокую степень гомологии, что свидетельствует об их близком родстве. Вследствие чего, воду и рыбу можно рассматривать как факторы передачи при аэромонадной инфекции, а бактерии рода *Aeromonas* - в качестве критерия микробиологической оценки водных объектов и рыбной продукции.

Предложен способ определения границ природных очагов биогельминтозов, дающий возможность применять генетические маркеры и показатели индекса подобия при выявлении локализации популяции карповых рыб в водных объектах для установления пределов распространения популяции рыб на конкретной территории (патент на изобретение РФ № 2545707 от 26.02.2015 «Способ определения границ природных очагов биогельминтозов»).

Разработан способ определения источника заражения при расшифровке вспышек бактериальных инфекций, позволяющий использовать кластерный анализ протеинограмм штаммов, предполагаемых возбудителей, определять их идентичность и, тем самым, устанавливать принадлежность к одному источнику

заражения (патент на изобретение РФ № 2696101 от 31.07.2019 «Способ расшифровки вспышек бактериальных инфекций и определения источника заражения»).

Выделен мультирезистентный штамм бактерий *Acinetobacter baumannii*, результаты полногеномного секвенирования которого выявили маркеры резистентности к антимикробным препаратам: аминогликозидам (aph(3'')-Ib; aph(6)-Id; aph(3')-Ia; aph(3')-Via; armA), бета-лактамам (blaOXA-23, blaOXA-66, bla ADC-73, blaTEM-ID), MLS-антибиотикам(mrs, mph), сульфонамиду (sul2), тетрациклину (tet(B)). Штамм депонирован в Государственной коллекции патогенных микроорганизмов и клеточных культур «ГКПМ-Оболенск» В-8561 и международной базе данных GenBank/NCBI (accession no SRR8881948), а также предложен для оценки эффективности антимикробных препаратов, дезинфицирующих средств (патент на изобретение РФ № 2711922 от 23.01.2020 «Мультирезистентный штамм бактерий *Acinetobacter baumannii* для стандартизации оценки эффективности разрабатываемых антимикробных препаратов и дезинфицирующих средств»).

Теоретическая и практическая значимость работы

Разработаны теоретические основы оценки состояния микропаразитоценоза в звене промежуточных и окончательного хозяев *O. felinus* путем внедрения новых подходов к его дифференциации. На основе комплексной оценки сходства и различия состава микробиоценоза толстой кишки человека дана его характеристика при инфекционно-инвазионных заболеваниях. Выявлены качественные и количественные особенности микробиоты: на фоне снижения аутохтонных бактерий, выполняющих функцию колонизационной резистентности толстого кишечника, отмечено возрастание аллохтонных микроорганизмов. Полученные результаты, свидетельствующие о нарушении микробиоценоза толстой кишки, обосновывают включение пробиотических препаратов в схемы лечения пациентов с паразитозами.

Получены новые данные о взаимовлиянии условно-патогенных микроорганизмов *K. pneumoniae*, *S. aureus* и продуктов жизнедеятельности марит *O. felineus* при сокультивировании их в искусственной среде (*in vitro*), заключающиеся в том, что метаболиты марит *O. felineus* подавляют рост и размножение этих бактерий. Экспериментально выявленные взаимодействия *K. pneumoniae*, *S. aureus* и метаболитов марит *O. felineus* позволили теоретически обосновать особенности функционирования микропаразитоценоза в паразитарной системе и раскрыть подходы к патогенетическим механизмам воздействия паразита на организм хозяина.

Результаты исследований структуры микробиоценоза и сезонной динамики микробиоты моллюсков – первого промежуточного хозяина *O. felineus* - позволили выдвинуть и теоретически обосновать гипотезу о влиянии свойств персистенции резидентных бактерий на приживаемость яиц и дальнейшее развитие личиночных стадий гельминта в теле моллюска, что в итоге обуславливает устойчивое функционирование паразитарной системы.

Показана необходимость использования комплекса диагностических тестов при обследовании на наличие паразитарной инвазии, включающего исследование микробиоценоза толстой кишки, определение чувствительности к антимикробным препаратам и бактериофагам (при обнаружении условно-патогенных бактерий). Это позволит провести коррекцию нарушений и будет способствовать профилактике воспалительных заболеваний желудочно-кишечного тракта, вызванных дегельминтизацией пациента. Полученные результаты исследований, выявляющие нарушения микробиоценоза толстой кишки обосновывают необходимость включения в схемы лечения паразитарной и инфекционной патологии пробиотиков на основе: *Bifidobacterium spp.* при описторхозе; бактерий рода *Lactobacillus* - лямблиозе, токсоплазмозе, токсокарозе и иксодовом клещевом боррелиозе.

Представляется целесообразным для идентификации видового разнообразия бактерии рода *Aeromonas* использовать метод масс-спектрометрии при

проведении бактериологического исследования мочи, который будет способствовать улучшению диагностики возбудителей урогенитальной инфекции.

При расшифровке вспышек бактериальной инфекции и определении источника заражения определена необходимость проведения протеомного анализа подобия штаммов бактерий, изолированных из различных объектов окружающей среды и клинического материала.

Установлена контаминация бактериями рода *Aeromonas* объектов обитания (вода, придонный грунт) сочленов жизненного цикла *O. felineus* (моллюски, рыба). Определено превалирование этих бактерий в структуре микробиоты промежуточных хозяев *O. felineus*. Показано, что рыбы, инвазированные метацеркариями *O. felineus*, в большей степени подвержены обсеменению *Aeromonas spp.*, которые значительно снижают качество рыбной продукции. Эти исследования с высокой вероятностью доказывают необходимость доработки схем идентификации *Aeromonas spp.* и включения указанных бактерий в качестве критерия санитарно-гигиенической оценки объектов окружающей среды.

В Государственной коллекции патогенных микроорганизмов и клеточных культур «ГКПМ-Оболensk» депонированы 26 штаммов: 12 *E. coli*, изолированные из биоматериала пациентов с диагнозом описторхоз и лямблиоз, отличающиеся кластерами генов вирулентности и патогенности (В-8794, В-8789, В-8790, В-8791, В-8792, В-8793, В-8795, В-8796, В-8797, В-8798, В-8799, В-8800); 1 штамм *E. coli* В-8794, выделенный от пациента с лямблиозом, депонирован как референс-штамм нового генотипа для типирования бактерий рода *Escherichia*; 12 штаммов *Aeromonas spp.* (В-8815, В-8816, В-8817, В-8818, В-8819, В-8820, В-8821, В-8822, В-8823, В-8824, В-8825, В-8826), изолированные из воды открытых водоемов, рыб и клинического материала, отличающиеся резистентностью к антимикробным препаратам; 1 штамм *Acinetobacter baumannii* (В-8557) депонирован как природный штамм, обладающий генами резистентности к бета-лактамам – blaOXA-104 и ADC-30 и отсутствием маркеров резистентности к другим группам антибиотиков. Депонированные штаммы могут применяться для стандартизации оценки эффективности разрабатываемых перспективных антимикробных

препаратов, а также в целях проведения филогенетических и молекулярно-генетических исследований.

В международном банке данных GenBank депонированы нуклеотидные последовательности 13 штаммов, носителей генов, ассоциированных с вирулентностью и резистентностью: *A. baumannii* (SRR8926368); *E. coli* (SRR11426061, SRR11426065, SRR11426066, SRR11426060, SRR11426067, SRR11426059, SRR11426064, SRR11426062, SRR11426068, SRR11426057, SRR11426058, SRR11426063), которые могут быть положены в основу разработки праймеров для создания диагностических наборов.

Сформирована рабочая коллекция штаммов, изолированных от пациентов с инфекционно-паразитарной патологией и объектов окружающей среды, которая может быть использована для изучения механизмов резистентности и штаммового разнообразия возбудителей бактериальных инфекций. Информация, содержащая сведения о локусе и месте выделения штаммов, составе и количественной характеристике, биологических свойствах, антибиотикорезистентности бактерий, включенных в рабочую коллекцию, оформлена в электронном виде (Excel).

Результаты исследований функционирования микропаразитоценозов при инфекционно-инвазионном процессе внедрены в образовательный процесс кафедры микробиологии ФГБОУ ВО «Тюменский государственный медицинский университет» Минздрава России (акт внедрения от 29.01.2020 г.) и ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Тюменской области (акт внедрения от 15.01.2020 г.) как региональный компонент медицинской паразитологии. Материалы диссертации вошли в дополнительные образовательные программы повышения квалификации и профессиональной переподготовки врачей на базе ФБУН «Тюменский научно-исследовательский институт краевой инфекционной патологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по специальности «Бактериология» (акт внедрения от 13.01.2020 г.).

Методология и методы исследования

При проведении исследований исходили из положений классической микробиологии, изучающей теоретические основы жизнедеятельности микроорганизмов: закономерности взаимоотношения с окружающей средой и живыми организмами, распространения в природе, взаимодействия с факторами окружающей среды и живыми организмами. Аспекты взаимодействия популяций паразита и хозяина изучались в соответствии с достижениями современной паразитологии [25], а также с позиций положения о саморегулирующихся хозяино-паразитарных экосистемах [18]. При расшифровке механизмов персистенции патогенов в организме хозяина применялся структурно-функциональный подход [40]. Разработка научно-практических рекомендаций основывалась на концепции медицинской паразитоценологии [87, 114], санитарной паразитоценологии [102]. Анализ источников современной литературы по вопросам микробиологии, микропаразитоценологии и профилактики паразитарных инвазий явился теоретической базой исследований.

Для выполнения поставленных задач были использованы микробиологические (бактериологические, биологические, масс-спектрометрические), молекулярно-генетические (полногеномное секвенирование, филогенетический анализ), паразитологические (Таблица 1) и статистические методы исследования.

Таблица 1 – Виды и количество исследований

Наименование исследований	Количество исследований
Микробиологические исследования (микробиоценозы)	811
Микробиологические исследования (биологические свойства бактерий)	1412
Определение чувствительности к антибиотикам	491
Микробиологические исследования (микробиоценоз моллюсков)	153
Микробиологические исследования объектов окружающей среды	248
Молекулярно-генетические исследования	30
Паразитологические исследования	60

Предмет изучения

Микробиоценоз толстой кишки пациентов, страдающих паразитарными инвазиями и инфекциями; микробиоценоз промежуточных хозяев возбудителя описторхоза, объекты окружающей среды (вода открытых водоемов, придонный грунт, лечебная грязь); состав и свойства персистенции условно-патогенных микросимбионтов, в том числе бактерий рода *Aeromonas*.

Материал исследования

Штаммы микроорганизмов

В работе использованы штаммы микроорганизмов, изолированные от пациентов с паразитарными инвазиями и инфекциями; выделенные при изучении микробиоценоза моллюсков и рыб – промежуточных хозяев *O. felineus*; из объектов окружающей среды (Таблица 2).

Таблица 2 –Количество штаммов микроорганизмов

Штаммы микроорганизмов	Количество штаммов
Микроорганизмы, выделенные от пациентов с паразитарными инвазиями и инфекциями	156
Микроорганизмы, выделенные при изучении микробиоценоза моллюсков – первого промежуточного хозяина <i>O. felineus</i>	937
Микроорганизмы, выделенные при изучении объектов окружающей среды	186
Штаммы бактерий <i>E. coli</i>	30
Бактерии рода <i>Aeromonas</i>	103

Клинические образцы материалов для исследования

Материал от пациентов с установленным диагнозом паразитарной инвазии получали в клиническом отделении Федерального бюджетного учреждения науки «Тюменский научно-исследовательский институт краевой инфекционной патологии» Роспотребнадзора.

Сбор материала и бактериологическое исследование содержимого толстой кишки проведены в группах пациентов с диагнозом: описторхоз, лямблиоз,

токсоплазмоз, токсокароз, иксодовый клещевой боррелиоз (ИКБ) в соответствии с требованиями нормативной документации [63].

Метацеркарии и мариты *O. felineus*

Метацеркарии *O. felineus* – 250 личинок, получали из рыбы (язь *Leuciscus idus* (Linnaeus, 1758)). Мариты *O. felineus* получали из печени золотистых хомяков, инвазированных метацеркариями – 60 экземпляров.

Животные

Микропаразитоценоз пресноводных переднежаберных моллюсков семейства *Bithyniidae* – первого промежуточного хозяина *O. felineus* изучен на 153 особях. Сбор моллюсков производился на реке Ирюм (90 особей), протекающей по территории Курганской и Тюменской областей, относящейся к водоемам Обь-Иртышского бассейна. В Амурской области – на реке Амур (63 особи).

Экспериментальную модель описторхоза создавали на 5 золотистых хомяках, *Mesocricetus auratus* – использовали самцов массой $76,1 \pm 3,3$ грамма. При выполнении экспериментов соблюдались все правила работы с лабораторными животными: Директива Европейского парламента и совета европейского союза по охране животных, используемых в научных целях [64] и в соответствии с нормативными требованиями Российской Федерации [57, 154].

Лабораторные животные содержались в изолированных клетках в стандартных условиях вивария, размещенного в лабораторном корпусе ФБУН ТНИИКИП Роспотребнадзора с режимом ограниченного доступа. Манипуляции производились в соответствии с правилами гуманного обращения с лабораторными (экспериментальными) животными и в соответствии с заключением комиссии по биоэтике ФБУН ТНИИКИП Роспотребнадзора. Эвтаназия лабораторных животных осуществлялась с использованием методов, соответствующих принципам, изложенным в Рекомендациях Европейской Комиссии по эвтаназии экспериментальных животных. В качестве метода эвтаназии использовался эфир медицинский (воздействие в течение 20 мин).

Объекты окружающей среды

Воду и придонный грунт отбирали из мест обитания моллюсков в соответствии с нормативной документацией [118, 122]. Исследовано 15 проб воды открытых водоемов (реки Ирюм, Амур) и 9 проб придонного грунта.

Пробы воды открытых водоемов - 22 и 118 проб лечебной грязи, добываемой в озерах Тюменского района, явились местом обнаружения бактерий рода *Aeromonas*.

Исследовано 84 экземпляра рыб, полученных любительским ловом из Обь-Иртышского водного бассейна гиперэндемичного очага описторхоза. Изучена зараженность метацеркариями *O. felineus* трех видов рыб семейства *Cyprinidae* в возрасте от 1+ до 7+ лет: язь *Leuciscus idus* (Linnaeus, 1758), плотва сибирская *Rutilus rutilus lacustris* (Linnaeus, 1758), укляя *Alburnus alburnus* (Linnaeus, 1758), выловленных в реках Тобол (Ярковский район), Иртыш (Тобольский район) и в окрестных пойменных водоемах г. Тюмени. Кроме того, на наличие плероцеркоидов *Diphyllobothrium latum*, исследовано несколько экземпляров хищных рыб: обыкновенный окунь (*Perca fluviatilis* (Linnaeus, 1758)), обыкновенная щука (*Esox lucius* (Linnaeus, 1758)), обыкновенный судак (*Sander lucioperca* (Linnaeus, 1758)). До проведения исследования рыба хранилась в условиях холодильника при температуре плюс 4-6° С в течение 2-3 суток. Из всех исследованных экземпляров рыб изолировано 154 культуры микроорганизмов, выделенных с поверхности тела и внутренностей рыб.

Микробиологические методы исследования

Для посева клинического биоматериала использовался классический бактериологический метод в соответствии с действующими нормативными документами [63, 144, 155].

Изучение кишечного микробиоценоза

Выделение штаммов осуществлялось общепринятыми методами [155]. Бактериологическое исследование содержимого толстой кишки проводили по

стандартной методике МЗ РФ [63]. Количественную оценку содержания КОЕ/1 г фекалий и характеристику степени микробиологических нарушений давали в соответствии с отраслевым стандартом [144], регламентирующим качественный и количественный состав основной микрофлоры толстой кишки у здоровых людей и рассматривает 3 степени микробиологических нарушений. Опираясь на их характеристики, нами были определены степени дисбиоза при различных паразитоценозах.

Выросшие на плотных питательных средах колонии идентифицированы по биохимическим тестам (бактериологический анализатор Sensititre ARIS 2X, Великобритания) и по прямому белковому профилированию с помощью времяпролетной масс-спектрометрии с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией с использованием MALDI-TOF MS серии Microflex LT с программным обеспечением Maldi BioTyper 3,0 (Bruker Daltonics, Германия). Анализ проводили в автоматическом и ручном режимах: проводили экстракцию белков последовательной обработкой микробной взвеси этиловым спиртом, 70% муравьиной кислотой с последующим добавлением ацетонитрила. В качестве вещества, обеспечивающего процессы десорбции и ионизации посредством поглощения лазерного излучения, использовали MALDI-матрицу (насыщенный водный раствор α -циано-4-гидроксикоричной кислоты, содержащий 50% ацетонитрила и 2,5% трифторуксусной кислоты). Расчет коэффициента достоверности (score) осуществлялся с использованием программного обеспечения Maldi BioTyper 3,0. Уровень достоверности выше 2,0 соответствовал высокому уровню видовой идентификации. Для каждого исследованного штамма бактерий приводилась ссылка на NCBI (National Center for Biotechnology Information).

Изучение факторов вирулентности бактерий

Наличие гемолизина, лецитиназы, плазмокоагулазы и лизоцима, исследованы у 154 штаммов. Гемолизин, лецитиназу и плазмокоагулазу определяли по общепринятым методикам [23].

Изучение свойств персистенции бактерий

Исследованы следующие биологические свойства выделенных бактерий: антилизоцимная активность, биопленкообразование. Антилизоцимную активность (АЛА) определяли по методике Бухарина О.В. с соавт. [38, 39, 44], БПО микроорганизмов исследовали по G.O. Pool (2000) фотометрическим методом на фотометре Elix808 (BioTech, США) [275].

Антилизоцимная активность (АЛА) и биопленкообразование (БПО) бактерий исследованы у 160 штаммов бактерий, выделенных из моллюсков и 11 – выделенных из среды их обитания (вода открытых водоемов и грунт).

Биопленкообразование. Исследовалась суточная агаровая культура. Бактериальную взвесь, соответствующую 3 Мак-Farland, раскапывали в лунки плоскодонного планшета по 15 мкл в трехкратной повторности. Затем в каждую лунку вносили по 135 мкл питательного бульона (МПБ). Постановка контроля: в 3 лунки закапывали по 135 мкл МПБ. (Если в контрольных лунках отмечался бактериальный рост – исследование прекращалось). Замеряли оптическую плотность в каждой лунке на фотометре (длина волны 450 нм). Планшет инкубировали в течение 24 ч при температуре плюс 37° С. По окончании инкубации вновь измеряли оптическую плотность. Результаты измерений оптической плотности показывали изменение концентрации бактериального роста. Затем содержимое всех лунок планшета сливали и просушивали в течение 30-40 мин. Добавляли фиксирующую смесь: этанол (95%) и метанол в соотношении 1:1. В каждую лунку добавляли по 150 мкл этой смеси и выдерживали 5 мин, затем вносили 0,1 % водный раствор генциан фиолетового (на дистиллированной воде). Выдерживали 40 мин. Краситель сливали, планшет промывали дистиллированной водой трехкратно. Планшет просушивали 30-40 мин, после чего в каждую лунку закапывали по 150 мкл 95% этанола. Выдерживали при комнатной температуре 30 мин. Затем, не сливая спирта, измеряли оптическую плотность при длине волны 640 нм.

Определение антилизоцимной активности [38]. Исследовалась суточная агаровая культура. Высевали *Micrococcus luteus* на чашку Петри с МПА. В

пробирке Eppendorf готовили контроль: 0,9 мл МПБ + 0,1 мл лизоцима (20 мкг/мл). Опыт: 0,8 мл МПБ или бульона Шендлера + 0,1 мл рабочего раствора лизоцима (20 мкг/мл) + 0,1 мл взвеси микроорганизма по 3 Mak-Farland. Термостатировали 24 ч при 37°C. На следующий день на 1 мл опытной смеси добавляли 0,1 мл хлороформа, выдерживали 1 ч. Затем центрифугировали 15 мин при 3200 об/мин. Супернатант отделяли в пробирки Eppendorf. Раскапывали в верхний и нижний ряды планшета: 0,9 мл бульона + 0,1 мл раствора лизоцима по 50 мкл. Взвесь убитого *M. luteus* (0,28 — 0,3 ОД) вносили по 200 мкл в каждую лунку. Первый замер (1 ряд) проводили через 30 сек после внесения *M. lutes*, второй - через 2 мин. Постепенно замеряли все ряды.

За уровень антилизоцимной активности исследуемых культур принимали максимальное значение концентрации лизоцима в среде, при которой еще наблюдался рост *M. luteus*. Антилизоцимную активность выражали в микрограммах инактивированного лизоцима.

Определение чувствительности к антибиотикам

Чувствительность штаммов *Aeromonas* к антимикробным препаратам (АМП) определялась на бактериологическом анализаторе Sensititre (Trek Diagnostic Systems, Великобритания) по минимальной ингибирующей концентрации. Определение чувствительности к антибиотикам диско-диффузионным методом осуществлялось по стандартным методикам в соответствии с нормативной документацией [121, 140].

Исследование микробиоценоза метацеркарий *O. felineus*, моллюсков

Метацеркарии выделяли из рыб семейства карповых компрессионным методом и методом переваривания в искусственном желудочном соке. Моллюсков и метацеркарии многократно отмывали стерильной водопроводной водой, затем гомогенизировали, высевали на плотные (Эндо, МПА, кровяной агар, Сабуро) и в жидкие (тиогликолевая) питательные среды.

Исследование объектов окружающей среды

- Исследование рыбной продукции. Микробиологические исследования рыбы - второго промежуточного хозяина *O. felineus* проводились по стандартной методике [77].

- Исследование воды открытых водоемов. Для анализа микробиологического состава водной среды использовался титрационный метод. Пробы речной воды (место отбора моллюсков) высевали в количестве 50 мл в жидкую питательную среду накопления ЛПС (лактозо-пептонная среда) и через 48 ч инкубации при 37°C высевали на среду Эндо. Чашки с посевами помещали в термостат и инкубировали при температуре 37°C в течение 18 - 24 ч. Все выросшие колонии отвивали и идентифицировали [122, 123].

- Исследование грунта открытых водоемов и лечебной грязи. Пробы придонного грунта водоемов отбирали и проводили в соответствии с методикой микробиологического исследования почвы [118, 120].

Молекулярно-генетические методы исследования

Молекулярно-генетические исследования проведены на штаммах *E. coli*, выделенных от пациентов с паразитарными инвазиями (описторхоз и лямблиоз) и заболеваниями желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) воспалительного характера.

Выделение тотальной ДНК из бактериальной культуры

Для выделения ДНК 2-3 петли бактериальной культуры переносили в микроцентрифужную пробирку «Eppendorf» с 400 мкл буферного раствора 1×TE (10 mM Tris, pH 8,0 и 1 mM EDTA). Затем в пробирку добавляли 50 мкл лизоцима (10мг/мл) и инкубировали в течение двух часов при 37°C. К полученной суспензии добавляли 75 мкл раствора SDS/протеиназа К (70 мкл 10% SDS и 5 мкл протеиназы К), 100 мкл 5M NaCl и 100 мкл раствора СТАВ/NaCl (4,1 г NaCl, 10 г СТАВ, 80 мл дистиллированной воды). Полученную смесь трясли до молочно-белой консистенции и инкубировали в течение 10 мин при 65°C. После инкубации в пробирку добавляли 750 мкл хлороформ/изоамиловый спирта (24:1), трясли 10 с

и центрифугировали при 14000 об/мин в течение 5 мин. Затем надосадочную жидкость, содержащую ДНК, отбирали в новую пробирку, добавляли 450 мкл изопропилового спирта и инкубировали в течение 10 мин на льду. Пробирку центрифугировали 15 мин при комнатной температуре при 14000 об/мин, супернатант удаляли при помощи автоматической пипетки. К осадку добавляли 1 мл 70% перегнанного этанола и центрифугировали в течение 15 мин при 4°C - 12000 об/мин. Супернатант удаляли, осадок высушивали при комнатной температуре и растворяли в 20 мкл дистиллированной воды.

Полногеномное секвенирование

Полногеномное секвенирование штаммов *E. coli* осуществлено на платформе Illumina MiSeq, с использованием наборов Nextera DNA Library Preparation Kit и MiSeq Reagent Kits v3 (600-Cycle Kit), согласно рекомендациям производителя. Перечень полученных архивов сырых ридов перечислен в Приложении 1.

Полученные единичные прочтения полногеномного секвенирования для каждого штамма *E. coli* были собраны в контиги при помощи программы Unicycler v.0.4.7. Для 28 образцов получены величины средних покрытий геномов выше 30, что свидетельствовало о достаточном объеме полученных данных для дальнейшего анализа. Для двух штаммов (*E. coli* -24 и *E. coli* - 1654-1) покрытие составило 24 и 26, соответственно. Несмотря на это, полученные сборки контигов пригодны для анализа. Общая длина полученных контигов (п.н.) и GC состав образцов соответствовал значениям размеров геномов и GC составу референсных штаммов *E. coli*, находящихся в базе данных NCBI Genome.

Филогенетический анализ

Для филогенетического исследования использовали программу Wombac 2.0 (<http://www.bioinformatics.net.au/software.wombac.shtml>), которая позволяет находить коровые SNP в нуклеотидных последовательностях и производить выравнивание этих полиморфизмов. Для построения филогенетического дерева

использовали программу SplitsTree4 (<http://www.splitstree.org/>). С помощью программы Mauve (<http://gel.ahabs.wisc.edu/mauve/>) определена последовательность гена 16S рРНК.

Определение серогруппы

Для определения серогруппы использовали сервер SerotypeFinder 3.0 (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/SerotypeFinder/>), а также программы Mauve (<http://gel.ahabs.wisc.edu/mauve/>), Lasergene и рабочие базы данных для определения серогрупп *E. coli* ОКК ФБУН ГНЦ ПМБ.

Мультилокусное сиквенс-типирование

Для поиска определения сиквенс типов использовали сервер MLST 2.0 (Multi-Locus Sequence Typing) (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/MLST/>), а также программу Lasergene.

Принадлежность к клональному комплексу взято с сайта – *E. coli* (Achtman) MLST locus/sequence definitions database (https://pubmlst.org/bigsub?db=pubmlst_ecoli_achtman_seqdef&page=downloadProfiles&scheme_id=4).

Определение генов вирулентности

Для поиска генов вирулентности использовали сервер VirulenceFinder 2.0 (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/VirulenceFinder/>).

Паразитологические методы исследования

Ихтиопаразитологические методы

Метод переваривания в искусственном желудочном соке мышц рыб семейства *Cyprinidae* (Карповые) для выделения метацеркарий *O. felineus* осуществляли в соответствии с п. 3.2.11.4. МУК 3.2.988-00 «Методы санитарно-паразитологической экспертизы рыбы, моллюсков, ракообразных, земноводных,

пресмыкающихся и продуктов их переработки» (Москва, Федеральный центр госсанэпиднадзора Минздрава России, 2001) [124].

Малакологические методы:

- компараторный метод для определения видов моллюсков;
- компрессионный метод выявления личинок (церкарий) паразита *O. felineus* в моллюсках (С.А. Беэр, 2005);
- метод прижизненной диагностики инвазии моллюсков личинками паразитов (С. А. Беэр, 2005).

Методы биологической пробы

Заражение экспериментальных животных (золотистых хомяков) осуществлялось перорально 50-тью жизнеспособными метацеркариями *O. felineus* на особь. Повторное заражение проводили через 3-е суток, дополнительно 50 метацеркариями (п.5.6. МУК 3.2.988-00).

После фиксации стабильной яйцепродукции (обнаружения яиц *O. felineus* в фекалиях зараженных хомяков) проводили эвтаназию лабораторных животных.

Метод неполного гельминтологического вскрытия млекопитающих

Для получения марит *O. felineus* применялась методика неполного гельминтологического вскрытия по К. И. Скрябину [233]. Под глубоким эфирным наркозом вскрывали инвазированных личинками *O. felineus* золотистых хомяков и с соблюдением правил асептики извлекали печень, желчный пузырь и поджелудочную железу. Желчный пузырь вскрывали. Печень и желчный пузырь заливали стерильным физиологическим раствором и оставляли в емкости при комнатной температуре на 20-30 мин. Печень, поджелудочную железу разминали руками, надосадочную жидкость сливали, видимых паразиты извлекали при помощи препаровальной иглы и помещали в стерильный физиологический раствор. Промывку печени проводили несколько раз до полного извлечения марит *O. felineus*.

Методика сокультивирования бактерий с маритами *O. felineus*

Паразитов помещали в теплый стерильный физиологический раствор и осуществляли 10-кратную отмывку с целью освобождения поверхности гельминта от загрязнений. В стерильные бактериологические пробирки разливали по 10 мл питательной среды 199 и помещали в них марит, по 12 экземпляров в каждую. Бактериальную суспензию готовили из суточных агаровых культур, доводя концентрацию инокулома до $1,5 \times 10^8$ КОЕ/мл, что соответствует стандарту мутности 0,5 по Мак-Farland. По 1 мл готовой суспензии бактерий вносили в пробирки со средой и маритами. Сформировали 2 опытные группы: 1) питательная среда 199, мариты и бактерии *K. pneumoniae*; 2) питательная среда 199, мариты и бактерии *S. aureus*; и 3 группы контрольные: 1) питательная среда 199 и бактерии *K. pneumoniae*; 2) питательная среда 199 и бактерии *S. aureus*; 3) питательная среда 199 и мариты *O. felineus*. В каждой группе, как опытных, так и контрольных, заложили по 10 пробирок в соответствии с 10-тью днями наблюдения.

Ежедневно из пробирок опытных и контрольных групп производили высеивание культур на чашки со средой Левина в двойной повторности из разведения 10^5 по 0,1 мл для определения количества бактериальных клеток. Исследовали общепринятые биохимические свойства культур, факторы патогенности (гемолитическая и желатиназная активность, плазмокуагулаза и фибринолизин, лецитиназа), чувствительность к антибиотикам (пенициллины, цефалоспорины, карбопенемы, тетрациклины). Параллельно изучали физиологические свойства марит и регистрировали количество жизнеспособных и погибших экземпляров. Физиологическое состояние гельминтов оценивали по следующим показателям: жизнеспособность, подвижность, наличие яиц в питательной среде. Жизнеспособность оценивали по двигательной активности при нанесении раздражения препаровальной иглой с использованием стереомикроскопа при увеличении $\times 70$. Нежизнеспособными (погибшими) считали мариты, у которых отмечалось отсутствие двигательной активности и прекращение моторики кишечника. Подвижность определяли по «шевелению» гельминта, вытягиванию и

подниманию передней части тела без перемещения тела, и передвижению по поверхности пробирки, «заползание» на стенки пробирки. Наличие яиц в пробирке с питательной средой определяли микроскопией осадка (центрифугирование содержимого после удаления из пробирки марины в течение 5 мин при 3000 об/мин).

Подсчет количества выделившихся яиц производили нарастающим итогом по времени культивирования гельминтов. С этой целью при небольших количествах яиц (не превышающих 200 яиц в пробирке) производили подсчет в камере Горяева. При больших значениях яйца интенсивно перемешивали в 1,0 мл физиологического раствора, микропипеткой извлекали 0,1 мл взвеси, производили подсчет яиц в этом объеме и затем умножали на 10. Конечный результат учитывали, как общее число яиц в пробирке. Оценку физиологического состояния гельминтов и жизнеспособность бактерий производили в 24 – часовом интервале в течение 10 суток [86].

Статистические методы исследования

Статистическую обработку материала по видовому составу и биологическим свойствам микрофлоры кишечника осуществляли в компьютерной оболочке Windows с помощью процессора электронных таблиц Microsoft Office Excel 2003 и программы «Биостат» с вычислением показателей: средней арифметической (M), средней ошибки средней величины (m), коэффициента корреляции (r). Биологические свойства были подвергнуты статистической обработке непараметрическим методом с применением критерия Манна-Уитни и параметрическим методом с применением t-критерия Стьюдента. Разница между сравниваемыми величинами считалась достоверной при значении $p < 0,05$. Для установления связи между параметрами использовали метод ранговой корреляции по Спирмену [55].

Результаты статистически обработаны с использованием методов вариационной статистики в программах Biostat, Microsoft Office Excel, SPSS Statistics 17.0.

Кластерный анализ биологических свойств микросимбионтов – с использованием стандартной программы «Maldi BioTyper 3,0»

Личное участие автора в получении результатов

Личный вклад автора состоит в участии во всех этапах выполнения диссертационной работы: в определении и формулировании цели и задач, сборе и анализе литературных источников, объеме и методов исследования, в проведении основного объема исследований.

Диагноз паразитарной инвазии на основании анамнеза, лабораторных исследований и объективных данных установлен заведующей отделением клиники ФБУН ТНИИКИП Роспотребнадзора к.м.н., старшим научным сотрудником Степановой К. Б. Бактериологические исследования биоматериала и объектов окружающей среды проведены лично автором в бактериологической лаборатории ФБУН ТНИИКИП Роспотребнадзора, часть исследований - совместно с сотрудниками Карпухиной Н. Ф., Ташлановой В. В., Посоюзных О. В., Колотовой О. Н.

Паразитологические исследования на животных проведены лично автором на базе лаборатории эпидемиологического мониторинга природно-очаговых паразитозов ФБУН ТНИИКИП Роспотребнадзора, исследования рыб и моллюсков - совместно с сотрудниками этой лаборатории: д.б.н., главным научным сотрудником Беляевой М. И. и д.б.н., главным научным сотрудником Фаттаховым Р. Г.

Полногеномное секвенирование штаммов *E. coli* и *Acinetobacter baumannii*, депонирование штаммов *E. coli*, *Aeromonas spp.* и *A. baumannii* проводилось на базе отдела коллекционных культур Федерального бюджетного учреждения науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» (ФБУН ГНЦ ПМБ) Роспотребнадзора г. Оболенск совместно с заведующим отделом, к.б.н. Богуном А. Г. и к.б.н., старшим научным сотрудником Кисличкиной А. А.

Автором лично проанализированы все полученные результаты, сформулированы положения, выносимые на защиту, выводы, оформлены заявки на изобретения. Полученные данные обобщены в основных публикациях и докладах на научно-практических конференциях.

Положения, выносимые на защиту

1. Внедрение в организм промежуточного или окончательного хозяина паразитарных агентов вызывает изменение структуры кишечного микробиоценоза, способствующее нарушению функции колонизационной резистентности бактерий (снижение количества нормофлоры и повышение количества условно патогенных бактерий).
2. Наличие комплексов генов вирулентности и O-серотипов штаммов *E. coli*, изолированных от больных паразитарными и воспалительными заболеваниями желудочно-кишечного тракта, свидетельствует о скрытом носительстве патогенного потенциала штаммов.
3. Сочлены микропаразитоценоза (микрораспространители *K. pneumoniae*, *S. aureus* и марины *O. felinus*) при сокультивировании в искусственной среде оказывают взаимовлияние.
4. Бактерии рода *Aeromonas* занимают доминирующее положение в структуре микропаразитоценоза первого и второго промежуточных хозяев *O. felinus*. Обнаружение *Aeromonas spp.* в объектах окружающей среды и клиническом материале от пациентов свидетельствует об их этиологической роли в развитии бактериальной инфекции и необходимости проведения микробиологических исследований водных объектов, рыбной продукции с целью идентификации бактерий рода *Aeromonas*.

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность полученных результатов, представленных в диссертации, обеспечивается достаточным объемом, использованием общепринятых и современных лабораторных методов исследований, корректным анализом и

интерпретацией полученных результатов, статистической обработкой данных. Исследовано 811 микробиоценозов толстой кишки пациентов с паразитарными инвазиями и инфекциями; 248 объектов окружающей среды (вода открытых водоемов, придонный грунт, лечебная грязь); микробиоценоз промежуточных хозяев возбудителя описторхоза изучен у 153 особей. Выделено 1412 штаммов бактерий, изучен состав и свойства персистенции условно-патогенных микросимбионтов, в том числе бактерий рода *Aeromonas*. Применялись следующие методы исследования: классический бактериологический, масс-спектрометрический, молекулярно-генетические (полногеномное и мультилокусное секвенирование, филогенетический анализ), микробиологические методы исследования объектов окружающей среды, экспериментальные исследования на животных, паразитологические (ихтиопаразитологические, малакологические, метод неполного гельминтологического вскрытия млекопитающих и сокультивирования бактерий с маритами гельминта).

Работа выполнена в соответствии с планом научных работ Федерального бюджетного учреждения науки «Тюменский научно-исследовательский институт краевой инфекционной патологии» Роспотребнадзора (тема №060 «Исследование функционирования паразитарной системы описторхоза: микросимбиотические, популяционно-генетические аспекты, особенности при смене хозяев, антропопрессии») на 2016-2020 гг., номер государственной регистрации АААА-А16-116022610096-6 от 26.02.2016 г. Исследования проведены на оборудовании, имеющем сертификаты качества, свидетельства и аттестаты о метрологической поверке.

Апробация диссертации проведена на заседании Ученого совета Федерального бюджетного учреждения науки «Тюменский научно-исследовательский институт краевой инфекционной патологии» Роспотребнадзора (протокол № 1 от 23.01.2020 г).

Основные положения диссертации и материалы исследований доложены на научно-практических конференциях: IX Всероссийском научно-практическом обществе эпидемиологов, микробиологов и паразитологов (Москва, 2007 г.);

Межрегиональной научно-практической конференции, посвященной 85-летию образования государственной санитарно-эпидемиологической службы Российской Федерации (Тюмень, 2007 г.); Всероссийской конференции «Актуальные аспекты паразитарных заболеваний в современный период» (Тюмень, 2008 г.); X съезде Всероссийского научно-практического общества эпидемиологов, микробиологов и паразитологов «Итоги и перспективы обеспечения эпидемиологического благополучия населения Российской Федерации» (Москва, 2012 г.); Межрегиональной научно-практической конференции, посвященной 90-летию образования государственной санитарно-эпидемиологической службы Российской Федерации (Тюмень, 2012 г.); Всероссийской конференции «Актуальные аспекты паразитарных заболеваний в современный период» (Тюмень, 2013 г.); VIII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Молекулярная диагностика - 2014» (Издательство МБА", 2014 г.); Российской научно-практической конференции в связи с 50-летием со дня организации Тюменского научно-исследовательского института краевой инфекционной патологии «Итоги и перспективы изучения проблем инфекционных и паразитарных болезней» (Тюмень, 2015 г.); VII Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора «Современные проблемы эпидемиологии и гигиены» (С-Петербург, 2015 г.); IV национальном конгрессе бактериологов и международном симпозиуме «Микроорганизмы и биосфера «MICROBIOS-2018» (Омск, 2018 г.); Симпозиуме «Профилактическая медицина основа здравоохранения. Актуальные вопросы анализа риска при обеспечении санитарно-эпидемиологического благополучия населения». X юбилейном терапевтическом форуме (Тюмень, 2018 г.); Конгрессе «Человек и лекарство. Урал – 2019». Симпозиуме «Профилактическая медицина – основа здравоохранения. Актуальные вопросы обеспечения санитарно-эпидемиологического благополучия населения» (Тюмень, 2019 г.).

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Структура, свойства и функции микробиоты толстой кишки

Стремительное развитие медицинской микробной экологии, экспериментальной и клинической гнотобиологии и других смежных наук привели к значительному прогрессу в изучении состава и функций нормобиоценозов различных биотопов организма человека, а также причин и следствий микрoэкологических нарушений. В клиническую практику все шире начали внедрять пробиотики – препараты из живых клеток микроорганизмов, оздоравливающих микрофлору человека.

Современное понимание закономерностей взаимодействия организма человека и его нормальной кишечной микрофлоры заставляет рассматривать ее количественные и качественные изменения, прежде всего с позиции адаптации и компенсации в целях восстановления и поддержания оптимального обмена веществ. Именно поэтому микробиоценоз толстого кишечника необходимо рассматривать через взаимодействие в симбиотической системе «организм человека – нормальная микрофлора» в целом [115].

Макроорганизм и населяющая его микрофлора, в том числе флора кишечника, являются сбалансированной экологической системой. Более того, в микробиоценозе существуют коррелятивные связи между отдельными видами бактерий. Качественное или количественное изменение одного из компонентов биоценоза оказывает влияние на всю систему [30].

1.1.1. Физиологическое значение микробиоты для макроорганизма

Организм человека находится в тесном взаимодействии с микробной флорой, колонизирующей ЖКТ. Состояние здоровья человека и резистентность к целому ряду заболеваний зависит во многом от характера кишечной микрофлоры и ее активности. Кишечная микрофлора играет важную роль в тканевом гомеостазе, так как при ферментации непереваренных сложных углеводов образуются компоненты с полезными или вредными для организма человека свойствами. К настоящему времени сложилось представление о том, что

кишечная микрофлора является своеобразным органом, состоящим из разнообразных бактериальных клеток, который выполняет целый ряд функций в организме [4, 179].

Специфика расселения различных микробных популяций по отдельным биотопам макроорганизма коррелирует со сложившимися там условиями для обитания микроорганизмов. Наиболее густо заселенной экосистемой является толстокишечный биотоп, в котором сконцентрировано около 60% микрофлоры человека. Общая численность микроорганизмов, обитающих в различных биотопах человеческого организма, достигает величины порядка 10^{14-15} . Таким образом, число микробных клеток примерно на два порядка превышает численность собственных клеток макроорганизма [180, 192].

В настоящее время изучено распределение различных видов эндосимбионтных бактерий в биотопах толстой кишки. Так, бактерии рода *Bifidobacterium* колонизируют преимущественно слепую, восходящую и нисходящую ободочную кишку, но почти полностью отсутствуют в сигмовидной и прямой. *Lactobacillus spp.* обитают во всех отделах толстого кишечника, кроме прямой; *E. coli* равномерно распределены по всему толстому кишечнику; *Enterococcus spp.* также обнаружены во всех ее отделах, но особенно много их в поперечно-ободочной и прямой кишке. Что касается факультативной и транзитной микрофлоры, то она чаще всего колонизирует нисходящую ободочную и сигмовидную кишку. Следовательно, особенно резкие контрасты в распределении различных видов эндосимбионтной микрофлоры между биотопами не выявлены. Формирование каловых масс происходит на всем протяжении толстого кишечника, поэтому бактерии, обнаруживаемые при посеве фекалий на бактериальные среды, представляют собой интегральное отражение всего многообразия видов микроорганизмов, обитающих в толстом кишечнике, а не только ее дистальных отделов, как полагают некоторые авторы [184, 186].

Анализ видового, численного состава и инфраструктуры микробного ценоза макроорганизма, указывает, что к основным, по своей патогенетической сущности, следует отнести род *Bifidobacterium* и семейство *Bacteroidaceae*.

Облигатных и факультативных анаэробов всегда на порядок больше аэробов, как в «анаэробных органах», так и на кожных покровах. В расселении различных видов бактерий обнаруживается своеобразная «этажность» по вертикали: в непосредственном контакте с эпителием находятся строгие анаэробы (*Bifidobacterium spp.*, *Bacteroidaceae*), далее располагаются факультативные анаэробы, еще выше – аэробы. Микробиота – совокупность живых микроорганизмов (бактерий, вирусов, простейших и др.), содержащихся в организме человека. Ни одна из функций толстого кишечника не может быть реализована без участия ее резидентной флоры [10].

Важнейшая функция микробиоты - трофическая. В физиологии различают дистанционное, просветное, аутолитическое и мембранное пищеварение, осуществляемое собственными ферментами организма, и симбионтное пищеварение, обеспечиваемое микрофлорой. При расщеплении полисахаридов и гликопротеидов внеклеточными гликозидазами микробного происхождения образуются моносахара (глюкоза, галактоза и т.д.), при окислении которых в окружающую среду выделяется в виде тепла не менее 60 % их свободной энергии. Низкомолекулярные метаболиты сахаролитической микрофлоры, в первую очередь летучие жирные кислоты, лактат и другие обладают заметным бактериостатическим эффектом. Они ингибируют рост бактерий родов *Salmonella*, *Shigella*, многих грибов рода *Candida*. В то же время их бактериостатический эффект не распространяется на резидентную микрофлору. Низкомолекулярные метаболиты, блокируя своими адгезинами рецепторы эпителиоцитов, препятствуют адгезии патогенной микрофлоры к эпителию и обладают способностью индуцировать хемотаксис бактерий. Этот эффект, с одной стороны, дает возможность нормальной микрофлоре, не обладающей локомоторным аппаратом (например, бактериям рода *Bacteroides*), но ассоциированной с подвижными видами, заселять свои экологические ниши. С другой стороны, низкомолекулярные метаболиты и некоторые короткие пептиды играют роль репеллентов по отношению к ряду болезнетворных бактерий.

Многие резидентные бактерии имеют специализированные лигандные структуры, обеспечивающие адгезию. Бактериальные колонии и ассоциации укрепляются также за счет ионных, полярных и гидрофобных взаимодействий и оказываются резидентами, проявляя естественный антагонизм к чужеродным агентам. Имеются данные о ключевом участии микрофлоры в обеспечении противовирусной защиты хозяина. Благодаря феномену молекулярной мимикрии и наличию рецепторов, приобретенных от эпителия хозяина, микрофлора приобретает способность перехвата и выведения вирусов, обладающих соответствующими лигандами. Резидентные виды микрофлоры помогают эпителию поддерживать необходимые значения физико-химических параметров гомеостаза.

Микробиота является своего рода хранилищем микробных плазмидных и хромосомных генов и обменивается генетическим материалом с клетками хозяина. Реализуются внутриклеточные взаимодействия преимущественно путем эндоцитоза, фагоцитоза. При внутриклеточных взаимодействиях достигается эффект обмена клеточным материалом. В результате этого микробиота приобретает рецепторы и другие антигены, присущие хозяину и делающие ее «своей» для иммунной системы макроорганизма. Эпителиальные ткани в результате этого обмена приобретают бактериальные антигены.

Системная стимуляция иммунитета – одна из важнейших функций микробиоты. Известно, что у безмикробных лабораторных животных иммунитет не только подавлен, но и происходит инволюция иммунокомпетентных органов.

Микробиота выполняет витаминосинтезирующую функцию (витамины группы В и К), является поставщиком коферментов. Участие в регуляции газового состава кишечника и других полостей организма хозяина осуществляется функционированием метанобразующих бактерий, использующих водород для своего метаболизма. Газы диффундируют в кровоток, образуя нестабильные комплексы с гемоглобином, впоследствии высвобождаются в легких, влияя на регуляцию кислородного обмена. Микробиота принимает участие в детоксикации экзогенных и эндогенных субстратов и метаболитов (аминов, меркаптанов,

фенолов, мутагенных стероидов и др.), с одной стороны, представляя собой массивный сорбент, выводя из организма токсические продукты с кишечным содержимым, с другой стороны, утилизируя их в реакциях метаболизма для своих нужд. Таким образом, взаимоотношения хозяин - микробиота носят сложный характер, реализующийся на метаболическом, регуляторном, внутриклеточном и генетическом уровнях [10].

Учитывая многообразие жизненно важных функций, выполняемых микрофлорой толстой кишки, ее рассматривают в качестве своеобразного «экстракорпорального органа», обеспечивающего многие аспекты жизнедеятельности организма человека. Любые количественные и качественные изменения эубиоза толстой кишки, протекающие с угнетением или исчезновением облигатной микрофлоры и размножением условно-патогенных бактерий, неизбежно отрицательно сказываются на функционировании пищеварительной системы и организма в целом [184, 213].

Б. А. Бердичевский с соавт. [19] выделяют аутофлору кишечного резервуара в самостоятельную систему защиты организма человека, которая в кооперации с другими системами сохранения гомеостаза, обеспечивает эффективный поиск и обновление погибших клеточных структур в рамках микробно-воспалительных реакций.

Эубиоз толстого кишечника человека представляет собой эволюционно (филогенетически) сложившуюся сбалансированную микроэкологическую систему, в которой симбионтная микрофлора находится в состоянии динамического равновесия, формируя микробные ассоциации, занимающие определенную экологическую нишу (биотоп). Эндосимбионтные бактерии, населяющие толстый кишечник, изучены на генетическом и молекулярном уровнях, а их роль в жизнедеятельности организма достаточно полно установлена [136, 231, 272].

Толстая кишка колонизирует огромное количество микроорганизмов, представляющих ее резидентную микрофлору. Общее количество бактерий, населяющих толстый кишечник человека, более чем в 2 раза превышает

количество всех эукариотических клеток в органах и тканях человека, а их биомасса составляет 2,5-3 кг или 5 % от массы тела. Колонизирующие его бактерии являются представителями 17 семейств, 45 родов и 400-500 видов. Некоторые авторы предлагают различать в кишечном микробиоценозе следующие бактерии: 1) сахаролитические (бактерии родов *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Enterococcus*), безусловно, полезные для человека; 2) протеолитические (бактерии родов *Bacteroides*, *Proteus*, *Clostridium*, некоторые штаммы *E. coli*), которые в определенных условиях могут стать потенциально опасными для здоровья человека [184].

В состав микробных ассоциаций толстого кишечника входят 3 группы микроорганизмов: 1) облигатная (индигенная, автохтонная) микрофлора; 2) факультативная (условно патогенная и сапрофитная микрофлора); 3) транзиторная (случайная, остаточная, аллохтонная). Доминирует облигатная микрофлора, представленная «строгими» анаэробами (бактерии родов *Bifidobacterium*, *Eubacterium*, *Bacteroides*) и аэробами (*Lactobacillus*, полноценная *E. coli* и *Enterococcus*). Соотношение между анаэробами и аэробами равно 10:1, и их биомасса различается в 1000 раз. Общее количество анаэробов достигает огромной величины: 10^{13} - 10^{14} , что составляет до 90 % всего количества микроорганизмов. Еще 8 – 10 % приходится на долю облигатных аэробов, а всего облигатная микрофлора составляет 98 – 99 %. Следовательно, на факультативную и транзиторную микрофлору приходится не более 1 – 2 % (энтеропатогенная *E. coli*, *S. aureus*, различные виды родов *Streptococcus*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Clostridium*, *Pseudomonas aeruginosa* и другие, а также дрожжеподобные грибы и грибы рода *Candida*). Другие виды бактерий появляются крайне редко. Поэтому для ориентировочной оценки состояния микробиоценоза толстой кишки (эубиоз или дисбиоз) достаточно установить 15 – 18 из них [184, 221, 244].

Бактерии рода *Bifidobacterium* – анаэробы, наиболее значимые представители облигатных бактерий в кишечнике детей и взрослых. Большая часть популяции рода *Bifidobacterium* располагается в толстой кишке, являясь ее

основной пристеночной и просветной микрофлорой, и присутствуют в кишечнике на протяжении всей жизни человека [110, 125].

Другие представители облигатной микрофлоры гастроинтестинального тракта - *Lactobacillus spp.*, средой обитания которых являются различные отделы ЖКТ, начиная с полости рта и кончая толстой кишкой, где они поддерживают рН на уровне 5,5-5,6. Наряду с *Bifidobacterium spp.* и *Lactobacillus spp.* группу нормальных кислотообразователей, составляют анаэробные пропионобактерии. Снижая рН окружающей среды, пропионобактерии проявляют антагонистические свойства в отношении патогенных и условно патогенных бактерий [1, 83, 95].

К представителям облигатной микрофлоры кишечника также относятся бактерии рода *Escherichia*. Их экологическая ниша в здоровом организме – толстый кишечник и дистальные отделы тонкой кишки. Бактерии *Peptostreptococcus spp.* представляют собой неферментирующие грамположительные анаэробные стрептококки, их эконоша – толстая кишка. *Enterococcus spp.* присутствуют в кишечнике в количестве 10^5 - 10^8 КОЕ/г и в норме не должны превышать общее количество *E. coli*.

Факультативная микрофлора толстой кишки представлена бактериями родов *Bacteroides*, *Peptostreptococcus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Bacillus*, дрожжевыми и дрожжеподобными грибами.

Условно патогенные энтеробактерии включают представителей родов семейства *Enterobacteriaceae*: *Klebsiella*, энтеропатогенная *E. coli*, *Proteus*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Serratia* и другие.

Неферментирующие грамотрицательные палочки чаще всего выявляются как транзитная микрофлора. Бактерии данной группы относятся к свободно живущим и легко попадают в кишечник из окружающей среды.

Микрофлора оказывает влияние на самые разнообразные процессы, совершающиеся в организме. Это влияние можно расценивать как позитивное, так и негативное. Одной из важных позитивных функций микробиоты является обеспечение устойчивости слизистой кишечника к заселению патогенными и УПМ – колонизационная резистентность. Механизмы реализации этой функции:

1) межмикробный антагонизм (продукция органических кислот, перекиси водорода, мурамидазы и других антибиотикоподобных веществ); 2) активация иммунной системы (индукция синтеза иммуноглобулинов, лизоцима, интерферона, про- и противовоспалительных цитокинов); 3) подавление транслокации микроорганизмов из просвета кишечника во внутреннюю среду организма хозяина. Среди позитивных функций микробиоты можно отметить: детоксикационную, антимуtagenную, антиканцерогенную, которые реализуются за счет гидролиза продуктов метаболизма белков, липидов, углеводов, деконъюгации желчных и гидроксирования жирных кислот, инактивации гистамина, ксенобиотиков и проканцерогенов. Кроме того, микробиота выполняет синтетическую функцию – образование аминокислот, короткоцепочечных жирных кислот, витаминов, гормонов, биоактивных аминов и других биологически активных веществ. Пищеварительная функция – усиление активности ферментов, пищеварительной и моторной функции ЖКТ [4, 58].

Негативные функции выполняют в первую очередь УПМ. При определенных условиях они могут стать источником инфекции - колонизировать слизистую с развитием гнойно-септических и других патологических состояний. Вместе с тем, УПМ стимулируют образование медиаторов воспаления протеиназами и токсическими субстанциями за счет увеличения проницаемости клеточных мембран, гипоксии и повреждении тканей, нарушения микроциркуляции и свертываемости крови. Кроме того, к негативным функциям относятся: сенсibiliзирующая – аллергические проявления, мутагенная и канцерогенная – развитие опухолей, а также УПМ выступает в качестве источника генов, ассоциированных с «островками» патогенности и маркерами лекарственной устойчивости, что способствует формированию патогенных клонов путем конъюгации, трансдукции и трансформации [108, 111, 189, 302].

Более подробно изучены функции самой представительной группы микроорганизмов-симбионтов – анаэробной микрофлоры семейств *Lactobacillaceae* и *Bifidobacteriaceae* [150].

Бактерии рода *Lactobacillus* имеют сложный механизм действия. Показан их положительный эффект на иммунитет, выражающийся в повышении числа клеток, секретирующих иммуноглобулины G в слизистой оболочке кишечника, что стимулирует локальное выделение интерферона, облегчает транспорт антигенов в лимфоидную ткань, повышает их уровень в пейеровых бляшках [141, 290, 313]. Есть данные, что *Lactobacillus spp.* способны активировать моноциты / макрофаги с индукцией ФНО-а (фактор некроза опухоли) и ИЛ-12 (интерлейкин), а также НК-клетки (естественные киллеры) периферической крови человека с индукцией ИФ-гамма [27]. Имеются многочисленные сведения о способности лактобацилл к влиянию на систему иммунитета, которое проявляется в стимуляции фагоцитарной активности нейтрофилов, макрофагов. Представители рода *Lactobacillus* стимулируют подавленную иммунную систему и не влияют на иммунную систему, находящуюся в нормальном состоянии [128].

Бактерии рода *Lactobacillus* активно участвуют в колонизационной резистентности, их бактериоцины активны в кислых средах. Высокую антагонистическую активность *Lactobacillus spp.* связывают с выраженной адгезивностью к клеткам кишечного эпителия, что блокирует соответствующие рецепторы для патогенных бактерий. Важную роль в механизмах антимикробной и вирулицидной активности лактобацилл играет их способность к продукции перекиси водорода, обладающего сильным окислительным действием в отношении структуры белковых молекул микроорганизмов. Бактерии рода *Lactobacillus* обладают устойчивостью к действию лизоцима, а некоторые штаммы даже продуцируют лизоцим, что в сочетании с лизоцимом слизистой оболочки кишечника способствует устойчивости последней к действию патогенной микрофлоры [220, 238, 242]. Кроме того, антибактериальная активность *Lactobacillus spp.* связана с выработкой ими в процессе сбраживания углеводов молочной кислоты, спирта. Доказана их роль в связывании и разрушении токсических веществ, образующихся под влиянием бактериальной флоры кишечника, которые обладают мутагенным и канцерогенным действием [7]. Бактерии *Lactobacillus spp.* ингибируют образование канцерогенов и

инактивируют фекальные бактериальные энзимы, конвертирующие проканцерогены, гиалуронидазы, азоредуктазы, нитроредуктазы, глюкозидазы, глюкуронидазы. Известно участие *Lactobacillus spp.* в биотрансформации желчных кислот, стероидных гормонов, щавелевой кислоты и контроле уровня сывороточного холестерина и сахара крови [185].

В настоящее время установлена ведущая роль представителей рода *Bifidobacterium* в обеспечении колонизационной резистентности (предотвращении заселения хозяина посторонними микроорганизмами). Они продуцируют различные антибактериальные субстанции с широким спектром активности, кроме того, выделяя большое количество кислых продуктов, лизоцима, бактериоцитов, спиртов, препятствуют проникновению микробов в верхние отделы желудочно-кишечного тракта и другие внутренние органы. Молочная и уксусная кислоты, продуцируемые *Bifidobacterium spp.*, способствуют усилению процессов всасывания в стенки кишечника ионов кальция, железа, витамина D. Они синтезируют аминокислоты и белки, витамины группы B, K, PP, пантотеновую и фолиевую кислоты, оказывают выраженное иммуностимулирующее действие на систему местного иммунитета кишечника [44, 131, 191, 203, 274].

Выделен белковый спектр S, предотвращающий адгезию энтеротоксигенных штаммов *E. coli* на компонентах гликокаликса клеток кишечника. Кроме того, они продуцируют различные неспецифические стимуляторы иммуногенеза и активаторы фагоцитарной и ферментативной активности. В частности, клеточная стенка *Bifidobacterium spp.* содержит мурамилдипептид, который активирует лимфопролиферативный ответ на B- и T-клеточные мутагены, стимулирует продукцию иммуноглобулинов, ИЛ-1 и ИЛ-2, а также фактора некроза опухоли, усиливающих цитостатическую функцию макрофагов. В последние годы было показано, что *Bifidobacterium spp.* ингибируют процесс локального изменения крипт кишечника, который, в свою очередь, является ранним неопластическим маркером потенциальной малигнизации толстой кишки [7]. Установлено, что исследуемые штаммы родов

Lactobacillus и *Bifidobacterium* проявляли выраженные различия по способности подавлять рост УПМ [90, 202, 266, 309].

Из аэробных микроорганизмов, серьезная роль в микробном биоценозе кишечника принадлежит *E. coli*, которая вырабатывает витамины (В₁, В₂, В₆, В₁₂, К, никотиновую, фолиевую, пантотеновую кислоты), участвуют в обмене холестерина, билирубина, холина, желчных и жирных кислот, опосредованно влияет на всасывание железа и кальция [188]. Они тормозят рост энтеропатогенных штаммов за счет продукции колицинов, инициируют в кишечнике синтез секреторных иммуноглобулинов, принимают участие в витаминобразовании [26].

Таким образом, учитывая важность и многогранность функций микробиоты макроорганизма, а также нарушение ее при различных заболеваниях ЖКТ (как осложнение паразитарных инвазий), необходимо сделать акцент на более детальном изучении микробиоценоза, чувствительности к антимикробным препаратам и бактериофагам УПМ его населяющей. В литературе имеются скудные данные о зависимости клинических проявлений при различных степенях нарушений, а также изменениях микробиоценоза при паразитоценозах, отсутствуют данные о зависимости степени дисбиоза от тяжести течения инвазии. Детальное изучение ассоциаций УПМ и взаимоотношение ее с облигатной флорой толстой кишки при паразитарных инвазиях, позволит инфекционистам решать вопросы диагностики и терапии на этиопатогенетическом уровне.

1.1.2. Этиология нарушений микробиоценоза кишечника

Исходя из того, что микробиоценоз – это биологическая система ассоциативного симбиоза, а для любой живой системы характерны внутренняя целостность, структурность (видовая, пространственная и функциональная), иерархичность, саморегуляция, с помощью которой поддерживается в целом существование системы, Н. Б. Перуновой сформулировано определение микросимбиоценоза. Микросимбиоценоз – единая динамическая система, обладающая выраженной способностью к ауторегуляции и аутостабилизации,

состоящая из многовидовых консорциумов микроорганизмов, образующих симбиотические связи между собой и макроорганизмом с целью создания благоприятных условий для своей жизнедеятельности и оказывающих непосредственное влияние на состояние здоровья организма хозяина [149].

В нашей работе используется термин «микробиоценоз», отражающий структуру микробиоты толстой кишки в норме. Термин «дисбиоз» свидетельствует о нарушениях структуры, количества микробиоты и появлении УПМ или патогенных бактерий в содержимом толстой кишки.

По этиологии дисбиоз толстой кишки может быть следующим: 1) инфекционным (или постинфекционным) – после перенесенных инфекционных заболеваний (особенно кишечных инфекций); 2) медикаментозным (обусловленным приемом различных активных фармакологических средств, прежде всего антибиотиков широкого спектра действия); 3) алиментарным (при несбалансированном, неадекватном питании с дефицитом пищеварительных волокон); 4) радиационным. Дисбиоз развивается при различных соматических заболеваниях, причем не только гастроэнтерологических (язвенный колит, болезнь Крона, диффузный полипоз и распространенный дивертикулез). Исходя из того, что дисбиоз может быть, с одной стороны, спутником любого заболевания, а с другой – выступать в качестве самостоятельного патогенетического фактора его развития, чрезвычайно важно проведение микробиологического обследования больных с различными клиническими проявлениями дисфункции ЖКТ [160, 174, 214, 276, 284].

В литературе данные о роли паразитарной инвазии в развитии дисбиоза очень скудные, при этом паразитарная инвазия не рассматривается как этиологический фактор нарушения микробиоценоза. Имеются сведения о нарушении микробиоценоза кишечника и желчи при остром и хроническом описторхозе [169], при лямблиозе [62].

Т. Ф. Степанова, анализируя публикации о роли микробиоценозов в патогенезе описторхоза, приводит результаты исследования хронической фазы инвазии. Показано, что инфекция играет существенную роль в патогенезе

описторхоза, в частности, в возникновении холецистита и холангита. Впервые экспериментальные исследования кишечного дисбиоза в острой и хронической фазах описторхоза проведенные в Тюменском научно-исследовательском институте краевой инфекционной патологии. Выявлен дисбаланс в микробиоценозе толстой кишки у животных на 40-й день инвазии, который сохранялся до 60-го дня эксперимента [168].

При обследовании репрезентативной группы пациентов с описторхозной инвазией развитие кишечного дисбиоза установлено в 85,6% случаев. Высокий показатель выявления нарушений микробиоценоза отмечен после эффективной антигельминтной терапии. Снижение *Bifidobacterium spp.* зарегистрировано в 38,5% случаев, снижение *E. coli* – в 37,4%. Помимо снижения нормальной микрофлоры автор в 21,1% наблюдал наличие в бакпосеве *Staphylococcus epidermidis*, *S. aureus* и *Klebsiella spp.* [37].

Описторхозная инвазия характеризуется развитием воспалительных и дискинетических проявлений, сопровождающихся изменениями в составе микробиоценоза [169]. Однако отягощающая роль отдельных групп микроорганизмов, их локализация не совсем ясны, хотя это может иметь значение при дегельминтизации и в реабилитации после лечения. С этой целью было изучено распределение микрофлоры в кишечном содержимом при различных клинических формах описторхозной инвазии: в острой фазе – холангит, в хронической – холангиогепатит, холангиохолецистит, ангиохолит, холецистопанкреатит, а также при суперинвазии. В содержимом толстой кишки наблюдается снижение *Bifidobacterium spp.* и *E. coli* на 1-2 порядка и заселение одним и реже двумя видами УПМ. При хронической фазе сохранялись нормальные биоценотические соотношения микрофлоры в 44% случаев. В остальных пробах отмечено снижение нормальной микрофлоры (в основном *Bifidobacterium spp.*) на 2 порядка, а также увеличение условно-патогенных энтеробактерий. Грибы рода *Candida* высевались в 2,2% случаев. На фоне снижения нормальной микрофлоры, иногда вплоть до полного отсутствия

Bifidobacterium spp., активизировались УПМ – представители родов *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus* [165].

Анализ состава микрофлоры различных локусов у пациентов с описторхозом, показал, что наряду с типичными УПМ присутствуют измененные формы - «атипичные штаммы», обладающие некоторыми отклонениями в биологических свойствах, в том числе и факторов патогенности, а также отличающихся резистентностью к антибиотикам. Отмечено, что атипичные штаммы, находящиеся в микробных ассоциациях, сохраняются и персистируют в виде атипичных форм, которые поддерживают патологическое состояние при инвазиях и инфекциях [59, 173].

Показано, что при бактериологическом исследовании содержимого толстой кишки 31,5% пациентов с лямблиозом, наблюдалось изменение микробного пейзажа. В младшей возрастной группе (2-3 лет) изменение микробиоценоза проявлялось у 50% детей, инфицированных *Lambliа intestinalis*. В группах детей 4 - 7 и 8 - 12 лет - 2 степени. У детей 13 - 15 лет частота изменений микробиоценоза кишечника ниже (11,1%) в сравнении с детьми в возрасте 2 - 3 лет (50%) [3, 68].

Косвенным показателем влияния *L.intestinalis* на функцию пищеварительной системы служит состав микробной флоры, который у здорового человека относительно стабилен. При инвазировании детей *L.intestinalis* не отмечается существенных изменений в видовом составе бактериальной флоры. Так, при наличии *L.intestinalis* гемолитические штаммы *E. coli* обнаруживаются даже реже, чем у неинвазированных детей. Бактериологическое исследование позволило выявить связь между количеством колиформных бактерий и обнаружением *L.intestinalis*. Чем меньше была концентрация *E coli*, тем чаще выявлялись *L.intestinalis*. В то же время при снижении количества кишечных бактерий не отмечалось увеличения численности *L.intestinalis* и признаков их усиленного размножения [62].

Высказывается предложение рассматривать изменение биоценоза зева как показатель развития кишечного дисбиоза - появление в зеве *E. coli*, *P. aeruginosa*, а также дрожжеподобных грибов рода *Candida* и *Staphylococcus spp.* в количестве,

превышающем $1g4,0/g$, может служить показателем развития нарушений микробиоценоза толстой кишки [175].

При бактериологическом исследовании содержимого толстой кишки установлено, что кишечные паразитозы угнетают иммунитет, повышая восприимчивость к другим заболеваниям, что подтверждает необходимость учета паразитологических показателей наряду с бактериологическими, при этиологической расшифровке острых кишечных инфекций [151].

Таким образом, изучение кишечного микробиоценоза с учетом роли микрофлоры в патогенезе паразитарных заболеваний необходимо для дальнейшего вскрытия механизмов воздействия симбионтных отношений на организм человека. Под действием симбионтов (паразитов и/или бактерий) в условиях миграции патогенов и токсинов в различные биотопы происходит модификация факторов персистенции и вирулентности микроорганизмов, что требует проведения более глубоких исследований.

Учитывая отягощающее влияние дисбиоза кишечника на течение гельминтоза, считаем актуальной проблему углубленного изучения структуры нормофлоры и УПМ толстой кишки пациентов, страдающих паразитозами.

1.1.2.1. Патотипы и серотипы *Escherichia coli*

Большинство штаммов *E. coli* являются частью нормальной микрофлоры кишечника человека и других млекопитающих. Патогенные виды могут вызывать пищевые отравления, септический шок, менингит и инфекции мочевыводящих путей (ИМП). В отличие от нормальной флоры, патогенные виды *E. coli* продуцируют токсины и другие факторы вирулентности, которые позволяют им персистировать в различных органах и системах [217, 268, 299]. От 70 до 95% ИМП вызываются штаммами *E. coli*. Эти штаммы, часто называемые внекишечной патогенной *E. coli* (ExPEC), обладают специфическими признаками вирулентности, позволяющими им колонизировать мочеполовой тракт [286].

Бактерии *E. coli* классифицируются на основе серологических характеристик и свойств вирулентности [268]. Вызывающие диарею *E. coli*

подразделяется на различные «патотипы» в зависимости от типа заболевания: энтеротоксигенная (ЕТЕС), энтеропатогенная (ЕРЕС), энтероинвазивная (ЕИЕС), энтерогеморрагическая (ЕНЕС), энтероагрегационная (ЕАЕС) и адгезивно-инвазивная (АИЕС) [299].

Штаммы *E. coli* группируются на основе О-антигенов, которые являются компонентами липополисахарида клеточной оболочки. О-антигены - важные факторы вирулентности, мишени врожденной и адаптивной иммунной системы, и играют роль во взаимодействиях хозяина и патогена. Поскольку они обладают антигенной специфичностью, уникальной для каждого штамма, являются биомаркерами для обозначения О-типов и используются для серотипирования *E. coli*. Обозначения О-групп идут от О1 до О185 и 11 ОХ-групп. Следует отметить, что антитела к нескольким О-антигенам перекрестно реагируют с другими О-антигенами и частично с К-антигенами не только *E. coli*, но и других видов *Escherichia* и семейства *Enterobacteriaceae*. Н-антиген является основным компонентом жгутиков, участвующих в движении *E. coli*. Существует 56 идентифицированных Н-антигенов, пронумерованных от Н1 до Н56. В течение многих десятилетий серотипирование О- и Н-антигенов, а в некоторых случаях капсульных (К-антигенов) было единственным способом классификации *E. coli* [211, 212, 268].

Нуклеотиды большого числа нетипируемых штаммов демонстрируют уникальные последовательности, которые нельзя обозначить как любую из установленных О-групп. На основе геносеротипирования могут быть определены О-группы для нетипируемых штаммов, поскольку SNP или мутации в кластерах О-антигена (О-AGC) затрудняют серологическую реакцию, что приводит к их обозначению как несеротипируемых. Секвенирование всего генома штаммов может выявить факторы, ответственные за синтез антигенных доменов О-антигенов. Таким образом, знание последовательностей О-AGC способствует определению биомаркеров, разработке быстрых, точных и надежных молекулярных диагностических систем, которые могут заменить традиционное серотипирование [211]. ЕТЕС является важной причиной диареи во всем мире,

особенно среди детей в возрасте до пяти лет в развивающихся странах, причем O6 является самой распространенной серогруппой [278].

Показано, что продукты животноводства и птицеводства являются важными источниками выделения нетипичных штаммов EPEC, которые могут быть связаны с болезнями человека. Выделенные атипичные EPEC из пищевых продуктов, имели широкий спектр серотипов: O2:H40, O5:H40, у детей с диареей - O8:H-. Большинство этих штаммов несут фактор вирулентности - интимин β [195].

Результаты исследований, указывают, что большинство уropатогенных *E. coli*, изолированных из образцов крови пациентов с уросепсисом, так и без уросепсиса, принадлежат к серотипам: O1, O2, O4, O6, O7, O8, O9, O14, O18, O22, O75 и O83. Наиболее распространенными типами явились O1 (12,2%) и O6 (10,2%) [215] (Таблица 3).

Таблица 3 - Серогруппы *E. coli*, наиболее часто вызывающие поражения у человека [152]

Поражения	Серогруппы	
	O-антиген	H-антиген
Кишечные:		
Энтеротоксигенные	O6, O8, O11, O15, O20, O25, O27, O63, O78, O80, O85, O114, O115, O128ac, O139, O148, O153, O159, O166, O167	H4, H7, H9, H11, H12, H19, H20, H21, H28, H40
Энтеропатогенные	O18, O26, O44, O55, O86, O111ab, O112, O114, O119, O125ac, O127, O128ab, O142, O158	H2, H6, H7, H11, H12, H14, H18
Энтероинвазивные	O28ac, O29, O112ac, O115, O124, O135, O136, O143, O144, O152, O164, O167	
Энтерогеморрагические	O26, O111, O157	H6, H7, H8, H11
Инфекции мочевыводящих путей	O1, O2, O4, O6, O7, O8, O9, O11, O18, O22, O25, O62, O75	
Бактериемии	O1, O2, O4, O6, O7, O8, O9, O11, O18, O22, O25, O75	
Менингиты	O1, O6, O7, O16, O18, O83	

Внекишечные патогенные *E. coli* являются существенной причиной ИМП и бактериемии во многих странах. При идентификации серогрупп из 658 изолятов из мочи и кровотока, определена популяция ExPEC, включающая 62 серогруппы. При этом, серогруппы O25, O6 и O2 доминировали над обоими типами инфекции [208].

ExPEC, вызывающие заболевание у домашней птицы, известное как птичий колибактериоз, являются основной причиной заболеваемости и смертности, связанных с экономическими потерями в птицеводстве во всем мире. Кишечник человека служит резервуаром для ExPEC. Покидая ЖКТ, они диссеминируют в другие части тела (мочевыводящие пути, кровь, легкие). Это приводит к развитию инфекции. Животные (свиньи и крупный рогатый скот), птица и продукты из птицы (яйца), а также домашние животные, могут быть контаминированы ExPEC. Таким образом, эти патогенные микроорганизмы, возможно, приобретены в результате кормления, а зоонозные патогенные микроорганизмы получены посредством контакта с животными. Исследования внебольничных ИМП и вспышек выявили общие источники возбудителей - загрязненные пищевые продукты. Быстрые и точные молекулярные методы исследования крайне необходимы для обнаружения и отслеживания патогенной *E. coli* в пищевых продуктах и у животных. Это важно для эпидемиологических исследований с целью повышения безопасности пищевых продуктов и сохранения здоровья животных и человека, а также для минимизации распространенности вспышек [217].

В отличие от традиционного серотипирования с использованием антисыворотки против различных O- и H-типов *E. coli*, молекулярное серотипирование нацелено на определение специфических генов для O-группы, обнаруженных в кластерах O-антигена, и H-антигена, которые кодируют различные жгутиковые типы. Мультилокусное секвенирование последовательностей (MLST) и секвенирование всего генома (WGS) генерирует уникальный «отпечаток пальца» бактерии, который можно использовать при расследовании вспышек и для определения источника инфекции. Таким образом,

молекулярное серотипирование *E. coli* предлагает альтернативные методы, которые сочетаясь с анализами на специфический ген вирулентности, позволят одновременно определять O- и H-группу, патотип и патогенный потенциал штамма [211].

Дальнейшие исследования в области изучения генов вирулентности штаммов *E. coli*, необходимо направить на разработку диагностических методов, доступных для практических лабораторий. Кроме того, благодаря представленным данным могут быть открыты новые рубежи в определении биомаркеров, понимание роли O-антигенов в патогенезе острых кишечных инфекций неясной этиологии.

1.1.2.2. Гены вирулентности *Escherichia coli*

Для определения микробиологической безопасности объектов окружающей среды необходима экспертиза, проведение которой занимает несколько суток при бактериологическом исследовании. Традиционные методики дают возможность проводить только видовую идентификацию или, в лучшем случае, определять факторы вирулентности патогенных микроорганизмов. Поэтому актуальной задачей становится не только выявление патогенных и условно-патогенных видов микроорганизмов, но и одномоментное определение их болезнетворного потенциала: прежде всего – основных факторов персистенции микроорганизмов по отношению к организму хозяина (сидерофоров, ингибиторов лизоцима и сериновых протеаз), их распространенность и распределение среди штаммов, выделяемых как из окружающей среды, так и из биоматериала обследуемых лиц [70].

Наряду с 200 видами «классических» патогенных бактерий, описано несколько десятков новых патогенных прокариот, главным образом оппортунистических. Патогенность новых возбудителей определяется модификацией их генетических характеристик. Путем горизонтального переноса происходит передача генов факторов вирулентности, локализованных в плазмидах, транспозонах, бактериофагах, «островках патогенности» (ОП) в

составе бактериальных хромосом. Примером «нового» патогена является ЕНЕС, вызывающий геморрагический колит и гемолитический уремический синдром. Такой штамм, описанный в 1982 г., несет Stt-конвертирующий токсин (Shiga-like toxin), плазмиду, содержащую ген другого токсина (гемолизина), а также ген фактора адгезии. Возникновение «новых» патогенов связано с изменениями условий жизни населения Земли.

Современные методы молекулярной биологии позволяют исследовать факторы вирулентности и кодирующие их гены, а также изучать регуляторные механизмы, контролирующие экспрессию генов вирулентности. К факторам вирулентности относят молекулы адгезии, необходимые для прикрепления к клеткам хозяина, токсины, капсулы, липополисахариды, специфические ферменты, обеспечивающие защиту от иммунной системы хозяина. Для многих патогенов характерна коэволюция с организмом-хозяином (совместная эволюция взаимодействия паразит-хозяин). Подобная коэволюция обеспечивает оптимальную регуляцию вирулентности, поскольку избыточная патогенность приводит к гибели организмов-хозяев и, следовательно, гибели паразита. Коэволюция включает эволюцию патогенов, направленную на защиту от иммунитета хозяина. Гены, кодирующие факторы патогенности, часто локализованы в геноме микроорганизмов в виде ОП, это облегчает перенос их с мобильными элементами и при конъюгации. Патогенные микроорганизмы вырабатывают факторы вирулентности, способствующие колонизации организма-хозяина и разрушению его клеток. У бактерий для защиты от деятельности системы комплимента, имеются капсулы или О-антигены (цепи липополисахаридов) [139].

В ходе эволюции и горизонтального переноса генов факторы вирулентности часто организуются в ОП. Возможно наличие нескольких таких структур у одного патогена. В ОП кодируются белки инъектисомы и некоторые другие, которые усиливают вирулентность и отсутствуют у непатогенных видов. Энтеропатогенные *E. coli* обладают генами, которых нет у комменсалистической формы [139].

Гены ОП контролируют синтез различного типа адгезинов, инвазинов, гемолизинов, токсинов (гемолизина, цитотоксического некротизирующего фактора-1 и др.), системы поглощения ионов железа, важных для размножения и жизнедеятельности возбудителя в тканях. Группы этих генов способны к горизонтальному и вертикальному перемещению. При этом встраивание их происходит в строго определенные сайты бактериальной ДНК. Предполагается, что данный механизм изменения патогенности бактерий играет важную роль в формировании патогенных вариантов различных видов бактерий, в том числе эшерихий. Адгезия бактерий на эпителии имеет первостепенное значение в развитии инфекционного процесса [78].

Молекулы адгезии способствуют прикреплению к эукариотическим клеткам, облегчая внедрение в ткани хозяина. Инфицирование начинается с процесса неспецифической агрегации на основе гидрофобного взаимодействия. Факторы прикрепления можно разделить на адгезины фимбрий и нефимбриальные адгезины. Адгезины фимбрий образуют гибкую тонкую нить на конце фимбрий. Адгезины способны распознавать рецепторные молекулы на клетках эукариот, обеспечивая специфичность взаимодействия.

Факторы вирулентности, участвующие в процессе инвазии, получили название инвазинов. Это является обязательным условием жизни облигатных внутриклеточных паразитов, обитающих и размножающихся только внутри клеток хозяина (*Chlamydia*, *Rickettsia*). На первом этапе происходит прикрепление к клетке хозяина, часто путем связывания с рецепторами хозяина, участвующими в передаче сигнала. На втором этапе патогены проникают в клетку, используя сигнальные молекулы, стимулирующие фагоцитоз, после чего происходит открытие кальциевых каналов, мембраны сморщиваются, и происходит поглощение бактерии. Молекулы бактериальной поверхности могут предотвращать связывание бактерий с фагоцитарными клетками и компонентами комплемента. Бактерии, поселяющиеся на слизистых, могут выделять IgA-протеазу, расщепляющую секреторный IgA [139].

К патогенным свойствам микроорганизмов относится и токсичность. Бактериальные токсины делят на 2 основные группы: экзотоксины (АВ-токсины, специфические экзотоксины, мембран-разрушающие токсины, суперантигены) и эндотоксины. Экзотоксины - растворимые, термолабильные белки, чаще продуцируются грамположительными бактериями, их гены могут переноситься плазмидами или профагами. АВ-токсины состоят из 2-х компонентов: ферментная субъединица А и транспортная В. Один из механизмов переноса - проникновение токсической субъединицы А в клетку: В-субъединица создает пору, через которую проникает А-токсин. Токсин, оказывая действие на рибосомы, блокирует синтез белка, что вызывает гибель клетки. Экзотоксин формирует канал в цитоплазматической мембране (цитолизина или гемолизина). Образующийся канал нарушает целостность мембраны, что приводит к лизису и гибели клетки. Эндотоксины грамотрицательных бактерий в составе внешней мембраны имеют липополисахариды, которые могут быть токсичными для хозяина, и определяют антигенную специфичность бактерий. Таким образом, факторы патогенности *E. coli* контролируются не только хромосомными генами клетки-хозяина, но и генами, привносимыми плазмидами или умеренными конвертирующими фагами [139].

Проведенные экспериментальные исследования указывают на то, что сопутствующая микрофлора может оказывать влияние на вирулентность *E. coli*. Показано, что после сокультивирования бактерий с *Blastocystis hominis* различной вирулентности возрастает частота встречаемости генов, определяющих способность к образованию фимбрий S, Р и 1 типа, бактериального адгезина интимина, цитотоксического некротизирующего фактора, продукции энтерогемолизина, α-гемолизина и шигоподобных токсинов, по сравнению с показателями до сокультивирования и в монокультурах. Это свидетельствует об их адаптивном значении в изменившихся условиях и дает представление о механизмах формирования вирулентных вариантов *E. coli*. Однако вклад данных механизмов в формирование новых фенотипических вариантов микроорганизмов остается неизученным [81].

Определения специфичных генов патогенности, характерных для диареогенных форм *E. coli*, проведенные у индигенных изолятов *E. coli*, показало, в первую очередь, наличие маркеров патогенности, обеспечивающих адгезию микроорганизмов на эпителии кишечника: ген *bfp*, контролирующей способность к формированию связывания пилей, и ген *eae*, ответственный за синтез бактериального адгезина интимина. При эубиозе и в условиях нарушения микрoэкологического равновесия в кишечном биоценозе (дефицит лакто- и бифидобактерий, вегетация УПМ) гены патогенности выявлялись в геноме *E. coli* по-разному. Так, при микрoэкологической норме обнаружение *bfp* было в 2 раза ниже, чем при дефиците индигенной и почти в 6 раз ниже, чем при вегетации УПМ ($p < 0,05$). Регистрация гена патогенности *eae* определялась только на фоне микрoэкологического дисбаланса. Детекция генов патогенности, кодирующих способность к токсинообразованию (*eltA*) и к инвазии (*ipaH*), происходит только в условиях дефицита индигенной микрофлоры с одновременным присутствием в биотопе условно-патогенной [73].

Пищевые инфекции, вызываемые штаммами ЕТЕС шига-токсинпродуцирующими - актуальная проблема общественного здравоохранения многих стран мира, включая высокоразвитые: США, Канаду, страны Европейского союза, Японию и др. Начиная с 1990-х гг. заболевания, обусловленные STEC-штаммами, регистрируют и в Российской Федерации. STEC-штаммы часто вызывают обычную водянистую диарею, которая, как правило, заканчивается выздоровлением в течение нескольких дней. При тяжелых формах болезни развивается геморрагическая диарея (геморрагический колит) и ассоциированный с ней гемолитико-уремический синдром. Эффективных методов лечения STEC-инфекций до настоящего времени не предложено; применение антибиотиков не рекомендуется, поскольку их использование повышает риск возникновения ГУС у детей и пожилых пациентов [139].

ЕТЕС является глобальным грамотрицательным патогенным микроорганизмом тонкой кишки, который ежегодно поражает до 200 миллионов человек во всем мире. В результате инфекции, вызванной ЕТЕС, экономический

ущерб ежегодно составляет 100 тыс. фунтов стерлингов. Классические факторы вирулентности ETEC, вызывающие заболевание, содержит в себе термолабильный (LT) и термостабильный (ST) энтеротоксины наряду с фактором колонизации – адгезином. Диарея, вызванная ETEC, является причиной примерно полумиллиона смертей в год, большинство из которых происходит в развивающихся странах [209, 310].

Растущая распространенность *E. coli*, устойчивой к противомикробным препаратам, является серьезной проблемой, требующей новых стратегий профилактики и применения противомикробных препаратов. Бактериоцины, функционально разнообразные токсины, вырабатываемые большинством микробов, изучены на предмет их антимикробного потенциала. Бактериоцины, продуцируемые энтеробактериями, в частности *E. coli*, являются синтезированными рибосомами токсинами, представляющими собой колицины и микроцины. Колицины, как правило, представляют собой крупные белки с высокой молекулярной массой (40–80 кДа), тогда как микроцины представляют собой низкомолекулярные (<10 кДа) (поли) пептиды. Широкий спектр колицинов и микроцинов включает многочисленные цитотоксические механизмы, в том числе: образование пор; разложение предшественников пептидогликана; фосфатазную активность; РНКазную активность (часто направленная на 16S рРНК и специфические тРНК); и ДНКазную активность. Совместный синтез специфического иммунного белка защищает от действия бактериоцина с помощью различных механизмов. Некоторые *E. coli* создают иммунную защиту для получения конкурентного преимущества. Колицины и микроцины внедряются в восприимчивую *E. coli*, используя белки- транспортеры, т. е. системы поглощения железа, диффузию или отток систем в качестве специфических рецепторов [204, 245].

Шига токсины (stxs) - факторы патогенности энтерогеморрагических *E. coli*, которые признаны в качестве главного пищевого патогена, вызывающего тяжелые заболевания. Изучено 96 штаммов разных типов *E. coli*, населяющих кишечный биотоп детей с функциональными нарушениями ЖКТ, на наличие генов,

кодирующих способность к токсинообразованию. Показано, что в геноме *E. coli* с нормальной ферментативной активностью присутствовали оба гена патогенности - stx1 - 24,2 %, stx2 - 9,1 %. Обнаружение этих генов в разных биохимических вариантах *E. coli* позволяет констатировать факт наличия резервуара потенциальной патогенности в ее непатогенных формах.

Острые кишечные инфекции, обусловленные вегетацией шигатоксин-продуцирующих *E. coli* различных серогрупп, включая O157:H7, регистрируются практически повсеместно. Однако, кроме *E. coli* O157:H7, группа шигатоксин-продуцирующих штаммов *E. coli* включает большое количество других серотипов, частота встречаемости и генетическая характеристика которых на территории РФ практически не изучена. При изучении вышеперечисленных факторов вирулентности в исследованной региональной выборке аутоштаммов, показана циркуляция шигатоксин-продуцирующих штаммов *E. coli*, не относящихся к серогруппе O157, а являющихся представителями индигенной микрофлоры, но при этом обладающих набором изученных генов патогенности. Штаммы с наличием исследуемых генов, выявленные при эубиозе кишечной биоты, по всей видимости, способны к персистенции в кишечнике человека без развития патологического процесса, но могут быть потенциальными возбудителями заболеваний [72, 73, 288].

Таким образом, присутствие генов вирулентности в разных биохимических вариантах *E. coli*, как по отдельности, так и в сочетаниях, позволяет констатировать наличие резервуара вирулентности у непатогенных эшерихий, о чем свидетельствует обнаружение этих генетических маркеров. Представленные данные свидетельствуют о необходимости расширения спектра исследований для максимально полного выявления патогенного потенциала микроорганизмов при исследовании микробиоты кишечника у лиц с любой патологией, в том числе паразитозов. Кишечная микрофлора - неотъемлемая часть каждого индивидуума. Необходимо дальнейшее изучение ее функций, состояний, приводящих к нарушению качественного и количественного состава микроорганизмов, заселяющих ЖКТ человека, а также исследование их патогенного потенциала.

1.2. Паразитоценоз и паразитарная система

Паразитология как наука сформировалась в XIX столетии. С этого времени началось изучение жизненных циклов гельминтов (экспериментальная паразитология) [2, 11, 181]. А. А. де Бари ввел в науку понятие «симбиоз» и определил его как продолжающееся тесное совместное существование различных организмов, причем сожительства как мутуалистического, так и антагонистического типа [43].

Большой вклад в исследования взаимодействия патогенных бактерий и их влияния на организм хозяина внесли работы И. И. Мечникова. Им изучены антагонизм паразитов и других симбионтов, синергическое влияние кишечной микрофлоры на кожную, роль гельминтов в качестве агентов, «открывающих ворота» патогенным микроорганизмам в ткани хозяина [25].

В начале XX века в России сформировались крупные научные паразитологические направления по основным теоретическим и прикладным вопросам паразитологии. К. И. Скрябин создал научную гельминтологическую школу, позволившую проводить всесторонние исследования гельминтов и вызываемые ими заболевания (гельминтозы), разрабатывать и проводить профилактические и оздоровительные противогельминтные мероприятия. Паразитизм по К. И. Скрябину – тип биологических взаимоотношений между организмами, когда один из них «паразит» обитает временно или постоянно на поверхности тела или в глубине органов и тканей другого – «хозяина», питаясь за его счет многократно и не оказывая ему взамен никакой услуги [163, 164]. В работе «Симбиоз и паразитизм в природе» он впервые систематизировал типы взаимоотношений организмов в природе: «индифферентный, дружественный или ненавистно-враждебный», акцентируя внимание на паразитизме. Анализ разных типов сожительства организмов, проведенный им, показал, что в чистом виде (извлечение пользы или нанесение вреда) сосуществование их вряд ли возможно. Комбинированные проявления сожительства организмов он предложил выделить в особый тип отношений – симбиопаразитизм [42].

Е. Н. Павловский в своей статье – «Организм как среда обитания» указывает на то, что «хозяин есть не один из компонентов сожительства двух животных организмов – паразита и хозяина, - а та среда, в которой живет и к которой приспособливается паразит». С этой точки зрения паразит может быть определен как – «организм, средой обитания которого является другой живой организм». В дальнейшем Е. Н. Павловский уточнил формулировку сущности паразита. «Паразитами называют животных, которые живут за счет особей другого вида, будучи биологически и экологически тесно связаны с ним в своем жизненном цикле на большем или меньшем его протяжении» [147]. Им же сформулировано понятие «паразитоценоз» как совокупность живых существ и бактериальных организмов, обитающих в организме хозяина. Наиболее важными проявлениями взаимоотношений, возникающих в паразитоценозе, исследователь считал те изменения в численности и вирулентности взаимодействующих видов паразитов, которые могут отразиться на реакции организма инфицированного хозяина [113]. Е. Н. Павловский указывал, что теорию паразитоценозов следует применять не только в клинике для уточнения диагноза и причин индивидуального течения болезни, но при паразитолого-экологическом исследовании путей циркуляции возбудителей болезни в ее очаге [146, 147]. Позднее В. Н. Беклемишевым обоснована самостоятельная дисциплина - медицинская паразитология, с включением общих вопросов и паразитологии рыб.

Наиболее четко экологическое понимание сущности паразитизма было сформулировано В. А. Догелем, который в рамках экологической паразитологии установил зависимость инвазированности животных от условий окружающей среды и физиологического состояния организма хозяев [65]. Организм хозяина, служащий средой обитания (вегетации) для паразита, как отмечает В. Н. Беклемишев, представляет собой автономную систему, существенно отличающуюся от остального внешнего мира. Изучением сущности и роли вреда-пользы паразитизма выдвинуто положение, что в природных сообществах паразитизм необходим как один из важных механизмов саморегуляции их состава и численности, а в антропоценозах - должен быть управляемым [13].

Дальнейшее развитие экологической паразитологии привело к возникновению популяционной паразитологии, в которой взаимоотношения паразита и хозяина рассматриваются на уровне популяций. Паразитизм является наиболее известной и очевидной формой симбиоза. Паразитизм возник как одно из направлений стратегии эволюции органического мира, обеспечивающее усложнение и многообразие форм жизни, или точнее – форм симбиотических отношений [157]. Важно отметить, что паразитизм возможен только при популяционных взаимоотношениях паразита и хозяина, то есть при регулярной смене паразитом одной особи хозяина другой. Эта смена для каждого паразита специфична, пути перехода сформировались в процессе эволюции и отразились на многих свойствах паразита. Л. В. Громашевский связал воедино локализацию возбудителя в организме и механизм его передачи, доказав, что оба эти явления в процессе эволюции развивались параллельно и в совокупности сформировали паразитический вид [193].

Развивая общую концепцию паразитизма, А. П. Маркевич [114] предложил новую дисциплину общепаразитологического уровня – паразитоценологию и определил ее как науку об объективных закономерностях существования экопаразитарных систем, а также популяций свободных стадий паразитов и других симбионтов, входящих в состав конкретного биогеоценоза. Объектом паразитоценологии становятся все системы, компонентами которых являются паразиты, в том числе паразитарные системы и, следовательно, очаги инфекций и инвазий. В задачи паразитоценологии, по его же мнению, входит изучение паразитоценогенных систем, их структуры, причинно-следственных связей, зависимостей и взаимодействия составляющих их компонентов, закономерностей их формирования, функционированию, с целью разработки методов управления ими. А. П. Маркевич определил паразитоценологию как комплексная теоретико-прикладная, медико-, ветеринарно-, фитопатолого-, биоценологическая наука об экопаразитарных системах, которая включает в себя паразитические и условно-патогенные организмы, ассоциации их свободноживущих поколений и гостальную среду, или симбиосферу. В её задачи входит изучение указанных

систем с целью разработки теоретических основ и методов управления ими, а также объединение всех разделов паразитологии.

Для выяснения законов жизни паразитоценозов, их становления, функционирования и развития возникает необходимость изучения сущности паразитоценологических процессов (межвидовые взаимосвязи паразитов, отношения с другими симбионтами, с организмом хозяина, биотическими и абиотическими факторами окружающей среды). Более частными задачами, по мнению А. П. Маркевича, являются изучение зависимости паразитоценоза от окружающей его микрофлоры, антагонизма и синергизма действия возбудителей инфекций и инвазий. Взаимодействие между организмом паразита и его средой (организм хозяина) носит иной характер, чем отношения между свободноживущими организмами и средой. В случае отношений «паразит-хозяин» среда паразита активно воздействует и реагирует на паразита, и это воздействие постоянно и интенсивно [86].

Экологическая сущность паразитизма, в процессе изучения постепенно стала ассоциироваться с патогенным действием на организм хозяина. Подобное понимание доминирует в паразитологии, эпидемиологии и микробиологии. Известно, что один и тот же паразит у одних вызывает патологию, у других – бессимптомную инфекцию (носительство). И. В. Давыдовский, высказывает мысль о том, что развитие болезни связано не только с генетически детерминированными свойствами паразита, но и с состоянием макроорганизма. В более поздних монографиях: Г. П. Сомов, В. Ю. Литвин (1988), О. В. Бухарин, Б. Я. Усвяцов (1996), О. В. Бухарин, В. Ю. Литвин (1997), признавая на словах экологический принцип сущности паразитизма, связывают паразитизм только с его последствием – причинением вреда организму хозяина [193].

1.2.1. Микробиологические аспекты паразитоценологии

Паразитоценологические исследования важны не только для развития биологии, но и для решения фундаментальных задач медицины. Медицинская паразитоценология в целом характеризует взаимовлияния популяций

паразитических организмов на здоровье человека. Н. А. Романенко и И. К. Падченко выделили одну из отраслей паразитоценологии - санитарную паразитоценологию, объектами изучения которой стали комплексы элементов инвазионного и инфекционного начала паразитов. В этом заключается объединяющая роль санитарной паразитоценологии по отношению к санитарной микробиологии и санитарной паразитологии. Санитарная паразитоценология изучает вопросы паразитизма во взаимодействии с внешней средой на биогеоценоотическом и межпопуляционном уровне. Она разрабатывает мероприятия по оздоровлению и охране окружающей среды от загрязнения инфекционно-инвазионным началом комплексов паразитов [100, 101].

Своеобразие биоценозов, формирующихся в различных биотопах, определяется множеством факторов, в том числе биологическими особенностями членов сообщества и характером их взаимоотношений. Исходя из этого, следует, что состояние водоемов и качество воды в них формируется всеми водными организмами: фито-, зоопланктоном, бентосом и микроорганизмами [129].

Симбиотические взаимодействия являются важным аспектом функционирования водных экосистем. Микроорганизмы в природных условиях водоема образуют разнообразные биотические связи практически со всеми живыми существами, причем организм хозяина одновременно может вступать в биологическую связь не с одной клеткой микроорганизма, а с целой гетерогенной популяцией таких клеток или с симбионтами, относящимися к нескольким разным видам [127].

Антропогенная нагрузка на водоемы вследствие нарушения экологической микросистемы может сопровождаться интенсивным развитием патогенных и потенциально-патогенных микроорганизмов. Известна роль воды в качестве фактора передачи в возникновении спорадических случаев и эпидемических вспышек различных заболеваний, что также определяет необходимость микробиологического контроля [50]. Основным микробиологическим показателем антропогенной нагрузки водоема являются бактерии группы кишечной палочки. В этой связи особый интерес представляет группа

микроорганизмов, которые являются факультативными паразитами, способными как к паразитированию в теплокровном организме, так и к сапрофитному существованию в окружающей среде, и поэтому обладают двойственной сапрофитной и паразитической природой [36].

Микрофлора воды открытых водоемов включает микроорганизмы, выделяемые из кишечника человека и животных, среди которых имеются представители нормальной и УПМ, но могут находиться и патогенные — возбудители кишечных инфекций (*Salmonella spp*, *Shigella spp*, *Vibrio spp* и другие). Однако вода не является средой, благоприятной для размножения микроорганизмов, для которых естественные биотопы — организмы человека или животных [71]. Вода - естественная среда обитания разнообразных микроорганизмов: бактерий, простейших, грибов, водорослей, вирусов и различных форм онтогенеза гельминтов. Основной путь самоочищения воды - конкурентная активация сапрофитической микрофлоры, приводящая к быстрому разложению органических веществ и уменьшению численности бактерий, особенно фекального происхождения. Кроме того, участие в этом процессе самих гидробионтов и их ферментов имеет особое значение. В связи с этим, значительные изменения количества биомассы различных видов микроорганизмов в воде водоемов, требуют рассмотрения этих вопросов с медицинской и экологической точек зрения.

1.2.2. Паразитоценотические аспекты при инфекционно-инвазионном процессе

Генетический полиморфизм взаимодействующих популяций создает разнообразие воздействия паразита на хозяина: бактерии – действие факторами патогенности, гельминты – поражение тканей хозяина. Иерархия, как паразитов, так и хозяев образует сложную сеть взаимоотношений, составляющих объект не только биоценологических, но и иммунологических, биохимических, общепатологических и других исследований. Таким образом, симбиозы

рассматриваются не просто в отдельных популяциях, а в популяциях, включенных в сообщества [18]. Проблема изучения симбиоза – одна из важнейших в современной биологической науке. Симбиоз, как форма сосуществования неродственных организмов представляет собой фундаментальное явление, характеризующее состояние живой природы [31].

При заселении биотопов человека между микроорганизмами складываются различные взаимоотношения, которые определяются качественной и количественной характеристикой микробного пейзажа [51]. Популяции микроорганизмов, вступая в сложные взаимоотношения – конкурентные или кооперативные, при заселении различных биотопов макроорганизма формируют специфический «микросимбиоценоз» [41]. Под микросимбиоценозом понимается открытая саморегулирующаяся система, представленная совокупностью популяций микроорганизмов автохтонных и аллохтонных видов, находящихся в сложных взаимосвязях, исход которых определяет гомеостаз хозяина [149].

В концепции ассоциативного симбиоза, включающей три вектора («хозяин – доминант»; «хозяин – ассоциант»; микросимбиоценоз), одним из наименее изученных является микросимбиоценоз, функционирующий как полимикробное сообщество, одновременно взаимодействующее с организмом хозяина, и определяющее, в конечном итоге, его функциональное состояние. Как любая живая система – микросимбиоценоз является как открытой системой, где микросимбионты осуществляют обмен веществ и энергии с окружающей средой, так и самоуправляемой, саморегулирующейся системой, перерабатывающей информацию для поддержания своей структуры и управления процессами метаболизма [133]. Вторжение посторонней (чужеродной) ассоциативной микрофлоры может нарушить гомеостаз хозяина за счет изменения межмикробных взаимоотношений в микросимбиоценозе, что приводит к формированию хронических очагов персистирующей инфекции [43].

Объединение микроорганизмов в систему, называемую микросимбиоценозом, обусловлено наличием системообразующего фактора – совокупности признаков, благодаря которым элементы системы объединяются и

функционируют как единое целое. В данном случае, речь идет о взаимодействии прокариот в организме хозяина. При паразитарной инвазии в макроорганизме элементами паразитарной системы становится микробиота хозяина (доминанты и ассоцианты) [40]. При этом нельзя не учитывать присутствие в организме гельминта и его микробиоту, необходимо рассматривать организм хозяина в целом. В понимании патогенеза инфекционного процесса преобладает положение о моноэтиологичности инфекционных заболеваний [87].

Микропаразитоценоз можно рассматривать как многокомпонентную многоуровневую паразитарную систему с особой структурно-функциональной организацией. Системный подход ориентирует исследователя включать все паразитарные связи в более сложные взаимодействия ассоциаций симбионтов и живой среды, учитывать их численность и включенность хозяев и всех обитателей в структуру и функции соответствующих биоценозов. Использование аспектов системного подхода в изучении микропаразитоценоза дает возможность исследовать его не только в деталях, но и в целом [145]. В. Н. Беклемишев впервые говорит о двух-, трех- и многочленных простых и сложных паразитарных системах, раскрывающих с позиций популяционного и общего системного подхода содержание происходящих в очагах процессах, дающие нить к познанию структуры очагов природно-очаговых болезней [13].

Комплекс биоценологических связей популяций организмов обеспечивает возбудителю смену хозяев в конкретных условиях абиотической среды тем самым, способствует сохранению возбудителя в качестве биологического вида [178]. Оценивая пути становления паразитарной системы, следует использовать взаимодополняющие методы, наиболее полно раскрывающие тенденции процессов, определяющих структуры паразитарных систем и распространение паразитов [21].

Гельминтозы, как правило, хронические заболевания, и поэтому нередко различные инфекции развиваются на фоне инвазионного процесса. К примеру, описторхозная инвазия нередко сочетается с другими инфекционными заболеваниями, что существенно влияет на течение и исход болезни, способствует

формированию бактерионосительства, снижает эффективность вакцинопрофилактики [117, 169]. Возможное взаимодействие микроорганизмов и гельминтов в организме общего хозяина может приводить к отбору микроорганизмов с определенными свойствами, а возможно и к модификации свойств гельминтов. В результате могут формироваться или селекционироваться более вирулентные штаммы возбудителей инфекционных болезней человека [86].

Сложный характер закономерностей паразитоценотических взаимосвязей при смешанной инвазии и инфекции обусловлен непосредственным взаимодействием возбудителей и опосредованным через организм общего хозяина. В понятие «паразитоценоз» включается совокупность организмов, населяющих организм одного хозяина. Вместе с хозяином он определяет уровень и характер отношений – «паразит-хозяин». Течение сочетанных паразитарных и бактериальных инфекций-инвазий, как правило, отягощающее, но совокупность возбудителей болезней не всегда наносит организму больший ущерб, чем каждый из них в отдельности. Между отдельными членами паразитоценоза существуют антагонистические отношения, сдерживающие рост и уменьшающие период существования тех или иных популяций. Чрезвычайно малая разработанность взаимовлияния сочленов паразитоценозов обуславливает необходимость планомерных исследований в этом направлении [148, 170].

В кишечнике хозяина всегда присутствуют в большом количестве различного рода микроорганизмы, чаще симбионты, а иногда и возбудители определенных болезней. Они создают в кишечнике своеобразную среду, которая может благоприятствовать или не благоприятствовать жизнедеятельности гельминтов. Исследованиями W. Stefanski, Z. Przyjalkowski (1964-1966) установлено, что стерильная среда кишечника или *Lactobacillus spp.* задерживают развитие кишечных трихинелл у мышей, в то время как *E. coli*, *Proteus spp.*, *Pseudomonas spp.* благоприятствуют их развитию. Животные гнотобионты вообще слабо или совсем не восприимчивы к гельминтам и другим паразитам. Так, по данным Z. Przyjalkowski (1972) интенсивность инвазии *Hymenolepis nana* у безмикробных мышей через 14 дней после заражения была в 20 раз слабее, чем у

обычных мышей. Отсутствие микробного метаболизма в кишечнике гнотобионтов приводит к нарушению биосинтеза ряда веществ - витаминов, ферментов, гормонов, аминокислот, а также к накоплению продуктов, в обычных условиях, расщепляемых микрофлорой [31].

По данным В. А. Бритова и М. Г. Василина, бактериальные симбионты трихинелл *Staphylococcus spp.* вызывают основной симптомокомплекс болезни при трихинеллезной инвазии. У гельминтов в качестве внутриклеточных симбионтов чаще присутствуют патогенные для хозяина бактерии, которые играют ведущую роль в патогенезе гельминтоза. В литературе этот вопрос освещен крайне слабо. Между тем знания о симбиотических взаимоотношениях бактерий и гельминтов и их роли в системе «хозяин – паразит – среда обитания» дают возможность активно влиять на процессы, происходящие в ней. Обзор некоторых литературных и собственных данных по симбионтам гельминтов позволил авторам утверждать, что симбиоз гельминтов с бактериями – явление постоянное и необходимое. В качестве симбионтов паразитические гельминты животных, как правило, содержат патогенных (для хозяев гельминтов) бактерий. Эти бактерии не причиняют вреда гельминтам и находятся с ними в мутуалистических взаимоотношениях. Симбионты активно участвуют в жизнедеятельности гельминтов как составная необходимая часть организма. Паразитические свойства гельминтов обуславливаются в большей степени именно бактериальными симбионтами. Кроме того, гельминты иногда воспринимают еще и дополнительную микрофлору, патогенную для хозяев гельминтов. Эта дополнительная микрофлора вступает в антагонистические отношения с их постоянными симбионтами. Тем не менее, передача возбудителей инфекционных болезней гельминтами – явление реальное и встречается не редко. Таким образом, изучение симбиоза гельминтов с бактериями и вирусами, в том числе типа паразитических взаимоотношений, сулит возможность разработки методов по биологической регуляции численности гельминтов [32, 47].

Для развития паразитарной системы у хозяев в местах обитания паразита должна быть нормальная симбиотическая микрофлора. Это обуславливает

специфичность паразито-хозяинных взаимоотношений, изучение которых даст возможность регулировать численность паразитоза. Гельминты в качестве внутриклеточных симбионтов содержат бактерии, которые, как правило, патогенны для хозяина гельминтов. Патогенез гельминтозов обусловлен главным образом этими внутриклеточными симбионтами. Гельминты представляют собой источник и фактор передачи возбудителей различных инфекций. С учетом этих положений повысится эффективность проведения профилактических и лечебных мероприятий в здравоохранении и сельском хозяйстве [32].

Изучение процессов поглощения и выживания штаммов *Burkholderia ceracia* в клетках инфузорий *Tetrahymena pyriformis* показало, что микроорганизмы поглощаются клетками простейших в течение 1 часа и могут длительно (более 14 дней) сохранять жизнеспособность внутри их. При этом, обнаружено, что микроорганизмы оказывают токсическое действие на клетки простейших, усиливая процесс образования цист в зависимости от их вирулентности [94].

Проявлениям синергизма между бактериями и зоопаразитами посвящены работы Е. А. Нивина [130], свидетельствующие о провоцирующем действии многих гельминтов, которые повреждая ткани, открывают дорогу для инфекции. Впервые в биоценозах наземных экосистем юга России, в организме шакала выявлен паразитоценоз, состоящий из 7 сочленов (*D. immitis* + *C. freundii* + *P. mirabilis* + *P. vulgaris* + *M. lineatus* + *U. stenocephala* + *Ixodes spp*) и микропаразитоценоз кардиальный из 4 сочленов (*D. immitis* + *C. freundii* + *P. mirabilis* + *P. vulgaris*) [69].

Показано, что на фоне инвазии наиболее яркие изменения в количественном отношении характерны для основной микрофлоры, представленной бифидобактериями, бактериоидами и лактобактериями. Из этого следует, что между основной микрофлорой и гельминтами существуют антагонистические взаимоотношения. Таким образом, гельминтофауна способствует количественному увеличению доли сопутствующей микрофлоры в микробиоценозе кишечника, для этих групп микроорганизмов характерны

синергетические взаимоотношения [82]. С целью создания биологического равновесия в эндо- и экзозоологической системе паразито-хозяинных отношений схемы лечения и профилактики инфекций должны учитывать всех диагностируемых сочленов ассоциации микроорганизмов, участвующих в инфекционном процессе. Лечение должно быть комплексным, направленным на макроорганизм для повышения его резистентности и на микроорганизмы, ослабляя или уничтожая их [99].

При паразитировании *Ascarididae*, *Trichocephalus* и их ассоциаций (микстинвазия) в кишечнике животных регистрируются изменения микробиоценоза. В процессе функционирования паразитарной системы возрастает факультативная микрофлора (бактерии родов *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Clostridium*, *Proteus*, *Candida* и *E. coli*.) при значительном снижении индигенной микрофлоры (*Lactobacillus spp.*, *Bifidobacterium spp.*, *Bacteroides spp.*). Отмеченные изменения состава микробиоценоза при моноинвазии выражены умеренно, а при микстинвазии – резко [74].

По мнению В. М. Апатенко взаимодействие сочленов того или иного ассоцианта имеет большое значение и сказывается на патогенезе. При изучении взаимодействия паразитирующих форм следует учитывать различия в проявлении того или иного действия *in vitro* и в самом организме. Паразитоценология представляет собой интегрированную науку, которая изучает широкий диапазон паразитирующих форм, исходя из единства макроорганизма как среды обитания второго порядка [8].

Раздел теории систем, касающийся связей со средой, способствовал углубленному теоретическому пониманию внутреннего и внешнего в развитии биосистем вообще и паразитарных систем в частности [18]. Поскольку гельминт и хозяин составляют единую, устойчивую, но неравновесную систему, то эволюционный процесс идет по пути установления более тесных связей в этой системе. Закономерности, пути и факторы сопряженной эволюции гельминта и хозяина составляют один из разделов паразитоценологии [84, 109]. Наиболее

существенными среди них являются для паразита – патогенность, а для хозяина – восприимчивость.

Патогенность – видовое свойство возбудителя, определяющее его способность паразитировать в организме специфического хозяина и вызывать у него нарушения нормальных физиологических процессов. Вирулентность возбудителя – характеристика внутривидовой и внутривидовой вариабельности патогенных свойств. Внутривидовая вариабельность возбудителя проявляется не только вирулентностью, но и целым рядом других сопряженных с ней независимых признаков. Восприимчивость – видовое свойство специфического хозяина, определяющее способность особей вида стать средой обитания возбудителя-паразита и ответить на его жизнедеятельность патологическими и иммунологическими реакциями, которые имеют адаптивное значение для организма и возбудителя. Резистентность и иммунитет – характеристики внутривидовой вариабельности хозяина по степени восприимчивости отдельных индивидуумов к заболеванию. Генотипическая и фенотипическая гетерогенность популяций паразита и хозяина – основа эволюционно сформировавшейся саморегуляции паразитарных систем, результат и причина их постоянной изменчивости. Теория саморегуляции паразитарных систем постулирует синхронизированность изменений паразита и хозяина. Механизмы адаптации биологических популяций не могут быть поняты вне связи с общими и особенными чертами их эволюционного формирования [13].

Ухудшение условий среды, каким бы фактором оно не было вызвано, первично приводит к перестройке отношения популяции ко всем другим факторам среды. Становятся понятными взаимообусловленность и взаимосинхронизированность всех процессов в паразитоценозе. Изменение взаимосоответствия в одном участке биоценоза вызывает перераспределение всех его компонентов.

Возможность прокариотических клеток к процессам самоперестройки на уровне клеток прекрасно выявляются при периодическом культивировании. При переходе к стационарному росту происходит изменение всех потоков

информации в микробной клетке: сохранения (замедление роста и повышение выживаемости), перераспределения (активация реципиентной активности в генетическом обмене), внесение (усиление изменчивости) и реализация (изменение спектра генетической активности), в том числе и факторов, связанных с патогенностью.

Популяции микроорганизмов в ходе саморегуляции претерпевают мощные перестройки, многие из которых происходят достаточно быстро. Эти изменения затрагивают многие параметры, определяющие свойства самой популяции: величину и плотность, скорость роста и отмирания и т.д. Все это вовлекает в процесс изменчивости различные молекулярно-генетические механизмы. Важнейшим свойством популяции является ее гетерогенность, определяемая мутационным и рекомбинационным процессами.

Мутационный процесс является основным в поддержании гетерогенности популяций практически любых организмов. В микробных популяциях он остается ведущим механизмом изменения наследственной информации и зависит от многих факторов, в том числе от работы комплексов ферментов, включающих нуклеазы, полимеразы, нуклеотидлигазы и другие.

Таким образом, патогенез паразитарных инвазий сложный и определяется взаимодействием его сочленов в системе «паразит-хозяин». Использование системного подхода в исследовании мира бактерий, паразитов и окружающей их среды позволит обеспечить решение поставленных теоретических и практических задач и проблем паразитоценологии, а кроме того, создаст возможность разработки подходов к управлению микропаразитоценозом.

Будущие успехи и достижения в решении теоретических и прикладных вопросов инфекционно-инвазионной патологии неразрывно связаны с развитием и совершенствованием паразитоценологии. Профилактика паразитозов и инфекций требует новых подходов и решений.

Известно, что гельминты как сочлены биоценозов играют важную роль в экологических системах, и эта роль в достаточной полноте пока не осмыслена. Без глубокого понимания взаимоотношений паразитов (и симбионтов вообще), а

также паразитов, хозяев и окружающей среды наше представление о явлениях паразитизма, патогенности паразитов и защитных реакциях их хозяев будет недостаточным.

1.2.3. *Opisthorchis felineus* – элемент паразитоценоза

Возникновение и становление паразитарной системы при описторхозе осуществлялось, в частности, формированием конкретных адаптивных форм или стадий развития паразита: в организме животных и человека, в моллюске, в рыбе. Для реализации сложившегося жизненного цикла паразита каждому конкретному состоянию его присуща смена биологического хозяина, поэтому механизм передачи в многочисленной паразитарной системе при описторхозе – не однозначное понятие. Оно включает в себя три детерминированных звена (механизма) соответствующих трем конкретным состояниям паразита. Это свидетельствует о необходимости дифференцированного подхода к проблеме борьбы с описторхозом. В приспособлении заразного начала к жизнедеятельности в организме хозяина имеются ограничивающие распространение паразита процессы (плодовитость, длительность пребывания в организме хозяина, партеногенез и другие), которые обеспечивают компенсаторные механизмы на уровне именно ограничивающих факторов. Тем самым поиск и выбор средств и методов планомерной регуляции паразитарных систем становится целенаправленным [99].

Паразитарная система *O. felineus* связана с пойменно-речными биоценозами. В процессе эволюции закрепился определенный круг хозяев, естественный отбор обеспечил свойства устойчивости гельминта на отдельных стадиях развития. Так, в почве пойменных территорий яйца *O. felineus* сохраняют жизнеспособность до 7 – 34 сут., в водоемах – до 1 года. Развитие в моллюсках способствует переживанию личиночных стадий в зимний период. В рыбах метацеркарии сохраняют инвазионную способность около двух лет. Половозрелые гельминты паразитируют в организме животных, в том числе человека, многие годы. Эти свойства гельминта являются существенными для

устойчивости паразитарной системы. В то же время имеется территориальная разобщенность биотопов первого промежуточного хозяина, а комплекс сезонных процессов в пойменно-речной геосистеме обуславливает временную разобщенность мест нереста, нагула, подрастания молоди, зимовок рыбы – второго промежуточного хозяина. Весенне-летние разливы рек вытесняют диких млекопитающих, ограничивают или полностью исключают возможность пребывания человека, домашних животных – окончательных хозяев в пойме. Это сказывается на сочленах паразитарной системы [178].

Гидрорежим пойменно-речных систем с одной стороны обеспечивает территориальную разобщенность, а с другой стороны, ликвидирует изолированность отдельных очагов и приводит к постоянной смене хозяев гельминта. Именно сезонная динамика гидрорежима выступает связующим звеном реализации движущих сил эпизоотического процесса, в основе которых лежат взаимоотношения генотипически и фенотипически неоднородных популяций хозяев и паразита. Следовательно, популяционный подход служит основой при изучении движущих сил и причин устойчивости паразитарной систем [178].

Вместе с тем, комплекс мероприятий по борьбе с описторхозом предполагает использование разрыва цепи развития паразита на стадии личинок (мирацидий – церкарий), которая происходит в моллюсках [20].

Прохождение всего биопланктона, в частности яиц гельминтов, через организм моллюска начинается с деформации яичевой оболочки, а затем включается процесс химической активации железы вылупления и стимуляции двигательной активности мирацидий. Возможно, он нарушается в организме резистентных и гиперинвазированных моллюсков, что отчасти объясняет блокировку выхода мирацидиев [53]. Кроме того, защитные механизмы выступают и как регуляторы численности паразитов в организме хозяина, препятствуя его гиперинвазированию. Таким образом, первые промежуточные хозяева *O. felineus* с включенным механизмом клеточного иммунитета, эффективно осуществляют роль трофического элиминатора яиц [22].

Представляется, что случайность встречи яиц *O. felineus* с моллюском, с одной стороны, и встречи вышедших в воду из моллюска церкарий с рыбой – с другой, привело к выработке в паразитарной системе *O. felineus* такого мощного компенсаторного механизма как партеногенез в организме моллюска. К тому же нужно добавить длительное пребывание в организме моллюска личинок *O. felineus*, плодовитость паразита и длительность пребывания его в организме окончательно хозяина [56, 98, 102].

А. С. Струговой впервые выявлен широкий круг бентосных и планктонных организмов с элиминационной активностью к свободноживущим фазам развития возбудителя описторхоза. Не менее 70% церкарий *O. felineus*, выходящих из инвазированных промежуточных хозяев, элиминируются планктонными и бентосными организмами [172].

Онтогенез гельминтов, происходящий в организме как промежуточных, так и окончательных хозяев - это комплексный процесс, зависящий в значительной мере от структуры микросимбиоценоза (микрופаразитоценоза). Первые исследования в области микрופаразитоценоза (микросимбиоценоза) при описторхозной инвазии проведены в Тюменском научно-исследовательском институте краевой инфекционной патологии под руководством Г. В. Кондинского [85], который исходя из положений теории симбиогенеза, предположил наличие симбионтных микроорганизмов у гельминтов, в том числе у *O. felineus* [86]. Г. В. Кондинский с соавторами исследовали микрофлору марит и метацеркарий *O. felineus* [89], а также взаимовлияние марит и брюшнотифозных бактерий при их совместном культивировании [85, 86]. В дальнейшем изучалось распределение микрофлоры в желчи и кишечном содержимом у больных при различных формах описторхозной инвазии. Т. Ф. Степановой определена роль микрофлоры желчевыводящих путей и кишечника при разных формах инвазионного процесса в острой и хронической фазах в эксперименте и у больных. Поэтому при обследовании больных с паразитозами бактериологические методы были включены в комплекс клинических, биохимических и иммунологических тестов [168, 169].

Данные, полученные В. А. Майером [112] свидетельствовали о том, что гельминты значительно отягощают клиническое течение острой и хронической дизентерии. Аналогичное значение имеют патогенные простейшие, в частности, лямблии. Накопилось много данных о влиянии антибиотикотерапии на нарушение микробиоценоза кишечника и других органов. Круг вопросов, изученных с позиций теории паразитоценозов, обширен. Однако все аспекты проблемы далеко не исчерпаны. Особый интерес к этой проблеме возникает в связи со стремительным развитием молекулярно-генетических исследований микроорганизмов, открывающих возможность проникнуть в самые глубокие механизмы внутривидовых и межвидовых взаимоотношений компонентов паразитоценоза, как между собой, так и с организмом хозяина [170].

Существующие способы воздействия на эпидемический процесс при описторхозе на уровне «социального звена», по-видимому, на сегодняшний день должны расцениваться как малоперспективные. В цикле развития *O. felineus* имеются две стадии, во время прохождения которых, паразит размножается в промежуточном и дефинитивных хозяевах. Эффективность любых антигельминтиков аннулируется повторным заражением в связи с высоким лоймопотенциалом очага. Воздействие же на промежуточного хозяина и уничтожения паразита на стадии мирацидия и церкария дискутируется на протяжении десятков лет [178].

Изысканию мер борьбы с трематодами человека в эксперименте и природных условиях посвящено изучение проблемы описторхоза в Западной Сибири, разрабатываемой Тюменским научно-исследовательским институтом краевой инфекционной патологии. Химические вещества, применяемые для уничтожения моллюсков, не обладают избирательными свойствами на моллюсков – они губительно действуют также на рыб и других животных в водоемах. Поэтому применение химических средств уничтожения битиний возможно только в мелких водоемах, не имеющих хозяйственного значения [35, 67, 102]. Очевидно, следует идти по пути более детального изучения биологии битиний, начиная с эмбриологии и изучения их болезней.

К настоящему времени имеется достаточно сведений по различным аспектам экологии и особенностям инвазированности трематодами основных промежуточных хозяев *O. felineus* – переднежаберных моллюсков рода *Codiella* [21]. Существуют единичные сведения о количестве и распределении некоторых групп бактерий в пищеварительном тракте моллюсков, а также об их способности накапливать в своем кишечнике микроорганизмы, часть из которых являются возбудителями заболеваний животных и человека [187], поэтому изучение микро- и макроэкологических особенностей моллюсков, в частности его микросимбиоза, очень важно. В связи с этим исследования с позиций изучения закономерностей функционирования микропаразитоценоза, на наш взгляд, помогут объяснить патогенетические механизмы воздействия паразита на организм хозяина.

Симбиотические взаимоотношения прокариот и эукариот являются одним из условий существования и развития живых организмов, независимо от уровня их организации. Моделью для изучения механизмов данных взаимоотношений может являться ассоциативный симбиоз моллюсков и бактерий. Исследование микробиоты, населяющей моллюсков, представляет интерес, по меньшей мере, в двух аспектах. Во-первых, в общебиологическом плане, поскольку система «моллюск-микробиота» является удобной моделью для изучения механизмов ассоциативного симбиоза. Во-вторых, в прикладном аспекте, что обусловлено эпидемиологической значимостью водных моллюсков, как потенциальных переносчиков инфекционных заболеваний, а также их причастности к очищению водоемов [187]. Последнее связано с фильтрационной активностью моллюсков, при которой часть микроорганизмов, находящихся в воде и попадающих в организм моллюска, становятся частью его микросимбиоза. Вместе с тем, при возможном попадании в организм моллюска условно-патогенной микрофлоры с выраженными факторами патогенности в условиях ослабленного его иммунного статуса и как следствие нарушений его барьерных функций (нарушение выделения лизоцима в частности), вероятна его колонизация этими бактериями. В настоящее время сведения о микрофлоре моллюсков битинид, о

таксономическом спектре микроорганизмов – ассоциантов гидробионтов малочисленны и не систематизированы [14, 135, 223, 264, 281, 289, 301]. Очевидно, что благодаря фильтрационной активности моллюсков, часть микроорганизмов, находящихся в воде попадают в организм моллюска, становясь частью его микросимбиоза.

Своеобразие биоценозов, формирующихся в различных биотопах, определяется множеством факторов, в том числе биологическими особенностями членов сообщества и характером их взаимоотношений. Исходя из этого, следует, что состояние водоемов и качество воды в них формируется всеми водными организмами: фито-, зоопланктоном, бентосом и микроорганизмами [129]. Моллюски, зараженные личинками *O. felineus*, обнаруживаются преимущественно в водоемах, расположенных в непосредственной близости от населенных пунктов, где человек является основным источником описторхозной инвазии, то есть в антропогенных очагах. В этой связи особый интерес для исследования представляет группа микроорганизмов, которые являются факультативными паразитами, способными как к паразитированию в теплокровном организме, так и сапрофитному существованию в окружающей среде, и поэтому обладают двойственной сапрофитной и паразитической природой [36].

Моллюски-фильтраторы способны поглощать из окружающей среды и накапливать в организме различные, в том числе и патогенные микроорганизмы. Микрофлору среды обитания моллюсков можно разделить на собственную и вносимую. Собственная микробиота обусловлена естественными экологическими условиями среды, а вносимая - сточными и промышленными загрязнениями. Поэтому при расшифровке механизмов ассоциативного симбиоза про- и эукариот важное значение имеет исследование структуры и свойств микроорганизмов, населяющих организм эукариот.

Завоевание такой среды обитания как макроорганизм требует от бактерий наличия способности проникать и распространяться в тканях и межклеточных пространствах, а также иметь орудие защиты от одной из важнейших его реакций

– фагоцитоза. Функции, обеспечивающие проникновение микроорганизмов в организм хозяина, позволяют противостоять его защитным системам, а также вызывать нарушения деятельности физиологически важных систем. Факторы патогенности с инвазивной функцией обеспечивают возбудителю возможность преодолеть слизистые барьеры, соединительно-тканые структуры и распространиться в межклеточном пространстве.

Комплекс биологических свойств, таких как инактивация лизоцима и формирование биопленок, способствует адаптации микроорганизмов к среде обитания и составляет системообразующий фактор микросимбиоза [145]. Показана роль лизоцима как одного из биологических факторов гидробионтов, участвующих в процессах самоочищения водоема от патогенной и условно-патогенной флоры [129]. Вместе с тем, выявлена прямая корреляционная зависимость между уровнем лизоцимной активности макрофитов и численностью антилизоцимных бактерий, что свидетельствует о функционировании системы «лизоцим гидробионтов – антилизоцим бактерий» [176].

Все группы бактерий симбионтов/ассоциантов, выделенные в микробиоценозе моллюсков, играют важную роль в формировании, поддержании и функционировании ассоциативного микропаразитоценоза. Положение симбионта в биоценозе определяется его свойствами, проявленными при взаимодействии с другими сочленами паразитоценоза. Оценка частоты встречаемости и удельного веса симбионтов в сообществе позволяет определить доминантные микросимбионты. Функциональная роль отдельных групп микроорганизмов в биоценозе моллюсков – доминант или ассоциант – свидетельствует о характере их взаимодействия, а также способствует повышению колонизационной резистентности всего биотопа. То есть существуют механизмы, обеспечивающие стабильное существование многокомпонентных симбиотических систем.

Биологическая роль микроорганизмов в таких комплексах недостаточно изучена. Известно, что грамотрицательные бактерии семейства *Vibrionaceae*, которые относятся к УПМ, при соответствующих условиях окружающей среды и

пониженной резистентности организма моллюсков могут вызывать инфекционные заболевания [149]. Показан saniрующий эффект моллюсков в отношении аллохтонной микрофлоры водоемов. Двустворчатых моллюсков используют также для очищения водной среды от избыточного органического вещества и минеральных взвесей, нефтепродуктов, а также ионов тяжелых металлов [223].

Роль моллюсков в биоценологических взаимоотношениях очень велика, так как они являются важнейшими компонентами системы самоочищения рек, прудов и озер. Бактерии играют видную роль в питании двустворок. Через тело моллюска в процессе питания проходит весьма значительное количество воды, при этом подавляющая часть бактерий, взвешенных в ней, остается в теле моллюска [136].

В процессе эволюции как аллохтонная, так и автохтонная микробиота приобрела соответствующие специфические факторы, инактивирующие субстраты, которые выполняют функцию защиты организма хозяина: лизоцим, интерферон. К данным факторам относится и антилизоцимная активность - способность бактерий специфически инактивировать лизоцим хозяина и обеспечить сохранение возбудителя в макроорганизме. Повышение антилизоцимной активности способствует тому, что бактериальная клетка приобретает свойства, направленные на инактивацию механизмов иммунитета организма и, как следствие, увеличению числа возбудителя в микробиоценозе.

Широкое представительство лизоцима как естественного антисептика эукариотических клеток хозяина неизбежно способствовало появлению адаптационных механизмов противодействия у прокариотических организмов за счет продукции специфических (или неспецифических) ингибиторов лизоцима [41]. Спектр адаптационных свойств микроорганизмов, соответствующих многообразию условий сред обитания, обеспечивается комплексом биологических характеристик. Способность инактивировать лизоцим и формировать биопленки считаются наиболее значимыми среди них. Показано, что антилизоцимная активность коррелирует со способностью бактерий к внутриклеточному паразитированию, более выраженному у штаммов с высоким

уровнем этой активности. Антилизозимная активность обнаружена у многих патогенных и условно-патогенных бактерий, чаще у грамотрицательных, среди которых ведущее место принадлежит представителям семейства *Enterobacteriaceae* – *Shigella*, *Salmonella*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Proteus spp.* [24].

Несмотря на достигнутые за последние годы успехи в изучении экологии возбудителей сапрозоонозов, многие их свойства остаются не раскрытыми. С современных позиций без этих знаний не может быть решен ряд вопросов, связанных с экологией возбудителя и закономерностями эпидемического процесса этих инфекций [36], а также и закономерностями функционирования паразитарной системы на уровне взаимодействия ее сочленов, включая микробиоту. Микробиоценоз их практически не исследовался.

Исходя из положений концепции Е. Н. Павловского об организме как среде обитания, методологии паразитоценологии [87, 113] следует полагать наличие симбионтных микроорганизмов у гельминтов, в том числе и у *O. felineus*. В частности показана необходимость жизнедеятельности бактериальных симбионтов для обеспечения жизненного цикла развития гельминта [32].

Из половозрелых марит и метацеркарий описторхов выделена грамположительная кокковая (5 культур) и палочковидная (2 культуры) микрофлора, по типу дыхания, относящаяся к факультативным анаэробам и факультативным аэробам. Анализ результатов этих исследований свидетельствует о том, что каждый гельминтоз представляет собой состояние организма, вызванное специфическим микропаразитоценозом (микросимбиоценозом) [86].

Известно, что *E. coli*, являются антагонистами брюшнотифозных бактерий. Авторы предполагали, что паразитирование *O. felineus* изменяет биологические свойства *E. coli* в сторону снижения их антагонистических свойств по отношению к бактериям *S. typhi*. Результаты исследования показали, что антагонистическая активность *E. coli*, выделенных от хронических брюшнотифозных носителей, была выше, чем у *E. coli*, выделенных от здоровых лиц и лиц, страдающих описторхозом (66 и 56-57% соответственно). Результаты этих исследований не

позволили говорить о патогенетическом влиянии паразитирования *O. felinus* путем угнетения антагонистической активности *E. coli* [88].

Микропаразитоценоз с системной точки зрения можно рассматривать как многокомпонентную многоуровневую паразитарную систему с особой структурно-функциональной организацией. Системный подход ориентирует исследователя включать все паразитарные связи в более сложные взаимодействия ассоциаций симбионтов и живой среды, учитывать их численность и включенность хозяев и всех обитателей в структуру и функции соответствующих биоценозов. Использование аспектов системного подхода в изучении микропаразитоценоза дает возможность исследовать его не только в деталях, но и в целом [147]. Прежде всего, это системно-элементный/системно-комплексный аспект, заключающийся в определении элементов или компонентов, составляющих микропаразитоценоз. Сюда включается исследование видового состава микроорганизмов, гельминтов, хозяев и продуктов жизнедеятельности всех компонентов системы, включая компоненты окружающей среды.

Внутренние связи, взаимодействия и зависимость между компонентами микропаразитоценоза выявляются в системно-структурном аспекте и позволяют получить представление о его внутренней организации. Исследования микропаразитоценоза в этом аспекте выявляет численность популяций и основные характеристики бактерий, гельминтов, продуктов их взаимодействия с организмом хозяина с учетом их места в иерархии системы.

Поскольку элементы системы, объединяются определенными взаимодействиями в структуры, предназначенные для выполнения определенных функций, выделяется системно-функциональный аспект в исследованиях микропаразитоценоза. Среди основных функций этого аспекта, обеспечивающих процессы жизнедеятельности всех элементов системы в динамике: биосинтетические, биоэнергетические, метаболические, генетико-репродуктивные - функции, направленные на сохранение вида.

Безусловно, для функционирования любой системы необходимы определенные ресурсы, обеспечивающие ее существование. Это отражено в

описании системно-ресурсного аспекта микропаразитоценоза. К основным ресурсам микропаразитоценоза можно отнести: генетические, адаптационные, метаболические, а также ресурсы жизнеобеспечения элементов системы и решение определенных функциональных задач. Кроме выполнения функций, структурированные элементы системы, в частности микропаразитоценоза, объединяются в единое целое для выполнения определенных целей, что представляется в системно-целевом аспекте.

Обеспечение целостности и особенности системы находят отражение в системно-интеграционном аспекте, определяющим совокупность качественных свойств системы: чувствительность, резистентность, вирулентность, патогенность.

Системно-коммуникационный аспект, отражающий внешние связи данной системы с другими, в том числе связи с окружающей средой. Сюда входит обмен информацией, веществами, согласование структурных и динамических характеристик микроорганизмов и гельминтов с характеристиками окружающей среды.

Нельзя не учитывать и системно-исторический аспект, позволяющий определить имеющийся научно-практический потенциал по изучению микропаразитоценозов, современное состояние и возможные перспективы развития. Степень сбалансированности паразитарных систем на современном этапе, современные ареалы паразитов и их хозяев, а также состояние очагов паразитозов – это события прошлых геологических эпох. Основные исторические тенденции изменений этих процессов позволяют судить о современной паразитологической ситуации и строить прогнозы ее изменений. Оценивая пути становления паразитарной системы, следует использовать взаимодополняющие методы, наиболее полно раскрывающие тенденции процессов, определяющих структуры паразитарных систем и распространение паразитов [20].

Таким образом, использование системного подхода в познании/исследовании мира бактерий, паразитов и окружающей их среды позволит обеспечить решение поставленных теоретических и практических задач

и проблем дисциплины - паразитоценологии, а кроме того, создаст возможность разработки механизмов управления микропаразитоценозом.

Заключение

При инфекционно-инвазионном процессе, когда прокариоты взаимодействуют с эукариотами, их метаболитами и организмом хозяина, то есть являются сочленами микропаразитоценоза, открытым остается вопрос о микробиоте гельминта и механизмах межмикробных взаимоотношений в организме гельминта, а также его личиночных стадий. Важность и многогранность функций микробиоты макроорганизма указывает на необходимость детального изучения микробиоценоза толстой кишки при инфекционном процессе, это отражает характеристику прокариотов. Не выяснены персистентные свойства микрофлоры, определяющий системообразующий фактор микропаразитоценоза. Недостаточно изучен микробиоценоз при паразитарной инвазии, особенно в части состава этиологически значимых инфекционных агентов, входящих в микропаразитоценоз.

В литературе имеются отдельные данные об изменениях микробиоценоза при различных паразитоценозах. Детальное изучение ассоциаций УПМ и взаимоотношение ее с облигатной флорой кишечника при паразитарных инвазиях, позволит решать вопросы терапии и дегельминтизации на этиопатогенетическом уровне.

Накопленные материалы свидетельствуют о необходимости углубленного изучения внутривидового разнообразия *E. coli*, определения факторов патогенности или их генетических детерминант, наряду с серотипированием, с целью окончательной идентификации эшерихий как возбудителей различных инфекционных заболеваний и осложнений при паразитарных инвазиях.

РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ
ГЛАВА 2. ВИДОВОЙ СОСТАВ И СТРУКТУРА МИКРОБИОЦЕНОЗА
ТОЛСТОЙ КИШКИ ПРИ ПАРАЗИТАРНЫХ ИНВАЗИЯХ

Гельминтозы способствуют возникновению инфекционных заболеваний, отягощают течение болезни и ее исход у инвазированных лиц посредством ряда патогенетических факторов, связанных с микробиотой [15, 28, 158, 161, 167, 171]. К этим факторам относятся: 1) изменение состава кишечной микрофлоры, что приводит к снижению ее антагонистической активности по отношению к возбудителям кишечных и других инфекций; 2) способность мигрирующих личинок гельминтов инокулировать патогенную микрофлору в ткани человека, служит благоприятной средой для размножения бактерий; 3) повреждающее действие половозрелых гельминтов на слизистую оболочку кишки способствует проникновению в ткани хозяина патогенной микрофлоры; 4) снижение кислотности желудочного сока облегчает проникновение некоторых патогенных возбудителей [132]. Таким образом, патогенез паразитарных инвазий сложный и определяется взаимодействием микро и макроорганизма в системе «паразит-хозяин» [16].

Учитывая отягощающее влияние кишечного микробиоценоза на течение гельминтоза, проведено изучение структуры нормофлоры и УПМ в содержимом толстой кишки пациентов с паразитарными инвазиями. Исследуемые паразитозы, количество пациентов в группах и их средний возраст указаны в таблице 4.

Таблица 4 - Количество пациентов с паразитозами и их средний возраст

Инвазия	Количество больных		Средний возраст
	абс. число	% ± m	
Описторхоз	275	33,91 ± 4,9	31
Лямблиоз	302	37,24 ± 4,56	14,9
Токсоплазмоз	136	16,77 ± 7,82	33,9
Токсокароз	59	7,27 ± 12,54	28,9
ИКБ	39	4,81 ± 15,62	31,0
Всего	811		27,9

Среди 275 пациентов с описторхозом, проживающих в г. Тюмени – 159 человек, 116 – жители гиперэндемичных по описторхозу территорий Тюменской области Ханты – Мансийского автономного округа (п. Талицкий 48 человек и 68 - п. Междуреченский). Оба поселка расположены на территории Обь-Иртышского водного бассейна. Поселок Талицкий территориально относится к Октябрьскому району и расположен вдали от левого берега Оби. Поселок городского типа Междуреченский является административным центром Кондинского района и расположен на правом берегу реки Конды.

2.1. Характеристика микробиоценоза при описторхозе

Исследована структура кишечного микробиоценоза 159 пациентов с диагнозом описторхоз, проживающих в городе Тюмени в возрасте от 4 до 59 лет. Характеризуя состав нормофлоры толстой кишки отмечено, что при описторхозной инвазии выражен дефицит бактерий рода *Bifidobacterium* – у $72,3 \pm 4,3\%$ пациентов. Дефицит бактерий рода *Lactobacillus* определен у $67,6 \pm 4,7\%$ обследованных. Содержание бактерий рода *Enterococcus* ниже нормы зарегистрировано у $30,4 \pm 6,9\%$, *E. coli* с нормальной ферментативной активностью – у $31,1 \pm 6,8\%$ пациентов с описторхозом. Таким образом, среди представителей нормофлоры, чаще всего отмечается дефицит бактерий родов *Bifidobacterium*, затем, *Lactobacillus*, в меньшей степени выражен дефицит *Enterococcus spp.* и *E. coli*. На фоне снижения содержания ниже нормы *E. coli* с нормальной ферментативной активностью выделение *E. coli* (Lac-) и *E. coli* (Gem+) отмечается у $16,9 \pm 3,1\%$ и $16,2 \pm 3,0\%$ пациентов соответственно.

Высеваемость других представителей семейства *Enterobacteriaceae* составила $35,14 \pm 6,6\%$. Чаще идентифицировались бактерии родов *Klebsiella* – в $19,6 \pm 7,4\%$ случаев, *Enterobacter* – около 7%. Бактерии родов *Citrobacter*, *Proteus*, *Providencia* и *Morganella* определялись в единичных случаях. Кроме того, бактерии *S. aureus* высевались в $15,5 \pm 7,5\%$, грибы рода *Candida* в $8,1 \pm 7,8\%$ случаев. Частота обнаружения бактерий *Clostridium spp.* и неферментирующих грамотрицательных бактерий (НГОБ) была невысока, не более 5%.

Микробиологические нарушения II и III степени отмечены в $65,5 \pm 3,9\%$ случаев. Эти изменения характеризовались повышенным содержанием УПМ до концентрации $10^5 - 10^7$ или обнаружением ассоциаций в концентрации до 10^7 и выше КОЕ/г. Отмеченные результаты можно объяснить большим содержанием в ТК бактерий рода *Klebsiella* и других представителей семейства *Enterobacteriaceae* – *Enterobacter spp.* и *Citrobacter spp.*, а также ассоциациями грамотрицательных бактерий, *S. aureus* и грибами рода *Candida*.

Паразитарная инвазия, в частности описторхоз, не всегда протекает в чистом виде. У пациентов, инвазированных описторхозом микст-инвазии выявились в 26,35% случаев (Рисунок 1). Описторхоз чаще сочетается с токсоплазмозом и ИКБ.

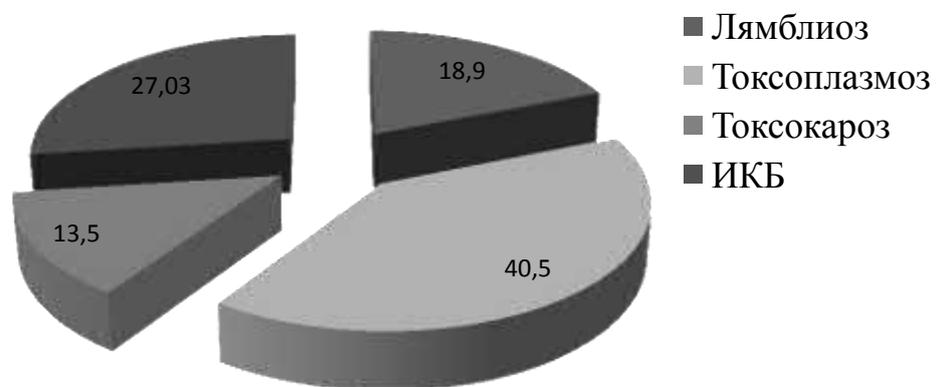


Рисунок 1 - Удельный вес микст-инвазий у пациентов с описторхозом (%)

При проведении сравнительного анализа микробиоты пациентов с описторхозом из г. Тюмени (159 человек) и проживающих в гиперэндемичных районах Тюменской области (116), было установлено, что наибольшие изменения в составе микрофлоры толстой кишки приходятся на автохтонную (индигенную) микрофлору – бактерии родов *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Enterococcus* и *E. coli* (Рисунок 2).

В среднем, более чем у 50% пациентов с описторхозом в содержимом толстой кишки отмечается дефицит бактерий родов *Bifidobacterium* и *Lactobacillus*; *Enterococcus spp.* и *E. coli* - у 32% пациентов.

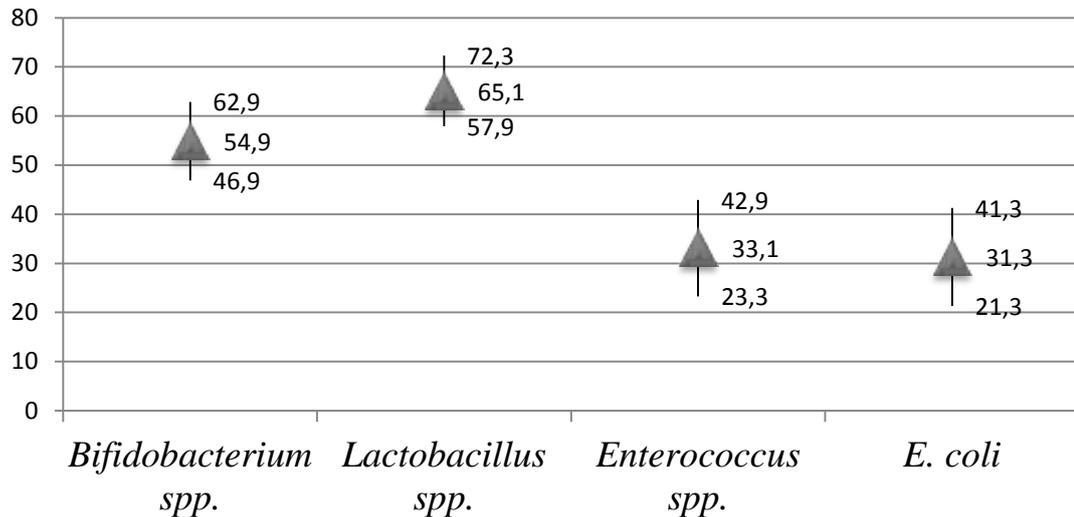


Рисунок 2 - Характеристика дефицита нормофлоры толстой кишки (%) при описторхозе у пациентов, проживающих в г. Тюмени и гиперэндемичных районах Тюменской области

Сравнительная характеристика дефицита индигенной микрофлоры толстой кишки пациентов с описторхозом, проживающих в г. Тюмени и в гиперэндемичных районах показала (Рисунок 3), что статистически значимые различия ($p < 0,001$) регистрируются только по *Bifidobacterium spp.* Дефицит их чаще встречался у пациентов, жителей г. Тюмени и составил $77,44 \pm 3,6\%$ случаев. Вместе с тем, у жителей гиперэндемичных районов в среднем этот показатель – $32,35 \pm 4,4\%$.

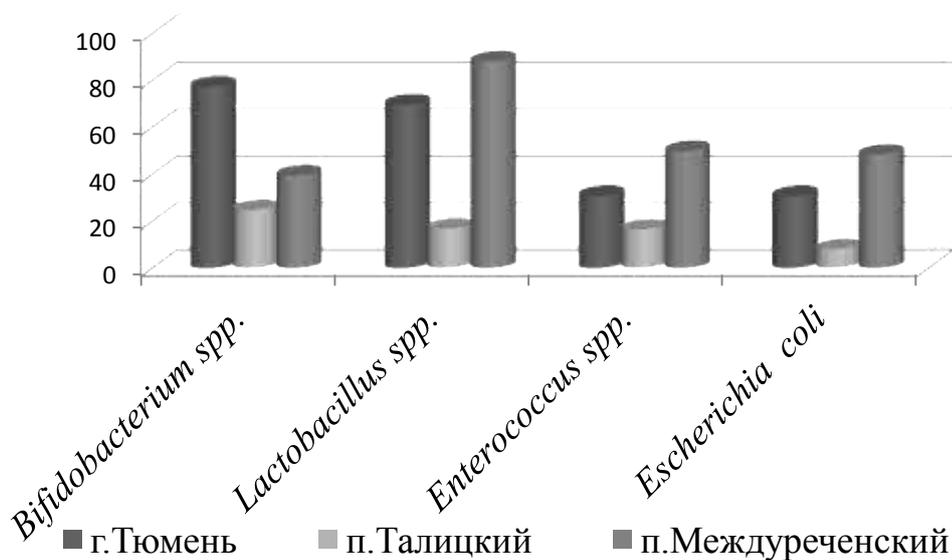


Рисунок 3 - Показатели нормофлоры толстой кишки пациентов при описторхозе (%), проживающих в г. Тюмени и гиперэндемичных районах

Дефицит *Lactobacillus spp.* регистрировался у 88,7% пациентов, проживающих в п. Междуреченский. Отмечаются статистически значимые различия при сравнении показателей содержания *Lactobacillus spp.* у жителей г. Тюмени и лиц из гиперэндемичных районов ($p < 0,001$). Аналогичные тенденции сохраняются по содержанию *Enterococcus spp.* и *E. coli*: выраженный дефицит у жителей п. Междуреченский и незначительное снижение у проживающих, в п. Талинский, различия также статистически значимы ($p < 0,02$).

E. coli (Lac-) и *E. coli* (Gem+) выделялись в 14% случаев, статистически значимые различия в сравниваемых группах выявлены только по *E. coli* (Gem+), которые не были обнаружены у пациентов, проживающих в п. Талинском.

Среди различных родов семейства *Enterobacteriaceae* наиболее часто идентифицировались бактерии рода *Klebsiella* – *K. pneumoniae* и *K. oxytoca*. Статистически значимые различия выявлены при сравнении количества этих бактерий в содержимом ТК жителей г. Тюмени и п. Междуреченского по *K. pneumoniae* ($p < 0,02$) и п. Талинского по *K. oxytoca* ($p < 0,001$). Обнаружено, что содержание бактерий *Enterobacter cloacae* у жителей г. Тюмени достоверно выше в сравнении с инвазированными из гиперэндемичных районов ($p < 0,05$) и, в частности, с жителями п. Талинский ($p < 0,001$). Структура УПМ приведена в таблице 5.

Таблица 5 - Структура бактерий семейства *Enterobacteriaceae*, выделенных из толстой кишки инвазированных возбудителем описторхоза жителей г. Тюмени и гиперэндемичных районов

Роды <i>Enterobacteriaceae</i>	г. Тюмень		п. Междуреченский		п. Талинский	
	абс.	%±m	абс.	%±m	абс.	%±m
<i>Klebsiella spp.</i>	31	19,5±3,14	7	10,29±3,69	4	8,33±3,99
<i>Enterobacter spp.</i>	13	8,18±2,17	6	12,5±4,77	0	-
<i>Citrobacter spp.</i>	6	3,77±1,51	3	4,41±2,49	0	-
<i>Proteus spp.</i>	3	1,89±1,08	2	2,94±2,05	0	-
<i>Morganella spp.</i>	2	1,26±0,88	1	1,47±1,46	0	-
<i>Providencia spp.</i>	2	1,26±0,88	0	-	0	-
<i>Hafnia alvei</i>	0	0	0	0	4	8,33±3,99

Неферментирующие грамотрицательные бактерии были представлены бактериями родов *Acinetobacter* (*A. lwoffii*, *A. baumannii*) у жителей г. Тюмени; *Pseudomonas* (*P. aeruginosa*, *P. alcaligenes*, *P. pseudoalcaligenes*) в п. Талинском. У обследованных жителей п. Междуреченский с описторхозной инвазией НГОБ в содержимом толстой кишки не были обнаружены.

Количество *S. aureus* в содержимом толстой кишки жителей г. Тюмени составляло $15,72 \pm 2,89\%$, п. Междуреченский - $11,76 \pm 3,91\%$ и $10,4 \pm 4,41\%$ у жителей п. Талинского. Выделение грибов рода *Candida* и *Clostridium spp.* было незначительно – от 4 до 10% случаев по сравниваемым населенным пунктам, статистически значимых различий не выявлено.

Известно, что стабильность кишечного микробиоценоза у здорового человека поддерживается с участием ряда механизмов. К ведущим факторам хозяина, лимитирующим бактериальный рост, относятся соляная кислота и кишечная моторика, объем десквамированного кишечного эпителия, целостность слизистой оболочки, секреция слизи, пищеварительных ферментов, иммуноглобулинов, особенно секреторного Ig A. Вместе с тем, присутствие *Bifidobacterium spp.* и *Lactobacillus spp.*, обладающих высокой антагонистической активностью в отношении патогенных бактерий и оказывающих иммуностимулирующее действие, препятствует размножению патогенной микрофлоры толстого кишечника [5, 6, 7, 8, 179, 190]. Серьезная роль в микробном биоценозе толстой кишки принадлежит также *E. coli* (Gem-), которая вырабатывает витамины B₁, B₂, B₆, B₁₂, K, никотиновую, фолиевую, пантотеновую кислоты, участвует в обмене холестерина, билирубина, холина, желчных и жирных кислот, опосредовано влияет на всасывание железа и кальция [188], поэтому дефицит ее имеет нежелательные последствия.

На базе Тюменского научно-исследовательского института краевой инфекционной патологии, начиная с 1989 г. проводились экспериментальные исследования кишечного микробиоценоза в острой и хронической стадиях описторхозной инвазии [171]. Полученные результаты исследования микробиоценоза толстой кишки при описторхозной инвазии жителей г. Тюмени и

гиперэндемичных районов также свидетельствовали о нарушениях, выражающиеся дефицитом основных представителей индигенной микробиоты, и как следствие – появление УПМ. Вместе с тем, дефицит нормофлоры может быть связан как с инвазией, так и с особенностями микрофлоры у жителей Севера [159].

Более выраженные изменения в составе микробиоценоза толстой кишки регистрируются у жителей п. Междуреченский, страдающих описторхозом: в 88% случаев отмечается дефицит *Lactobacillus spp.*, в 50% случаев – *Enterococcus spp.* и *E. coli* с нормальной ферментативной активностью. Вместе с тем, у пациентов с описторхозом, проживающих в п. Талинском, отмечается незначительное снижение исследуемой нормофлоры и как следствие - низкая высеваемость условно-патогенных энтеробактерий. Выделялись только такие представители энтеробактерий как *K. pneumoniae* и *Hafnia alvei*. Незначительные нарушения микробиоценоза толстой кишки при описторхозе у жителей этого поселка можно объяснить тем, что они получают своевременную качественную медицинскую помощь, и непродолжительность инвазии способствовала сокращению осложнений со стороны ЖКТ.

В патогенезе описторхоза важным звеном является оказание механического, токсического и аллергического воздействия гельминтов и их метаболитов на организм человека [33, 34, 60, 76, 143]. Поступающие в организм хозяина продукты жизнедеятельности *O. felineus* и продукты распада погибших гельминтов, являются, по сути, антигенами и вызывают сенсibilизацию организма [45, 46, 138]. Нарушаются моторная и секреторная функции ЖКТ, процессы полостного и пристеночного пищеварения. Возникает симптомокомплекс проявлений паразитоценоза, отражающий нарушение барьерной функции кишечника в связи с воспалением. Что и приводит, на наш взгляд, к изменениям микробиоценоза кишечника.

Таким образом, при описторхозной инвазии нарушается микробиоценоз толстой кишки, но утверждать, что у жителей гиперэндемичных по описторхозу районов данные нарушения более выражены, не представляется возможным. Так,

у жителей г. Тюмени с диагнозом описторхоз, отмечаются существенные нарушения микробиоценоза, проявляющиеся дефицитом бактерий рода *Bifidobacterium*. Можно предположить, что процесс формирования дисбиоза при паразитарных инвазиях многофакторный, на который сказывается своевременность и качество оказания медицинской помощи, длительность инвазии и частота употребления в пищу необеззараженной рыбы. Кроме того, существенное влияние оказывает и наличие сопутствующих заболеваний ЖКТ воспалительного характера. В следствии чего, при разработке тактики лечения пациентов с описторхозом необходимо брать во внимание результаты исследования кишечного микробиоценоза.

2.2. Характеристика микробиоценоза при лямблиозе

Основная зона обитания возбудителей лямблиоза *Lamblia intestinalis* в организме человека – проксимальные отделы тонкой кишки. Фиксируясь на поверхности энтероцитов, они получают питательные вещества, находящиеся в просвете кишки, и даже из пространства между ворсинками щеточной каймы. Патологическое воздействие *L. intestinalis* на макроорганизм является многоплановым. С одной стороны, они закрывают всасывательную поверхность тонкой кишки и перехватывают поступающие питательные вещества, что является причиной нарушения питания организма хозяина. С другой стороны, *L. intestinalis* вызывают механическое и токсическое повреждение эпителия на слизистую кишечника. Нарушение кишечного всасывания расстраивает процессы переваривания и состояние микробиоценоза ЖКТ. Действие токсинов приводит к нарушению барьерных функций и повышению проницаемости кишечной стенки, в результате чего в организм поступают токсические вещества из просвета кишки, обуславливая выраженное действие на макроорганизм [250]. Таким образом, развивается интоксикация и создается благоприятный фон для аллергических состояний [92, 105, 142, 182].

Клиническая симптоматика лямблиоза складывается из нескольких симптомокомплексов, главным из которых является гастроэнтеральный. В связи с

тем, что *L. intestinalis* паразитируют в кишечнике человека, основные клинические симптомы лямблиоза диагностируются со стороны ЖКТ: диарея, метеоризм, боли в животе, тошнота, рвота, снижение аппетита [2, 93, 106, 137]. Аналогичные симптомы отмечаются и при нарушении микробиоценоза. Поскольку лямблиоз утяжеляет течение заболеваний пищеварительной системы, нарушается основная функция нормальной микрофлоры кишечника - участие в процессах пищеварения. Жизнедеятельность *L. intestinalis* в тонкой кишке находится в прямой зависимости от состояния пищеварительной системы. Богатая углеводами диета способствует не только резкому увеличению их количества [2, 5], но и размножению УПМ [279, 306].

Проведено исследование микробиоценоза содержимого толстой кишки 302 пациентов с установленной лямблиозной инвазией в возрасте от 1 года до 60 лет. Средний возраст пациентов, включенных в исследование, составил 14,9 лет. Количество детей до 14 лет составило 65,56%, в том числе дети до 7 лет - 47,02%. Поскольку клиническое течение лямблиоза в различных возрастных группах имеет определенные характеристики [12], микробиоценоз толстой кишки был исследован с учетом возрастных особенностей. Все пациенты были распределены на 5 групп: I - 1 – 3 года, II - 4 - 7 лет, III - 8 - 14 лет, IV - 15 - 30 лет и V - от 31 года до 60 лет. Средний возраст и количество инвазированных пациентов в возрастных группах представлены в таблице 6.

Таблица 6 – Распределение пациентов с лямблиозной инвазии в возрастных группах

Группа	I		II		III		IV		V	
	абс.	%	абс.	%	абс.	%	абс	%	абс	%
Количество пациентов	58	19,2	84	27,8	56	18,5	50	16,56	54	17,88
Средний возраст	2,3		5,3		10,4		23,9		41,7	

В составе нормофлоры толстой кишки детей и взрослых при лямблиозной тнвазии отмечается более выраженный дефицит бактерий рода *Lactobacillus* от $68,52 \pm 3,1\%$ до $80,95 \pm 2,6\%$ (Рисунок 4). Статистически значимых различий по указанному показателю в различных возрастных группах не выявлено.

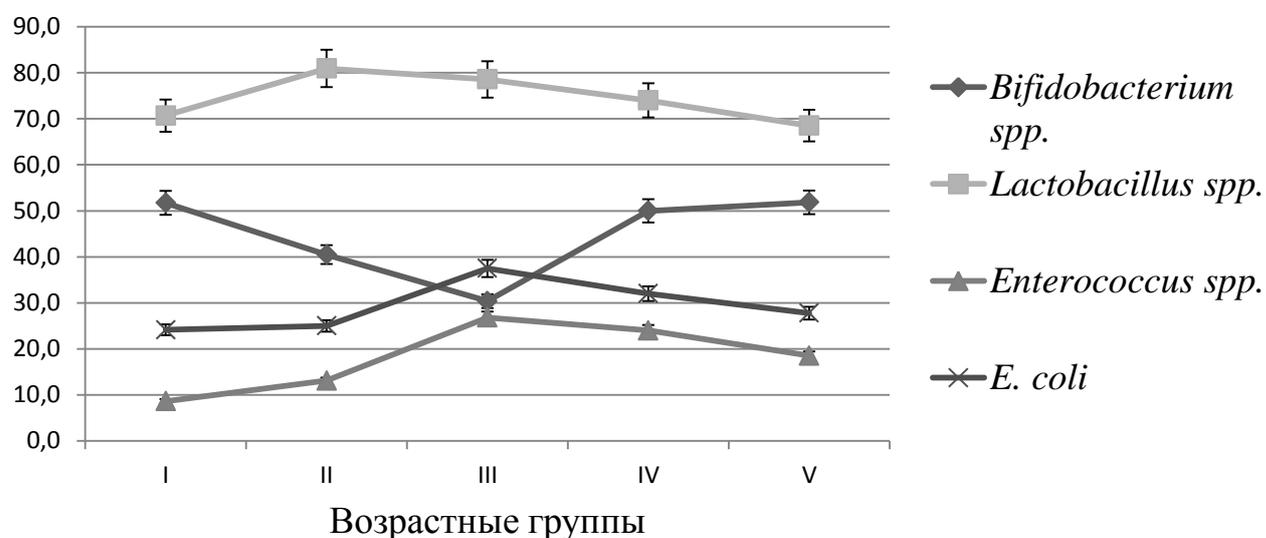


Рисунок 4 - Характеристика дефицита некоторых представителей нормофлоры толстой кишки у пациентов с лямблиозом

Недостаточное количество бактерий рода *Bifidobacterium* отмечается у детей до 3-х лет и взрослых (I и V возрастные группы), а наименьший показатель регистрируется в III возрастной группе, при этом, различия статистически достоверны, $p < 0,02$. Дефицит *E. coli* с нормальной ферментативной активностью колеблется от $24,1 \pm 4,9\%$ до $37,5 \pm 5,18\%$, статистически достоверных возрастных особенностей по этому показателю не отмечено. Недостаток бактерий рода *Enterococcus* более выражен в III и IV возрастных группах и менее всего в группе детей до 3-х лет, различия статистически достоверны, $p < 0,01$ и $p < 0,05$ соответственно.

У пациентов, страдающих лямблиозом во всех возрастных группах дефицит *E. coli* с нормальной ферментативной активностью коррелирует с дефицитом бактерий рода *Enterococcus* (Рисунок 4). Вместе с тем, снижение количества ниже нормы *Bifidobacterium spp.* находится в обратной зависимости от содержания в

толстой кишке *Enterococcus spp.* и *E. coli*, за исключением детей старшего возраста.

Высеваемость некоторых видов УПМ при лямблиозе в различных возрастных группах представлены в таблице 7. Оценка содержания *E. coli* (Lac-), показала, что в III возрастной группе высеваемость их была наименьшей, наибольшее зарегистрировано в IV группе у взрослых, различия статистически значимы, $p < 0,05$. По обнаружению *E. coli* (Gem+) отмечается аналогичная тенденция. Самая низкая высеваемость их регистрировалась в III возрастной группе, но различия статистически не достоверны, $p > 0,05$. Высеваемость грибов рода *Candida* колебалась от 4,76% до 8,0%, при этом у взрослых она была выше, чем у детей, но различия статистически не значимы. Статистически достоверные различия у детей и взрослых отмечались по частоте обнаружения *S. aureus*. У детей в первых трех возрастных группах высеваемость *S. aureus* была значительно выше по сравнению с IV и V группами, $p < 0,05$. Наиболее выраженные статистически достоверные различия отмечались в I и V группах, $p < 0,002$.

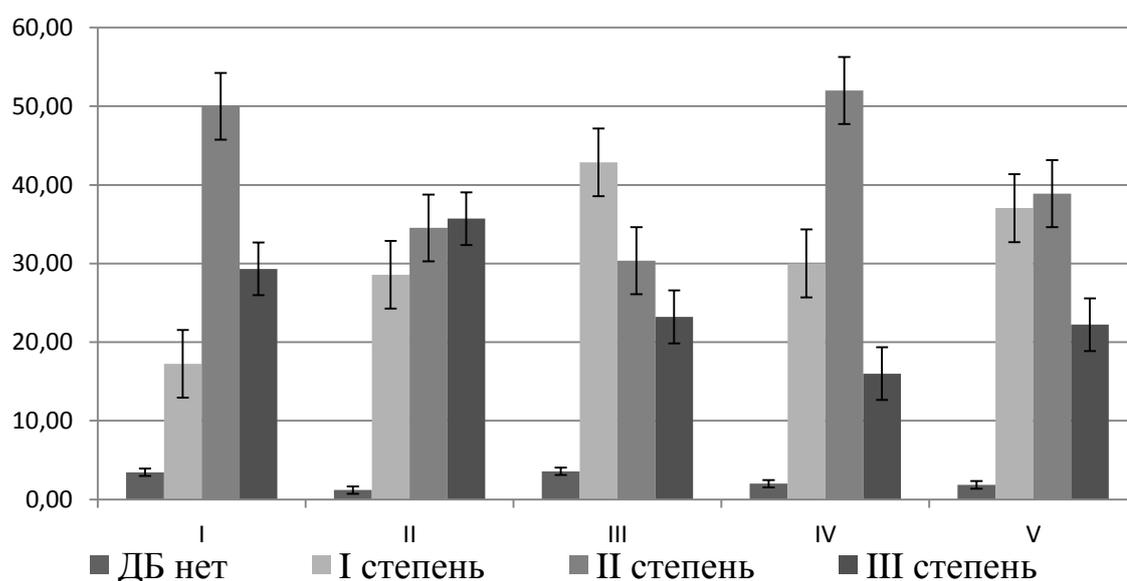


Рисунок 5 - Степени микробиологических нарушений дисбиоза толстой кишки при лямблиозе

Из представителей бактерий семейства *Enterobacteriaceae* чаще всего идентифицировались бактерии родов *Klebsiella*, *Enterobacter* и *Citrobacter*.

Таблица 7 - Содержание некоторых видов УПМ в содержимом толстой кишки пациентов с диагнозом лямблиоз в различных возрастных группах

Возрастные группы	I		II		III		IV		V	
	абс.	% ± m	абс.	% ± m	абс.	% ± m	абс.	% ± m	абс.	% ± m
<i>E. coli</i> (Лас-)	7	12,1± 4,3	10	11,9±3,5	3	5,4±3,0*	9	18,0±5,4*	8	14,8±4,8
<i>E. coli</i> (Gem+)	9	15,5±4,7	14	16,7±4,1	5	8,9±3,8	9	18,0±5,4	10	18,5±5,3
Грибы рода <i>Candida</i>	4	6,9±3,3	4	4,8±2,3	3	5,4±3,0	4	8,0±3,8	4	7,4±3,6
<i>S. aureus</i>	21	36,2±4,5*	27	32,1±5,1	17	30,4±6,1	9	18,0±5,4	6	11,1±4,3*
Всего семейство <i>Enterobacteriaceae</i>	26	44,8±6,5	39	46,4±5,4	16	28,6±6,0	17	34,0±6,7	16	29,6±6,2
Из них бактерии родов: <i>Enterobacter</i>	8	13,8±4,5	8	9,5±3,2	4	7,1±3,4	3	6,0±3,4	4	7,4±3,6
<i>Citrobacter</i>	3	5,2±2,9	6	7,1±2,8	0	0,00	1	2,0±1,98	0	0,00
<i>Klebsiella</i>	14	24,1±5,6	19	22,6±4,6	10	17,9±5,1	11	22,0±5,9	11	20,4±5,5

Примечание: * - статистически значимые показатели

В графе «семейство *Enterobacteriaceae*» показатель без учета бактерий рода *Escherichia*

Сравнение высеваемости бактерий отдельных родов в различных возрастных группах оказались статистически не достоверными. Вместе с тем, суммированная высеваемость бактерий семейства *Enterobacteriaceae* (без *E. coli*), показала, что у детей до 7 лет, она достоверно выше ($p < 0,05$) по сравнению с детьми старше 7 лет и взрослых.

Анализ степени микробиологических нарушений содержимого толстой кишки при лямблиозной инвазии, свидетельствует о том, что более выраженные изменения отмечались в двух первых возрастных группах, то есть у детей до 7 лет (Рисунок 5). Эти изменения характеризовались повышением содержания УПМ до концентрации 10^5 – 10^7 или обнаружением ассоциаций в концентрации до 10^7 КОЕ/г. Полученные результаты можно объяснить большим содержанием в толстой кишке у детей таких УПМ как *S. aureus*, бактерий рода *Klebsiella*, *Enterobacter spp.* и *Citrobacter spp.*

Микст-инвазии определялись у 22 пациентов при лямблиозе, что составило 7,28%. Спектр микст-инвазий при лямблиозе и их удельный вес представлен на рисунке 6. Токсоплазмоз и токсокароз наиболее часто встречаются в сочетании с лямблиозной инвазией.

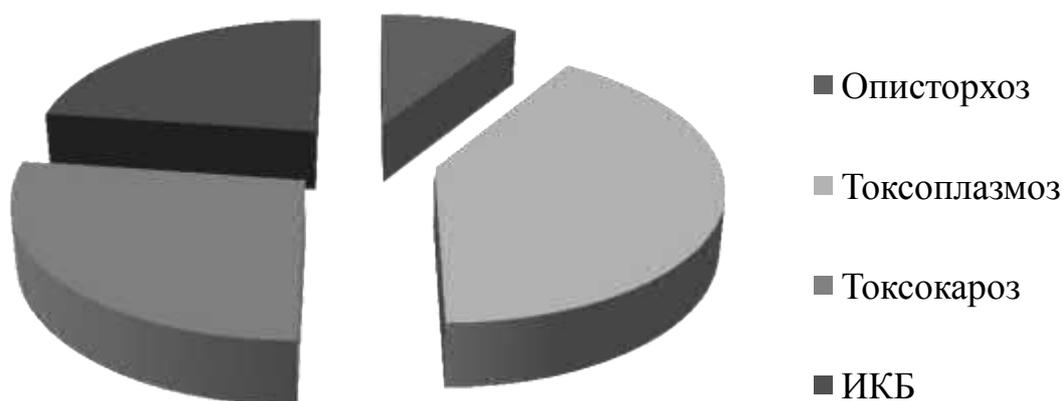


Рисунок 6 - Удельный вес микст-инвазий у пациентов, инвазированных *L. Intestinalis*, %

2.2.1. Сравнительная характеристика микробиоценоза пациентов с лямблиозой инвазией и воспалительными заболеваниями ЖКТ

В процессе жизнедеятельности вегетативные формы *L. intestinalis* из проксимального отдела тонкой кишки (основная зона обитания) спускаются в дистальные отделы кишечника, где образуют цисты и в таком виде выводятся из организма. Косвенным показателем влияния *L. intestinalis* на функцию пищеварительной системы может служить состав микробной флоры толстой кишки [227]. При исследовании микробиоценоза содержимого толстой кишки при лямблиозе наблюдали большой разброс показателей степени изменений. Вместе с тем, увеличение патогенной и УПМ способствует развитию осложнений паразитарной инвазии, а также других соматических и инфекционных заболеваний [62, 68].

Симптоматика лямблиоза очень сходна с заболеваниями пищеварительного тракта воспалительного характера: хроническим гастродуоденитом, заболеваниями кишечника, патологией желчевыводящих путей. В связи с этим вопросы дифференциальной диагностики требуют особого внимания [92]. Поэтому при исследовании микробиоценоза толстой кишки пациентов с лямблиозом в контрольную группу были взяты больные с заболеваниями ЖКТ, свободные от лямблиозной инвазии.

При сравнении полученных результатов исследования содержания нормофлоры (бактерий родов *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Enterococcus* и *E. coli*) в содержимом толстой кишки пациентов с лямблиозом и при воспалительных заболеваниях ЖКТ статистически значимые различия отмечаются по обнаружению бактерий родов *Lactobacillus* и *Enterococcus*. Более выраженный дефицит *Lactobacillus spp.* и *Enterococcus spp.* отмечается при воспалительных заболеваниях ЖКТ ($p < 0,001$ и $p < 0,02$ соответственно), а также дефицит *E. coli* с нормальной ферментативной активностью, но различия статистически не значимы (Рисунок 7).

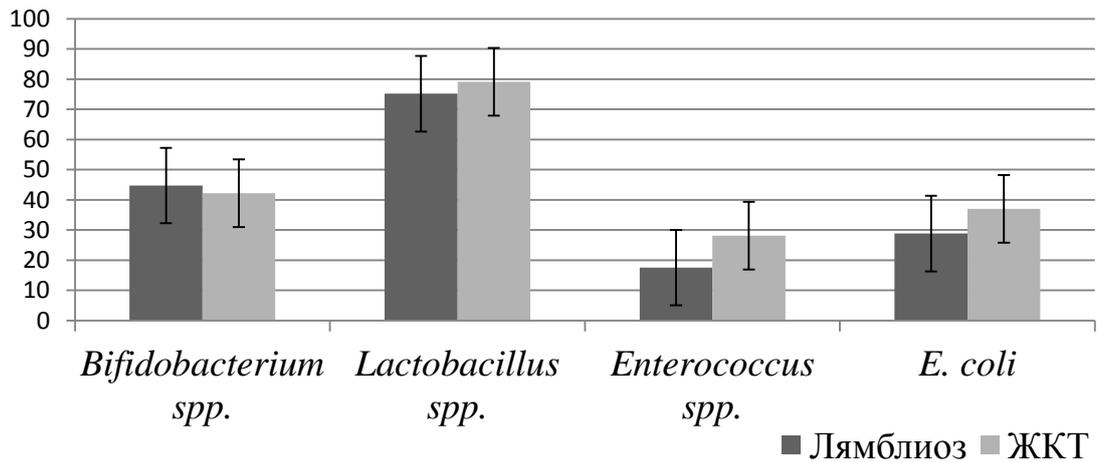


Рисунок 7 - Сравнительная характеристика дефицита нормофлоры толстой кишки при лямблиозной инвазии и воспалительных заболеваниях ЖКТ (%)

Известно, что бактерии рода *Lactobacillus* обладают устойчивостью к действию лизоцима, а некоторые штаммы сами продуцируют лизоцим, диацетил, перекись водорода, что в сочетании с лизоцимом слизистой оболочки кишечника способствует устойчивости ее к действию патогенной флоры. Эти функции обеспечивают важную роль лактобацилл в механизмах антимикробной и вирулицидной активности [159].

На фоне снижения *E. coli* с нормальной ферментативной активностью у 33,3% пациентов с заболеваниями ЖКТ отмечается более частое обнаружение *E. coli* (Lac-) и *E. coli* (Gem+) (Рисунок 8). Аналогичная тенденция регистрируется и по количеству идентификаций грибов рода *Candida* и *Clostridium spp.*

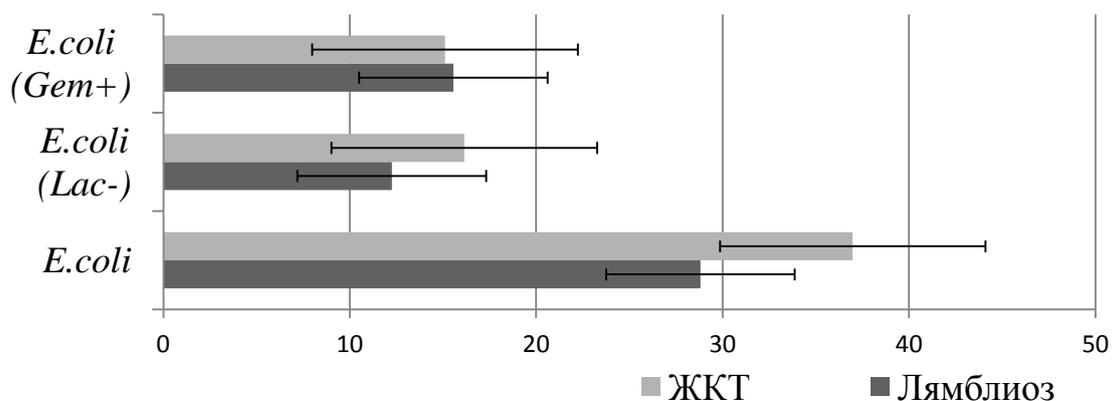


Рисунок 8 - Частота обнаружения *E. coli* (Lac-) и *E. coli* (Gem+) на фоне дефицита *E. coli* с нормальной ферментативной активностью при лямблиозе и воспалительных заболеваниях ЖКТ, %

Анализ высеваемости бактерий семейства *Enterobacteriaceae* при лямблиозе и воспалительных заболеваниях ЖКТ показал, что в содержимом толстой кишки при лямблиозе чаще обнаруживались УПМ, хотя различия статистически не значимы (Рисунок 9).

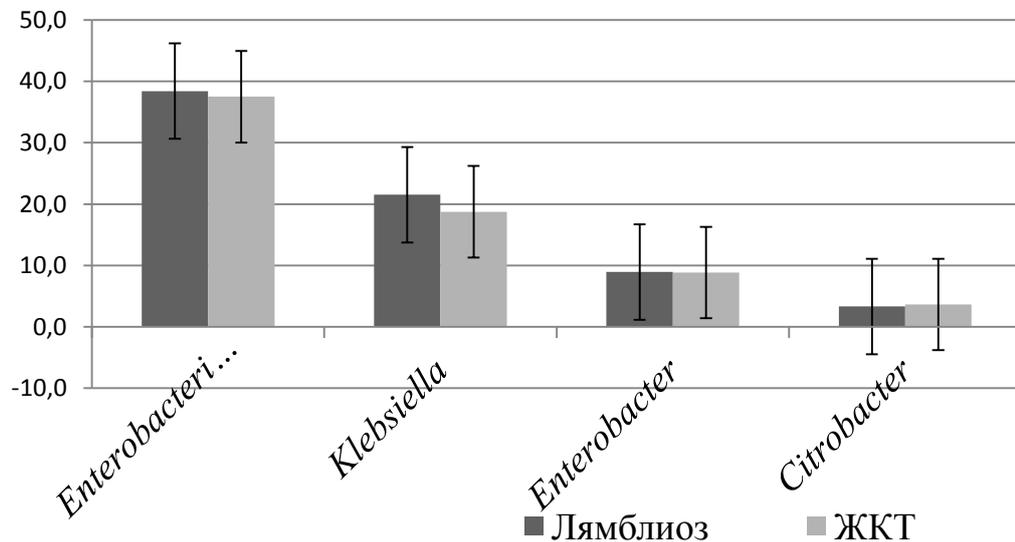


Рисунок 9 - Соотношение высеваемости бактерий семейства *Enterobacteriaceae* (некоторых родов) при лямблиозной инвазии и воспалительных заболеваниях ЖКТ, %

Это касается в первую очередь бактерий родов *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Citrobacter* и *S. aureus* (Рисунок 10). При заболеваниях ЖКТ воспалительного характера дисбиоз толстой кишки чаще всего развивается в связи с возникновением дефицита нормофлоры, в частности бактерий родов *Lactobacillus* и *Enterococcus*.

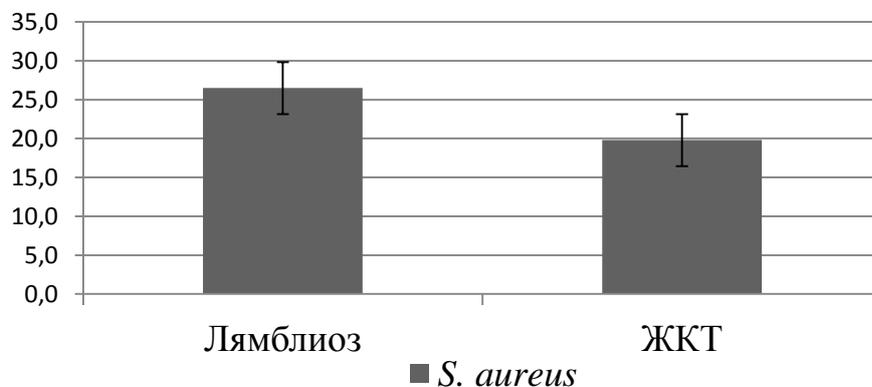


Рисунок 10 - Соотношение высеваемости бактерий *S. aureus* при лямблиозе и воспалительных заболеваниях ЖКТ, %

Сравнительная характеристика микробиоценоза толстой кишки при лямблиозе и при воспалительных заболеваниях ЖКТ по степени нарушений, показала, что чаще встречаются дисбиозы II – III степени (Рисунок 11).

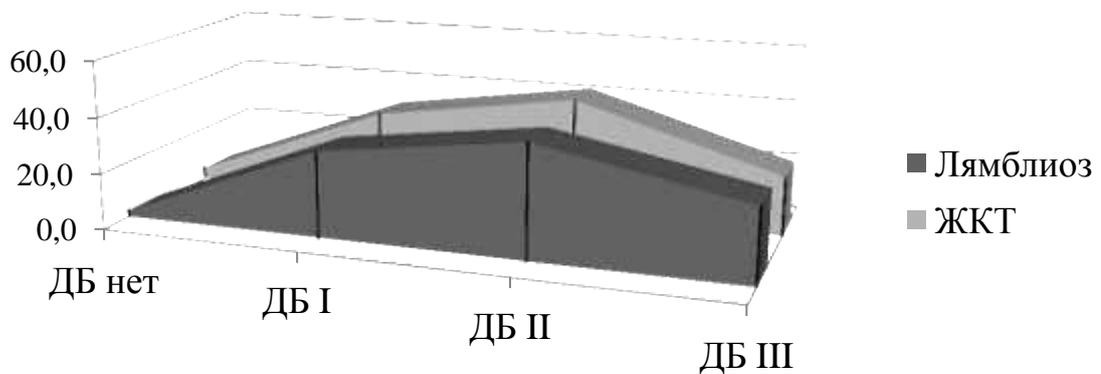


Рисунок 11 - Сравнительная характеристика микробиоценоза толстой кишки по степени нарушений при лямблиозе и воспалительных заболеваниях ЖКТ, %

Воспалительные заболевания бактериальной этиологии клинически проявляются преимущественно гастроэнтеритом. Известно, что при энтеритах идет потеря *Lactobacillus spp.* что и обуславливает дефицит бактерий данного рода. При лямблиозе страдает весь тонкий кишечник. Изменения слизистой тонкой кишки создают условия, препятствующие развитию *Bifidobacterium spp.*, что приводит к снижению их количества. Поскольку бифидобактерии являются первичным пусковым механизмом иммунитета ЖКТ, при их потере отмечается нарастание УПМ.

Таким образом, сравнительное изучение микробиоценоза ТК пациентов с лямблиозной инвазией и заболеваниями ЖКТ воспалительного характера не инвазированных лямблиями показало, что при лямблиозной инвазии в микробиоценозе кишечного содержимого чаще обнаруживаются УПМ семейства *Enterobacteriaceae*, в частности бактерии родов *Enterobacter*, *Klebsiella* и *Providencia*, а также *S. aureus*. При заболеваниях ЖКТ воспалительного характера дисбиоз ТК чаще всего связан с возникновением дефицита нормофлоры, в частности бактерий родов *Lactobacillus* и *Enterococcus*.

Результаты данного исследования указывают на то, что при первичном обращении пациентов по поводу дисфункции кишечника, врач инфекционист сможет заподозрить патологию ЖКТ или паразитарную инвазию, в частности лямблиоз. И, кроме того, нацелить врача на дальнейшую диагностику без назначения дополнительных, мало информативных исследований.

2.3. Характеристика микробиоценоза при токсоплазмозе

Ворота инфекции при токсоплазмозе – органы пищеварения. Внедрение возбудителя происходит в нижних отделах тонкого кишечника, с током лимфы токсоплазмы попадают в региональные лимфатические узлы и гематогенно попадают в различные органы и ткани и фиксируются в них. Один из симптомов токсоплазмоза – дискинезия толстой кишки, как следствие выделения паразитами продуктов жизнедеятельности и токсических веществ [29, 66, 153, 253].

Дефект перистальтики кишечника, связанный с внедрением токсоплазм в слизистую, вызывает механическую задержку эвакуации и застой кишечного содержимого. Создаются условия для продолжительного контакта слизистой с кишечным содержимым. Все это приводит не только к нарушениям микробиоценоза, но и к нарушению толерантности к резидентной нормальной микрофлоре, что влечет за собой изменения на клеточном и молекулярном уровнях: воспаление слизистой, нарушение барьерной функции, транслокацию бактерий и эндотоксинов из просвета кишечника в лимфатические узлы и системный кровоток. В процесс включается клеточный и гуморальный иммунитет. Известно, что микробиота кишечника принимает активное участие в неспецифической стимуляции иммунокомпетентных клеток и тканей (адьювантно-активные соединения, имеющие в качестве действующего начала липополисахариды и мурамилдипептид, образуются из нормальной микрофлоры кишечника человека) [103, 126].

Результаты исследования микробиоценоза толстой кишки при токсоплазмозе, указывают на выраженный дефицит бактерий рода *Lactobacillus*, который определялся у $81,62 \pm 3,7\%$ пациентов. Дефицит *Bifidobacterium spp.*

отмечен в $46,32 \pm 6,3\%$ случаев. Содержание бактерий рода *Enterococcus* ниже нормы зарегистрировано у $20,59 \pm 7,6\%$ пациентов, *E. coli* с нормальной ферментативной активностью – у $35,29 \pm 6,8\%$. Таким образом, среди представителей нормофлоры, чаще отмечается дефицит *Lactobacillus spp.* затем, *Bifidobacterium spp.*, в меньшей степени выражен дефицит *E. coli* и бактерий рода *Enterococcus* (Рисунок 12).

На фоне снижения содержания *E. coli* с нормальной ферментативной активностью отмечается повышенное выделение *E. coli* (Lac-) и *E. coli* (Gem+) – у $19,12 \pm 7,7\%$ и $7,35 \pm 8,2\%$ пациентов токсоплазмозом соответственно. Кроме того, грибы рода *Candida* высевались в $2,94 \pm 1,4\%$ случаев, *S. aureus* – $22,06 \pm 3,6\%$.

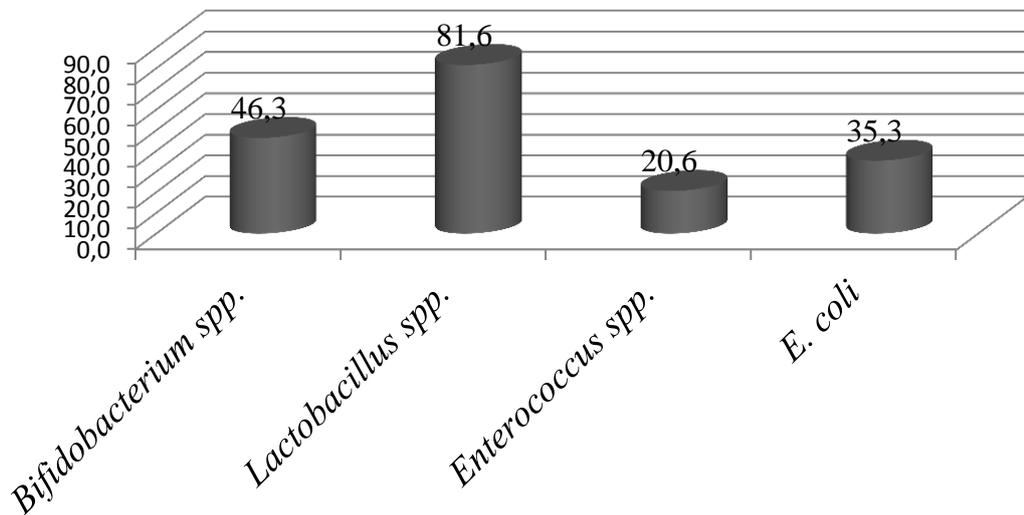


Рисунок 12 - Дефицит некоторых представителей нормофлоры в содержимом толстой кишки пациентов при токсоплазмозе

Высеваемость УПМ семейства *Enterobacteriaceae* составила $36,76 \pm 6,8\%$, чаще идентифицировались представители родов *Klebsiella*, *Citrobacter* и *Enterobacter*, их высеваемость составила $21,32 \pm 7,6\%$, $7,35 \pm 8,2\%$ и $4,41 \pm 8,3\%$ соответственно. Высеваемость *Clostridium spp.* и НГОБ была невысока и составила $4,41 \pm 1,8\%$ и $1,47 \pm 1,0\%$ соответственно.

Наиболее выраженные нарушения микробиоценоза кишечника II и III степени отмечены у $58,82 \pm 4,2\%$ пациентов. Этот факт можно объяснить большим содержанием в ТК *E. coli* (Lac-), бактерий рода *Klebsiella*, а также ассоциациями грамотрицательных бактерий и *S. aureus*.

У пациентов с токсоплазмозом были выявлены микст-инвазии в $26,47 \pm 3,8\%$ случаев, токсоплазмоз чаще всего сочетается с токсокарозом и описторхозом, в меньшей степени с лямблиозом и ИКБ (Рисунок 13).

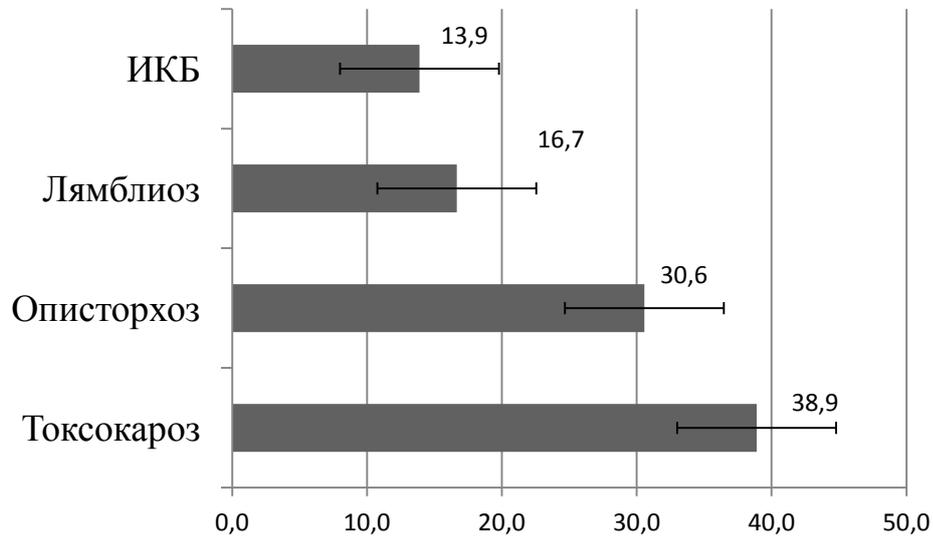


Рисунок 13 - Удельный вес микст-инвазий при токсоплазмозе, %

2.4. Характеристика микробиоценоза при токсокарозе

Для токсокароза характерен пероральный путь заражения (чаще контаминационный, реже алиментарный). В организме человека из яиц токсокар, попавших в желудок, а затем в тонкий кишечник, вылупляются личинки, которые внедряются в слизистую оболочку, а затем лимфо- и гематогенно мигрируют в сосуды печени, где часть личинок оседает и инцистируется. Остальные проходят через печень, попадают в нижнюю полую вену, затем правое сердце и капиллярную сеть легких, где большинство оседают. Прошедшие через легкие личинки попадают в большой круг кровообращения и разносятся в различные органы и ткани. В процессе миграции личинки травмируют сосуды и ткани, вызывая геморрагии, некроз, воспалительные изменения. Личинки токсокар могут сохранять жизнеспособность многие годы, периодически, под влиянием каких-либо факторов, возобновляя миграцию и обуславливая тем самым рецидивы заболевания [17, 54, 61, 116]. Основой патогенеза токсокароза является

сенсibilизация организма пациента продуктами обмена и распада личинок, что ведет к проявлению аллергических реакций. В выделениях личинок содержатся вещества, обладающие антигенной активностью (экзоантигены). Соматические антигены попадают в организм человека после разрушения личинки (эндоантигены). При висцеральном токсокарозе имеет место абдоминальный синдром – боли и вздутие живота, тошнота, рвота, диарея [134, 156].

Как отмечалось выше, токсокароз встречается реже по сравнению с другими исследуемыми нами инвазиями. Характеризуя микробиоценоз толстой кишки при токсокарозе, необходимо отметить выраженный дефицит бактерий рода *Lactobacillus*, который отмечен у $77,97 \pm 6,1\%$ и дефицит *Bifidobacterium spp.* - у $38,97 \pm 10,2\%$ пациентов с токсокарозом. Содержание бактерий рода *Enterococcus spp.* ниже нормы зарегистрировано в $22,03 \pm 5,4\%$ случаев, снижение *E. coli* с нормальной ферментативной активностью – в $33,9 \pm 6,2\%$.

Таким образом, среди представителей нормофлоры, чаще всего отмечался дефицит *Lactobacillus spp.* затем, *Bifidobacterium spp.*, в меньшей степени выражен дефицит *E. coli* и *Enterococcus spp.* (Рисунок 14).

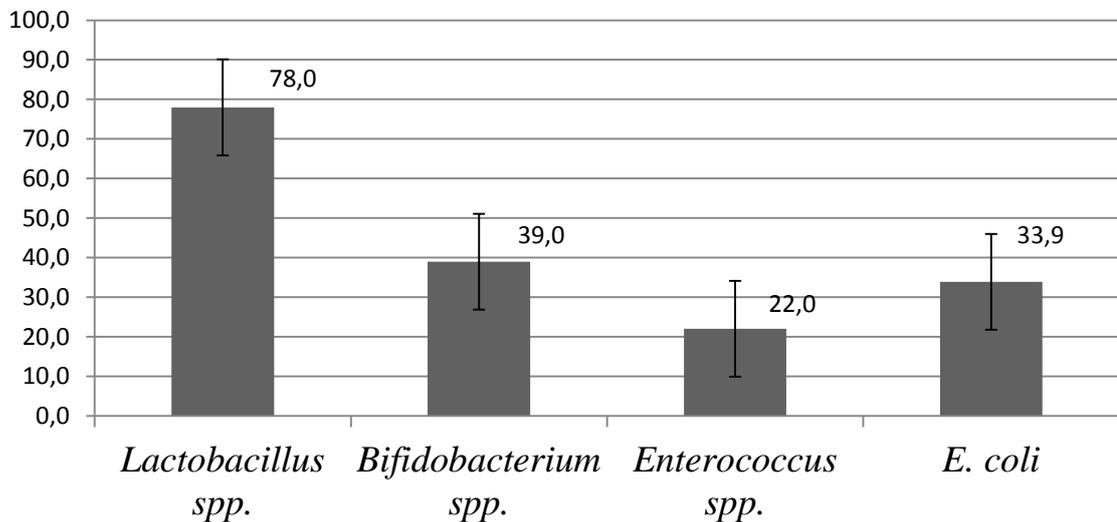


Рисунок 14 - Дефицит представителей нормофлоры в содержимом толстой кишки при токсокарозе

На фоне снижения содержания *E. coli* с нормальной ферментативной активностью отмечается повышенное выделение *E. coli* (Lac-) и *E. coli* (Gem+) – у $25,42 \pm 5,7\%$ и $15,25 \pm 4,7\%$ пациентов с токсокарозом соответственно. Кроме того,

грибы рода *Candida* высевались в $6,78 \pm 3,3\%$ случаев, *S. aureus* – $20,34 \pm 5,2\%$. Из грамотрицательных УПМ чаще идентифицировались представители семейства *Enterobacteriaceae* ($27,12 \pm 5,8\%$), представители родов *Klebsiella* и *Proteus* (Рисунок 15). Отмечались единичные случаи обнаружения бактерий рода *Citrobacter*. Высеваемость *Clostridium spp.* составила $1,69 \pm 1,7\%$, НГОб у пациентов, инвазированных токсокарозом не были обнаружены.

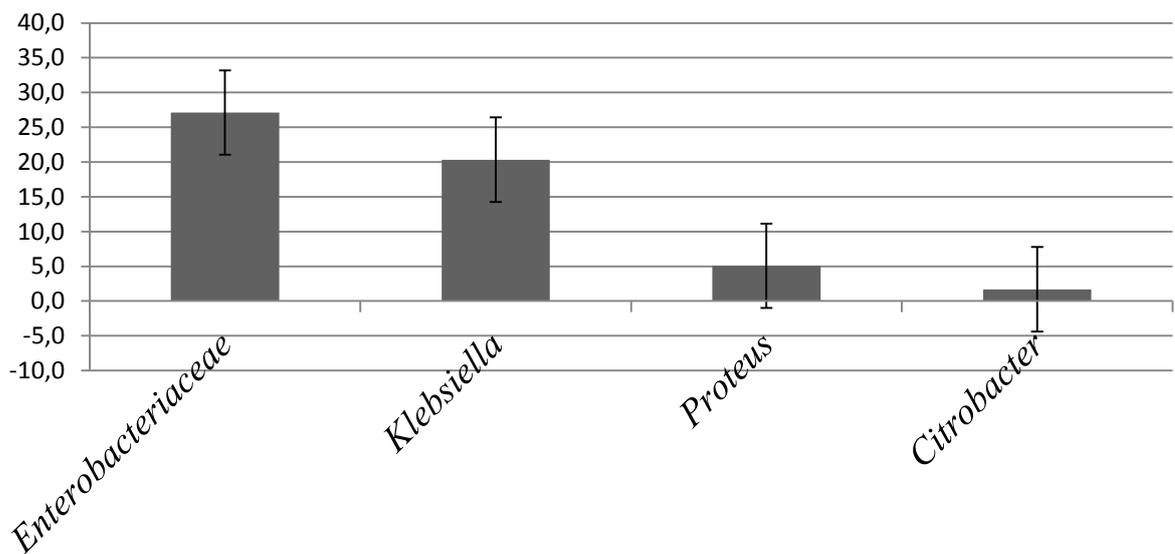


Рисунок 15 - Высеваемость бактерий семейства *Enterobacteriaceae* из толстой кишки пациентов при токсокарозе

Более выраженные нарушения дисбиоза толстой кишки при токсокарозе (II и III степени) отмечены в $62,7 \pm 6,2\%$ случаев. Указанные данные регистрировались за счет высеваемости *E. coli* (Lac-) и *E. coli* (Gem+), *S. aureus*, бактерий рода *Klebsiella* и *Proteus*, а также ассоциаций грамотрицательных бактерий, *S. aureus* и грибами рода *Candida*.

У пациентов, страдающих токсокарозом микст-инвазии выявились в $40,68 \pm 6,3\%$ случаев. Характеристика микст инвазий представлена на рисунке 16. Показано, токсокароз чаще сочетались с токсоплазмозом, в меньшей степени - с описторхозом и лямблиозом.

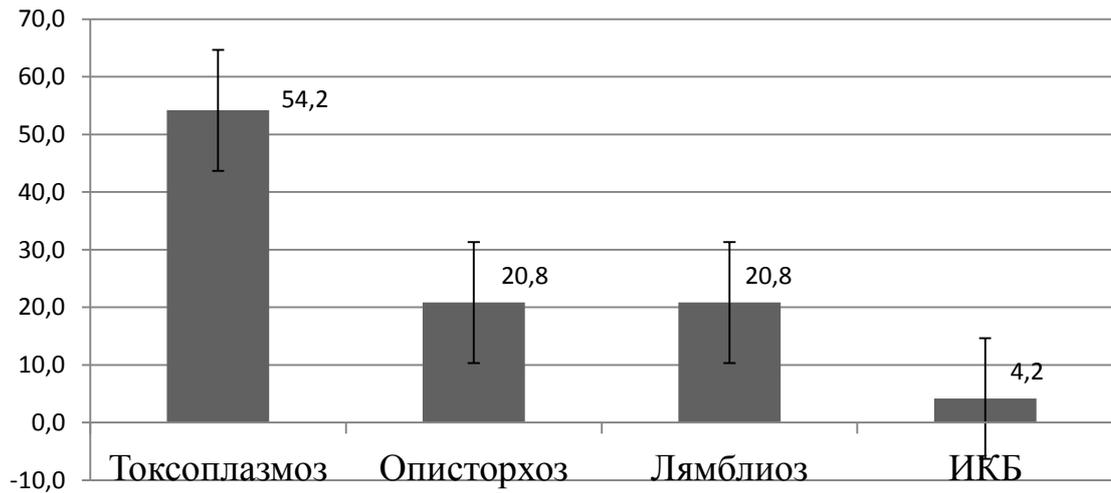


Рисунок 16 - Удельный вес микст-инвазий пациентов при токсокарозе, %

2.5. Характеристика микробиоценоза при иксодовом клещевом боррелиозе (ИКБ)

Проникающие в организм боррелии, возбудители иксодового клещевого боррелиоза (ИКБ), болезни Лайма, интенсивно размножаются в клетках мононуклеарно-фагоцитарной системы и поступая в кровь, вызывают бактериемию. Часть возбудителей в крови разрушаются с освобождением эндотоксинов, вызывающих явления интоксикации, повышение проницаемости сосудов, нарушение гемодинамики. Под воздействием антител образуются агрегаты из боррелий, нагруженных тромбоцитами, которые задерживаются и подвергаются фагоцитозу и лизису в капиллярах внутренних органов. Среди клинических проявлений отмечаются симптомы со стороны ЖКТ - типичные боли в животе, явления энтероколита.

Таким образом, при внедрении паразита в макроорганизм изменяется его экологическая система, одним из главных компонентов которой является микробиоценоз кишечника. Накопление продуктов жизнедеятельности и субстанций распада паразитов в кишечнике, а также других полостях организма, способствует изменению рН внутренней среды, в результате чего нарушается микробиоценоз кишечника [91].

Характеризуя состав кишечного микробиоценоза при ИКБ, необходимо отметить выраженный дефицит бактерий рода *Lactobacillus*, который определялся

у $82,05 \pm 6,8\%$ пациентов, дефицит *Bifidobacterium spp.* отмечен в $58,97 \pm 7,9\%$ случаев. Содержание бактерий рода *Enterococcus spp.* и *E. coli* с нормальной ферментативной ниже нормы зарегистрировано у $17,95 \pm 6,1\%$ и $25,64 \pm 7,0\%$ пациентов соответственно. Таким образом, среди исследуемых представителей нормофлоры, чаще всего отмечался дефицит *Lactobacillus spp.* затем, *Bifidobacterium spp.*, в меньшей степени выражен дефицит *E. coli* и бактерий рода *Enterococcus*.

Из грамотрицательных УПМ чаще высеивались представители семейства *Enterobacteriaceae*, высеиваемость их составила $33,3 \pm 7,5\%$. Идентифицировались представители родов *Klebsiella* и *Proteus*, другие представители родов семейства *Enterobacteriaceae* определялись довольно редко с одинаковой частотой (Рисунок 17).

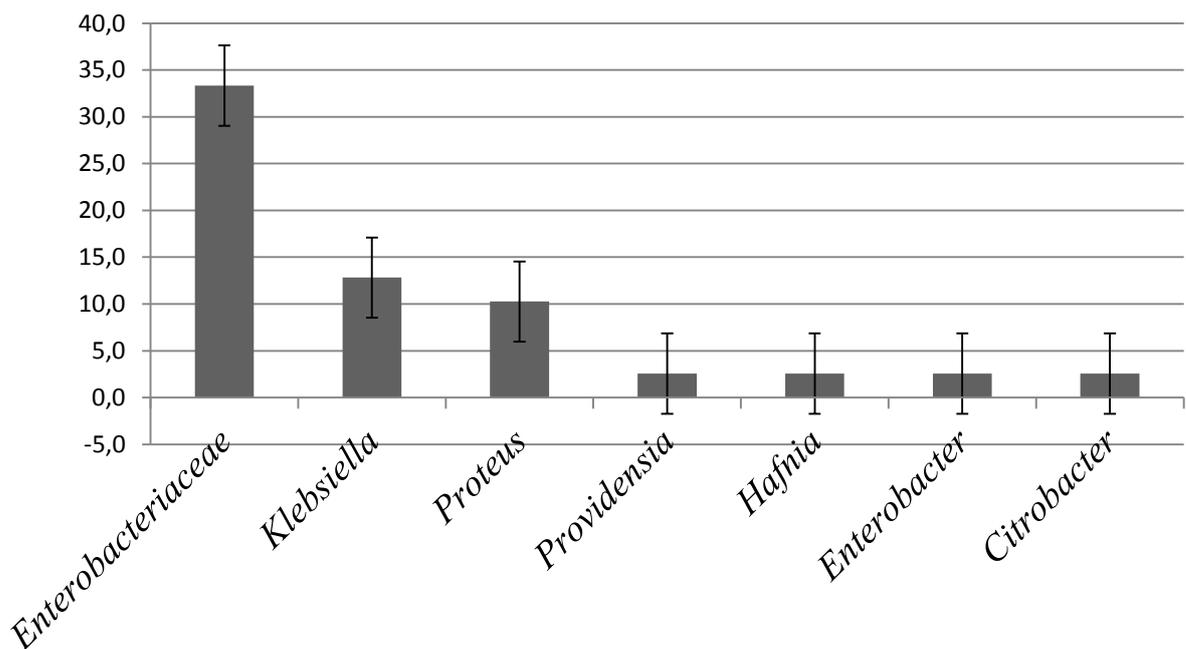


Рисунок 17 - Высеиваемость бактерий семейства *Enterobacteriaceae* из толстой кишки пациентов при ИКБ

На фоне дефицита *E. coli* с нормальной ферментативной активностью в содержимом толстой кишки регистрировались единичные случаи обнаружения *E. coli* (Lac-) и *E. coli* (Gem+), причем, в равных количествах - $7,69 \pm 4,3\%$. Кроме того, грибы рода *Candida* высеивались в $7,69 \pm 4,3\%$ случаев, *S. aureus* – $17,95 \pm 6,1\%$.

Высеваемость бактерий рода *Clostridium* составила $5,12 \pm 3,5\%$, НГОБ в содержимом ТК при ИКБ не были обнаружены.

Микроэкологические нарушения II и III степени регистрировались в $51,28 \pm 8,0\%$ случаев. Эти результаты можно объяснить высоким содержанием в толстой кишке родов *Klebsiella* и *Proteus*, а также ассоциациями грамотрицательных бактерий, *S. aureus* и грибами рода *Candida*.

У пациентов с диагнозом ИКБ микст-инвазии выявлялись в $46,15 \pm 7,9\%$ случаев. Характеристика микст-паразитозов представлена на рисунке 18. ИКБ чаще сочетался с лямблиозом и токсоплазмозом, в меньшей степени с токсокарозом. В наших исследованиях не зарегистрированы случаи микст-инфекций с описторхозом.

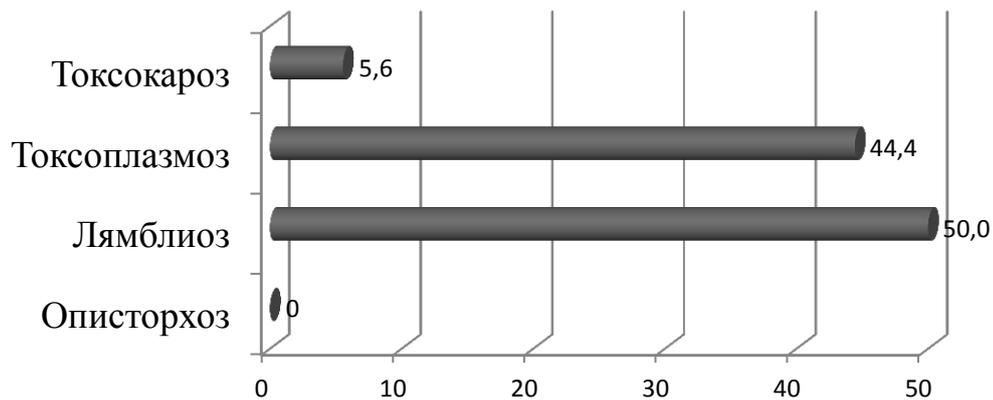


Рисунок 18 - Удельный вес микст-инвазий пациентов при ИКБ, %

Наиболее часто встречающейся инвазией является лямблиоз и токсокароз. Значительно реже регистрируется ИКБ. Лямблиозом чаще болеют дети, в то время как, другими инвазиями поражаются люди зрелого трудоспособного возраста.

2.6. Сравнительная характеристика микроэкологической системы толстой кишки при паразитарных инвазиях

Анализ содержания некоторых представителей микробиоценоза толстой кишки показал, что при различных паразитарных инвазиях имеются некоторые

общие тенденции – снижение количества представителей нормофлоры. При лямблиозе, тканевых паразитозах и ИКБ, на первое место выходит дефицит бактерий рода *Lactobacillus* - до $82,0 \pm 3,3\%$. Более выраженное снижение количества бактерий рода *Bifidobacterium* регистрируются при описторхозе, причем, отмечены статистически значимые различия по этому показателю при сравнении с лямблиозом ($p < 0,001$), токсоплазмозом ($p < 0,001$), токсокарозом ($p < 0,002$). Вместе с тем, при сравнении частоты обнаружения бактерий *Lactobacillus spp.* при описторхозе и токсоплазмозе, определены статистически значимые различия ($p < 0,002$). Описторхозная инвазия отличается от других тем, что дефицит *E. coli* с нормальной ферментативной активностью и бактерий рода *Enterococcus spp.* выражены в равной степени, в то время как при других инвазиях дефицит *E. coli* на порядок выше. Сравнительная характеристика дефицита нормофлоры толстой кишки при некоторых паразитарных инвазиях показана на рисунке 19.

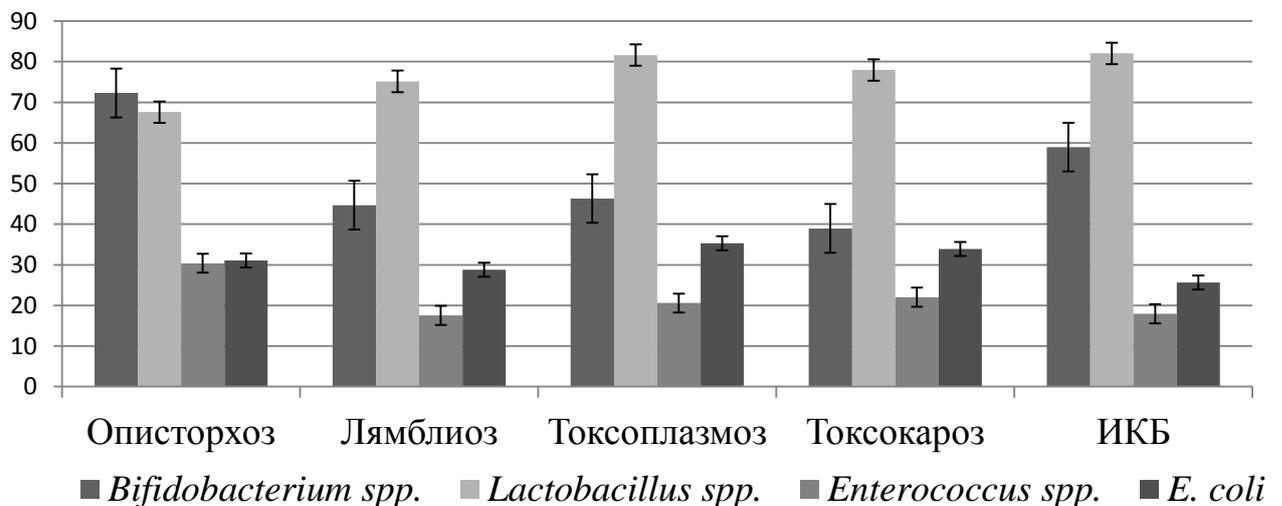


Рисунок 19 - Характеристика дефицита нормофлоры толстой кишки при некоторых паразитарных инвазиях

Анализ структуры *E. coli* с нормальной ферментативной активностью, *E. coli* (Lac-) и *E. coli* (Gem+), показал, что при описторхозе, лямблиозе и токсокарозе *E. coli* (Gem+) и *E. coli* (Lac-) высеваются с одинаковой частотой (Рисунок 20).

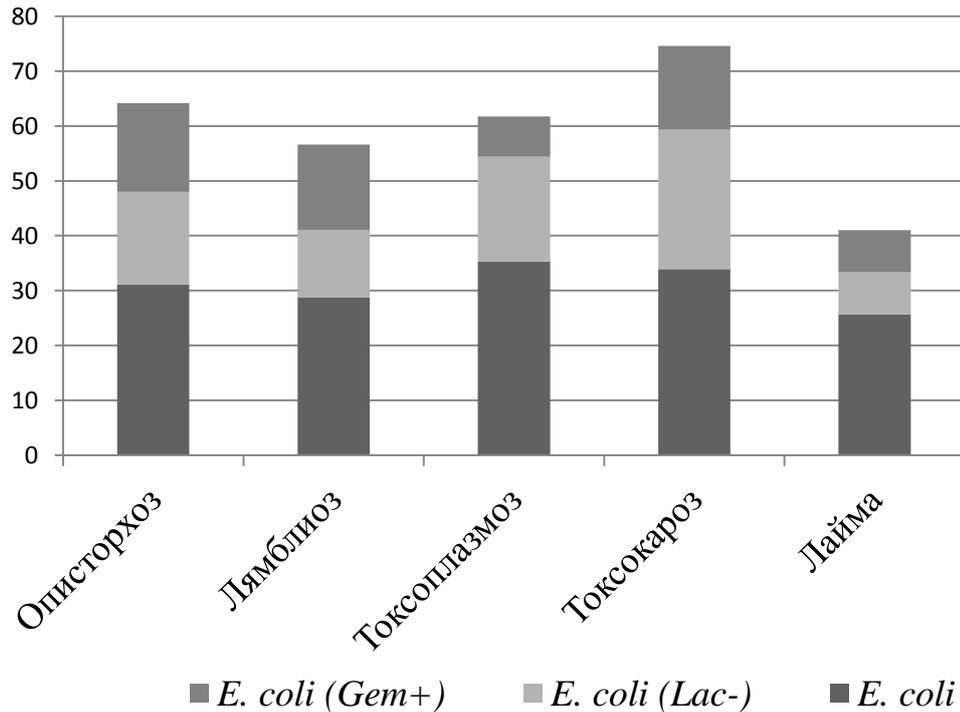


Рисунок 20 - Содержание *E. coli* в толстой кишке при некоторых паразитозах

Анализ высеваемости УПМ из содержимого толстой кишки пациентов с паразитозами, показал, что лидирующее положение занимали бактерии семейства *Enterobacteriaceae* (Рисунок 21). Вторые позиции принадлежали бактериям *S. aureus* и грибам рода *Candida*. Статистически значимых различий в высеваемости указанных бактерий не выявлено. При лямблиозе и токсоплазмозе высеваемость бактерий семейства *Enterobacteriaceae* и *S. aureus* несколько выше, чем при других инвазиях.

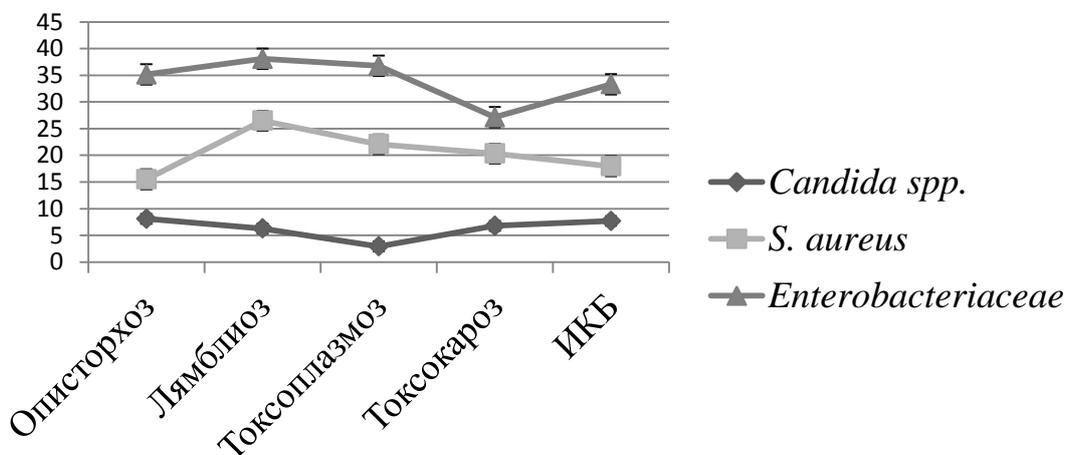


Рисунок 21 - Высеваемость УПМ из толстой кишки при паразитозах (%)

Среди представителей семейства *Enterobacteriaceae* при всех рассматриваемых инвазиях, чаще идентифицировались бактерии рода *Klebsiella*, при ИКБ - бактерии рода *Proteus* (Рисунок 22).

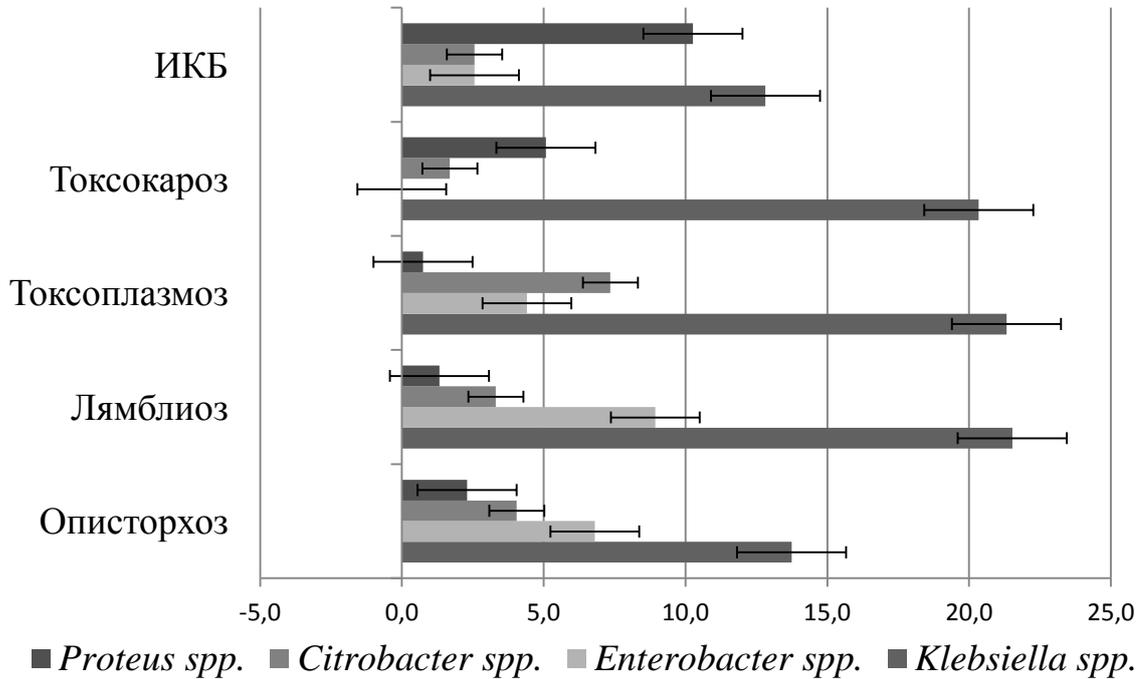


Рисунок 22 - Высеваемость бактерий семейства *Enterobacteriaceae* при некоторых паразитозах

Высокая высеваемость УПМ объяснялась тем, что функция колонизационной резистентности при выраженном дефиците нормофлоры (бактерий родов *Lactobacillus* и *Bifidobacterium*) снижена или отсутствует. Дефицит бактерий родов *Lactobacillus* и *Bifidobacterium* в содержимом толстой кишки пациентов с паразитарными инвазиями объясняет факт интоксикации и сенсibilизации организма продуктами обмена и распада гельминтов, так как доказана их роль в связывании и разрушении токсических веществ.

Как отмечалось выше, *E. coli*, не обладающие гемолитической активностью, принимают участие в синтезе витаминов, обмене холестерина, билирубина, холина, желчных и жирных кислот. Таким образом, при дефиците ее в микробиоценозе толстой кишки в организме нарушаются обменные процессы и витаминобразование.

Оценка степени микробиологических нарушений при инфекционно-инвазионном процессе, свидетельствовала о том, что незначительные изменения, соответствующие I степени, более характерны для ИКБ (Рисунок 23). Более глубокие нарушения микробиоценоза толстой кишки регистрировались при описторхозе и соответствовали II – III степени. Изменения характеризовались повышенным содержанием УПМ до концентрации 10^5 – 10^7 или обнаружением ассоциаций в концентрации до 10^7 и выше КОЕ/г. Полученные результаты свидетельствовали о высоком содержании в микробиоценозе толстой кишки бактерий родов *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, кроме того, ассоциаций грамотрицательных бактерий, *S. aureus* и грибов рода *Candida*.

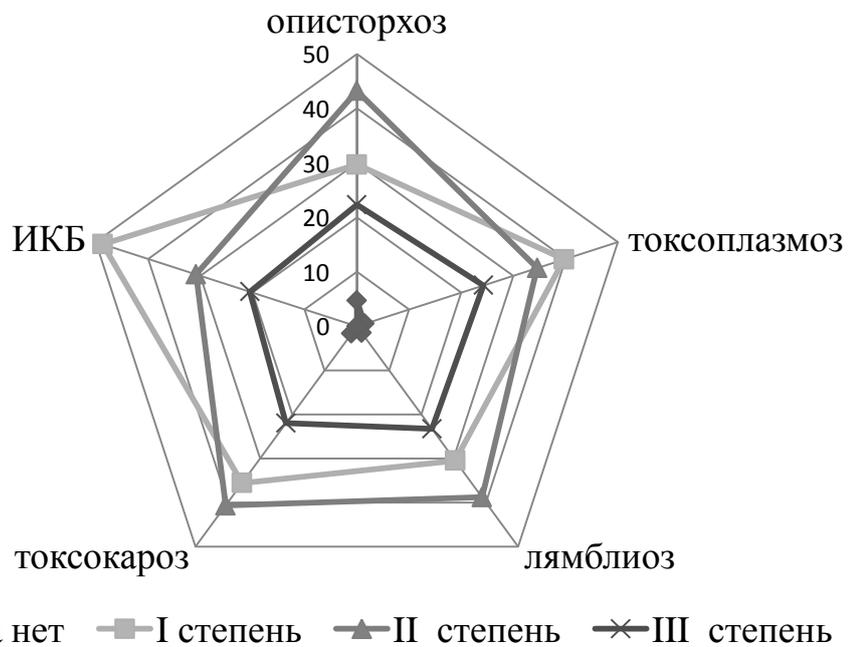


Рисунок 23 - Степени микроэкологических нарушений толстой кишки при инфекционно-инвазионном процессе

Таким образом, паразитарная инвазия и нарушения кишечного микробиоценоза взаимосвязанные явления. Насколько важно обследование на наличие паразитарного заболевания при дисбиозе, настолько и важно обследование на дисбиоз при паразитарных болезнях. Своевременная коррекция нарушений микробиоценоза, развивающегося вследствие паразитарной инвазии, способствует не только уменьшению воспалительного процесса в толстом

кишечнике за счет уменьшения УПМ, но и косвенно влияет на уменьшение интоксикации и повышение защитных сил организма, кроме того, содействует профилактике воспалительных заболеваний ЖКТ.

Дисбиоз толстой кишки при паразитоценозе значительно отягощает основное заболевание, требует длительного лечения – коррекции иммунитета и нормализации микробиоценоза. Поэтому вопросы изучения нарушений микробиоценоза кишечника, как в количественном, так и в качественном соотношении важны для раскрытия механизмов этих нарушений и их восстановления. Детальное изучение микрoэкологической системы толстого кишечника с учетом роли микрофлоры в патогенезе паразитарных заболеваний необходимо для дальнейшего исследования механизмов влияния симбионтных отношений на организм человека.

2.6.1. Сиквенс серогруппы штаммов *Escherichia coli*

Показано, что при паразитарных инвазиях, таких как лямблиоз и описторхоз, нарушается баланс микробиоты толстой кишки, проявляющийся дефицитом нормофлоры. В первую очередь почти у 70% пациентов отмечается снижение количества бактерий родов *Bifidobacterium* и *Lactobacillus*. Содержание бактерий *E. coli* с нормальной ферментативной активностью ниже нормы регистрируется в среднем у 30% пациентов, при этом, возрастает частота обнаружения *E. coli* (Lac-) и *E. coli* (Gem+) и регистрируется у 16,5% обследованных лиц с паразитарными инвазиями. При воспалительных заболеваниях ЖКТ также наблюдаются изменения в структуре микробиоценоза и выделении УПМ. Для определения специфических патогенетических механизмов влияния метаболитов паразитирующих гельминтов на микробиоту толстой кишки проведено полногеномного секвенирования штаммов *E. coli*, изолированных от пациентов с паразитарными и воспалительными заболеваниями ЖКТ.

Результаты, полученные на основе серотипирования, свидетельствовали о наличии у изученных штаммов *E. coli* кластеров генов O- и H-серогрупп, относящихся к диареегенным - энтеротоксигенным (ЕТЕС) и энтероинвазивным

(EPEC). Также выявлены кластеры генов O-серогрупп внекишечных патогенных *E. coli* (ExPEC), являющихся возбудителями инфекций мочевыводящих путей, бактериемий, менингитов (Таблица 8).

Таблица 8 - Сиквенс серотипы штаммов *E. coli*, выделенных из содержимого толстой кишки пациентов с хроническими паразитарными и воспалительными заболеваниями ЖКТ

Типы <i>E.coli</i>	Сиквенс серотипы штаммов		
	заболевания ЖКТ	Лямблиоз	Описторхоз
ETEC	O6:H16, O15:H1, O25:H1	O63:H29	O6:H1, O6:H5, O6:H31, O8:H30, O25:H4
EPEC	-	O28ab:H9	O144:H45
ExPEC	O1:H7, O2:H7, O2:H6	O9:H10	O1:H7, O2:H6,
Прочие	O141:H32, O169:H9	O12:H4, O21:H12, O74:H23, O169:H45, O81:H27	O12:H20, O73:H31
O?	O?:H7, O?:H10,	O?:H5, O?:H6	-

Примечание: «O?» – несеротипируемые *E. coli*

Треть исследуемых штаммов по O-антигену отнесены к патотипу ETEC. Среди ETEC обнаруживался серотип O6, в основном при описторхозной инвазии (3 штамма из 10), а также серотипы O25, выделенные при описторхозной инвазии и воспалительных заболеваниях ЖКТ. Серотипирование в реакции агглютинации на стекле показало следующие результаты: с поливалентной сывороткой ОКА – следы агглютината, жидкость в капле мутная (+), с поливалентной сывороткой ОКД – слабо заметная мелкозернистая агглютинация (+), с иммуноглобулином O25 – реакция отрицательная (гомогенно мутная жидкость в капле), с сывороткой O25 (прогретая при 100°C, 30') – агглютинат слабо выражен, жидкость в капле мутная. Таким образом, по результатам реакции агглютинации на стекле эти штаммы не могут быть определены как серотип O25, так как положительная

реакция считается только при агглютинации не ниже чем на 3 (+++) – хорошо выраженный агглютинат, жидкость в капле не полностью прозрачная.

Выделенные штаммы *E. coli* от пациентов с паразитозами явились носителями кластеров генов серогрупп O144 и O28ab, относящихся к EIEC. Штамм серогруппы O144 также исследован в реакции агглютинации на стекле: с поливалентной сывороткой ОКА – следы агглютината, жидкость в капле мутная (+), с поливалентной сывороткой ОКЕ – (+), с иммуноглобулином O144 – реакция отрицательная, с адсорбированной сывороткой O144 (прогретая) – (+++). Результат реакции агглютинации на стекле также расценивался как отрицательный.

Среди серотипов, отнесенных к ExPEC, были обнаружены кластеры антигенов O1, O2 и O9 серогрупп, которые чаще встречались в группе пациентов с воспалительными заболеваниями ЖКТ. В группу прочих *E. coli* вошли штаммы серогрупп O12, O21, O73, O74, O81 и O169, которые обнаруживались у пациентов с диагнозом лямблиоз. Кроме того, 4 штамма *E. coli*, выделенные от пациентов с лямблиозной инвазией и заболеваниями ЖКТ, оказались не серотипируемые по O-антигену (Таблица 8).

Учитывая то, что нуклеотидные кластеры антигенов некоторых штаммов показывают уникальные последовательности, которые нельзя обозначить как одну из установленных O-серогрупп, штаммы обозначены как нетипируемые. На основе геносеротипирования, демонстрирующего мутации в кластере O-антигенов (O-AGC), которые затрудняют серологическую реакцию, появляется возможность определения O- и H-антигенов у несеротипируемых штаммов.

Нами впервые предпринята попытка изучения генома штаммов *E. coli*, выделенных от пациентов, страдающих паразитарными инвазиями. Показано, что 8 из 10 исследованных штаммов *E. coli*, изолированных при описторхозе, относились к группам: ETEC - O6, O8, O25; EIEC – O144; ExPEC – O1, O2. Описторхозная инвазия в большей степени влияет на колонизацию организма человека штаммами *E. coli*, носителями кластеров генов патогенности и

вирулентности, что возможно связано с нарушением иммунитета, либо более выраженным влиянием метаболитов *O. felineus*.

Филогенетическое древо на основе определенных коровых SNP исследованных штаммов *E. coli* и полных геномов (хромосом) *E. coli*, находящихся в базе данных DDBJ/EMBL/GenBank представлено на рисунке 24. Штамм *E. coli*-1654-1, изолированный от пациента с диагнозом лямблиоз находится на отдельной далеко отходящей ветви. В филогенетическое исследование были добавлены геномы штаммов других видов рода *Escherichia* – *E. albertii*, *E. fergusonii*, *E. marmotae* (Рисунок 25). Это не позволило уточнить систематическое положение штамма *E. coli*-1654-1, который оказался равноудаленным от других видов рода *Escherichia*. Указанный штамм также нельзя классифицировать как *Shigella spp.*, которые являлись клональными видами и располагались внутри группы штаммов *E. coli*. Последовательность гена 16S рРНК была проанализирована в базе данных BLAST 16S рРНК (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>). Гомология гена 16S рРНК штамма *E. coli*-1654-1 с генами 16S рРНК референсных штаммов представлена в таблице 9.

Филогенетическое древо на основе определенных коровых SNP 29 штаммов *E. coli* (без образца *E. coli*-1654-1) и полных геномов (хромосом) *E. coli*, находящихся в базе данных DDBJ/EMBL/GenBank представлено на рисунке 26. Исследованные штаммы находятся на отдельных далеко отстоящих ветках, кроме следующих групп: *E. coli*-83 и *E. coli*-3463; *E. coli*-2057 и *E. coli*-24; *E. coli*-45-2 и *E. coli*-49, а также группы, включающей штаммы *E. coli*-3422, *E. coli*-93, *E. coli*-1338, *E. coli*-2688, *E. coli*-2756, *E. coli*-329, *E. coli*-199 и *E. coli*-45-1.

Таблица 9 - Гомология гена 16S рРНК образца *E. coli*-1654-1 с генами 16S рРНК референсных штаммов

	Штамм	Идентичность		Кол-во SNP	Ссылка
		количество нуклеотидов	%		
1.	<i>Escherichia fergusonii</i> ATCC 35469	1538/1542	99.74	4	NR_074902.1

Продолжение таблицы 9

2.	<i>Shigella flexneri</i> ATCC 29903	1482/1488	99.60	6	NR_026331.1
3.	<i>Escherichia fergusonii</i> ATCC 35469	1465/1473	99.46	8	NR_027549.1
4.	<i>Shigella sonnei</i> CECT 4887	1513/1521	99.47	8	NR_104826.1
5.	<i>Escherichia coli</i> NBRC 102203	1459/1467	99.45	8	NR_114042.1
6.	<i>Escherichia fergusonii</i> NBRC 102419	1458/1467	99.39	9	NR_114079.1
7.	<i>Shigella boydii</i> P288	1505/1515	99.34	10	NR_104901.1
8.	<i>Escherichia albertii</i> Albert 19982	1477/1494	98.86	17	NR_025569.1
9.	<i>Shigella dysenteriae</i> ATCC 13313	1470/1488	98.79	18	NR_026332.1
10.	<i>Escherichia marmotae</i> HT073016	1483/1504	98.60	21	NR_136472.1
11.	<i>Salmonella bongori</i> NCTC 12419	1508/1544	97.67	36	NR_074888.1
12.	<i>Salmonella enterica</i> LT2	1507/1544	97.60	37	NR_074910.1

ЕТЕС являются важной причиной диареи во всем мире, особенно среди детей в возрасте до пяти лет в развивающихся странах, причем серогруппа Об является самой распространенной, тем более что имеет отношение как к диарейным, так и внекишечным проявлениям инфекции [215, 278].

Известно, что толстый кишечник человека является резервуаром для ЕхРЕС, которые могут заселять мочевыводящие пути, кровь, легкие, и приводить к манифестным заболеваниям. Домашние животные могут быть носителями ЕхРЕС, которые инфицируют человека посредством контакта с ними [195, 217]. Показана этиологическая роль в развитии инфекции мочевыводящих путей *E. coli* серогрупп О1, О2, О4, О6, О7, О8, О9, О14, О18, О22, О75 и О83, причем чаще всего регистрировались О1 (12,2%) и О6 (10,2%) [215, 223]. Среди изолятов мочи и кровотока отмечено преобладание штаммов серогрупп О25, О6 и О2 [208]. Секвенирование всего генома штаммов может выявить факторы, ответственные за синтез антигенных доменов О-антигенов [211].

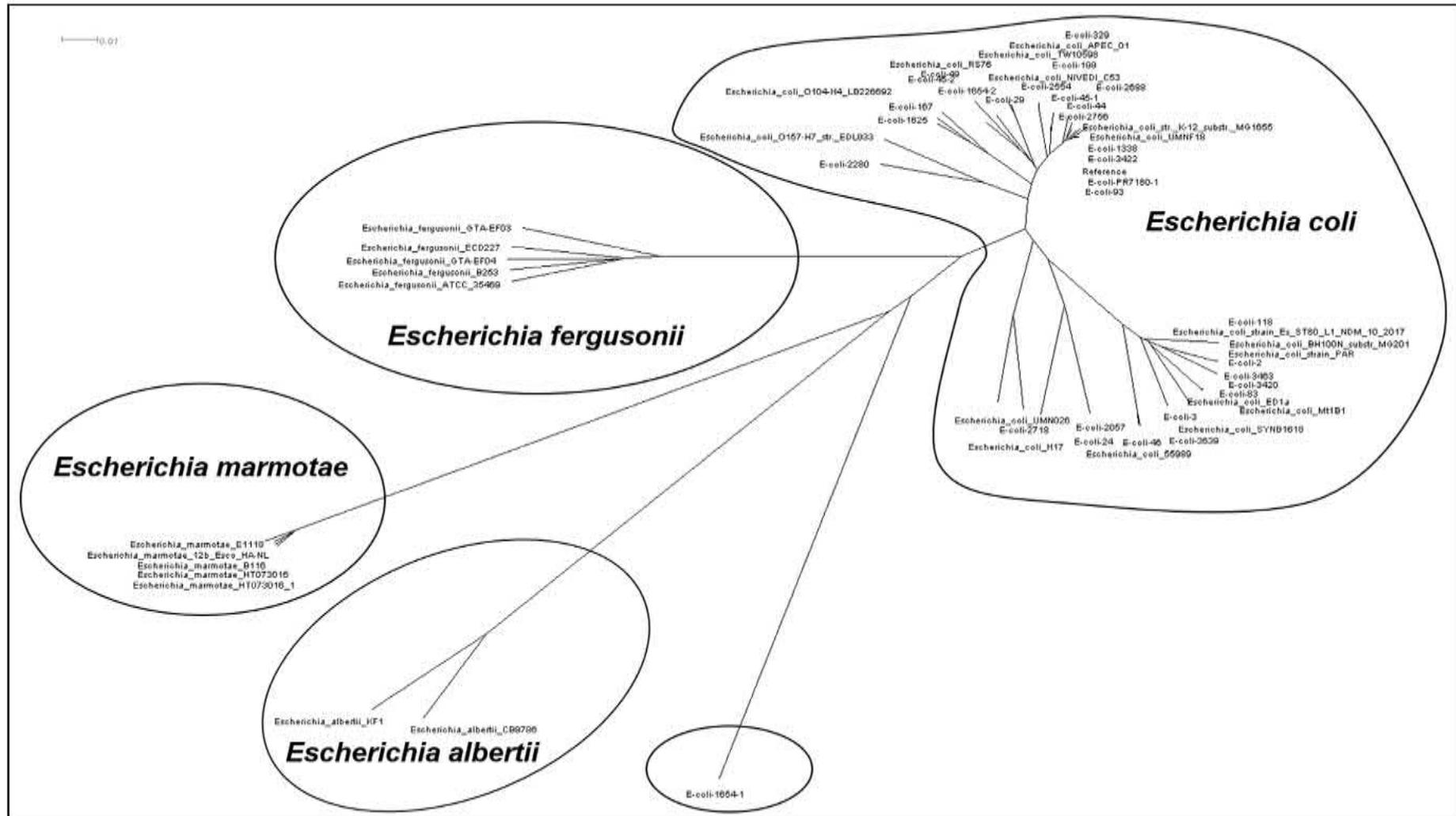


Рисунок 25 - Филогенетическое древо на основе определенных коровых SNP исследованных штаммов *E. coli* и полных геномов (хромосом) рода *Escherichia*, находящихся в базе данных DDBJ/EMBL/GenBank (статистический метод – NJ)

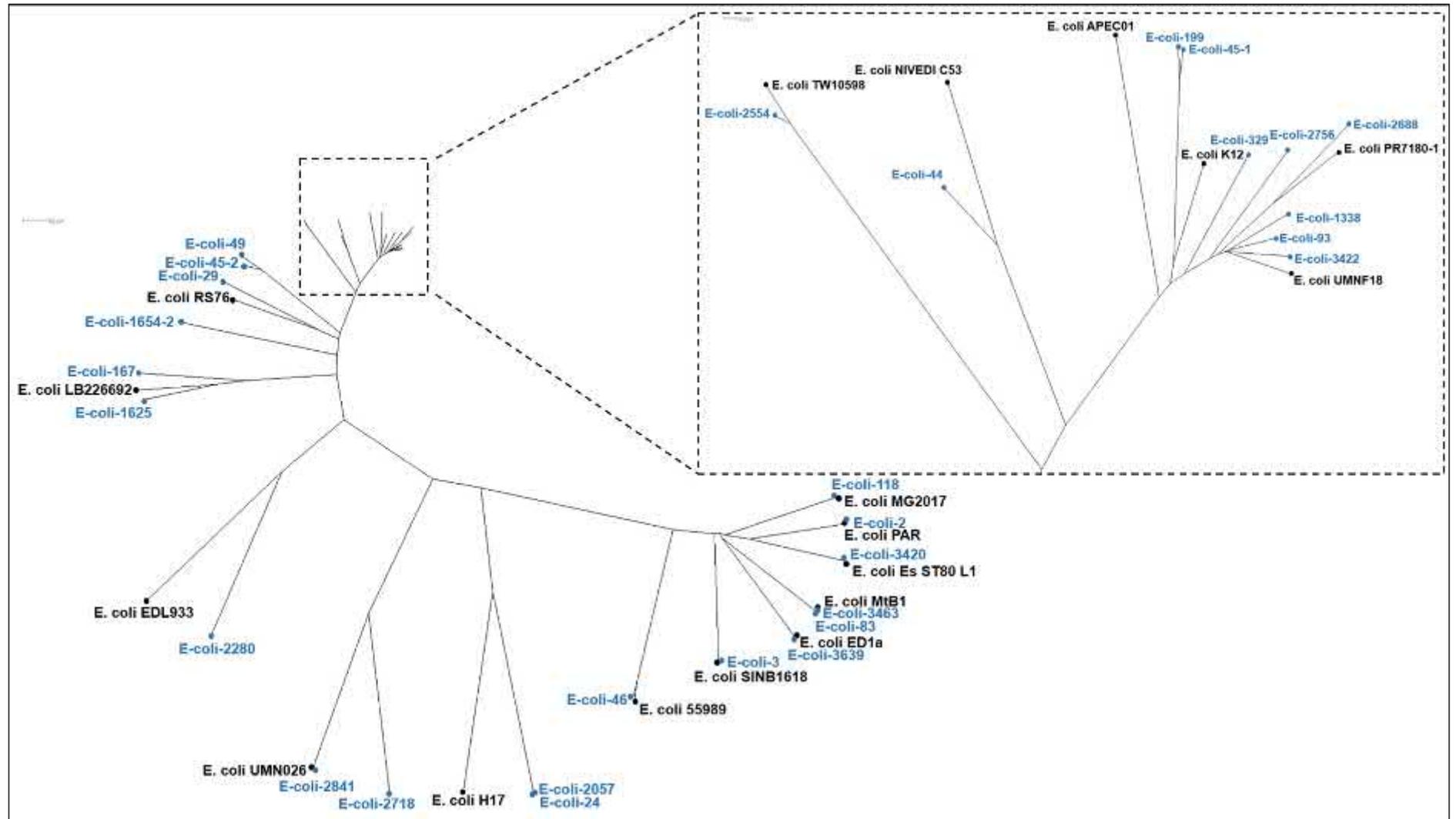


Рисунок 26 - Филогенетическое древо на основе определенных коровых SNP 29 штаммов *E. coli* (без штамма *E. coli*-1654-1) и полных геномов (хромосом), находящихся в базе данных DDBJ/EMBL/GenBank (статистический метод – NJ).

Результаты полногеномного секвенирования изученных штаммов *E. coli*, свидетельствует о том, что геносеротипирование позволяет выявить кластеры антигенов, несущих резервуар потенциальной патогенности (ЕТЕС, ЕІЕС и ЕхРЕС), определение которых классическими бактериологическими методами невозможно. Это имеет значение для изучения популяции ЕхРЕС и определения функции серогрупп в этом патотипе. Более того, определение О-серогрупп важно и при определении энтеропатогенных и энтерогеморрагических *E. coli*, являющихся возбудителем при пищевых вспышках. В связи с этим, введен в действие Межгосударственный Стандарт ГОСТ ISO/TS 13136-2016, регламентирующий метод определения бактерий *E. coli*, продуцирующих Шига-токсин, в том числе серогрупп О157, О111, О26, О103 и О145 в пищевых продуктах и кормах для животных [233, 288].

Дальнейшие исследования в области изучения генов вирулентности штаммов *E. coli*, необходимо направить на разработку диагностических методов, доступных для практических лабораторий. Кроме того, благодаря полученным данным, могут быть исследованы новые рубежи в открытии биомаркеров, понимании роли О-антигенов в патогенезе кишечных инфекций и другие.

Таким образом, молекулярное серотипирование предлагает альтернативные методы для серотипирования *E. coli*, и, кроме того, они могут сочетаться с анализами на специфические комплексы генов вирулентности, позволяя одновременно определять О- и Н-группу, патотип и патогенный потенциал штамма. Это важно использовать при расследовании эпидемических вспышек и определении источника инфекции.

2.6.2. Комплексы генов вирулентности *Escherichia coli*

E. coli является комменсалом кишечника человека. Однако иногда они вызывают внекишечные инфекции, такие как инфекции мочевыводящих путей, уропатогенные *E. coli* (UPEC). Они отличаются от комменсальных и диарейных штаммов филогенетическими группами и факторами вирулентности.

Комменсальные штаммы в основном относятся к филогенетическим группам А и В1, в то время как большинство ExPEC относятся к группе В2 или D [267].

Частота обнаружения генов, ассоциированных с вирулентностью, у штаммов *E. coli*, изолированных из толстой кишки пациентов с паразитарными инвазиями (лямблиоз, описторхоз) и воспалительными заболеваниями ЖКТ, представлена в таблице 10.

Среди группы генов, отвечающих за **адгезию**, у исследованных штаммов обнаружены *iha* (33,3%), *lpfA* (23,3%), *sfaS* (13,3%), *pic* (13,3%).

Геномы трети исследованных штаммов содержали *iha* (Adherence protein) - бактериальный белок, содержащийся в хромосомном острове *E. coli* и обеспечивающий адгезию. Способность прикрепляться к эпителиальным клеткам является важным признаком вирулентности, позволяющий патогенам эффективно доставлять токсины в клетки, преодолевать перистальтический клиренс и получать доступ к питательным веществам, полученным от хозяина [258].

Четверть штаммов обладали геном *lpfA* (Long polar fimbriae). Длиннополярные фимбрии способствуют колонизации *E. coli* и играют роль в патогенезе и вирулентности *Salmonella enterica* [243]. *Lpf* - один из немногих адгезивных факторов ЕНЕС O157:H7, связанных с колонизацией кишечника. Анализ базы данных генов, кодирующих основные фимбриальные субъединицы, показал, что они присутствуют как в комменсальных, так и патогенных (кишечных и внекишечных) штаммах *E. coli* [305].

Кроме того, были определены *sfaS* (S-fimbriae minor subunit) и *pic* (Serine protease autotransporters of *Enterobacteriaceae* SPATE). S-фимбриальные адгезины являются продуцентами патогенов внекишечной *E. coli* и вызывают инфекции мочевыводящих путей и менингит новорожденных. S-фимбриальные адгезины увеличивают степень фимбрирования и адгезионные свойства рекомбинантных штаммов *E. coli* K-12 [249]. Автотранспортеры сериновых протеаз *Enterobacteriaceae* - это внеклеточные протеазы, продуцируемые ими и выполняющие разнообразные функции (адгезин, протеаза, эстераза, липаза и другие) [210, 235, 269].

Таблица 10 - Частота обнаружения комплексов генов, ассоциированных с вирулентностью, штаммов *E. coli*, изолированных из толстой кишки пациентов с паразитарными инвазиями и воспалительными заболеваниями ЖКТ

Фактор вирулентности		Описторхоз		Лямблиоз		заболевания ЖКТ	
		абс. ч.	%	абс. ч.	%	абс. ч.	%
Адгезины:							
Adherence protein	<i>iha</i>	3	5,36	3	9,38	4	7,02
Long polar fimbriae	<i>lpfA</i>	1	1,79	2	6,25	4	7,02
S-fimbriae minor subunit	<i>sfaS</i>	3	5,36	-	0,00	1	1,75
Serine protease autotransporters of <i>Enterobacteriaceae</i> (SPATE)	<i>pic</i>	2	3,57	-	0,00	2	3,51
Итого		9		5		11	
Инвазии:							
Enterobactin siderophore receptor protein	<i>iroN</i>	4	7,14	-	0,00	2	3,51
Siderophore receptor	<i>ireA</i>	1	1,79	4	12,50	1	1,75
ABC transporter protein MchF	<i>mchF</i>	2	3,57	1	3,13	3	5,26
Hexosyltransferase homolog	<i>capU</i>	2	3,57	1	3,13	1	1,75
Итого		9		6		7	
Токсины:							
EAST-1 heat-stable toxin	<i>astA</i>	2	3,57	-	0,00	2	3,51
Cytotoxic necrotizing factor	<i>cnfI</i>	2	3,57	-	0,00	2	3,51
Vacuolating autotransporter toxin	<i>vat</i>	4	7,14	-	0,00	2	3,51
Secreted autotransporter toxin	<i>sat</i>	2	3,57	1	3,13	-	0,00
Salmonella HilA homolog	<i>eilA</i>	1	1,79	-	0,00	3	5,26
Plasmid-encoded enterotoxin	<i>senB</i>	2	3,57	2	6,25	2	3,51
Shigella IgA-like protease homologue	<i>sigA</i>	1	1,79	2	6,25	-	0,00
Итого		14		5		11	

Продолжение таблицы 10

Фактор вирулентности		Описторхоз		Лямблиоз		заболевания ЖКТ	
Бактериоцины:		абс. ч.	%	абс. ч.	%	абс. ч.	%
MchC protein	<i>mchC</i>	2	3,57	1	3,13	3	5,26
Microcin H47 part of colicin H	<i>mchB</i>	2	3,57	-	0,00	3	5,26
Microcin M part of colicin H	<i>mcmA</i>	2	3,57	-	0,00	3	5,26
Colicin B	<i>cba</i>	1	1,79	-	0,00	-	0,00
Colicin M	<i>cma</i>	1	1,79	-	0,00	-	0,00
Endonuclease colicin E2	<i>celB</i>	1	1,79	3	9,38	1	1,75
Итого		9		4		10	
Ферменты:							
Glutamate decarboxylase	<i>gad</i>	8	14,29	9	28,13	8	14,04
Increased serum survival	<i>iss</i>	6	10,71	3	9,38	7	12,28
Enterocoagulative immunoglobulin repeat protein	<i>air</i>	1	1,79	-	0,00	3	5,26
		15		12		18	
Всего комплексов генов <i>E. coli</i>		56	38,6±4,0*	32	22,1±3,4*	57	39,3±4,1*

Примечание: * - статистически значимые отличия (описторхоз – лямблиоз - $p < 0,001$; ВЗ ЖКТ – лямблиоз - $p < 0,002$)

В группе комплексов генов, выполняющих функции **инвазинов**, обнаруженных в геномах исследованных нами штаммов *E. coli*, идентифицировались *iroN* (20%), *ireA* (20%), *mchF* (20%), *capU*.

У пятой части изолятов *E. coli* в составе генома определялся *iroN* (Enterobactin siderophore receptor protein) – белки-рецепторы, функционирующие как рецепторы сидерофора и являющиеся фактором вирулентности, по крайней мере, для инфекции мочевыводящих путей [291, 292]. Показано, что рецептор сидерофора *IroN* участвует в проникновении в клетки уротелия ExPEC in vitro [216]. У такого же количества исследованных штаммов *E. coli* нами был выявлен рецептор сидерофоров *ireA* (Siderophore receptor), участвующий в транспорте цитрата трехвалентного железа. Известно, что *ireA* кодирует новый фактор вирулентности, который участвует в получении Fe [282]. В группе генов, кодирующих функции инвазинов были определены мембранные белки–транспортеры *mchF* (ABC transporter protein), которые осуществляют перенос разнообразных субстратов через клеточные мембраны [304], а также ген гомолог гексозилтрансферазы *capU* (Enteroaggregative *E. coli* - EAEC), являющейся кишечным патогеном, обнаруживаемым во всем мире в связи с острой и постоянной диареей у детей и взрослых [271, 259].

Геномы штаммов *E. coli*, изолированные от пациентов с паразитарными и воспалительными заболеваниями ЖКТ, также содержали следующие комбинации генов, обеспечивающих **токсические свойства**: *astA*, *cnf1*, *vat*, *sat*, *eilA*, *senB*, *sigA*. EAST-1 heat-stable toxin (*astA*) - термостабильный энтеротоксин, фактор вирулентности, который присутствует у комменсальных, агрегационных и неагрегационных штаммов *E. coli* [265, 267]. Основным агентом диареи, вызванной ЕТЕС, является бактериальный термостабильный энтеротоксин [310]. Ген, кодирующий *cnf* (цитотоксический некротизирующий фактор - Cytotoxic necrotizing factor), локализован на хромосоме уропатогенных *E. coli* в составе ОП. Эпидемиологические данные подтверждают значение *cnf1* как фактора вирулентности при внекишечных инфекциях у человека [218]. Вакуолирующий аутотранспортный токсин *Vat* (Vacuolating autotransporter toxin), представляет

собой цитотоксин, способствующий проявлению уropатогенности *E. coli* (UPEC) [273]. Секретируемый аутотранспортный токсин *sat* (Secreted autotransporter toxin), принадлежащий подсемейству аутотранспортеров сериновой протеазы Enterobacteriaceae (SPATE), действует как фактор вирулентности в экстраинтестинальных и кишечных патогенных штаммах *E. coli* [254] и обладает цитотоксическим эффектом [304]. Белок *eilA* (Salmonella HiLA homolog) является главным регулятором острова патогенности сальмонелл и штаммов *E. coli*, как патогенных, так и непатогенных и связан с формированием биопленки [237]. Ген *sen* (Plasmid-encoded enterotoxin) – энтеротоксин, обнаруженный в EIEC и *Shigella spp* [271]. Показано, что некоторые гены, кодирующие токсины, могут быть перенесены из патотипов DEC в UPEC, поэтому эти изоляты могут превращаться в потенциальных агентов, вызывающих диарею [236, 267].

Группа генов – бактериоцинов, обнаруженных в геноме исследуемых нами штаммов *E. coli*, изолированных от пациентов с пазатарными инвазиями и ВЗ ЖКТ, представлена микроцинами и колицинами: *mchC* (2%), *mchB* (16,7%), *mcmA* (16,7%), *cba* (3,3%), *cma* (3,3%), *celB* (16,7%).

Микроцины *mchC* (MchC protein), *mchB* (Microcin H47 part of colicin H), *mcmA* (microcin M part of colicin H) - группа низкомолекулярных бактериоцинов пептидной природы, продуцируемых энтеробактериями и оказывающих антибактериальное действие на родственные бактерии [196, 197, 245, 293]. Колицины - крупные белки с высокой молекулярной массой (Colicin B (*cba*), Colicin M (*cma*), Endonuclease colicin E2 (*celB*)). Широкий спектр колицинов и микроцинов включает многочисленные цитотоксические механизмы: образование пор, разложение предшественников пептидогликана; фосфатазную активность, РНКазную (часто направленная на 16S рРНК и специфические тРНК) и ДНКазную активность [204, 234].

Нами обнаружено, что 25 штаммов из 30 изолятов от пациентов при инфекционно-инвазионном процессе, обладают ферментом, катализирующий процесс декарбоксилирования Glutamatedecarboxylase (*gad*), таблица 10. Он

экспрессируется *E. coli* и другими кишечными бактериями, как комменсальными, так и патогенными в ответ на стрессовые воздействия окружающей среды [205].

В геноме исследованных штаммов *E. coli* определялся ген повышенной выживаемости в сыворотке *iss* (Increased serum survival) и поверхностный белок, аутоотранспортер сериновой протеазы *air* (Enteroaggregative immunoglobulin repeat protein), которые идентифицируются как факторы вирулентности *E. coli* [229, 232, 241, 312].

Результаты полногеномного секвенирования штаммов *E. coli*, изолированных от больных паразитарными инвазиями и воспалительными заболеваниями ЖКТ, свидетельствуют о наличии у них 25 комплексов генов вирулентности: адгезинов - *pic*, *sfaS*, *iha*, *lpfA*; инвазинов - *mchF*, *iroN*, *ireA*, *capU*; токсинов - *astA*, *cnf1*, *vat*, *sat*, *senB*, *eilA*, *sigA*; бактериоцинов – *mchB*, *mchC*, *mcmA*, *cba*, *cta*, *celB*. Практически у всех штаммов (80 %) обнаружен ген increased serum survival (*iss*) – ген повышенной выживаемости в сыворотке крови, а также ген Glutamate decarboxylase (*gad*) – фермент, катализирующий процесс декарбоксилирования в микробной клетке. Ген enteroaggregative immunoglobulin repeat protein (*air*), который все чаще признается причиной диарейных заболеваний, и ген Salmonella HilA homolog (*eilA*), являющийся главным регулятором «острова патогенности», определены у 3-х штаммов *E. coli*. Выявлено, что 38,6% от всего количества идентифицированных комплексов генов, ассоциированных с вирулентностью, пришлось на штаммы *E. coli*, изолированные от больных описторхозом и 39,3% - при воспалительных заболеваниях ЖКТ. В международном банке данных (GenBank) депонированы нуклеотидные последовательности штаммов *E. coli*, отличающиеся наличием генов, ассоциированных с вирулентностью и резистентностью (Приложение 2). Таким образом, описторхозная инвазия в большей степени влияет на колонизацию организма человека штаммами *E. coli*, носителями кластеров генов патогенности и вирулентности, что возможно связано с нарушением иммунитета, либо более выраженным влиянием метаболитов *O. felineus*.

Заключение

При всех паразитарных инвазиях, взятых в исследование, зарегистрированы нарушения кишечного микробиоценоза, как по содержанию индигенной микрофлоры, так и УПМ. При лямблиозе, токсоплазмозе, токсокарозе и иксодовом клещевом боррелиозе выявлен выраженный дефицит бактерий рода *Lactobacillus*, при описторхозе – *Bifidobacterium spp.*

Характеристика возрастных особенностей микробиоценоза при лямблиозе выявила различия в трех возрастных группах: дети до 7 лет, 8 – 14 лет и взрослые. Микробиоценотические изменения толстой кишки у детей 8 – 14 лет выражены слабее: чаще встречается I степень нарушений, характеризующаяся снижением количества нормофлоры. У детей до 7 лет лямблиоз протекает с ярко выраженными нарушениями микробиоценоза ТК: на фоне дефицита бактерий рода *Lactobacillus* возрастает количество *S. aureus*, бактерий родов *Klebsiella*, *Enterobacter* и *Citrobacter*. При тканевых паразитозах (токсоплазмозе и токсокарозе) содержание *E. coli* (Gem+) выше, вместе с тем, дефицит *E. coli* с нормальной ферментативной активностью находится в прямой корреляционной зависимости с *E. coli* (Lac-).

Среди УПМ из содержимого толстой кишки пациентов с паразитозами чаще высеивались бактерии рода *Klebsiella*. преимущественно, при лямблиозе и тканевых паразитозах (токсоплазмозе и токсокарозе). Вторые позиции принадлежали бактериям *S. aureus* и грибам рода *Candida*. Бактерии рода *Proteus* чаще высеивались при ИКБ.

Результаты, полученные на основе серотипирования методом полногеномного секвенирования, свидетельствовали о наличии у изученных штаммов *E. coli* кластеров генов O- и H-серогрупп, относящихся к диареегенным - энтеротоксигенным (ЕТЕС) и энтероинвазивным (ЕИЕС). Выявлены кластеры генов O-серогрупп внекишечных патогенных *E. coli* (ExPEC), являющихся возбудителями инфекций мочевыводящих путей, бактериемий, менингитов. Треть исследуемых штаммов по O-антигену отнесены к патотипу ЕТЕС. Среди ЕТЕС обнаружен серотип O6, в основном при описторхозной инвазии, серотипы O25 -

при описторхозной инвазии и воспалительных заболеваниях ЖКТ. У пациентов с паразитозами были обнаружены гены серогрупп O144 и O28ab, относящихся к ЕПЕС. Среди серотипов, отнесенных к ЕхРЕС, обнаружены кластеры антигенов O1, O2 и O9 серогрупп, чаще они обнаруживались в группе пациентов с воспалительными заболеваниями ЖКТ.

Показано, что 38,6% от всего количества идентифицированных комплексов генов, ассоциированных с вирулентностью, пришлось на штаммы *E. coli*, изолированных при описторхозе и 39,3% - при воспалительных заболеваниях ЖКТ. По сравнению с лямблиозом, описторхозная инвазия в большей степени влияет на колонизацию организма человека штаммами *E. coli*, носителями кластеров генов патогенности и вирулентности ($p < 0,001$), что возможно связано с более выраженным нарушением иммунитета, либо влиянием метаболитов *O. felineus*.

Исследование микробиоценоза толстой кишки при различных паразитозах является важным звеном в изучении патогенетических механизмов влияния симбионтных отношений на организм человека. Под действием симбионтов (паразитов и/или бактерий) в условиях миграции патогенов и токсинов в различные биотопы происходит модификация факторов персистенции и вирулентности микроорганизмов, что требует проведения более глубоких исследований.

ГЛАВА 3. МЕЖПОПУЛЯЦИОННЫЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ СОЧЛЕНОВ МИКРОПАРАЗИТОЦЕНОЗА

3.1. Паразитоценотические отношения в микропопуляциях условно патогенных бактерий и марит *Opisthorchis felineus*

Для изучения характера взаимоотношений в микропопуляции условно-патогенных бактерий и гельминтов использовали модифицированную методику по совместному культивированию, предложенную Г. В. Кондинским [85].

Исследований, посвященных вопросу влияния гельминтов на биологические свойства сопутствующей в паразитоценозе микрофлоры, чрезвычайно мало. Вместе с тем, результаты таких исследований с позиции изучения закономерностей функционирования микропаразитоценозов помогут выяснить патогенетические механизмы воздействия паразита на организм хозяина, в частности, выявить факторы, влияющие на состав кишечной микрофлоры и биологические свойства отдельных ее видов.

В Тюменском научно-исследовательском институте краевой инфекционной патологии проводятся многолетние исследования по изучению дисбиотических состояний кишечника и других локусов организма при паразитарных инвазиях, в частности, контаминацией условно патогенными бактериями дуоденального содержимого при описторхозной инвазии. Исследованиями Г. В. Кондинского с соавторами [86, 87] по выявлению симбионтов *O. felineus* установлено, что в маритах накапливаются возбудители брюшного тифа с пониженными показателями вирулентности.

Человек в цикле развития *O. felineus* играет роль окончательного (дефинитивного) хозяина. Мариты *O. felineus*, поселяясь в желчных протоках, желчном пузыре, а также в поджелудочной железе выделяют конечные продукты жизнедеятельности (метаболиты) в окружающую среду, которые затем с желчью и соком поджелудочной железы поступают в желудочно-кишечный тракт [86, 251]. Здесь происходит их взаимодействие с представителями микробиоценоза кишечника.

При совместном паразитировании в организме окончательного хозяина марит *O. felineus* и УПМ, в частности бактерий *K. pneumoniae* и *S. aureus*, образуется своеобразная система, в которой осуществляется взаимовлияние паразита, его метаболитов и микроорганизмов. Роль симбионтной флоры в паразито-хозяинных отношениях существенна, но недостаточно изучена.

Определение взаимовлияния метаболитов марит *O. felineus* и бактерий (*K. pneumoniae* и *S. aureus*) осуществлялось в искусственной питательной среде 199 при их совместном культивировании на основе изучения некоторых физиологических функций половозрелых гельминтов и свойств бактерий. Полная гибель марит в опытных группах 1 и 2 произошла на восьмые сутки. В опытной группе 1 (мариты + *K. pneumoniae* +199 среда), их жизнеспособность была несколько выше (Таблица 11). При ежедневном подсчете количества живых и погибших марит, отмечались некоторые физиологические особенности, такие как наполненность пищеварительной системы и репродуктивных органов. Скорее всего, это свидетельствовало о разной степени зрелости марит *O. felineus*.

Таблица 11 - Жизнеспособность марит *O. felineus* при совместном культивировании с бактериями *K. pneumoniae* и *S. aureus*

Сутки наблюдения	Количество жизнеспособных марит <i>O. felineus</i> при сокультивировании:					
	с бактериями <i>K. pneumoniae</i> (опыт 1)		с бактериями <i>S. aureus</i> (опыт 2)		без бактерий (контрольная группа 3)	
	абс.	% ± m	абс.	% ± m	абс.	% ± m
1	12	100,00	12	100,00	12	100,00
2	12	100,00	12	100,00	10	83,33±11,74
3	8	66,67±16,64	10	83,33±11,74	10	83,33±11,74
4	8	66,67±16,64	4	33,33±23,55	10	83,33±11,74
5	7	58,33±18,61	2	16,67±26,34	4	33,33±23,55
6	2	16,67±26,34	1	8,33±27,62	2	16,67±26,34
7	2	16,67±26,34	1	8,33±27,62	2	16,67±26,34
8	0	-	0	-	0	-
9	0	-	0	-	0	-
10	0	-	0	-	0	-

Жизнеспособность бактерий *K. pneumoniae* и *S. aureus* при сокультивировании их в среде 199 без марит (контрольные группы 1 и 2) сохранялась до конца наблюдения (Рисунок 27). Максимальное значение КОЕ по суткам приходилось на первые 5 суток для обоих видов. Таким образом, питательная среда 199 не оказывала ингибирующего действия на рост и размножение бактерий указанных видов и не влияла на результаты сокультивирования бактерий в присутствии марит гельминта.

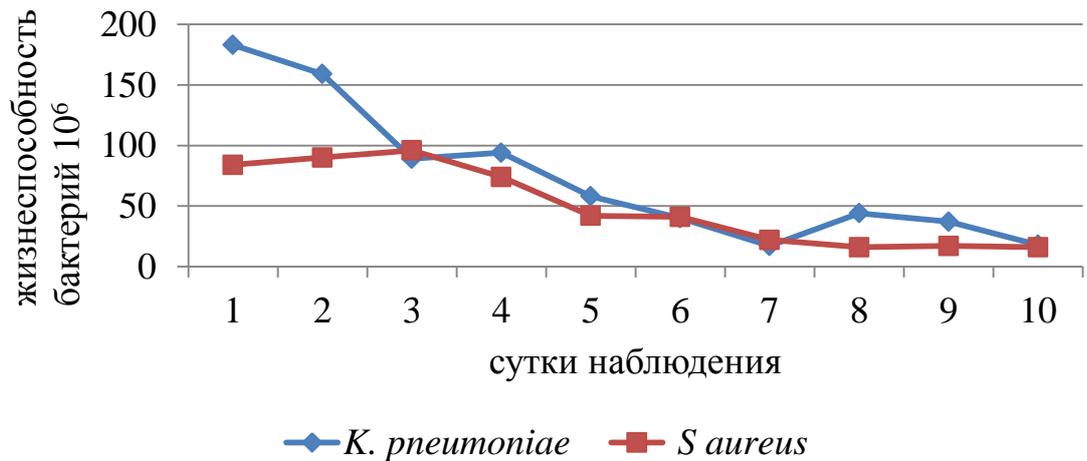


Рисунок 27 - Жизнеспособность бактерий *K. pneumoniae* и *S. aureus* при культивировании в среде 199

При совместном культивировании марит *O. felineus* и бактерий *K. pneumoniae* в питательной среде 199 (опытная группа 1) в течение первых четырех суток наблюдения жизнеспособность марит и бактерий оставалась практически на первоначальном уровне и составила в среднем 10 особей и $5,1 \times 10^7$ КОЕ/мл соответственно. На 5 – 6 сутки наблюдения количество бактерий *K. pneumoniae* в опыте снижалось до $2,9 \times 10^7$ КОЕ/мл, в то время как жизнеспособные мариты *O. felineus* на 5-е сутки еще сохранялись, а на 6-е и 7-е сутки наблюдения в опыте оставались единичные жизнеспособные мариты. При этом количество бактерий *K. pneumoniae* на 7 – 8 сутки увеличивается до $5,2 \times 10^7$ КОЕ/мл, но к 9 – 10 суткам снижается до $1,5 \times 10^7$ КОЕ/мл (Рисунок 28). Жизнеспособность *K. pneumoniae* в питательной среде без марит достоверно выше, чем с маритами (контрольная группа 1). По истечении 4-х суток наблюдения, в опытной группе 1, отмечалось

снижение количества жизнеспособных бактерий *K. pneumoniae* вплоть до 7-х суток.

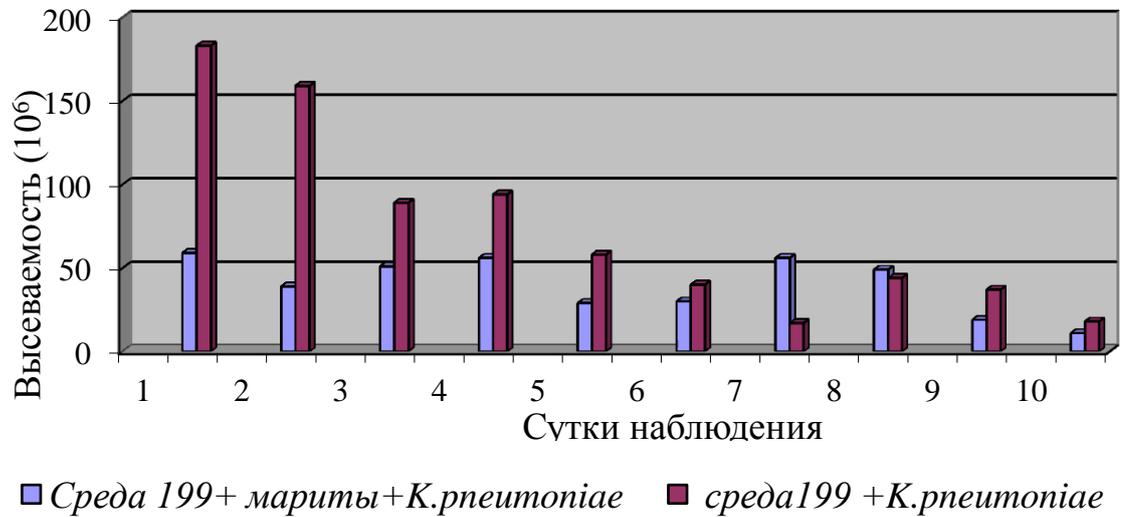


Рисунок 28 - Количество бактерий *K. pneumoniae* (КОЕ/мл) в питательной среде 199 при сокультивировании их с мартитами *O. felineus* и без них

Высеваемость бактерий *S. aureus* при их совместном культивировании с мартитами *O. felineus* (вторая опытная групп) представлена на рисунке 29. Отмечается резкое падение количества жизнеспособных бактерий ко 2-м суткам наблюдения с $7,5 \times 10^7$ до $0,6 \times 10^7$ КОЕ/мл.

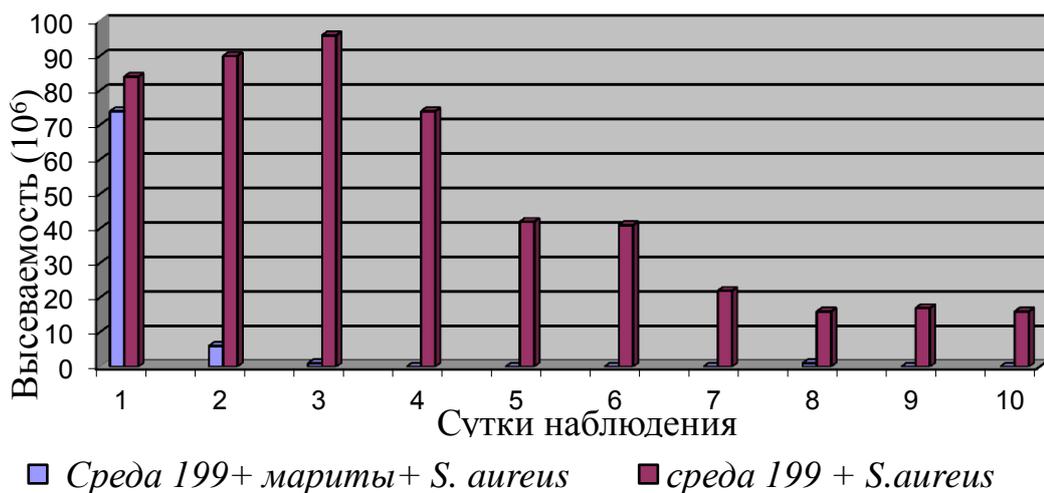


Рисунок 29 - Высеваемость бактерий *S. aureus* (КОЕ/мл) при культивировании в питательной среде 199 с мартитами *O. felineus* и без них

В контрольной группе 4 высеваемость бактерий *S. aureus* имела тенденцию к снижению на 5 – 6 сутки и до конца наблюдения оставалась на уровне $1,8 \times 10^7$ КОЕ/мл.

Количество жизнеспособных марит *O. felineus* при сокультивировании с бактериями *K. pneumoniae*, *S. aureus* и без них, представлено на рисунке 30. Жизнеспособность марит резко снижалась после 5-ти суток наблюдения и на 8 – 10 сутки жизнеспособных марит не остается. Эти данные получены во всех трех группах, характеризующих жизнеспособность марит – 1-й и 2-й опытных и 3 контрольной. Статистически значимых различий жизнеспособности марит *O. felineus* как в опытных группах, так и в контрольной, не зарегистрировано.

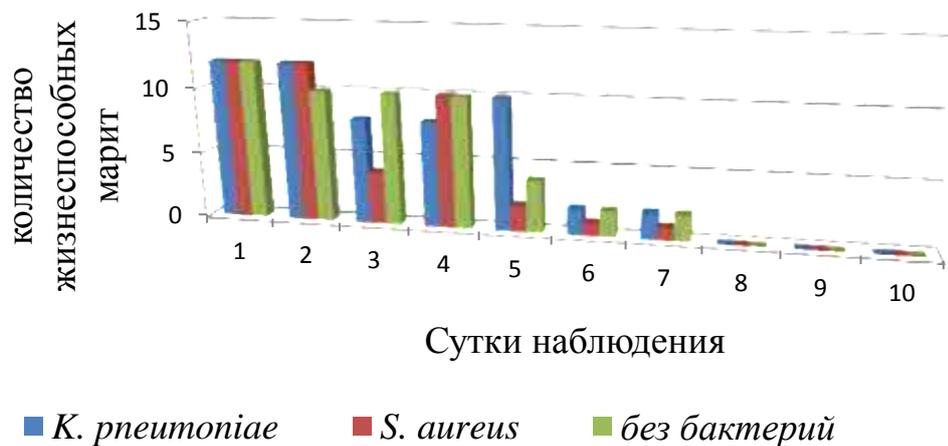


Рисунок 30 - Количество жизнеспособных марит *O. felineus* при совместном культивировании с бактериями *K. pneumoniae*, *S. aureus* и без них

В ходе эксперимента исследовалось влияние марит гельминта на изменение основных биохимических показателей, ферментов патогенности (гемолизин, лецитиназа, фосфатаза, желатиназа, плазмокоагулаза, лизоцим) фаголитическая активность и чувствительности к антибиотикам бактерий *K. pneumoniae* и *S. aureus* в процессе их сокультивировании ежедневно в течение 10 суток наблюдения. Было установлено, что бактерии *K. pneumoniae* в процессе наблюдения не изменили своих биохимических свойств и ферментов патогенности, за исключением разложения дульцита на 5 сутки, вариант контроля «питательная среда 199 + *K. pneumoniae*» и утилизации аргинина на вторые и

третьи сутки в обоих вариантах (Таблица 12, 13). Изучение чувствительности их к антибиотикам и специфическим бактериофагам (Таблица 14), также не выявило различий в показателях зоны подавления роста бактерий опытной и контрольной групп. Проведение аналогичных исследований с бактериями *S. aureus* (Таблица 15, 16, 17) различий не выявило.

Таким образом, можно предположить, что в эксперименте *in vitro* при совместном культивировании метаболиты марит *O. felineus* оказывают ингибирующее влияние на рост и размножение бактерий *K. pneumoniae* и *S. aureus*, причем *S. aureus* в большей степени. Вероятно, это может быть связано на первоначальном этапе с конкуренцией за питание, воздействием продуктов обмена марит гельминта на функционирование микроорганизмов. Поскольку этиологическим феноменом паразитоза является симбионтная флора и метаболиты марит *O. felineus*, необходимо продолжить изучение их влияния с применением современных технологий, углубленным изучением белковой структуры микроорганизмов с помощью протеомного анализа и молекулярно-генетических методов.

Результаты проведенных исследований свидетельствуют о том, что метаболиты марит *O. felineus* оказывают некоторое ингибирующее влияние на рост бактерий *K. pneumoniae* и *S. aureus*, а также при сокультивировании *in vitro* бактерии *K. pneumoniae* и *S. aureus* не оказывают угнетающего влияния на марины *O. felineus*.

Полученные результаты являются основой для внедрения принципов медицинской паразитоценологии в исследовательскую работу и практику здравоохранения, открывают перспективы по разработке методов диагностики, терапии и профилактики инфекционных и паразитарных болезней на основе фундаментальных научных знаний о закономерностях функционирования микропаразитоценозов человека.

ГЛАВА 4. МИКРОБИОЦЕНОЗ МОЛЛЮСКОВ СЕМЕЙСТВА *VITHYNIIDAE* КАК ОСНОВА ФОРМИРОВАНИЯ СИМБИОТИЧЕСКИХ ОТНОШЕНИЙ В СИСТЕМЕ «ПАРАЗИТ-ХОЗЯИН» ПРИ ОПИСТОРХОЗЕ

Методики исследования личинок и партенит трематод разнообразны, но не унифицированы. Выделение всех личиночных стадий онтогенеза, происходящих в организме переднежаберных моллюсков, проблематично. На наш взгляд, результаты исследований микробиоты (видового состава и биологических свойств) моллюсков битиниид - первых промежуточных хозяев *O. felineus*, можно экстраполировать на все личиночные стадии - мирацидии, спороцисты, редии и церкарии. Тем более, что первоначальный этап – выход из яйца мирацидия, протекает в кишечнике моллюска, в содержимом которого присутствует все разнообразие микробиоты как собственной, так и окружающей среды.

В ходе бактериологических исследований из моллюсков битиниид были изолированы бактерии, принадлежащие к 10 семействам, 29 родам и 90 видам, всего 937 штаммов. Изоляты бактерий условно разделены на 4 группы: 1) бактерии рода *Aeromonas* – 371 штамм; 2) неферментирующие грамотрицательные бактерии - 328 штаммов; 3) грамположительные спорообразующие палочковидные бактерии – 108; 4) бактерии семейства *Enterobacteriaceae* - 130.

4.1. Бактерии рода *Aeromonas*, основные представители микробиоты первого промежуточного хозяина *O. felineus*

Бактерии рода *Aeromonas* семейства *Aeromonadaceae* - это факультативно-анаэробные грамотрицательные палочки. В естественных условиях они способны размножаться при температуре от 4 до 45 °С, а также при pH среды от 4,5 до 9,8. Патогенные свойства *Aeromonas spp.* проявляются благодаря наличию у них цитолитического токсина, энтеротоксина, β-гемолизина.

Результаты исследования микробиоты метацеркарий *O. felineus* показали, что она представлена бактериями рода *Aeromonas*, идентифицировались следующие виды: *A. veronii*, *A. media*, *A. caviae*, *A. eucrenophila*, *A. encheleia*.

В ходе исследования микробиоценоза моллюсков идентифицирован 371 штамм бактерий рода *Aeromonas*: из моллюсков, собранных из реки Ирюм – 184 и реки Амур – 187. Видовой состав *Aeromonas spp.* представлен в таблице 18.

Таблица 18 – Структура видов бактерий рода *Aeromonas*, выделенных из моллюсков, обитающих в реках Ирюм и Амур

№ п/п	Виды бактерий рода <i>Aeromonas</i>	Количество штаммов		Всего штаммов, % ± m
		моллюски из реки Ирюм	моллюски из реки Амур	
1.	<i>A. veronii</i>	57	58	31,0 ± 4,31
2.	<i>A. hydrophila</i>	34	35	18,6 ± 4,68
3.	<i>A. ichthiosmia</i>	34	22	15,09 ± 4,78
4.	<i>A. bestiarum</i>	14	24	10,24 ± 4,92
5.	<i>A. salmonicida</i>	14	10	6,47 ± 5,02
6.	<i>A. eucrenophila</i>	11	24	9,43 ± 4,94
7.	<i>A. media</i>	13	5	4,85 ± 4,96
8.	<i>A. giandaei</i>	4	4	2,16 ± 5,04
9.	<i>A. caviae</i>	1	1	0,54 ± 5,18
10.	<i>A. enchelia</i>	1	0	0,27 ± 5,18
11.	<i>A. popoffii</i>	0	4	1,08 ± 5,16
12.	<i>A. molluscorum</i>	1	0	0,24 ± 5,16
	Всего	184	187	100

Бактерии рода *Aeromonas* были обнаружены и в среде обитания (воде и придонном грунте водоема) первых промежуточных хозяев *O. felineus*. В структуре микробиоценоза моллюсков содержание этих бактерий составило 39,57±2,54%. Спектр выделенных бактерий рода *Aeromonas* очень широк и представлен следующими видами: *A. veronii*, *A. hydrophyla*, *A. ichthiosmia*, *A. salmonicida*, *A. bestiarum*, *A. eucrenophila*, *A. media*, *A. cavia*, *A. giandaei*, *A. enchelia*, *A. popoffii*, *A. molluscorum* (Рисунок 31). Лидирующее место в структуре видового состава занимают *A. veronii*, *A. hydrophyla*, *A. ichthiosmia*. Важно

подчеркнуть, что бактерии рода *Aeromonas* обнаруживались практически в каждой особи моллюска, причем от 2 до 6 видов в одной особи.

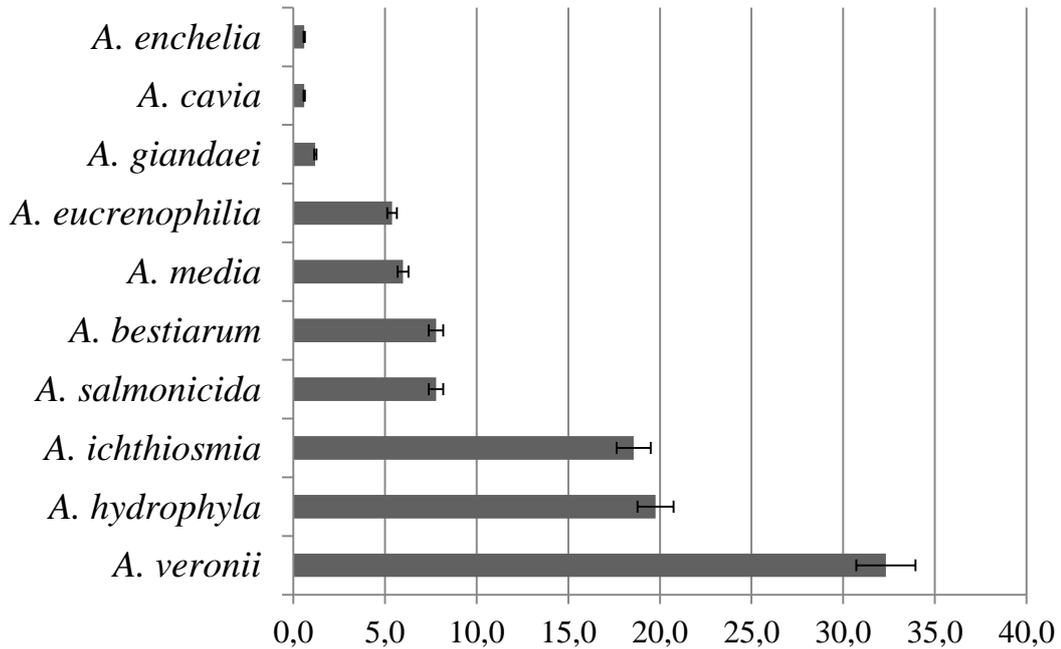


Рисунок 31 - Видовая структура бактерий рода *Aeromonas*, выделенных из моллюсков битиниид

Видовой состав *Aeromonas spp.*, идентифицированных из моллюсков и среды их обитания, показан в таблице 19. Чаще всего выделялись *A. veronii*, *A. hydrophila*, *A. ichthiosmia*.

Таблица 19 - Видовой состав бактерий рода *Aeromonas* в микросимбиозе моллюсков *Bithyniidae* и мест их обитания

Микросимбиоз моллюсков	Микросимбиоз водоема	Микросимбиоз придонного грунта
<i>A. veronii</i>	<i>A. veronii</i>	<i>A. veronii</i>
<i>A. hydrophila</i>	<i>A. hydrophila</i>	-
<i>A. ichthiosmia</i>	<i>A. ichthiosmia</i>	<i>A. ichthiosmia</i>
<i>A. bestiarum</i>	-	-
<i>A. salmonicida</i>	-	-
<i>A. eucrenophila</i>	-	-
<i>A. media</i>	-	-
-	<i>A. caviae</i>	-

При сравнении микробиоценоза моллюсков и среды их обитания выявлено, что спектр видов рода *Aeromonas* в микробиоценозе моллюсков намного шире. Отмечено 3 вида бактерий общих для моллюска и водной среды; 2 вида - для моллюсков и придонного грунта водоема.

Известно, что *Aeromonas spp.* распространены повсеместно в различных водных объектах. Они изолированы из воды рек, озер, прудов, морской воды (устья), питьевой воды, грунтовых и сточных вод. Нередко бактерии рода *Aeromonas* обнаруживаются в пищевых продуктах. Их выделяли из морепродуктов, рыбы, овощей, сырого молока, мяса курицы, баранины, телятины, свинины, говяжьего фарша. Некоторые виды *Aeromonas* являются патогенами рыб: *A. salmonicida*, *A. hydrophila*, *A. media*. Вместе с тем, *Aeromonas* – патоген животных и человека с нарушением иммунной системы. Таким образом, повышенные концентрации *Aeromonas spp.* в водных экосистемах в теплые месяцы создают возможность для воздействия на организм рыбы, животных и человека, следовательно, повышается риск развития инфекции и/или колонизации этими микробами. Поскольку животные являются резервуаром для внедрения и обмена видов *Aeromonas* в окружающем микробном мире, потенциал для инфекции *Aeromonas* зоонозного происхождения постоянно нарастает [239].

Водные штаммы представлены только четырьмя видами: *A. veronii*, *A. hydrophila*, *A. ichthiosmia*, реже - *A. caviae*. Изучение биологических свойств наиболее часто встречающихся видов, выделенных из моллюсков и места их обитания, показало следующие результаты. Абсолютно все исследованные штаммы обладали гемолитической активностью и характеризовались отсутствием лизоцима и плазмокоагулазы. По наличию лецитиназы отмечаются некоторые различия у штаммов, выделенных из моллюсков и воды, хотя они не имели статистически достоверных различий (Рисунок 32).

Адаптация микроорганизмов в среде обитания (биотопе хозяина) определяется наличием комплекса биологических свойств, среди которых способность инактивировать лизоцим и формировать биопленки являются

универсальными факторами, способствующими выживаемости микробиоты и составляющими системообразующий фактор микросимбиоза [209].

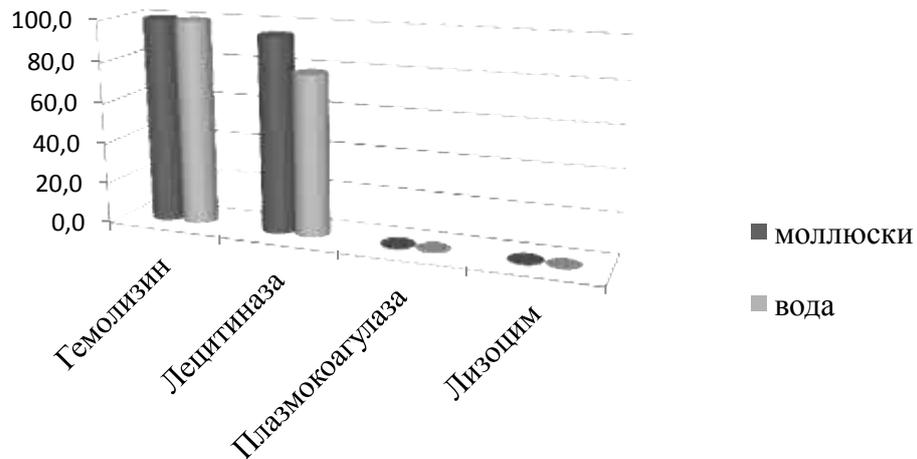


Рисунок 32 - Наличие факторов патогенности бактерий рода *Aeromonas*, выделенных из моллюсков битиниид и воды водоема

Проведенные исследования позволили установить, что выраженность антилизоцимной активности (АЛА) и биопленкообразования (БПО) бактерий рода *Aeromonas* варьировали в зависимости от источника выделения штаммов. Изменения вышеуказанных показателей в зависимости от их видовой принадлежности нами не выявлено. Штаммы, изолированные из моллюсков битиниид, проявляли более высокие значения АЛА, показатель составил $0,7 \pm 0,05$ мкг/мл*ОП, в то время как аналогичный показатель для водных штаммов *Aeromonas spp.* - $0,5 \pm 0,04$ мкг/мл*ОП. Что касается БПО, культуры, выделенные из воды, имели более высокие значения - $0,4 \pm 0,02$ OD450, по сравнению с подобными показателями у штаммов, изолированных из моллюсков - $0,3 \pm 0,01$ OD450 (Таблица 20).

Таблица 20 - Показатели антилизоцимной активности и биопленкообразования бактерий рода *Aeromonas*, выделенных из моллюсков битиниид и воды водоема

Штаммы <i>Aeromonas</i> , выделенные из:	Количество штаммов	АЛА (мкг/мл*ОП)	БПО (OD450)
моллюски	40	$0,7 \pm 0,05$	$0,3 \pm 0,01$
вода водоема	14	$0,5 \pm 0,04$	$0,4 \pm 0,02$

Результаты проведенных исследований показали, что бактерии рода *Aeromonas* широко представлены в микробиоценозе как моллюсков битиниид, так и в местах их обитания (вода). При определении биологических свойств микроорганизмов было установлено, что выраженность антилизосимной активности и биопленкообразования бактерий рода *Aeromonas* варьировали в зависимости от источника выделения штаммов. Показано, что бактерии рода *Aeromonas* являются одними из типичных представителей микробиоты водоема, что делает их возможным кандидатом на роль бактерий, способных колонизировать моллюсков.

Таким образом, бактерий рода *Aeromonas*, присутствующие в микросимбиоценозе моллюсков, обладают комплексом биологических свойств, в том числе таких, как способность инактивировать лизоцим и формировать биопленки, что способствует адаптации микроорганизмов к среде обитания. Полученные данные вносят вклад в расшифровку механизмов формирования, поддержания и функционирования ассоциативного микропаразитоценоза.

4.2. Неферментирующие грамотрицательные бактерии – сочлены микробиоценоза первых промежуточных хозяев *Opisthorchis felineus*

Из группы неферментирующих грамотрицательных бактерий (НГОб), выделенных из моллюсков семейства *Bithyniidae*, изолировано 328 штаммов ($35,01 \pm 2,63\%$). Были идентифицированы бактерии родов *Acinetobacter* – 79 (42/37 р. Ирюм и р. Амур соответственно); *Pseudomonas* – 85 (71/14 соответственно); рода *Shewanella* – 58 (48/10); *Comamonas* - 49 (44/5) и прочие – 57 (57/0) (Таблица 21). Штаммы бактерий, выделенные из моллюсков и идентифицированные как НГОб, отнесены к 6 семействам и 8 родам: *Pseudomonadaceae* (род *Pseudomonas*), *Moraxellaceae* (род *Acinetobacter*), *Comamonadaceae* (роды *Comamonas* и *Delftia*), *Shewanellaceae* (род *Shewanella*), *Xanthomonadaceae* (род *Stenotrophomonas*), *Flavobacteriaceae* (роды *Chryseobacterium*, *Empedobacter*); кроме того, встречались единичные виды: *Myroides odoratiminas*, *Wautersiella folsonii*.

Таблица 21 - Количество и видовой состав штаммов НГОБ, выделенных из моллюсков, обитающих в реках Ирюм и Амур

№ п/п	НГОБ	Количество штаммов		Всего штаммов % ± m
		моллюски из р. Ирюм	моллюски из р. Амур	
1.	<i>Acinetobacter baylyi</i>	1	6	2,21 ± 5,46
2.	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	0	1	0,32 ± 5,52
3.	<i>Acinetobacter shindleri</i>	1	0	0,32 ± 5,52
4.	<i>Acinetobacter johnsonii</i>	17	1	5,68 ± 5,36
5.	<i>Acinetobacter junii</i>	13	7	6,31 ± 5,34
6.	<i>Acinetobacter haemolyticus</i>	0	4	1,26 ± 5,49
7.	<i>Acinetobacter parvus</i>	0	1	0,32 ± 5,52
8.	<i>Acinetobacter tandoii</i>	5	12	5,36 ± 5,37
9.	<i>Acinetobacter guillouiae</i>	3	1	1,26 ± 5,49
10.	<i>Acinetobacter pittii</i>	1	1	0,63 ± 5,51
11.	<i>Acinetobacter radioresistens</i>	0	1	0,32 ± 5,52
12.	<i>Acinetobacter lwofii</i>	1	1	0,63 ± 5,51
13.	<i>Acinetobacter tjernbergiae</i>	0	1	0,32 ± 5,52
14.	<i>Shewanella putrefaciens</i>	40	8	15,14 ± 5,08
15.	<i>Shewanella profunda</i>	8	2	3,15 ± 5,44
16.	<i>Pseudomonas putida</i>	18	2	6,31 ± 5,34
17.	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1	0	0,32 ± 5,52
18.	<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	5	1	1,89 ± 5,47
19.	<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i>	5	0	1,58 ± 5,48
20.	<i>Pseudomonas monteilii</i>	5	1	1,89 ± 5,47
21.	<i>Pseudomonas oleovorans</i>	3	0	0,95 ± 5,5
22.	<i>Pseudomonas fulva</i>	2	0	0,63 ± 5,51
23.	<i>Pseudomonas giessenii</i>	1	0	0,32 ± 5,52
24.	<i>Pseudomonas mendocina</i>	7	7	4,42 ± 5,4
25.	<i>Pseudomonas mosselii</i>	14	0	4,42 ± 5,4
26.	<i>Pseudomonas frederiksbergens</i>	1	0	0,32 ± 5,52
27.	<i>Pseudomonas alcaligenes</i>	9	0	2,84 ± 5,45
28.	<i>Pseudomonas spp.</i>	0	3	0,95 ± 5,5
29.	<i>Chryseobacterium gleum</i>	17	0	5,36 ± 5,37
30.	<i>Comamonas terrigena</i>	12	0	3,79 ± 5,42
31.	<i>Comamonas testosteroni</i>	15	0	4,73 ± 5,39
32.	<i>Comamonas aquatica</i>	17	5	6,94 ± 5,33
33.	<i>Delftia acidovorans</i>	23	0	7,26 ± 5,32
34.	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	9	0	2,84 ± 5,45
35.	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i>	1	0	0,32 ± 5,52
36.	<i>Stenotrophomonas acidaminiphila</i>	1	0	0,32 ± 5,52
37.	<i>Acidovorax</i>	1	0	0,32 ± 5,52
38.	<i>Empedobacter brevis</i>	5	0	1,58 ± 5,48
	Всего	262	66	328

Структура НГОБ, сочленов микробиоценоза моллюсков семейства *Bithyniidae* представлена на рисунке 33. По частоте обнаружения лидирующее положение занимали бактерии родов *Pseudomonas* и *Comamonas*, к представителям которых отнесено более 50% всех выделенных микроорганизмов этой группы. Далее следовали бактерии родов *Acinetobacter*, *Shewanella*, *Delftia*, *Stenotrophomonas*, *Chryseobacterium*, *Empedobacter*.

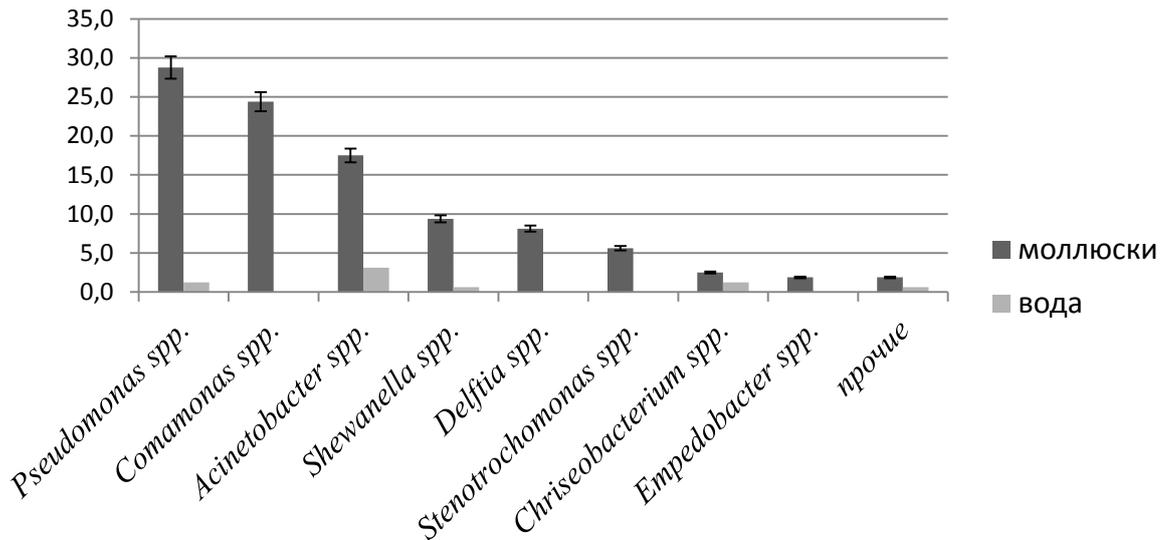


Рисунок 33 - Структура НГОБ, сочленов микробиоценоза моллюсков семейства *Bithyniidae* и среды их обитания (%)

Самой многочисленной и разнообразной группой НГОБ, выделенных из битиниид, оказались бактерии рода *Pseudomonas*, представленные следующими видами: *P. putida*, *P. alcaligenes*, *P. mosselii*, *P. mendocina*, *P. brassicacerum*, *P. chlororaphis*, *P. oleovorans*, *P. monteillii*, *P. aeruginosa*, *P. alcalifaciens*, *P. fulva*. Причем $20,62 \pm 9,05\%$ в структуре бактерий рода *Pseudomonas* идентифицировались *P. putida*, затем следовали *P. mendocina* и *P. mosselii* по $14,43 \pm 9,4\%$ соответственно, частота обнаружения остальных видов составила менее 10%.

При анализе состава микробиоценоза моллюсков и среды их обитания, установлено, что из 19 видов, обнаруженных как в моллюсках, так и в среде их обитания - водоеме, определены 2 общих вида: *P. putida* и *Shewanella putrefaciens*, и 1 общий вид бактерий *Acinetobacter junii* в пробах грунта (Таблица 22).

Таблица 22 - Видовой состав НГОБ в микробиоценозе моллюсков и мест их обитания

Микробиоценоз МОЛЛЮСКОВ	Микробиоценоз ВОДОЕМА	Микробиоценоз ГРУНТА
<i>Shewanella putrefaciens</i> ,	<i>Shewanella putrefaciens</i>	-
<i>Pseudomonas putida</i>	<i>Pseudomonas putida</i>	-
<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	-	-
<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i>	-	-
<i>Pseudomonas monteilii</i>	-	-
<i>Pseudomonas oleovorans</i>	-	-
<i>Pseudomonas fulva</i>	-	-
<i>Pseudomonas mendocina</i>	-	-
<i>Acinetobacter johnsonii</i>	-	-
<i>Acinetobacter junii</i>	-	<i>Acinetobacter junii</i>
<i>Acinetobacter tandoii</i>	-	-
<i>Acinetobacter guillouiae</i>	-	-
<i>Acinetobacter genomospecies</i>	-	-
-	<i>Acinetobacter pittii</i>	<i>Acinetobacter pittii</i>
-	-	<i>Acinetobacter baumannii</i>
<i>Chryseobacterium gleum</i>	-	-
<i>Comamonas terrigena</i>	-	-
<i>Comamonas testosteroni</i>	-	-
<i>Delftia acidovorans</i>	-	-

Количество выделенных штаммов указанных родов и их персистентные свойства: АЛА и БПО, представлены в таблице 23.

Таблица 23 - Персистентные свойства (АЛА мкг/мл*ОП и БПО OD450) НГОБ, представителей микробиоценоза моллюсков битинийд

НГОБ	Абс. число штаммов	Средние показатели АЛА	Штаммы с АЛА >1		БПО
			Показатель	Количество штаммов (%)	
<i>Pseudomonas spp.</i>	44	0,36±0,02	1,49±0,02	8 (18,18)	0,49±0,04
<i>Comamonas spp.</i>	39	0,51±0,02	1,55±0,02	11 (28,2)	0,43±0,03
<i>Acinetobacter spp.</i>	23	0,64±0,02	1,52±0,02	8 (34,78)	0,58±0,03
<i>Shewanella spp.</i>	14	0,26±0,02	1,74±0,03	1 (7,14)	0,45±0,03
<i>Delftia spp.</i>	13	0,78±0,01	1,7±0,01	4 (30,76)	0,49±0,03
<i>Stenotrophomonas spp.</i>	9	0,21±0,01	1,9±0,01	1 (11,11)	0,48±0,03
<i>Chryseobacterium spp.</i>	2	0,87±0,01	1,74±0,01	1 (50,0)	0,5±0,04
<i>Empedobacter spp.</i>	3	0,77±0,02	2,1±0,04	1 (33,33)	0,63±0,03
Прочие	2	0,49±0,01	0	0	0,43±0,05
Всего	149	0,54±0,02	1,54±0,02	35 (36,4)	0,5±0,04

Анализ показателей АЛА показал, что почти треть штаммов имели высокие значения. К ним относились бактерии родов *Acinetobacter*, *Delftia*, *Comamonas*, а также реже встречающиеся – *Chryseobacterium*, *Empedobacter*. Среди бактерий, относящихся к родам *Shewanella*, *Stenotrophomonas*, *Pseudomonas*, встречались единичные штаммы с высокими показателями АЛА.

По показателю АЛА *Pseudomonas spp.* разделены на группы со средними (от 1,0 до 1,5 мкг/мл*ОП) - *P. brassicacerum*, *P. monteillii*, *P. aeruginosa* и низкими значениями (от 0,5 до 1 мкг/мл*ОП) - *P. chlororaphis*. Количество штаммов с показателями АЛА более 1 мкг/мл*ОП составляли всего 18,18±5,8%. *Pseudomonas spp.*, имеющие АЛА менее 0,5 мкг/мл*ОП, относились к виду *P. putida*, остальные штаммы этого рода не обладали антилизоцимной активностью. Причем необходимо отметить, что реже встречающиеся виды обладали более высокими показателями АЛА. Штаммы *P. brassicacerum*, *P. monteillii*, обладающие высокими значениями АЛА, имели слабо выраженные свойства БПО (в 2 раза ниже средних). К штаммам *Pseudomonas spp.*, обладающих БПО более 0,5, относились такие виды, как *P. putida*, *P. mosselii*, *P. alcalifaciens*.

Следующая группа по частоте обнаружения в составе микробиоценоза моллюсков – это бактерии рода *Comamonas*, среди которых в $53,85 \pm 10,9\%$ случаев встречались *C. aquatica*. В сравнении с другими видами этого рода, они обладали наибольшим значением АЛА (в среднем $0,79 \pm 0,02$ мкг/мл*ОП) и наименьшим значением БПО – $0,35 \pm 0,04$ OD450. Причем, треть штаммов *C. aquatica* обладали высокой АЛА, показатель составил более $2,1 \pm 0,01$ мкг/мл*ОП. Другие виды этого рода идентифицированы как *C. terrigena* (АЛА – $0,19 \pm 0,01$ мкг/мл*ОП, БПО – $0,48 \pm 0,02$ OD450) и *C. testosteroni* (АЛА – $0,58 \pm 0,01$ мкг/мл*ОП, БПО – $0,46 \pm 0,04$ OD450). Необходимо отметить очень низкое значение АЛА штаммов *C. terrigena* при выраженной функции биопленкообразования.

Среди бактерий рода *Shewanella* идентифицировались штаммы видов *S. putrefaciens* и *S. profunda*. Микроорганизмы указанных видов обладали очень низкими значениями АЛА и БПО. Штаммы бактерий рода *Delftia* представлены одним видом *D. acidovorans* и высевались только из моллюсков, показатели АЛА и БПО представлены в таблице 23. Бактерии *Stenotrophomonas maltophilia* высевались значительно реже по сравнению с описанными выше видами и имели низкий показатель АЛА за исключением одного штамма, показатель АЛА которого составил $1,9 \pm 0,01$ мкг/мл*ОП.

Видовой состав бактерий рода *Acinetobacter* представлен преимущественно штаммами *A. junii* и *A. johnsonii*, кроме того, выделены единичные штаммы *A. tandoii*, *A. guillouiae* и *A. shindleri*. Важно подчеркнуть, что более трети штаммов ($34,78 \pm 8,0\%$), представителей этого рода, такие как *A. junii*, *A. johnsonii* и *A. tandoii*, имели высокие показатели АЛА (Таблица 24). По функции биопленкообразования среди бактерий рода *Acinetobacter* отмечены *A. junii*, имеющие максимальное значение.

Единичные штаммы бактерий *Chryseobacterium gleum* и *Empedobacter brevis* отличались более высокими средними значениями АЛА, которые были выше аналогичных показателей для всей группы бактерий. Показатели биопленкообразования бактерий *Empedobacter brevis* также превышали соответствующие средние показатели.

Таблица 24 - Видовая структура, показатели АЛА (мкг/мл*ОП) и БПО (OD450) бактерий рода *Acinetobacter*, составляющих микробиоценоз моллюсков битиниид

Виды бактерий рода <i>Acinetobacter</i>	Абс. число штаммов	Средние показатели АЛА	АЛА >1		БПО
			Показатель	Количество штаммов (%)	
<i>A. junii</i>	11	0,71±0,02	1,53±0,02	4 (36,4)	0,7±0,03
<i>A. johnsonii</i>	6	0,54±0,02	1,53±0,02	2 (33,3)	0,49±0,03
<i>A. tandoii</i>	3	0,99±0,03	1,48±0,03	2 (66,6)	0,49±0,04
<i>A. guillouiae</i>	2	0	0		0,42±0,05
<i>A. shindleri</i>	1	0,6±0,02	0		0,4±0,05
Всего	23	0,64±0,02	1,52±0,02	8 (34,8)	0,58±0,04

Микроорганизмы, изолированные из среды обитания моллюсков битиниид, отнесены к бактериям родов *Pseudomonas* (*P. aeruginosa* и *P. koreensis* – водные штаммы), *Acinetobacter*, *Chryseobacterium* и единичный штамм, определенный как *Rheinheimera soli*. Штамм бактерий *P. aeruginosa* отличался почти нулевым значением АЛА, а штамм *P. koreensis* имел высокий показатель БПО – 0,8±0,07 OD450. Среди штаммов рода *Acinetobacter*, выделенных из воды и грунта, определялись виды *A. junii*, *A. pittii*, *A. baumannii* и *A. coalcoceticus*. Среднее значение показателя АЛА этих штаммов составило 0,94±0,02 мкг/мл*ОП, при том, что у штаммов, выделенных из моллюсков - 0,64±0,02 мкг/мл*ОП. Что касается показателя АЛА больше 1 у штаммов, выделенных из среды обитания моллюсков (воды и придонного грунта), он составил 1,97±0,02 мкг/мл*ОП. Кроме того, водный штамм *S. putrefaciens* имел АЛА 1,19±0,02 мкг/мл*ОП, БПО – 0,62±0,01 OD450.

Сравнение средних значений АЛА свидетельствовало о том, что штаммы, выделенные из среды обитания моллюсков, имели более высокие значения и отличались почти в 2 раза от штаммов, выделенных из битиниид. Количество исследованных штаммов из среды обитания с показателями АЛА более 1 составило 36,4±15,2%, в то время как, выделенных из битиниид – 24,8±3,5%.

Таким образом, частота обнаружения штаммов НГОБ, циркулирующих в среде обитания моллюсков и обладающих выраженной АЛА, достоверно выше по сравнению со штаммами, выделенными из моллюсков. Сравнение водных штаммов и представителей микробиоты моллюсков по функции биопленкообразования различий не выявило.

Расшифровка механизмов ассоциативного симбиоза микроорганизмов и беспозвоночных животных (моллюсков) не представляется возможной без исследования его структуры и свойств микроорганизмов. Бактерии родов *Pseudomonas* и *Acinetobacter* широко распространены в почве и воде, растут в широком диапазоне температур и pH среды, используют огромное разнообразие субстратов для роста. В организме человека, бактерии этого рода встречаются в различных локусах. Чаще всего они выделяются в больничных стационарах среди персонала и пациентов и характеризуются высокой устойчивостью к антимикробным препаратам [262].

Микроорганизмы семейства *Comamonadaceae* рода *Comamonas* и вида *Delftia acidovorans* широко распространены в природе и часто встречаются в активном иле, почве, морской воде, на тканях растений и животных. Разнообразные ниши рода *Comamonas* делают его экологически важным и предполагают, что эта группа бактерий может хорошо экологически и физиологически адаптироваться к среде обитания [207, 261]. Бактерии *Chryseobacterium gleum* также повсеместно распространены в почве и воде [333, 339]. *Shewanella* единственный “неферментер”, вырабатывающий сероводород. Бактерии этого рода выделяются из пресной и морской воды, сточных вод, многих пищевых продуктов, ранее назывался *Pseudomonas putrefaciens* [294, 306].

Все указанные выше представители НГОБ имеют широкое географическое распространение в природе, они встречаются в различных экологических нишах, включая все водные объекты, обнаруживаются в почве, рыбе и продуктах питания. Многие из них нередко выделяются из клинических образцов, внешней среды больничных стационаров. Как условно-патогенные микроорганизмы,

инфицируют в первую очередь новорожденных и лиц с ослабленным иммунитетом во всех возрастных группах [285, 306].

Таким образом, в структуре микробиоценоза моллюсков битинид – первого промежуточного хозяина *O. felineus* лидирующее положение среди НГОБ занимали бактерии родов *Pseudomonas*, *Comamonas* и *Acinetobacter*; в структуре микробиоценоза их среды обитания – бактерии рода *Acinetobacter*. Нуклеотидные последовательности штамма *Acinetobacter baumannii*, изолированного из придонного грунта водоема, отличающегося наличием генов резистентности к бета-лактамам (blaOXA-104, ADC-30) и отсутствием маркеров резистентности к другим группам антибиотиков размещены в международной базе данных GenBank/NCBI, приложение 2. Штаммы с выраженной АЛА преимущественно встречались среди бактерий родов *Acinetobacter*, *Delftia* и *Comamonas*. Показано, что АЛА водных штаммов была на порядок выше штаммов, выделенных из моллюсков (2,13 и 0,9 мкг/мл*ОП соответственно). Разницы по свойству биопленкообразования не выявлено.

4.3. Спорообразующие грамположительные бактерии семейства *Bacillaceae*, представители микробиоты моллюсков битинид

В группе грамположительных спорообразующих палочковидных бактерий идентифицировано 108 штаммов, изолированных из моллюсков (89/19 реки Ирюм и Амур соответственно), что составило $11,53 \pm 3,07\%$. Среди штаммов семейства *Bacillaceae*, идентифицированы представители 4 родов: *Bacillus*, *Solibacillus*, *Lysinibacillus*, *Exiguobacterium*; и семейства *Paenibacillaceae*, родов *Brevibacillus* и *Paenibacillus* (Таблица 25).

Таблица 25 - Структура грамположительных спорообразующих бактерий, выделенных из моллюсков, обитающих в реках Ирюм и Амур

№ п/п	Виды бактерий семейства <i>Bacillaceae</i>	Количество штаммов		Всего штаммов % ± m
		моллюски из р. Ирюм	моллюски из р. Амур	
1.	<i>Bacillus pumilus</i>	24	1	23,15 ± 8,44

Продолжение таблицы 25

2.	<i>Bacillus licheniformis</i>	19	0	17,59 ± 8,68
3.	<i>Bacillus megaterium</i>	9	2	10,19 ± 9,06
4.	<i>Bacillus subtilis</i>	2	0	1,85 ± 9,48
5.	<i>Bacillus weihenstephanensis</i>	2	0	1,85 ± 9,48
6.	<i>Bacillus meristlavi</i>	2	0	1,85 ± 9,48
7.	<i>Bacillus thuringiensis</i>	5	0	4,63 ± 9,34
8.	<i>Bacillus cereus</i>	7	5	11,11 ± 9,02
9.	<i>Bacillus arcenicus</i>	0	1	0,93 ± 9,53
10.	<i>Bacillus bagius</i>	1	0	0,93 ± 9,53
11.	<i>Bacillus atrophaeus</i>	1	0	0,93 ± 9,53
12.	<i>Bacillus termoamilovorans</i>	1	0	0,93 ± 9,53
13.	<i>Bacillus sonorensis</i>	2	0	1,85 ± 9,48
14.	<i>Bacillus miroides</i>	2	0	1,85 ± 9,48
15.	<i>Solibacillus silvestris</i>	0	8	7,41 ± 9,21
16.	<i>Lysinibacillus sphaericus</i>	5	0	4,63 ± 9,34
17.	<i>Lysinibacillus fusiformis</i>	2	0	23,15 ± 9,48
18.	<i>Exiguobacterium aurantiacum</i>	0	2	1,85 ± 9,48
19.	<i>Brevibacillus borstelensis</i>	1	0	0,93 ± 9,53
20.	<i>Brevibacillus centrosporus</i>	1	0	0,93 ± 9,53
21.	<i>Paenibacillus amylolyticus</i>	1	0	17,59 ± 9,53
22.	<i>Paenibacillus macerans</i>	2	0	10,19 ± 9,48
	Всего	89	19	100

Микробиоценоз моллюсков битинийд отличался видовым разнообразием бактерий семейств *Bacillaceae* и *Paenibacillaceae*: *Bacillus*, *Solibacillus*, *Lysinibacillus*, *Exiguobacterium*, *Paenibacillus* и *Brevibacillus* (Рисунок 34). Наиболее многочисленный и разнообразный по видовому составу род *Bacillus*, на долю которого пришлось 78,9±3,81% выделенных штаммов этого семейства.

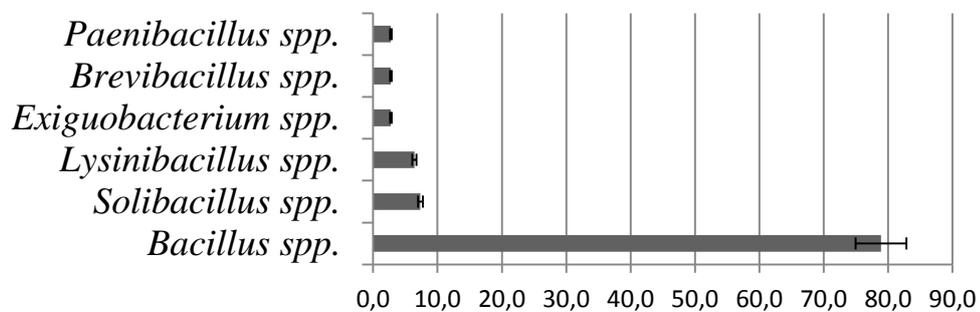


Рисунок 34 - Структура бактерий семейства *Bacillaceae*, входящих в состав микробиоценоза моллюсков (%)

Чаще всего определялись такие виды как *B. pumilus* (20 штаммов), *B. licheniformis* (19 шт.), *B. megaterium* (9 шт.), *B. cereus* (6 шт.), а также единичные виды: *B. thuringiensis*, *B. merisflavi*, *B. weihenstephanensis*, *B. mycoides*, *B. thermoamylovorans*, *B. sonorensis*, *B. atrophaeus*, *B. subtilis*, *B. badius*. На долю бактерий рода *Lysinibacillus* пришлось $6,48 \pm 2,37\%$, которые составили два вида *L. fusiformis* и *L. sphaericus*. Среди бактерий рода *Brevibacillus* идентифицировались три вида, такие как *B. berstelensis*, *B. centrosporus*, *B. agri* и в структуре составили $1,8 \pm 1,3\%$. На бациллы родов *Paenibacillus* и *Exiguobacterium* пришлось равное количество, которое составило по $3,53\%$ соответственно. Род *Paenibacillus* был представлен видами *Paenibacillus macerans* и *Paenibacillus amylolyticus*, к роду *Exiguobacterium* отнесен один вид *Exiguobacterium aurantiacum*.

Из воды рек идентифицировано 5 видов, относящихся к семейству *Bacillaceae*, из рода *Bacillus* - виды *B. pumilus*, *B. thuringiensis*, *B. weihenstephanensis*, *B. arsenicus*, из рода *Exiguobacterium* - один вид *E. aurantiacum*.

В исследуемых пробах придонного грунта водоема в местах сбора моллюсков идентифицировались наиболее часто встречающиеся в микробиоценозе моллюсков и воды водоемов виды *B. pumilus* и *B. megaterium*, а также не встречающийся в указанных объектах вид *B. flexus*. Кроме того, были идентифицированы бациллы *Exiguobacterium aurantiacum*, которые присутствуют в структуре микробиоценоза моллюсков и их водной среде обитания.

Бактерии семейства *Bacillaceae* составляют разнообразную группу грамположительных палочковидных бактерий, образующих внутриклеточные споры. Они широко распространены в почве и водной среде. Большинство бацилл — это почвенные сапрофиты. Некоторые бациллы вызывают болезни животных и человека, токсикоинфекции. Бактерии продуцируют несколько токсинов, включая некротизирующий энтеротоксин, рвотный токсин, фосфолипазу С, протеазы, гемолизины и энтеротоксины, которые являются важными детерминантами вирулентности [225, 240, 260, 277, 311]. Бациллы *Exiguobacterium aurantiacum* грамположительные, не спорообразующие бактерии широко распространены в

природе. Они изолированы из океана, пресной и морской воды, льда, термальных источников, почвы, микробных биопленок. Могут расти в широком диапазоне температур (до -55°C) и pH (5-11), выдерживать высокие уровни УФ-излучения. Имеются сведения о выделении этих бацилл из крови пациентов с бактериемией [280].

Таким образом, обнаружение бактерий семейств *Bacillaceae* в водоемах, расположенных вблизи населенных пунктов в гиперэндемичных очагах описторхоза, требует детального рассмотрения проблемы микробиоценоза водоема с медицинской и экологической точек зрения. С позиции медицины оценивается степень эпидемиологической опасности воды в отношении кишечных инфекций и паразитарных инвазий.

4.4. Бактерии семейства *Enterobacteriaceae*

Группу штаммов бактерий семейства *Enterobacteriaceae* составили 130 культур (89/41 река Ирюм и река Амур соответственно), выделенных из моллюсков семейства *Bithyniidae*, таблица 26.

Таблица 26 - Количество и видовой состав штаммов бактерий семейства *Enterobacteriaceae*, выделенных из моллюсков, обитающих в реках Ирюм и Амур

№ п/п	Виды бактерий семейства <i>Enterobacteriaceae</i>	Количество штаммов		Всего штаммов % ± m
		моллюски из р. Ирюм	моллюски из р. Амур	
1.	<i>Escherichia coli</i>	2	0	1,55 ± 8,74
2.	<i>Citrobacter freundii</i>	16	16	24,81 ± 7,63
3.	<i>Citrobacter braakii</i>	7	17	18,60 ± 7,94
4.	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	15	0	11,63 ± 8,28
5.	<i>Klebsiella oxytoca</i>	2	0	1,55 ± 8,74
6.	<i>Enterobacter kobei</i>	4	0	3,10 ± 8,67
7.	<i>Cronobacter sakazakii</i>	0	1	0,78 ± 8,77
8.	<i>Enterobacter cowanii</i>	0	1	0,78 ± 8,77
9.	<i>Enterobacter asburiae</i>	7	0	5,43 ± 8,56
10.	<i>Enterobacter cloacae</i>	8	1	6,98 ± 8,49
11.	<i>Enterobacter ludwigii</i>	4	1	3,88 ± 8,63
12.	<i>Morganella morganii</i>	1	0	0,78 ± 8,77

Продолжение таблицы 26

13.	<i>Kluyvera ascorbata</i>	1	0	0,78 ± 8,77
14.	<i>Hafnia alvei</i>	1	0	0,78 ± 8,77
15.	<i>Serratia fonticola</i>	2	0	1,55 ± 8,74
16.	<i>Raoultella ornithinolytica</i>	2	3	3,88 ± 8,63
17.	<i>Raoultella planticola</i>	1	0	0,78 ± 8,77
18.	<i>Pectobacterium betavasculorum</i>	1	0	0,78 ± 8,77
19.	<i>Pectobacterium carotovorum</i>	1	0	0,78 ± 8,77
20.	<i>Plesiomonas shigelloides</i>	14	1	11,63 ± 8,28
	Итого	89	41	100

В структуре микробиоценоза моллюсков бактерии семейства *Enterobacteriaceae* составили $13,87 \pm 3,03\%$. Оно представлено 13 родами, такими как *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Plesiomonas*, *Serratia*, *Escherichia*, *Raoultella*, *Pectobacterium*, *Edwardsiella*, *Morganella*, *Hafnia*, *Cronobacter*, *Kluyvera* и 20 видами. По частоте обнаружения представителей этого семейства в микробиоценозе битиниид более 50% всех выделенных штаммов отнесены к родам *Enterobacter*, *Citrobacter* – по $25,81 \pm 4,5\%$. Далее следовали бактерии рода *Klebsiella* ($19,35 \pm 4,1\%$) и *Plesiomonas shigelloides* ($15,05 \pm 3,7\%$). По разнообразию видов отличался род *Enterobacter*: *E. asburiae*, *E. cloacae*, *E. kobei*, *E. ludwigii*. Род *Citrobacter* представлен видами *C. freundii* и *C. braakii*. Среди бактерий рода *Klebsiella* преимущественно идентифицировались *K. pneumoniae*, реже *K. oxytoca*. Представители рода *Serratia* не многочисленны, идентифицировались два вида *S. marcescens* и *S. fonticola*. Двумя видами также представлен род *Raoultella* - *R. ornithinolytica* и *R. planticola*. Среди единичных находок были штаммы *E. coli* ($2,15 \pm 1,5\%$), *Pectobacterium betavasculorum*, *Edwardsiella tarda*, *Morganella morganii*, *Hafnia alvei* – по $1,08 \pm 1,1\%$ соответственно.

Микробный пейзаж водоема отличался большим видовым разнообразием и представлен 24 видами, относящимися к 14 родам семейства *Enterobacteriaceae*: *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Plesiomonas*, *Serratia*, *Escherichia*, *Raoultella*, *Pectobacterium*, *Erwinia*, *Morganella*, *Hafnia*, *Rahnella*, *Pantoea*, *Dickeya*. Наибольшим разнообразием видов также отличались бактерии рода *Enterobacter*:

E. asburiae, *E. cloacae*, *E. kobei*, *E. ludwigii*, *E. pyrinus*. В воде водоема обнаруживались виды, которые не были идентифицированы из моллюсков: *E. pyrinus*, *C. kozeri*, *S. liquefaciens*, *P. carotovorum*, *Erwinia persicina*, *Rahnella aquatilis*, *Pantoea agglomerans*, *Dickeya zeaе*, *Dickeya chrysanthemi*. Из грунта водоема выделены 7 видов, относящихся к 6 родам семейства *Enterobacteriaceae*. Род *Enterobacter* был представлен двумя видами - *E. cloacae* и *E. ludwigii*. Структура бактерий семейств *Enterobacteriaceae*, составляющих микробиоценоз моллюсков и мест их обитания, показана на рисунке 35.

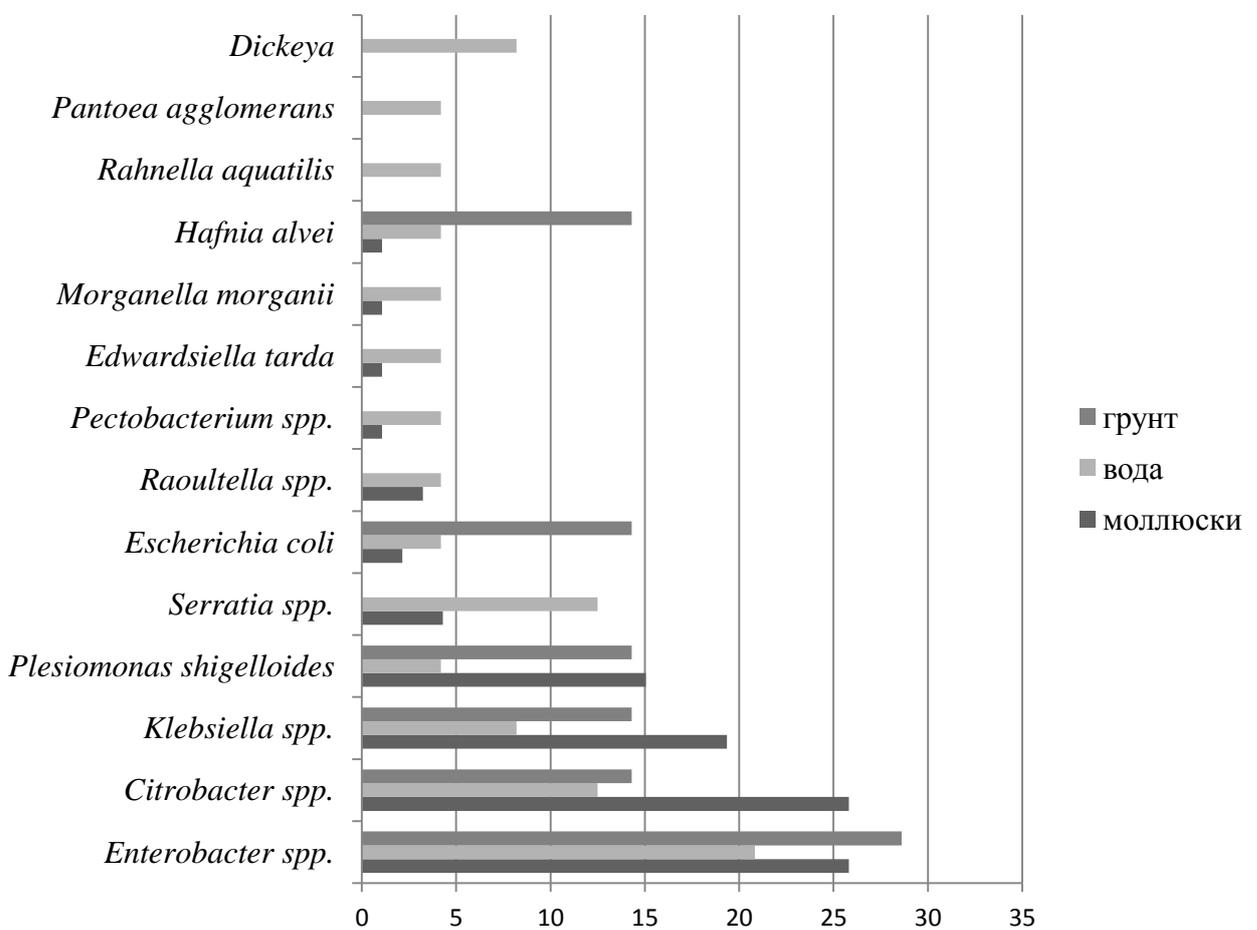


Рисунок 35. - Структура бактерий семейств *Enterobacteriaceae*, составляющих микробиоценоз моллюсков и мест их обитания (%)

Большое количество энтеробактерий в воде р. Ирюм свидетельствовало об антропогенной нагрузке, что подтверждается близостью населенного пункта к водоему. Популяция первого промежуточного хозяина *O. felineus* и его

микробиоценоз неразрывно связаны с местом их обитания – водоемом, и зависит от ряда факторов, связанных с деятельностью человека.

Сравнительная характеристика микробиоценоза моллюсков с микробным пейзажем места их обитания свидетельствует о том, что водная среда их обитания имеет более разнообразный спектр родов и видов семейства *Enterobacteriaceae*, в то время как грунт водоема в отношении представителей этого семейства очень скуден.

В качестве индикаторных микроорганизмов, характеризующих фекальное загрязнение водоемов, учитываются бактерии группы кишечной палочки (БГКП) - *Escherichia*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Hafnia*. Большое разнообразие энтеробактерий в исследуемой нами воде реки Ирюм свидетельствует об антропогенной нагрузке в весенне-летний период, что подтверждалось близостью населенного пункта к водоему. Кроме указанных выше БГКП, нами были выделены бактерии родов семейства *Enterobacteriaceae*, о которых в отечественной литературе имеются скудные сведения. Это бактерии родов *Plesiomonas*, *Serratia*, *Raoultella*, *Pectobacterium*, *Edwardsiella*, *Morganella*.

Plesiomonas shigelloides широко распространены в воде, почве и являются единственным оксидаза-положительным представителем семейства *Enterobacteriaceae* (ранее относились к семейству *Vibrionaceae*). Видовое название “*shigelloides*” получили вследствие выраженного антигенного сходства с бактериями рода *Shigella*. Бактерии *P. shigelloides* являются возбудителями диарейных заболеваний, связанных с употреблением загрязненной воды и рыбной продукции [247].

Бактерии *Raoultella ornithinolytica* были впервые выделены из кишечника рыбы, клещей, воды устьев рек. Заболевание, вызванное этими возбудителями, проявляется желудочно-кишечными симптомами и симптомами интоксикации и ассоциируется с употреблением рыбы, условия температурного режима хранения которой были нарушены. В литературе описан кишечный синдром, вызванный *R. ornithinolytica*, который клинически не отличался от брюшного тифа [248, 270].

Pantoea agglomerans также обитают в воде, почве и являются возбудителем воспалительных заболеваний животных и человека. Среди них наиболее распространены септический артрит или синовит, катетер-ассоциированные инфекции, инфекции мочевыводящих путей чаще у людей с ослабленным иммунитетом. Кроме того, регистрируются случаи нозокомиальной инфекции [257].

Rahnella aquatilis чаще всего выделяется из воды. В клинической практике их изолируют из крови, хирургических ран, мочи, мокроты, бронхиальных смывов и стула [228, 263, 303]. *Pectobacterium carotovorum* и *Dickeya zeae* в основном изолируют из травянистых растений и известны как фитопатогены [255]. Бактерии *P. carotovorum* и *D. zeae* способны вызвать заболевание практически в любой растительной ткани и являются вездесущим патогеном растений с широким спектром хозяев [219, 298, 300].

Комплекс взаимоотношений микроорганизмов в биотопе, а также с окружающей средой и человеком, рассматривается в рамках экологии. Вода - естественная среда обитания разнообразных микроорганизмов: бактерий, простейших, грибов, водорослей, вирусов и различных форм онтогенеза гельминтов. Основной путь самоочищения воды - конкурентная активация сапрофитической микрофлоры, приводящая к быстрому разложению органических веществ и уменьшению численности бактерий, особенно фекального происхождения. Кроме того, участие в этом процессе самих гидробионтов и их ферментов имеет особое значение.

Персистентные свойства (АЛА мкг/мл*ОП и БПО OD450) изучены у бактерий семейства *Enterobacteriaceae*, составляющих микробиоценоз моллюсков, следующих родов: *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Plesiomonas*, *Serratia*, *Escherichia*, *Raoultella*, *Morganella*, *Hafnia*, *Kluuvera*. Среди водных штаммов энтеробактерий указанные характеристики определялись у представителей всех выше перечисленных родов, кроме *Plesiomonas*. Исследованные штаммы, выделенные из грунта, относились к родам *Enterobacter*, *Escherichia*, *Plesiomonas*.

Исследование 129 штаммов бактерий семейства *Enterobacteriaceae* показало, что АЛА обладали 40 штаммов (31,01±4,07%). В 50 % случаев и более АЛА регистрировалась у таких родов как *Plesiomonas*, *Serratia*, *Raoultella* и *Morganella*. Штаммы, изолированные из моллюсков и обладающие АЛА, составили 25,8±5,4%, изолированные из воды водоема -32,7±6,3%, из грунта – 62,5±17,1%. Наиболее выраженной АЛА среди представителей микробиоценоза моллюсков битиниид, обладали представители родов *Plesiomonas*, *Serratia*, *Raoultella*. Что касается водных штаммов, более высокие показатели отмечались у штаммов родов *Serratia* и *Morganella*. Штаммы энтеробактерий, изолированные из грунта, обладали высокой антилизоцимной активностью, преимущественно бактерии родов *Escherichia* и *Enterobacter*. Частота обнаружения культур, принадлежащих к различным родам семейства *Enterobacteriaceae*, обладающих АЛА, варьировала от 12,5±3,05 до 83,3±3,45 % случаев (Рисунок 36).

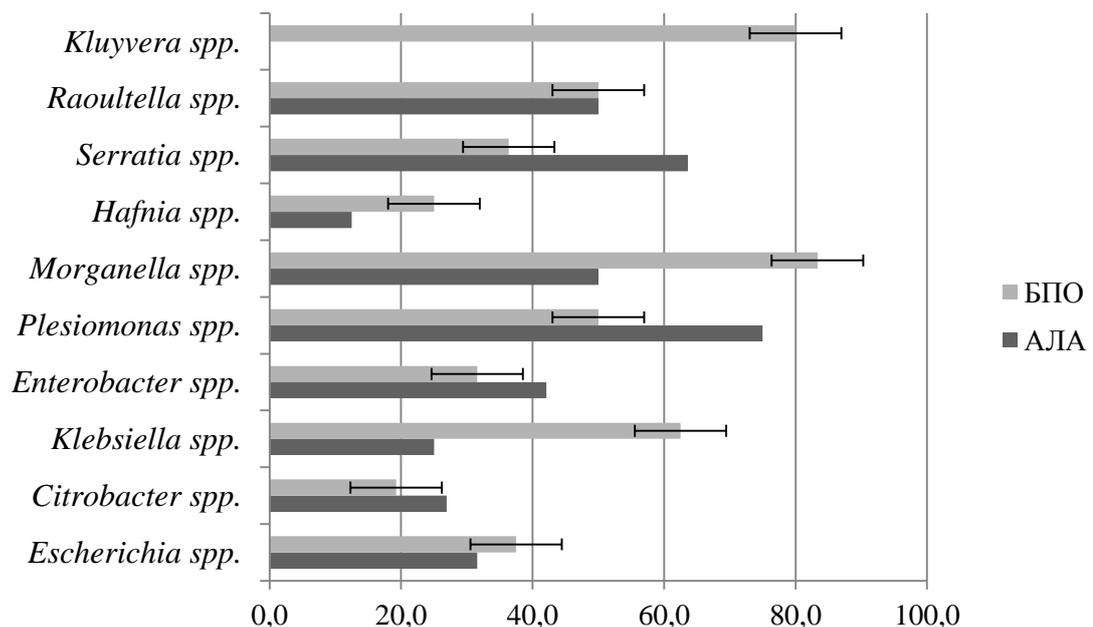


Рисунок 36 - Частота обнаружения штаммов бактерий семейства *Enterobacteriaceae*, обладающих АЛА и БПО.

Среднее значение показателя АЛА всех исследованных штаммов семейства *Enterobacteriaceae*, обладающих указанной активностью, составило 1,44±0,001 мкг/мл*ОП. При этом штаммы, выделенные из моллюсков и воды водоема, имели

следующие показатели - $1,55 \pm 0,001$ и $1,25 \pm 0,002$ мкг/мл*ОП соответственно. Значение АЛА штаммов, выделенных из грунта, достоверно выше ($p < 0.01$), в среднем составило $1,79 \pm 0,001$ мкг/мл*ОП. Показатели уровня АЛА энтеробактерий исследуемых родов в зависимости от состава микробиоценоза (моллюск, вода и грунт водоема), представлены в таблице 27.

Таблица 27 - Характеристика показателей АЛА штаммов бактерий *Enterobacteriaceae*, представителей микробиоценоза моллюсков и среды их обитания

Роды бактерий семейства <i>Enterobacteriaceae</i>	Штаммы из моллюсков		Штаммы из воды		Штаммы из грунта	
	Кол-во штаммов, обладающих АЛА(%)	АЛА	Кол-во штаммов, обладающих АЛА(%)	АЛА	Кол-во штаммов, обладающих АЛА(%)	АЛА
<i>Escherichia</i>	33,3	$2,0 \pm 0,001$	10,00	$2,0 \pm 0,001$	100	$2,0 \pm 0,001$
<i>Citrobacter</i>	25,00	$1,3 \pm 0,001$	33,3	$1,3 \pm 0,001$	-	-
<i>Klebsiella</i>	27,3	$1,9 \pm 0,001$	20,00	$2,0 \pm 0,001$	-	-
<i>Enterobacter</i>	22,2	$0,2 \pm 0,002$	55,6	$0,4 \pm 0,002$	100	$2,0 \pm 0,001$
<i>Plesiomonas</i>	66,7	$2,1 \pm 0,001$	-	-	100	$1,04 \pm 0,001$
<i>Morganella</i>	100	0	75,00	$0,9 \pm 0,002$	-	-
<i>Hafnia</i>	100	0	20,0	$1,6 \pm 0,002$	-	-
<i>Serratia</i>	50	$1,9 \pm 0,001$	71,4	$1,7 \pm 0,002$	-	-
<i>Raoultella</i>	100	$2,0 \pm 0,001$	-	0	-	-
<i>Kluuyvera</i>	-	-	-	0	-	-

Таким образом, можно констатировать тот факт, что среди бактерий семейства *Enterobacteriaceae*, входящих в состав микробиоценоза моллюсков, наиболее часто обнаруживаются штаммы бактерий родов *Plesiomonas*, *Raoultella*, *Serratia*, и *Morganella* как по частоте обнаружения, так и по выраженности свойств АЛА. В составе микробиоценоза водоема среди штаммов, обладающих высокой АЛА, чаще встречались представители родов *Serratia* и *Morganella*, а по значению этого показателя – *Klebsiella* и *Escherichia*.

Исходя из того, что АЛА рассматривается как фактор патогенности, характеризующий их способность к персистенции, представляет интерес

выяснение связи с другими факторами патогенности и со свойствами бактерий, связанными с их патогенностью. Изучение биологических свойств энтеробактерий, выделенных из моллюсков и места их обитания, показало следующие результаты. Гемолитическая активность была выявлена у бактерий рода *Serratia* и *Enterobacter*. Среди штаммов бактерий рода *Serratia* гемолизин определялся у большей части водных штаммов и штаммов, изолированных из моллюсков. Среди бактерий рода *Enterobacter* гемолитическая активность отмечалась лишь у четверти водных штаммов. Вместе с тем, у бактерий рода *Serratia* регистрировалась и желатиназная активность. Среди водных штаммов этого вида фактором патогенности обладали две трети из них, в то время как, у штаммов, изолированных из моллюсков, лишь четверть. Абсолютно все исследованные штаммы, независимо от места их выделения, характеризовались отсутствием лизоцима, плазмокоагулазы, лецитиназы.

Характеризуя уровень АЛА бактерий, следует отметить, что абсолютные значения признака определяются не только видовой принадлежностью, но и нахождением в определенном биотопе (эковариальные отличия), «статусом» микроорганизма. Экспрессия АЛА может быть обусловлена микроокружением, учитывая, что в рамках биоценозов микроорганизмы существуют не отдельными, изолированными друг от друга кластерами, а образуют ассоциации, консорциумы. При симбиотических взаимодействиях происходит изменение персистентного потенциала популяций, что нередко имеет существенное значение в развитии инфекционного процесса [41].

Известно, что бактериальные популяции энтеробактерий являются гетерогенными по уровню АЛА, то есть обнаруживаются клоны, обладающие АЛА, их количество составляет от 3 до 17%. [24]. Установлено, что АЛА присуща многим видам УПМ – этиологических агентов сепсиса новорожденных. При этом интенсивность АЛА является видоспецифической и может различаться у штаммов одного вида [49]. Результаты нашего исследования свидетельствуют о том, что среди штаммов различных родов энтеробактерий встречаются как антилизозим отрицательные, так и штаммы с высокими показателями АЛА

независимо от их биотопа. Вместе с тем, есть указания на то, что на уровень персистентных свойств бактерий оказывает влияние и дефицит источников питания, выражающийся в преимущественном снижении способности образовывать биопленки и увеличении АЛА [162].

Свойство БПО чаще отмечалось у штаммов, изолированных из моллюсков и воды (Рисунок 37). Они принадлежали к родам *Morganella*, *Klebsiella*, *Kluyvera*, а также *Plesiomonas* и *Raoultella*. Значение этого показателя в среднем для всех энтеробактерий составило $0,27 \pm 0,02$ OD450. Более высокими показателями БПО отличались штаммы, изолированные из воды водоема – $0,29 \pm 0,02$ OD450, принадлежащие к родам *Morganella*, *Kluyvera*, *Serratia* и *Citrobacter*. Средние значения БПО штаммов, выделенных из моллюсков (*Klebsiella spp.*, *Enterobacter spp.*, *Morganella spp.* и *Plesiomonas spp.*) и грунта (*E. coli*), составили $0,26 \pm 0,02$ и $0,13 \pm 0,02$ OD450, соответственно.

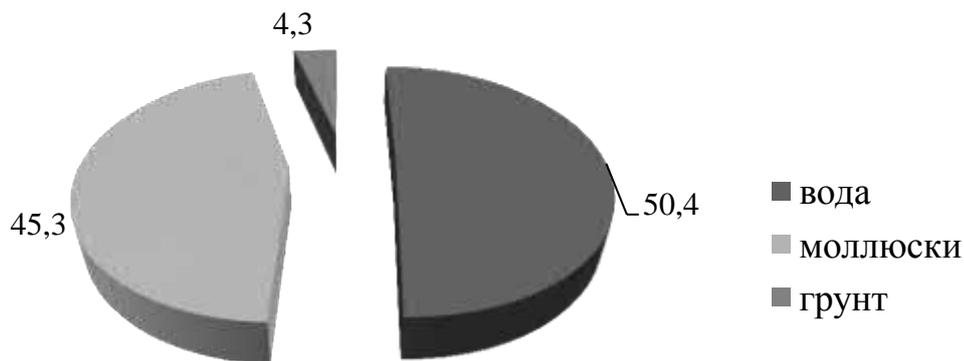


Рисунок 37 - Структура штаммов, обладающих свойством биопленкообразования, входящих в состав микробиоценоза моллюсков и мест их обитания

Таким образом, уровень АЛА и БПО у подавляющего большинства исследованных штаммов энтеробактерий, изолированных из моллюсков и воды водоема с антропогенной нагрузкой гиперэндемичного очага описторхоза, определен как средний и высокий. Причем больше всего таких штаммов отмечалось среди бактерий родов *Serratia*, *Plesiomonas*, *Raoultella* и *Morganella*. Кроме того, энтеробактерии рода *Serratia* и *Enterobacter* как водные штаммы, так и штаммы, изолированные из моллюсков, обладали гемолитической и

желатиназной активностью. Все штаммы энтеробактерий, изолированных из грунта водоема, отличались тем, что обладали высоким уровнем АЛА и БПО и принадлежали к родам *Escherichia*, *Enterobacter* и *Plesiomonas*.

4.5. Сезонная динамика структуры микробиоты моллюсков битинид – первых промежуточных хозяев *O. felineus*

Изучение сезонной изменчивости микробиоценоза моллюсков, представляет интерес не только в теоретическом плане, но имеет практическое значение, связанное с закономерностями структуры их микробиоты. Известно, что мирацидии, внедряются как в восприимчивых, так и в моллюсков, обладающих выраженными факторами защиты (наличие лизоцима). Однако у резистентных хозяев в первые же часы после заражения следует оборонительный ответ в виде клеточной реакции на инвазию: в одних случаях хозяин полностью разрушает паразита, в других, инкапсулированный паразит способен образовать спороцисту, но церкарии не формируются [20]. В ответной реакции моллюсков на инвазию участвуют иммунные факторы (клеточные), биохимические – ферменты, белки плазмиды, а также микробиота моллюска.

Говоря о защитных свойствах моллюска в отношении инвазии его личинками гельминтов, исследователи подчеркивают только клеточные и гуморальные факторы [194, 198, 201, 287]. Рассматривая механизмы толерантности и защиты, регулирующие взаимоотношения моллюска с паразитом, определяются две взаимосвязанные проблемы: совместимость популяции хозяина и паразита, а также формирование защитной реакции, предотвращающей гиперинвазирование моллюска. Механизм защитной реакции кроется в функционировании взаимодополняющих барьеров (иммунологических, физиологических, этологических). На наш взгляд, оценивая важную роль микробиоты в жизнедеятельности организма, необходимо учитывать и бактериологические факторы защитного механизма моллюска, в частности антагонистическая активность, биопленкообразование, антилизоцимная активность.

Несмотря на достигнутые за последние годы успехи в изучении экологии возбудителей сапрозоонозов, многие их свойства остаются не раскрытыми. С современных позиций без учета этих знаний не может быть решен ряд вопросов, связанных с экологией возбудителя и закономерностями эпидемического процесса, а также и закономерностями функционирования паразитарной системы на уровне взаимодействия ее сочленов, включая микробиоту.

Процессы жизнедеятельности моллюсков - первых промежуточных хозяев *O. felineus*, в том числе заражение их яйцами паразита, непосредственно зависят от сезонов годового цикла. Сопоставление трех факторов: продолжительности периода зимней диапаузы моллюсков, динамики их пораженности яйцами *O. felineus* и динамики гидрологического режима водоемов дают возможность предполагать сроки достижения максимального числа пораженных моллюсков в водоемах. Восемь с половиной месяцев в году (со второй половины августа по середину мая) заражения моллюсков не происходит, поскольку они находятся в состоянии зимней диапаузы. С середины мая до середины августа заражение моллюсков теоретически возможно (они активны), но поскольку для завершения партеногенетического цикла развития личинок в моллюске требуется около 2 месяцев, моллюски, заразившиеся в середине мая, не раньше, чем в середине июля, становятся «опасными» для рыб. Факт постепенного, а с середины июля – резкого увеличения пораженности моллюсков, с ярко выраженным пиком в конце этого месяца представляет собой интерес для установления сроков заражения моллюсков [20].

В изучении биологии битиниид, безусловно, достигнуты определенные успехи (распространенности, миграции, пораженности), в то же время не раскрытыми остаются вопросы взаимодействия сочленов микропаразитоценоза, включающего и микробиоту моллюска. С современных позиций без исследования сезонных изменений микробного спектра не может быть решен вопрос, связанный с закономерностями функционирования паразитарной системы на уровне взаимодействия ее сочленов. В связи с этим, считаем актуальными изучение динамики структуры микробиоты моллюсков битиниид, первых промежуточных

хозяев *O. felineus*, отобранных в гиперэндемичном очаге описторхоза в весенне-летний сезон, когда отмечается максимальная пораженность моллюсков личинками *O. felineus*.

Сравнение параметров микробиоценоза моллюсков в помесечной динамике проводилось отдельно для различных родов бактерий. Оценка сезонной динамики бактерий рода *Aeromonas* показала, что максимальное их количество ($42,5 \pm 3,2\%$) обнаруживалось в составе микробиоты моллюска в конце мая - начале июня. В июле и августе регистрировалось снижение количества этих микроорганизмов до $33,3 \pm 3,8\%$ и $14,41 \pm 2,4\%$ соответственно. То есть, прослеживается тенденция снижения количества *Aeromonas spp.* в микробиоценозе моллюска в течение летнего сезона. Статистически значимые результаты ($p < 0,01$) получены при сравнении указанных показателей в июне и августе.

В группе НГОБ, в отличие от бактерий рода *Aeromonas*, в течение летних месяцев происходило постепенное увеличение их количества в структуре микробиоты моллюска. Анализ помесечной динамики выделения бактерий родов *Acinetobacter*, *Comamonas*, *Shewanella*, *Pseudomonas* и других бактерий, включенных в эту группу, не выявил статистически значимых различий. Но при объединении данных всех родов, прослеживалась статистически значимая динамика нарастания их к августу ($p < 0,01$). Так, в июне высеваемость этих бактерий регистрировалась в $32,08 \pm 3,0\%$ случаев, в июле – $29,9 \pm 3,7\%$, в августе $59,01 \pm 3,3\%$. Необходимо подчеркнуть, что отмеченная динамика регистрировалась преимущественно за счет бактерий родов *Pseudomonas* и *Comamonas*.

Что касается сезонной динамики группы бактерий семейства *Bacillaceae*, в июне и августе их доля в структуре микробиоты составила $18,75 \pm 2,5$ и $18,2 \pm 2,6\%$ соответственно, в то время как в июле регистрировалось снижение этого показателя до $2,7 \pm 1,3\%$, при этом статистически значимых различий показателей не выявлено ($p < 0,05$).

Бактерии семейства *Enterobacteriaceae* в июне и августе в структуре микробиоты моллюсков составляли незначительную часть ($5,45 \pm 1,5\%$ и $8,56 \pm 1,9\%$

соответственно). В июле отмечалось их существенное увеличение до $34,00 \pm 3,9\%$, при этом, статистически значимые различия регистрировались при сравнении показателей июня и августа с показателями июля ($p < 0,01$) (Рисунок 38). Наличие энтеробактерий в водном объекте и в составе микробиоценоза моллюсков отражает уровень фекального загрязнения биоценоза окружающей среды. В самый теплый летний месяц – июль – антропогенное фекальное загрязнение максимальное, что определяет возрастание доли бактерий семейства *Enterobacteriaceae* в структуре микробиоты моллюсков.

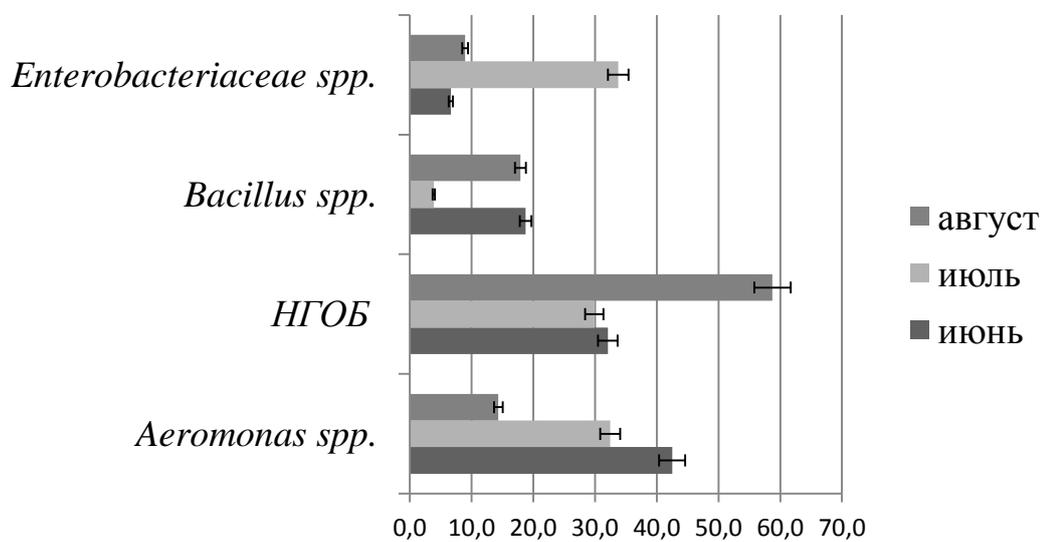


Рисунок 38 - Сезонная динамика основных представителей микробиоты моллюсков

С учетом сезонной динамики проанализировано количество различных видов микроорганизмов в каждой отдельной особи моллюсков битиниид. В среднем количество видов бактерий в каждой особи в течение весенне-летнего сезона оставалось стабильным и составило от 8,3 до 9,3. При этом внутривыделенных групп бактерий в летние месяцы отмечается некоторая динамика. Так, в июне, в каждой особи моллюска идентифицировалось от 1 до 6 видов бактерий рода *Aeromonas*, что в среднем составило 3,6. В июле и августе этот показатель составил 3,1 и 1,2 соответственно. Что касается бактерий, составляющих группу НГОБ, в июне в каждой особи регистрировалась от 0 до 9 видов, наименьший показатель, отмечен в июне - 2,55, в июле отмечалось

небольшое увеличение его до 2,8, а в августе этот показатель составил максимальное значение - 5,0 видов. Таким образом, еще раз подтверждается факт максимального присутствия *Aeromonas spp.* в структуре микробиоты моллюсков в начале сезона и снижение их к августу, в то время как НГОБ составляют минимум в начале сезона и накапливаются к концу сезона.

Количество видов бактерии семейства *Bacillaceae* в каждой особи в июне и августе имеет одинаковое значение – 1,5, в середине сезона – июле – этот показатель минимален – 0,2. Количество бактерий семейства *Enterobacteriaceae* в каждой особи в июне и августе минимально – 0,5 и 0,7 соответственно, в то время как в июле отмечается максимальное разнообразие видов – 3,2.

Таким образом, в начале эпидсезона в структуре микробиоты преобладают аэромонады как в целом, так и по видовому разнообразию, которые к концу лета «замещаются» НГОБ (Рисунок 38). Важно отметить, что *Aeromonas spp.* в начале летнего сезона, имея преимущество по разнообразию видов и количеству в структуре микробиоты, отличаются невысокими показателями АЛА (0,7 мкг/мл ОП), в то же время бактерии группы НГОБ, накапливаясь к августу, обладают более выраженной АЛА (1,54 мкг/мл ОП). То есть в период максимальной пораженности моллюсков личинками *O. felineus* его микробиота обладает максимальной АЛА.

Только те штаммы, которые обладают высокой АЛА, БПО и другими факторами патогенности могут противостоять лизоциму моллюсков и его колонизационной резистентности. Проникая в организм моллюска, эти «агрессивные» штаммы вызывают ослабление его факторов защиты, в том числе иммунных, и таким образом, способствуют приживаемости яиц *O. felineus* и дальнейшему партеногенезу в организме моллюска. Сам факт низкой пораженности моллюсков партенитами *O. felineus* весной и в начале лета, с последующим резким ее нарастанием, а затем спадом в конце лета говорит о том, что заражение основной массы моллюсков происходит весной данного года, а не является следствием продолжающегося развития перезимовавших партенит. Этим объясняется также быстрое снижение уровня пораженности моллюсков в

водоемах, куда прекратилось или резко уменьшилось поступление инвазионного материала. Таким образом, весна является основным сезоном заражения моллюсков, что обуславливается еще и тем, что яйца *O. felineus*, поступающие в этот период в водоемы, могут длительно сохранять жизнеспособность [20].

Заключение

Микробиоценоз переднежаберных моллюсков битинид - первых промежуточных хозяев *O. felineus* - и среды их обитания, представлен широким спектром микробных популяций. Доминирующей флорой в биоценозе моллюсков являются бактерии рода *Aeromonas*, а также грамотрицательные, преимущественно неферментирующие бактерии. В микробиоценозе водоема и придонного грунта (мест обитания моллюсков) преобладали бактерии семейства *Enterobacteriaceae*. Результаты исследования микробных сообществ моллюсков и среды их обитания, указывают на то, что спектр популяций микробиоты моллюска по видовому составу шире в сравнении с микробиоценозом придонного грунта и воды. Доля общих видов микроорганизмов для моллюска и водной среды составляет треть штаммов, в сравнении с микробиоценозом придонного грунта – шестая часть общих штаммов. Таким образом, моллюск имеет аутохтонную (резидентную) и аллохтонную (транзиторную) микробиоту, которая, безусловно, оказывает влияние на его защитные механизмы. Известно, что иммунный статус организма беспозвоночного животного зависит не только от состава его микробиоты, участвующей в выработке иммунных комплексов, но и от ее биологических свойств, в частности персистентных характеристик (АЛА и БПО). Показано, что эти персистентные свойства бактерий рода *Aeromonas* варьировали в зависимости от источника выделения штаммов и их видовой принадлежности.

Сравнение средних значений АЛА бактерий семейства *Enterobacteriaceae* свидетельствовало о том, что штаммы, выделенные из моллюсков и водной среды их обитания, практически не отличались по этому показателю. Частота обнаружения штаммов энтеробактерий, обладающих выраженной АЛА, и циркулирующих в водной среде обитания моллюсков, при сравнении со

штаммами, выделенными из моллюсков, также не имели статистически значимых различий. Сравнение водных штаммов и представителей микробиоты моллюсков по функции БПО выявило наиболее высокие показатели у водных штаммов, чуть ниже показатель отмечен у штаммов, изолированных из моллюсков. Штаммы энтеробактерий, выделенные из придонного грунта, имели очень низкие показатели БПО.

Сезонные колебания структуры микробиоценоза моллюсков увеличивают экологическую емкость микробных сообществ и разнообразие ниш во времени. Микробиота любого живого организма участвует во всех биохимических процессах и влияет на его иммунный статус. Формируя колонизационную резистентность, микробиота моллюска препятствует физиологической адаптации яйца описторха в организме моллюска и, как следствие, запуску цикла развития особи гельминта. Поэтому изучение сезонной изменчивости имеет важное значение для понимания закономерностей структуры и динамики микропаразитоценоза моллюсков (бактерии, яйца гельминта).

Полученные результаты показали пик «активных» микроорганизмов в период, когда, по данным исследователей Тюменского научно-исследовательского института краевой инфекционной патологии [177], отмечается максимальная пораженность моллюсков. Это позволило обосновать гипотезу о влиянии микробиоценоза моллюска на приживаемость яиц в его организме.

В структуре микробиоценоза моллюсков битиниид, а, следовательно, и личиночных стадий первого промежуточного хозяина *O. felineus* лидирующее положение занимают бактерии рода *Aeromonas*. Затем следуют НГОб - бактерии родов *Pseudomonas*, *Comamonas* и *Acinetobacter*. В структуре микробиоценоза среды обитания битиниид идентифицировались преимущественно бактерии рода *Acinetobacter*. Штаммы с выраженной АЛА преимущественно встречались среди бактерий родов *Acinetobacter*, *Delftia* и *Comamonas*. Показано, что АЛА водных штаммов на порядок выше штаммов, выделенных из моллюсков. Разницы по свойству БПО не выявлено.

ГЛАВА 5. РАСПРОСТРАНЕННОСТЬ БАКТЕРИИ РОДА *AEROMONAS*

Бактерии рода *Aeromonas* вездесущие микроорганизмы земной и водной среды, как пресной, так и соленой. Некоторые виды *Aeromonas* являются патогенами рыб: *A. salmonicida*, *A. hydrophila*, *A. media*. В литературе все чаще бактерии этого рода упоминаются в связи с их ролью в инфекционной патологии человека. Основными видами *Aeromonas*, ответственными за инфекции человека и животных, являются: *A. hydrophila*, *A. caviae*, *A. veronii biogroup sobria*. Считается, что *Aeromonas* являются одной из основных причин гастроэнтерита, диареи, инфекций мягких тканей, мышечных инфекций, сепсиса и кожных заболеваний [226, 230, 239, 296, 308]. Доказана роль *A. hydrophila* в возникновении пищевой инфекции, несмотря на то, что более детальная идентификация их стала разрабатываться лишь в последнее время. При заражении бактериями *A. hydrophila* у людей с ослабленным иммунитетом может развиваться септицемия [79]. Бактерии рода *Aeromonas* представляют серьезную проблему для многих стран Европы и Азии, в которых аэромонадная инфекция составляет от 1 до 13% острых кишечных заболеваний у взрослых и до 50% у детей [80]. По данным китайских исследователей наиболее распространенными видами, изолированными из фекалий при диареех и воды, были *A. veronii* (42,5%) и *A. caviae* (37,5%) [256].

Микробиологические исследования смывов с предметов производственной среды отделения реанимации и интенсивной терапии новорожденных Национального госпиталя педиатрии г. Ханой СРВ, проведенные нами показали, что в 20,97% проб были изолированы *A. caviae*, *A. hydrophila*.

Из 97 проб водных объектов г. Ульяновска и Ульяновской области было выделено 17 штаммов *A. salmonicida*, что составило 17,5% положительных проб. При изучении распространения *A. hydrophila* исследовали 189 проб воды открытых водоемов Ульяновской области (128 проб озёрной воды и 60 проб речной воды). Из озерной воды данный микроорганизм выделяли в 9,1% исследуемых проб, из речной воды - в 2,7% проб [79, 80, 104]. При исследовании

микробного пейзажа воды и донного грунта пресных водоемов юга Тюменской области выделялись следующие виды *Aeromonas*: *A. veronii*, *A. hydrophila* и *A. ichthiosmia* – из воды, из донного грунта - *A. veronii* и *A. ichthiosmia*.

В развитии инфекции, связанной с бактериями *Aeromonas*, может играть роль не только водный фактор, но также и алиментарный. Особую опасность для человека представляют контаминированные аэромонадами морепродукты (рыба, ракообразные, моллюски), продукты растительного происхождения (овощи, фрукты, ягоды), а также свинина, говядина, баранина и мясо птицы, молочные продукты и непосредственно вода [48, 239].

Разрозненные сведения о фактах обнаружения в объектах окружающей среды, рыбной продукции и клиническом материале бактерий рода *Aeromonas* указывают на важность этих исследований.

5.1. Распространенность бактерий рода *Aeromonas* в объектах окружающей среды

Микробиоценоз кишечного содержимого рыб был представлен ассоциациями бактерий семейства *Enterobacteriaceae* ($53,3 \pm 6,6\%$) и *Aeromonadaceae* ($46,7 \pm 6,7\%$). В структуре бактерий семейства *Enterobacteriaceae* идентифицировались штаммы родов *Klebsiella* (43,75%), *Citrobacter* (25,0%), *Serratia* (18,75%), *Raoultella* и *Enterobacter* (6,25% соответственно). Семейство *Aeromonadaceae* представлено видами *A. salmonicida* (35,7%), *A. hydrophila* и *A. bestiarum* (по 21,4% соответственно); *A. ichthiosmia*, *A. eucrenophila* и *A. veronii* (7,1% соответственно).

В результате исследования 56 экземпляров рыб семейства *Cyprinidae* (карповых) зараженность жизнеспособными личинками (метацеркариями) *O. felineus* установлена у 26 ($46,4 \pm 6,7\%$).

Зараженность язя была наибольшей и составила 82,4% со средней интенсивностью инвазии 143 личинки в 1 экземпляре рыбы. Количество метацеркарий в 1 г мышц в среднем было 14,7 личинки и варьировало от 2 до 42 личинок. Экстенсивность инвазии плотвы личинками *O. felineus* установлена в

30,8 % со средним количеством личинок $4,5 \pm 2,6$ в 1 г мышц. Из 10 исследованных экземпляров уклей, заражена метацеркариями *O. felineus* была лишь одна особь (Таблица 28). При исследовании 7 экземпляров окуня, единичных экземпляров щуки и судака личинок *D. latum* не обнаружено.

Таблица 28 - Зараженность рыб семейства *Cyprinidae* личинками *Opisthorchis felineus*

Виды рыб	Количество исследованных экземпляров	Из них заражено	Экстенсивность инвазии $p \pm m, \%$	Средняя интенсивность инвазии	Среднее количество личинок в 1 г мышц
Язь	17	14	$82,4 \pm 9,2$	$143 \pm 11,3$	$14,7 \pm 3,2$
Плотва	39	12	$30,8 \pm 7,4$	$26,3 \pm 2,7$	$4,5 \pm 2,6$

Сравнительный анализ контаминации бактериями замороженной и свежесвыловленной рыбы (без замораживания) свидетельствует о том, что на 1 экземпляр свежей рыбы приходится 2,2 штамма бактерий, в то время как на 1 экземпляр замороженной рыбы приходится 1,6 штаммов. Что касается контаминации бактериями рода *Aeromonas*, на 1 экземпляр замороженной рыбы их приходится 0,1 (6 штаммов *Aeromonas spp.* на 53 экземпляра рыб), а свежесвыловленной рыбы – 0,6 штаммов бактерий (20 штаммов *Aeromonas spp.* на 31 экземпляр).

Исследовано 14 экземпляров свежесвыловленного язя (*Leuciscus idus* семейства *Cyprinidae*), из реки Обь-Иртышского бассейна гиперэндемичного очага описторхоза, любительским ловом. До проведения исследования рыба хранилась в условиях холодильника при температуре плюс 4-6°C. У 92,8% экземпляров рыб в кишечном содержимом идентифицированы бактерии рода *Aeromonas*, представленных видами *A. salmonicida*, *A. hydrophila*, *A. bestiarum*, *A. ichthiosmia*, *A. eucrenophila*, *A. veronii*.

При исследовании 26 экземпляров свежесвыловленных сеголеток рыб семейства *Cyprinidae* было показано, что $42,3 \pm 9,7\%$ были контаминированы *Aeromonas spp.*

Микробиологические исследования проб воды открытых водоемов свидетельствует о том, что *Aeromonas spp.* были обнаружены в $59,1 \pm 10,5\%$ случаев.

Результаты исследования проб лечебной грязи, добываемой из грунта озера, показали, что в $32,3 \pm 4,3\%$ (38/118) в 1 г были обнаружены бактерии рода *Aeromonas spp.* При этом только 4,2% проб (4/118) не соответствовали допустимым значениям МУ №143-9/316-17 «Методические указания по санитарно-микробиологическому анализу лечебных грязей».

Повышенные концентрации аэромонад в водных экосистемах в теплые месяцы [80] создают возможность для воздействия на организм рыбы, животных и человека. В таком случае повышается риск колонизации этими микробами, а также развития бактериальной инфекции. Поскольку животные являются резервуаром для внедрения и обмена бактериями рода *Aeromonas* в окружающем микробном мире, потенциал для этой инфекции зоонозного происхождения постоянно нарастает [239].

Хотя некоторые виды рода *Aeromonas* являются патогенами человека, их присутствие, плотность и относительное изобилие редко учитываются при оценке качества воды [296, 307, 308]. Статистических данных о циркуляции *A. hydrophila* и других видов рода *Aeromonas* в объектах ветеринарно-санитарного надзора в нашей стране не существует. Целенаправленного поиска их в пищевом сырье и продуктах не проводится, так как наличие этих микроорганизмов не регламентируется действующими нормативными документами. Кроме этого, практические бактериологи имеют недостаточный комплект методических разработок по выделению и идентификации бактерий рода *Aeromonas* [80].

5.2. Частота обнаружения бактерий рода *Aeromonas* в клиническом материале

Проведена оценка частоты обнаружения бактерий рода *Aeromonas* в биоматериале 102 пациентов медицинских организаций некоторых регионов Западной Сибири из различных локусов. Среди обследованных лиц 7 человек

проживали в ЯНАО (Ямало-Ненецкий автономный округ), 52 пациента - жители ХМАО-Югры (Ханты-Мансийский автономный округ), 43 – жители юга Тюменской, Курганской и Свердловской областей. Средний возраст пациентов составил 27 лет. Выделено 103 штамма бактерий рода *Aeromonas*, в том числе *Aeromonas spp.* были обнаружены у 16 детей до 5 лет.

Анализ случаев выделения бактерии рода *Aeromonas* из клинического материала показал, что чаще всего они изолировались из мочи – $53,9 \pm 4,9\%$ (55) штаммов, в $17,65 \pm 3,7\%$ (18) проб обнаруживались в мазках со слизистой зева, в $12,7 \pm 3,2\%$ (13) - при проведении исследований микробиоценоза толстой кишки (Рисунок 39). Кроме того, единичные штаммы рода *Aeromonas* были выделены со слизистой носа, из бронхов, мокроты, цервикального канала, влагалища, грудного молока, кисты семенного канатика, уха, раневого отделяемого и при патологоанатомическом исследовании трахеи.

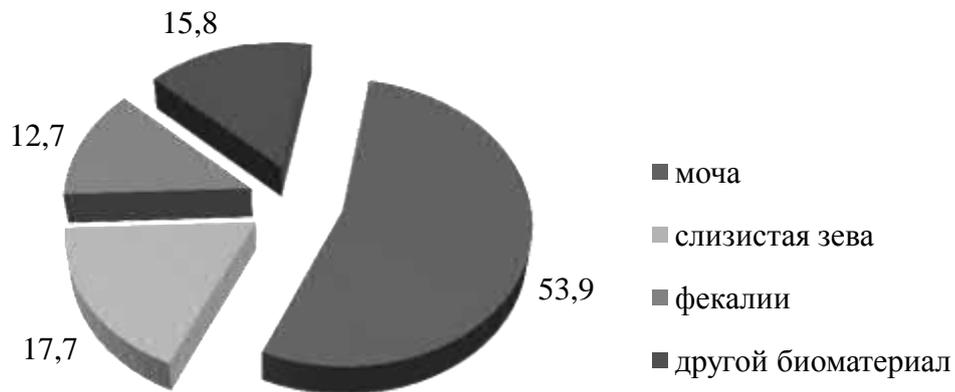


Рисунок 39 – Частота обнаружения бактерий рода *Aeromonas* в клиническом материале

Из 18 видов рода *Aeromonas*, указанных в NCBI (*A. bestiarum*, *A. caviae*, *A. encheleia*, *A. enteropelogenes*, *A. eucrenophila*, *A. hydrophila*, *A. ichthiosmia*, *A. jandae*, *A. media*, *A. molluscorum*, *A. popoffii*, *A. punctata*, *A. salmonicida* (2), *A. schubertii*, *A. simiae*, *A. sobria*, *A. veronii* - база Maldi-Tof MS), нами выделено и идентифицировано 9 видов (Рисунок 40). Не удалось идентифицировать до вида 4 штамма. Видовая характеристика бактерий рода *Aeromonas*, изолированных из

различных проб биоматериала характеризовалась разнообразием. Наиболее часто идентифицировались виды *A. caviae* и *A. hydrophila*.

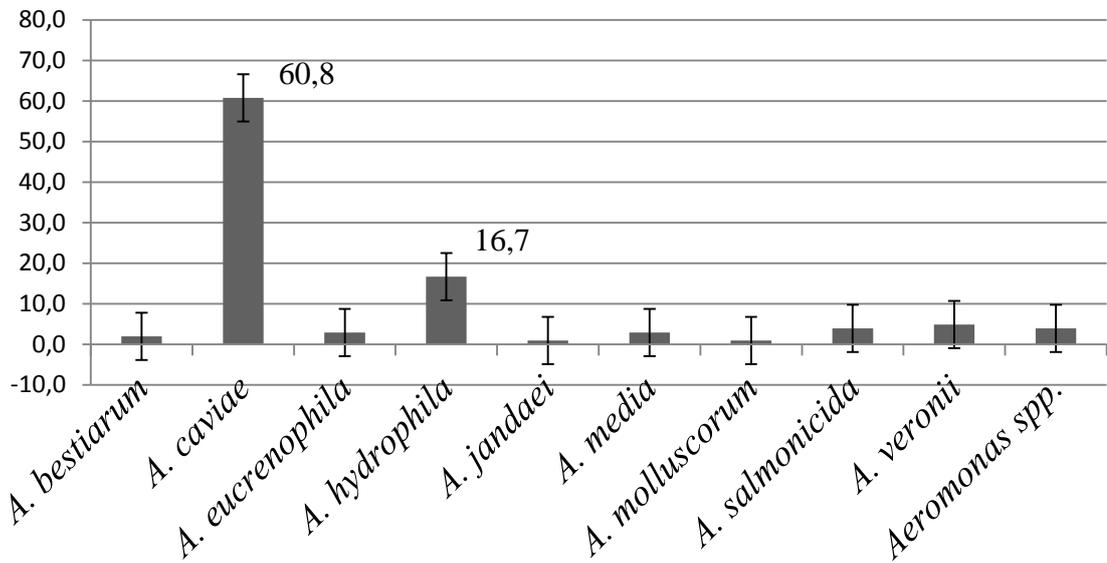


Рисунок 40 - Структура бактерий рода *Aeromonas*, выделенных из клинического материала

Анализ сезонности выделения *Aeromonas spp.* из клинического материала по месяцам, показал два «пика» подъема - апрель и сентябрь. Причем сезонные подъемы характерны как для южных районов Тюменской области, так и ХМАО-Югры (Рисунок 41). Показатель корреляционной зависимости помесечной динамики обнаружения *Aeromonas spp.*, у пациентов в этих регионах составил – 0,81.

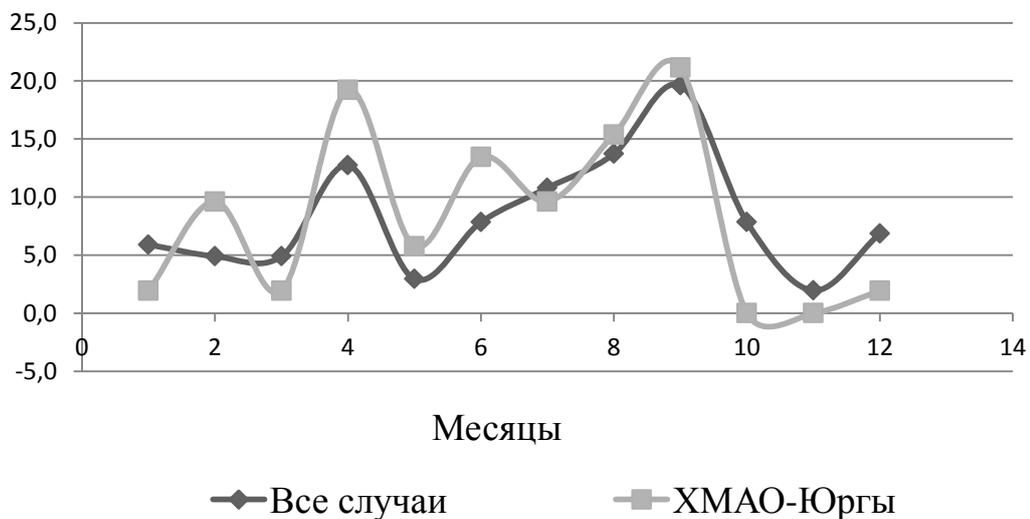


Рисунок 41 - Помесечное распределение случаев обнаружения *Aeromonas spp.* в клиническом материале

Данные литературы подтверждают существование сезонных различий по частоте обнаружения этих микроорганизмов в воде открытых водоемов, подъём отмечается в период с мая по сентябрь [79].

Проведенные исследования показали, что в 48,04% проб биоматериала бактерии рода *Aeromonas* изолировались в монокультуре, в остальных пробах выделялись в ассоциациях: 34,3% проб – 2 культуры микроорганизмов, 12,74% - 3 культуры и 4,9% - 4 вида бактерий (Рисунок 42). В одной пробе биоматериала было обнаружено 5 видов микроорганизмов (из наружного слухового прохода).

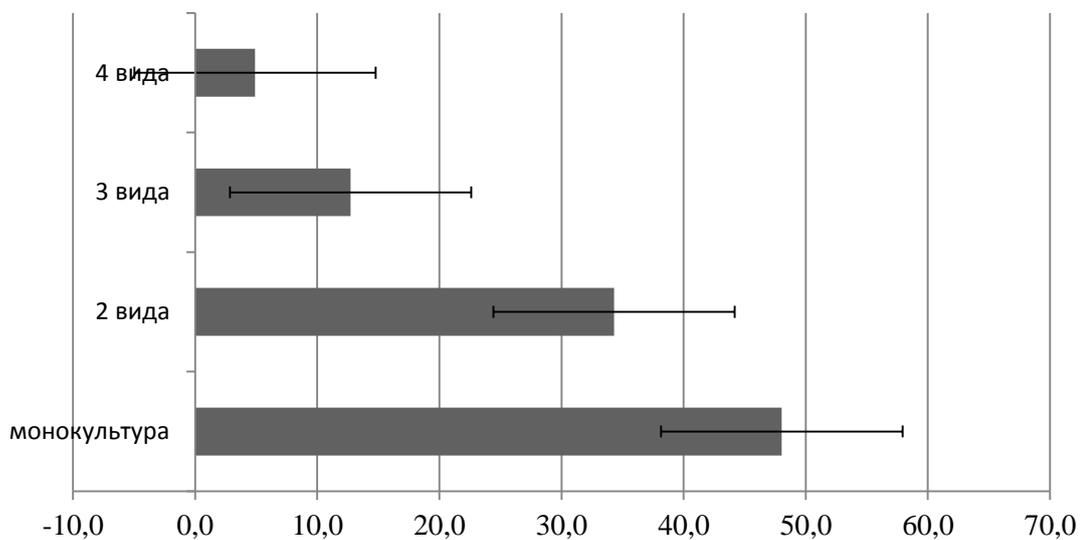


Рисунок 42 – Монокультуры и ассоциации бактерий рода *Aeromonas*

В ассоциациях с аэромонадами высевались бактерии родов *Acinetobacter*, *Enterobacter*, *K. pneumoniae*, *S. aureus* и другие УПМ. Кроме того, важно отметить, что выделенные из биоматериала бактерии рода *Aeromonas* в 90% случаев обладали гемолитической активностью независимо от вида, локуса выделения, ассоциации или монокультуры.

Исследование чувствительности к антибактериальным препаратам *Aeromonas spp.* проводилось методом серийных разведений [121]. По минимальной ингибирующей концентрации (МИК) выявлена резистентность к тикарциллин/клавуланату (группа пенициллинов + ингибитор β-лактомаз) и колистину (группа полимиксинов) (Рисунок 43).

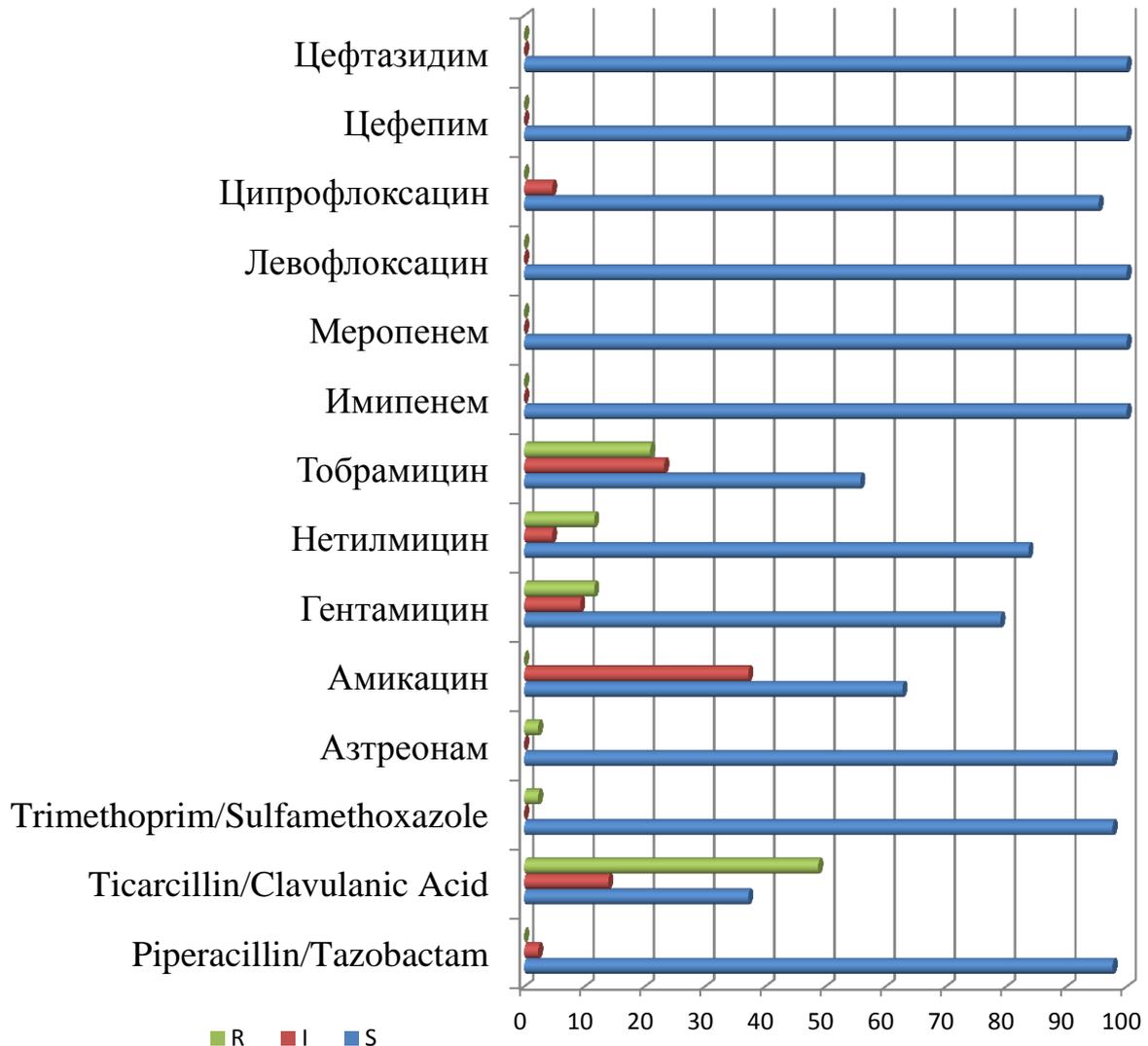


Рисунок 43 – Резистентность бактерий рода *Aeromonas* к антимикробным препаратам (МІК)

Зарегистрирована высокая чувствительность к цефалоспорином, фторхинолонам, карбопенемам, монобактамам и некоторым комбинированным препаратам - пиперациллин и ингибитор β -лактамазы тазобактам (Tazocin); триметоприм/сульфаметоксазол (Ко-тримоксазол). Почти у половины исследованных штаммов отмечена резистентность к тикарциллин/клавулановая кислота (Сотикарклав) и у 20 % штаммов к АМП группы аминогликозидов.

Бактерии рода *Aeromonas* относятся к семейству *Aeromonadaceae*. Это факультативно анаэробные грамотрицательные палочки, чаще подвижные. Оксидазоположительные, каталазоположительные, разжижают желатин. По сбраживанию углеводов, образованию сероводорода и гидролиза мочевины

отмечается вариация признаков. В естественных условиях они способны размножаться при температуре от плюс 4° до 45° С, а также при рН среды от 4,5 до 9,8.

Патогенные свойства *Aeromonas spp.* проявляются благодаря наличию у них цитолитического токсина, энтеротоксина, β-гемолизина. Показано, что водные штаммы обладают гемолитической активностью и характеризуются отсутствием лизоцима и плазмокоагулазы. Анализ гемолитической и протеолитической активности бактерий рода *Aeromonas* свидетельствует о том, что наиболее вирулентными могут считаться штаммы, выделенные из сточных вод и открытых водоемов, а также молока [79].

Результаты изучения чувствительности к антибактериальным препаратам среди потенциально патогенных штаммов *Aeromonas* демонстрируют их повышенную резистентность, что свидетельствует о существующей угрозе развития аеромонадной инфекции. Отмечено, что среди изолятов, устойчивых к тетрациклину и ципрофлоксацину, преобладали два вида – *A. hydrophila* и *A. veronii* [296, 297]. Кроме того, среди штаммов, выделенных из воды, устойчивость к девяти антибиотикам, были значительно выше, чем у штаммов, изолированных из фекалий при диарее ($p \leq 0,003$). Так, количество водных штаммов *Aeromonas*, обладающих множественной резистентностью к антибиотикам, составило 30,2% (19/63), в то время как из фекалий - 8,6% (16/187). В данном исследовании указывается на множество факторов, связанных с патогенезом *Aeromonas*, и показано, что экологические штаммы *Aeromonas* обладали более широким спектром MAR по сравнению с клиническими источниками [200, 256].

Анализ случаев обнаружения бактерий рода *Aeromonas* в клиническом материале из различных локусов пациентов лечебных организаций, их видовое разнообразие, выделение в монокультуре и ассоциациях, резистентность к антибиотикам и весенне-осенние подъёмы свидетельствуют об этиологической значимости этих микроорганизмов в инфекционном процессе.

Учитывая выраженную вариацию биохимических признаков бактерий рода *Aeromonas*, существует необходимость разработки диагностических препаратов для их идентификации.

5.3. Протеомный анализ штаммов бактерий рода *Aeromonas*, изолированных из объектов окружающей среды и клинического материала

Сравнительный анализ бактерий рода *Aeromonas* проведен на 35 штаммах. Из язя (*Leuciscus idus*) семейства карповых (*Cyprinidae*) – второго промежуточного хозяина *O. felineus*, исследовано 20 штаммов, выделенных из 14 экземпляров свежевывловленных рыб. Водные штаммы бактерий рода *Aeromonas* изолированы из открытых водоемов (о. Тулубаево – штаммы 146а, 147; о. Кривое – штамм 159; река Пышма - 170). Указанные водоемы входят в Обь-Иртышский бассейн Западной Сибири. Из клинического материала (зев, моча, кал), пациентов исследовано 11 штаммов, а также штамм *A. veronii* выделенный из лечебной грязи, добываемой в озере Тулубаево.

Среди штаммов бактерий рода *Aeromonas*, изолированных из рыб, были идентифицированы: *A. bestiarum* (7), *A. salmonicida* (5), *A. hydrophila* (4), *A. veronii* (4). Внутривидовой корреляционный анализ показал значительное сходство их протеинограмм. При этом, коэффициент корреляции составил для штаммов *A. hydrophila* — 0,95, *A. veronii* — 0,78, *A. bestiarum* - 0,84 и *A. salmonicida* — 0,94. Анализ дендрограммы белковых спектров *Aeromonas spp.* показал, что штаммы разделились на 2 группы кластеров: *A. hydrophila* (1а, 1b, 3b, 4f), *A. veronii* (2с, 3а, 8b, 14а) и *A. bestiarum* (2d, 4с, 5b, 5с, 6, 11, 12), *A. salmonicida* (2а, 4е, 5d, 7b, 8а) (Рисунок 44). Такое разделение обусловлено наибольшим сходством белкового профиля между данными видами.

Среди штаммов *Aeromonas*, изолированных из воды поверхностного слоя открытых водоемов, были идентифицированы: *A. veronii* (2), *A. hydrophila* (1) и *A. salmonicida* (1).

Корреляционный анализ белковых спектров штаммов водных, и выделенных от рыб и из лечебной грязи, отнесенных к виду *A. veronii*,

свидетельствует о их высоком родстве. Коэффициент корреляции составил 0,78. Сравнение протеинограмм этих штаммов со штаммом, выделенным из клинического материала, также показал высокую степень белкового сходства, коэффициент корреляции - 0,76.

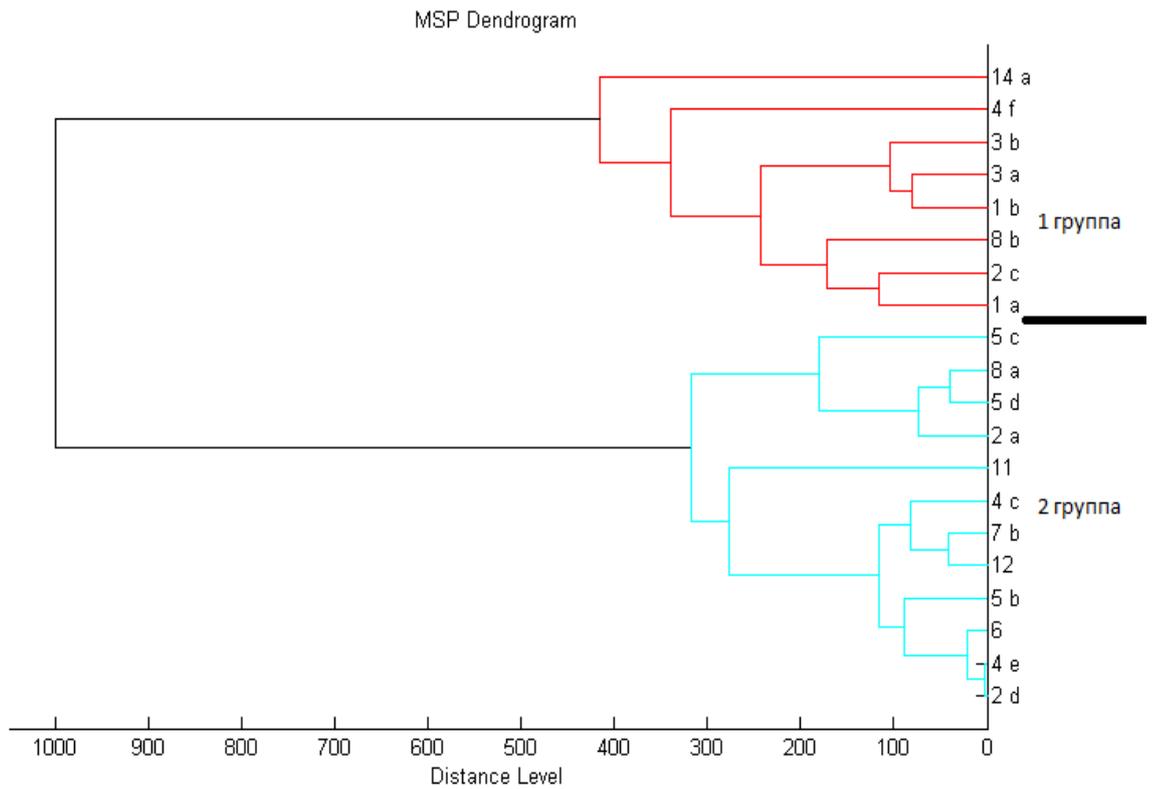


Рисунок 44 - Дендрограмма белковых спектров штаммов *Aeromonas*, выделенных из рыб

На рисунке 45 (А) представлена дендрограмма штаммов *A. hydrophila*, выделенных из рыб - 4f, 1a, 3b, 1b; из воды – 159; из клинического материала – 1690. Анализ кластеров белков свидетельствует о том, что сравниваемые водный штамм и штаммы, изолированные из рыб, имеют близкое филогенетическое родство. Вместе с тем, кластеры белков клинического штамма, подтверждают только его видоспецифичность.

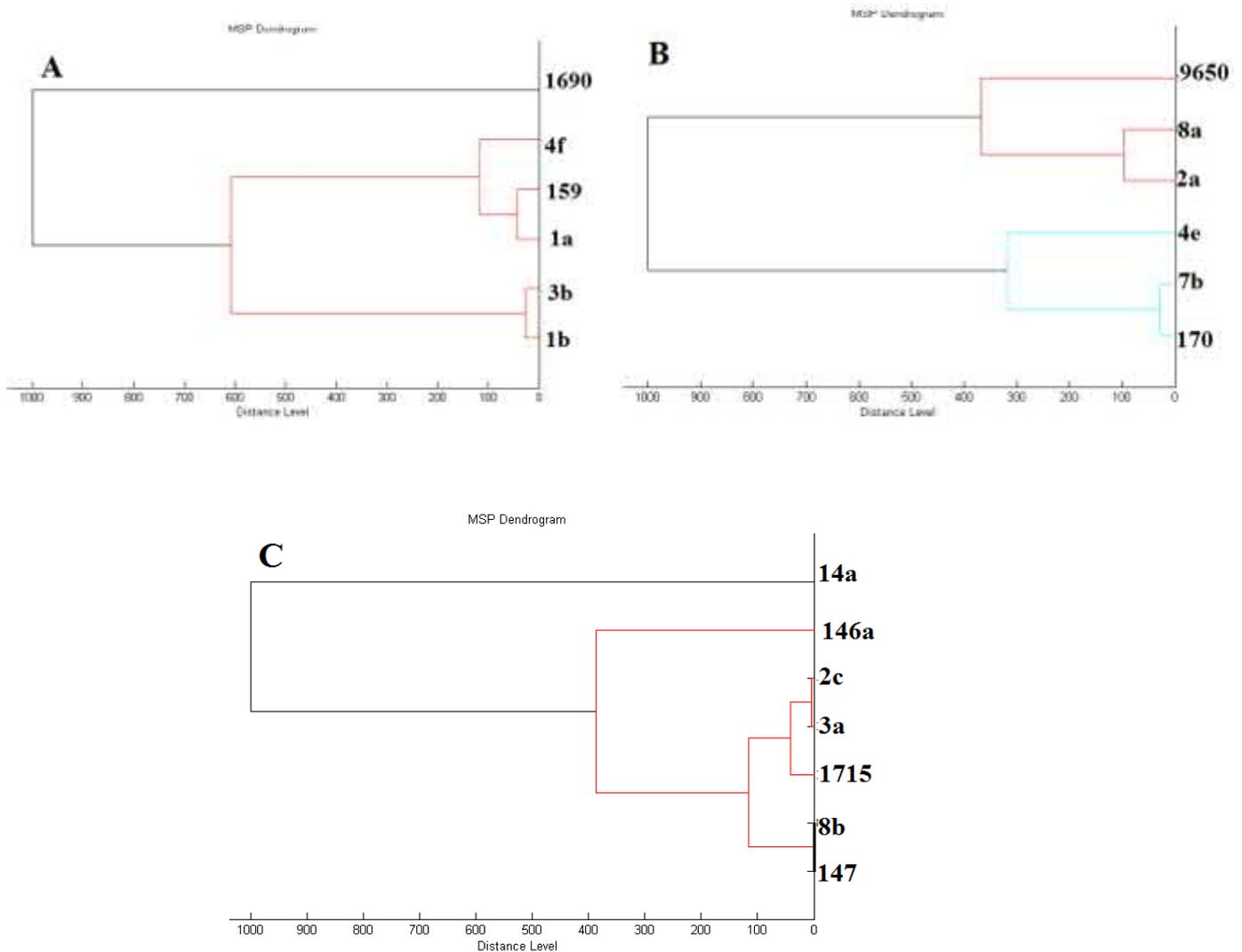


Рисунок 45 - Дендрограммы протеомных спектров штаммов *A. hydrophila* (A), *A. salmonicida* (B) и *A. veronii* (C), выделенных из рыб, воды поверхностного слоя открытых водоемов и клинического материала

При сравнении протеомных спектров водного штамма *A. hydrophila* и штаммов этого вида, изолированных из рыб, выявлено их филогенетическое родство, которое подтверждается высоким коэффициентом корреляции, среднее значение составило 0,94.

Коэффициент корреляции пяти штаммов *A. salmonicida*, изолированных из рыб и водного штамма составил 0,95. А при сравнении этих штаммов с клиническим штаммом *A. salmonicida* коэффициент корреляции был равен 0,93.

При оценке данных кластерного анализа протеинограмм, полученных из рыбы и воды поверхностного слоя открытых водоемов внутри каждого вида (*A. hydrophila*, *A. veronii*, *A. salmonicida*), получены коэффициенты корреляции: 0,94,

0,78 и 0,95 соответственно. Высокие показатели доказывают циркуляцию филогенетически близкородственных штаммов бактерий рода *Aeromonas* водной среды и рыбы.

Кластеры белковых спектров штаммов *A. salmonicida*: 8a, 2a, 4e, 7b – изолированные из рыб; 170 – водный штамм и штамм 9650 – из клинического материала представленные на дендрограмме, (Рисунок 45 (B)), распределились на две группы. Протеомный профиль клинического штамма объединился с кластерами штаммов, изолированных из рыб; во вторую группу кластеров вошли профили белков водного штамма и штаммов, изолированных из рыб.

Дендрограмма белковых спектров бактерий *A. veronii*, отображает протеинограммы штаммов, изолированных из рыб - 8b, 3a, 2c, 14a, клинического материала – 1715 и поверхностного слоя воды открытых водоемов - 147, 146a, (Рисунок 45 (C)). Белковые спектры всех штаммы этого вида практически распределились в одной группе кластеров, что свидетельствует о близком филогенетическом родстве, исключение составил штамм 14a.

Сравнительный анализ дендрограмм клинических штаммов *A. hydrophila*, *A. salmonicida* и *A. veronii* со штаммами, выделенными из воды и рыб, а также высокий коэффициент корреляции их белковых спектров, свидетельствует о том, что воду и рыбу можно рассматривать как факторы передачи при аэромонадной инфекции. Вместе с тем, в структуре клинических штаммов рода *Aeromonas*, изолированных из различных локусов, преимущественно определялись *A. caviae*. В исследование взято 8 штаммов этого вида, изолированных от больных, проживающих в городах юга Тюменской, Свердловской областей, а также ХМАО-Югры. Среди них максимальное подобие белковых спектров отмечено у штаммов 3253, 3724, 2912, изолированных из мочи (Рисунок 46). Важно подчеркнуть, что эти штаммы выделены от больных, проживающих на географически отдаленных территориях. Это подчеркивает их штаммоспецифичность и подтверждает широкое распространение бактерии рода *Aeromonas*.

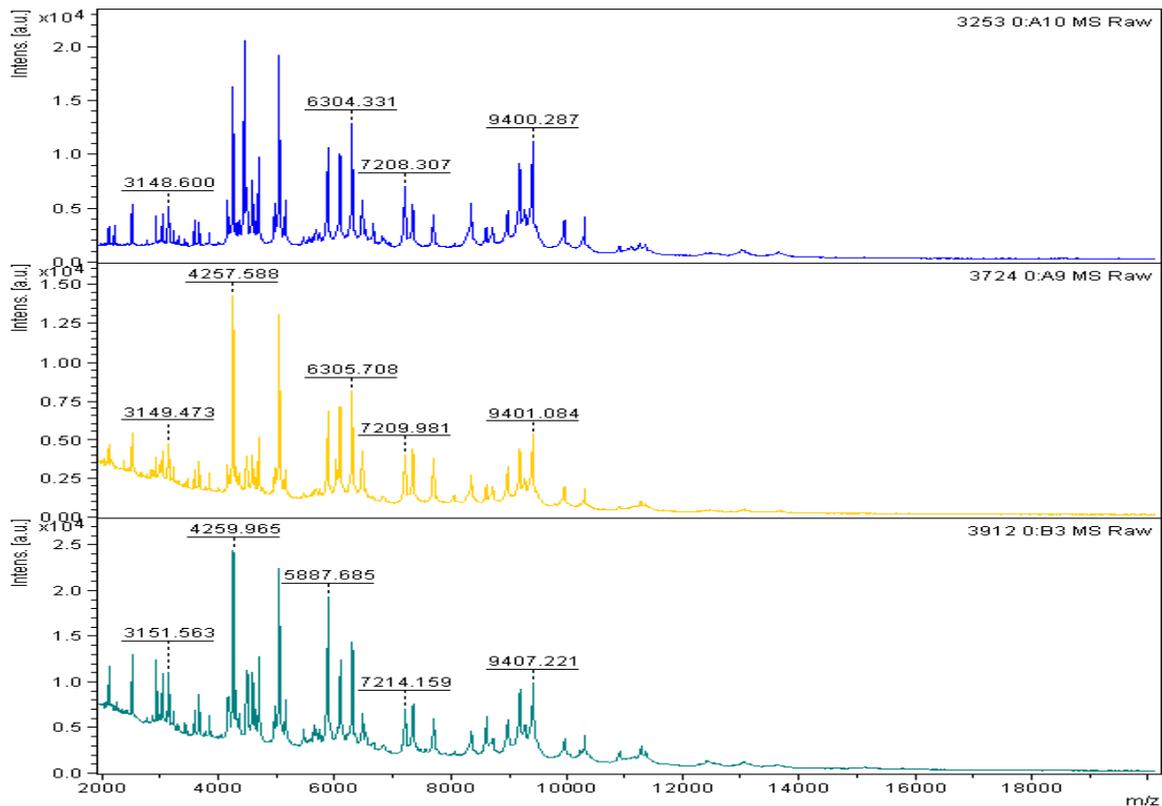


Рисунок 46 - Протеинограммы клинических штаммов *A. caviae*

Для протеомного анализа подобия штаммов бактерий рода *Aeromonas*, изолированных из различных объектов окружающей среды и клинического материала, применен способ расшифровки вспышек бактериальных инфекций и определения источника заражения (Патент 2696101 РФ. Способ расшифровки вспышек бактериальных инфекций и определения источника заражения / Катаева Л. В., Колотова О. Н., Степанова Т. Ф., (RU) - № 2018127230/04; заявл. 24.07.2018; опубл. 31.07.2019. Бюл. № 22). В соответствии с изобретением, выделенные классическим бактериологическим методом штаммы бактерий идентифицируют методом масс-спектрометрии, в результате которого получают их протеинограммы – белковые спектры. Полученные протеинограммы подвергают кластерному и корреляционному анализу. Корреляционный и кластерный анализ выполняют в программном обеспечении MALDI Biotyper прибора MICROFLEX, Bruker Daltonics. Кластерный анализ показывает однородность анализируемых штаммов бактерий. Корреляционному анализу подвергаются белковые спектры штаммов выборки, определяются коэффициенты корреляции, по которым

вычисляется показатель корреляционной зависимости - это среднее значение коэффициентов корреляции всех сравниваемых протеинограмм штаммов бактерий с учетом стандартной ошибки среднего.

Стандартная ошибка среднего (m) вычисляется по формуле:

$$m = \pm \frac{\sigma}{\sqrt{n}} \text{ где,}$$

m - стандартная ошибка среднего

σ — величина среднеквадратического отклонения генеральной совокупности;

n количество значений коэффициента корреляции (n , если ≥ 30 ; $n-1$, если ≤ 30)

Расчет величины среднеквадратического отклонения производят по формуле:

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum(x-x_{\text{ср}})^2}{n}} \text{ где,}$$

x – значение коэффициента корреляции;

$x_{\text{ср}}$ – среднее значение коэффициентов корреляции

При оценке полученного показателя корреляционной зависимости с учетом стандартной ошибки среднего, берут значения выше 0,75, что свидетельствует о высокой корреляционной зависимости и идентичности анализируемых штаммов бактерий, так как их показатели m/z (массы белка на заряд) совпадают. При этом считают, что все идентичные штаммы бактерий относятся к одному источнику бактериальной инфекции. Эпидемиологическое расследование на основе полученных данных позволяет точно определить источник заражения (больной человек, продукт питания, окружающая среда). По кластерному анализу и показателям высокой корреляционной зависимости протеинограмм исследуемых штаммов бактерий можно сделать вывод об их высоком подобии, а, следовательно, об общем источнике заражения бактериальной инфекцией.

Таким образом, применение протеомного анализа для характеристики штаммов расширяет возможности оценки циркуляции в окружающей среде и вероятных путей проникновения их в организм рыбы, животных и человека. Для совершенствования биологической безопасности водных биотопов актуальным

является изучение их микробиоценоза, в частности циркуляции бактерий рода *Aeromonas*, с целью получения информации о патогенных свойствах, антибиотикорезистентности, сезонных колебаниях. Для предотвращения распространения инфекций, вызванных бактериями рода *Aeromonas*, необходимо проведение микробиологических исследований водных объектов, объектов окружающей среды, а также рыбной продукции.

Заключение

Таким образом, полученные результаты исследования свидетельствуют о высокой контаминации микроорганизмами рыб, не подвергающихся низкотемпературной обработке до употребления в пищу. Микроорганизмы, изолированные из рыб, инвазированных личинками возбудителя описторхоза, относятся к условно-патогенным бактериям и играют роль в этиологии воспалительных заболеваний кожи рыб, что влияет на качество пищевой рыбной продукции. Поэтому, при обработке рыбы (чистка, потрошение, разделывание) необходимо соблюдать санитарно-гигиенические правила во избежание контаминации рук, разделочных досок и рабочих поверхностей. Соблюдение условий хранения и режима обработки рыбы позволит минимизировать риски заражения биогельминтозами, передающимися через рыбу, и бактериальными инфекциями ЖКТ населения.

Сравнительный анализ дендрограмм клинических штаммов *A. hydrophila*, *A. salmonicida* и *A. veronii* со штаммами, выделенными из воды и рыб, а также высокий коэффициент корреляции их белковых спектров, свидетельствует о том, что воду и рыбу можно рассматривать как факторы передачи при аэромонадной инфекции.

Анализ случаев обнаружения бактерий рода *Aeromonas* в клиническом материале из различных локусов пациентов лечебных организаций, их видовое разнообразие, выделение в монокультуре и ассоциациях, резистентность к антибиотикам и весенне-осенние подъёмы свидетельствуют об этиологической значимости этих микроорганизмов в инфекционном процессе. Для совершенствования биологической безопасности водных биотопов актуальным

является изучение их микробиоценоза, в частности циркуляции бактерий рода *Aeromonas*, с целью получения информации о патогенных свойствах, антибиотикорезистентности, сезонных колебаниях. Для предотвращения распространения инфекций *Aeromonas* необходимо проведение микробиологических исследований водных объектов, объектов окружающей среды, а также пищевых продуктов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Миграция гельминта в организме хозяина вызывает патологические изменения его тканей и органов, которые проявляются воспалительной реакцией (дуоденитом, энтеритом) и нарушением микробиоценоза в толстой кишке. При инвазировании человека гельминтами существенно изменяется состав кишечной микробиоты, проявляющийся дисфункцией ЖКТ, причем, при большей интенсивности инвазии отмечена более высокая степень дисбиоза [37, 62, 132]. Однако изменения нормофлоры в структуре микробиоценоза содержимого кишечника, а также отягощающая роль отдельных групп УПМ, их значение в патогенезе недостаточно изучены, хотя это имеет значение при лечении инфекционных и паразитарных заболеваний.

В настоящее время актуальными остаются вопросы взаимовлияния сапрофитных и УПМ в микропопуляции с гельминтами. Для их решения необходимо проведение исследований, направленных на определение взаимовлияния микропопуляций (УПМ и продуктов жизнедеятельности марит *O. felineus*), как сочленов микропаразитоценоза, на формирование дисбиоза толстой кишки.

Наряду с тем, что имеется достаточно сведений по различным аспектам биологии и особенностям инвазированности трематодами основных промежуточных хозяев *O. felineus* – переднежаберных моллюсков семейства *Bithyniidae* [20], микробиоценоз которых практически не исследовался и материалов в доступной литературе нами не обнаружено. Существуют единичные сведения о количестве и распределении некоторых групп бактерий в пищеварительном тракте моллюсков, их способности накапливать в своем кишечнике микроорганизмы, часть из которых являются возбудителями заболеваний животных и человека [187]. Вследствии этого исследования с позиций изучения закономерностей функционирования микропаразитоценоза могут объяснить патогенетические механизмы воздействия паразита на организм хозяина. Не выявлена роль и участие персистентного потенциала,

антагонистической активности и биопленкообразования микросимбионтов (нормофлоры и УПМ) в качестве одного из возможных механизмов формирования микропаразитоценоза. Исследование микропаразитоценоза в разрезе микробиологических аспектов важно для рациональной профилактики инфекционных и паразитарных заболеваний и представляет чрезвычайно актуальную проблему.

Обеспечение населения безопасной в эпидемическом отношении доброкачественной водой является одной из важных задач в системе микробиологического мониторинга. Актуальность темы исследования связана с нарастающим влиянием антропогенных факторов контаминации водных объектов, окружающей среды возбудителями кишечных инфекций. Для совершенствования биологической безопасности водных биотопов необходимо изучение их микробиоценоза, в частности циркуляции бактерий рода *Aeromonas*, с целью получения информации о патогенных свойствах, антибиотикорезистентности, а также сезонных колебаниях их количества в структуре микробного пейзажа. Для предотвращения распространения инфекций, вызванных бактериями рода *Aeromonas*, необходимо проведение микробиологических исследований водных объектов, объектов окружающей среды, а также пищевой рыбной продукции. В перспективе необходимо решение вопроса о внесении бактерий этого рода в критерии оценки качества, в первую очередь, водных объектов. В развитии инфекции, связанной с бактериями *Aeromonas*, может играть роль не только водный фактор, но и алиментарный. Особую опасность для человека представляют контаминированные аэромонадами пищевая рыбная продукция и непосредственно вода.

Все выше перечисленное предопределило тематическую направленность наших исследований, которые способствовали раскрытию механизмов межмикробного взаимодействия нормофлоры с УПМ толстой кишки при паразитарных инвазиях и изысканию новых подходов для дальнейших исследований, направленных на минимизацию осложнений воспалительного характера после дегельминтизации. Это обусловило направление исследований по

обоснованию значимости бактерий рода *Aeromonas* в этиологии бактериальных инфекций.

При внедрении паразита в макроорганизм изменяется его экологическая система, одним из главных компонентов которой является микробиоценоз ТК окончательного хозяина. Исследование микробиоценоза содержимого толстой кишки при описторхозе показало, что среди исследуемых представителей нормофлоры, чаще всего регистрируется дефицит бактерий рода *Bifidobacterium*, затем, *Lactobacillus*, в меньшей степени выражен дефицит *Enterococcus spp.* и *E. coli*. На фоне снижения содержания *E. coli* с нормальной ферментативной активностью отмечается повышенное выделение *E. coli* (Lac-) и *E. coli* (Gem+) - $6,9 \pm 7,5\%$ и $16,2 \pm 7,5\%$ соответственно. Частота обнаружения других представителей семейства *Enterobacteriaceae* составила $35,14 \pm 6,6\%$. Чаще идентифицировались бактерии рода *Klebsiella* – в $19,6 \pm 7,4\%$ случаев, *Enterobacter* – около 7%. Грибы рода *Candida* идентифицировались в $8,1 \pm 7,8\%$ случаев, *S. aureus* – $15,5 \pm 7,5\%$. Паразитарная инвазия, в частности описторхоз, не всегда протекает в чистом виде. У пациентов с описторхозом микстинвазии выявились в 26,35% случаев. Показано, что описторхоз чаще сочетается с токсоплазмозом и ИКБ.

Сравнительный анализ микробиоценоза толстой кишки пациентов с описторхозом, проживающих в г. Тюмени и в гиперэндемичных по этой инвазии районах Тюменской области, показал, что наибольшие изменения приходятся на автохтонную (индигенную) микрофлору – бактерии родов *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Enterococcus* и *Escherichia coli*. При этом статистически значимые различия ($p < 0,001$) регистрируются только по *Bifidobacterium spp.* Дефицит их в содержимом кишечника чаще встречается у больных описторхозом жителей г. Тюмени и составляет $77 \pm 3,62\%$ случаев, у жителей гиперэндемичных по описторхозу районов – $33,6 \pm 4,4\%$.

Таким образом, при описторхозной инвазии нарушается микробиоценоз кишечника, как у жителей гиперэндемичных по описторхозу районов, так и у жителей г. Тюмени, проявляющийся дефицитом *Bifidobacterium spp.* Можно

предположить, что процесс формирования дисбиоза толстой кишки при паразитарных инвазиях многофакторный: географическое расположение – близость водоема, рыбная ловля, уровень жизни, экологическая культура, медицинская помощь, длительность инвазии. Кроме того, существенное влияние оказывает и наличие сопутствующих заболеваний ЖКТ воспалительного характера. В связи с этим, при лечении пациентов, страдающих описторхозом необходимо учитывать результаты исследований микробиоценоза толстой кишки.

Состав нормофлоры толстой кишки при лямблиозной инвазии, характеризуется более выраженным дефицитом бактерий рода *Lactobacillus*, снижение их количества колеблется от $68,52 \pm 3,08\%$ до $80,95 \pm 2,6\%$ инвазированных лямблиями детей и взрослых. Статистически значимых отличий по указанному показателю в различных возрастных группах не выявлено. Более выраженный дефицит бактерий рода *Bifidobacterium* отмечается у детей до 3-х лет и взрослых, а наименьший показатель регистрируется в возрастной группе от 8 до 14 лет, при этом, различия статистически достоверны, $p < 0,02$. Уменьшение количества *E. coli* с нормальной ферментативной активностью колеблется от $24,1 \pm 4,9\%$ до $37,5 \pm 5,2\%$, статистически достоверных возрастных особенностей по этому показателю не отмечено. Дефицит бактерий рода *Enterococcus* более выражен в возрасте 8-30 лет и менее всего в группе детей до 3-х лет, различия статистически достоверны, $p < 0,01$ и $p < 0,05$ соответственно. Во всех возрастных группах дефицит *E. coli* с нормальной ферментативной активностью коррелирует с дефицитом *Enterococcus spp.* Вместе с тем, снижение количества *Bifidobacterium spp.* находится в обратной зависимости от содержания в ТК *Enterococcus spp.* и *E. coli*, за исключением детей старшего возраста.

Частота обнаружения в содержимом толстой кишки пациентов с лямблиозом *E. coli* (Lac-) и *E. coli* (Gem+) в группе детей 8 – 14 лет составила наименьшее значение, наибольший показатель зарегистрирован в группе пациентов 15 – 30 лет, различия статистически значимы, $p < 0,05$. Высеваемость грибов рода *Candida* у пациентов различных возрастных групп колебалась от

4,76% до 8,0%, при этом у взрослых этот показатель был выше, чем у детей, но различия статистически не значимы.

Статистически достоверные различия у детей и взрослых отмечаются по частоте обнаружения в кишечнике больных лямблиозом бактерий *S. aureus*. У детей до 14 лет высеваемость их была значительно выше по сравнению с группой 15 лет и старше, $p < 0,05$. Наиболее выраженные статистически достоверные различия отмечались в группе детей 1 – 3 года и лиц старше 30 лет, $p < 0,002$.

Среди бактерий семейства *Enterobacteriaceae* чаще всего идентифицировались бактерии родов *Klebsiella*, *Enterobacter* и *Citrobacter*, при этом частота обнаружения их в различных возрастных группах пациентов статистически не достоверна. Вместе с тем, суммированная высеваемость бактерий семейства *Enterobacteriaceae* (без *E. coli*), показала, что у детей до 7 лет, она достоверно выше ($p < 0,05$) по сравнению с детьми старше 7 лет и взрослых.

Анализ степени нарушений микробиоценоза содержимого толстой кишки пациентов с лямблиозом свидетельствует о том, что более выраженные изменения отмечаются у детей до 7 лет. Эти изменения характеризовались повышением содержания УПМ до концентрации 10^5 – 10^7 или обнаружением ассоциаций в концентрации до 10^7 КОЕ/г. Полученные результаты можно объяснить большим содержанием в ТК детей таких УПМ как *S. aureus*, бактерий родов *Klebsiella*, *Enterobacter* и *Citrobacter*.

Микст-инвазии определялись у 22 пациентов с лямблиозом (7,28 %). Токсоплазмоз и токсокароз наиболее часто встречаются в сочетании с лямблиозной инвазией.

Поскольку у пациентов с проявлениями воспалительного характера ЖКТ также нарушается микробиоценоз толстой кишки, проведена его сравнительная характеристика. При сопоставлении полученных результатов содержания нормофлоры (бактерий родов *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Enterococcus* и *E. coli*) в кишечном содержимом пациентов с лямблиозной инвазией и при ВЗ ЖКТ не инвазированных лямблиями, статистически значимые различия отмечаются по обнаружению бактерий родов *Lactobacillus* и *Enterococcus*. При ВЗ ЖКТ

отмечается более выраженный дефицит *Lactobacillus spp.* и *Enterococcus spp.*, чем у пациентов с лямблиозной инвазией, ($p < 0,001$ и $p < 0,02$ соответственно). Дефицит *E. coli* с нормальной ферментативной активностью более выражен при заболеваниях ЖКТ воспалительного характера, но различия статистически не значимы. На фоне снижения *E. coli* с нормальной ферментативной активностью у 33,3% больных с заболеваниями ЖКТ отмечается более частое обнаружение *E. coli* (Lac-) и *E. coli* (Gem+), а также грибов рода *Candida* и *Clostridium*.

Анализ высеваемости бактерий семейства *Enterobacteriaceae* (некоторых его родов) при лямблиозной инвазии и при ВЗ ЖКТ свидетельствует о более частом обнаружении УПМ в содержимом ТК пациентов, инвазированных лямблиями, хотя различия статистически не значимы. Это касается в первую очередь бактерий родов *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Providenciae* и *S. aureus*. Воспалительные заболевания ЖКТ бактериальной этиологии клинически проявляются преимущественно гастроэнтеритом. Известно, что при энтеритах идет потеря *Lactobacillus spp.*, что и обуславливает дефицит бактерий этого рода. При лямблиозной инвазии страдает весь тонкий кишечник. Изменения слизистой тонкой кишки создают условия, препятствующие развитию *Bifidobacterium spp.*, что приводит к снижению их количества. Поскольку они являются первичным пусковым механизмом иммунитета ЖКТ, при их потере отмечается нарастание УПМ.

Состав симбионтной микрофлоры ТК при токсоплазмозе характеризуется выраженным дефицитом бактерий рода *Lactobacillus*, который определялся у $81,62 \pm 3,7\%$ пациентов. Дефицит бактерий рода *Bifidobacterium* при токсоплазмозе отмечен в $46,32 \pm 6,3\%$ случаев. Содержание бактерий рода *Enterococcus spp.* ниже нормы зарегистрировано у $20,59 \pm 7,5\%$ пациентов, *E. coli* с нормальной ферментативной активностью – у $35,29 \pm 6,9\%$. Таким образом, среди исследуемых представителей нормофлоры, чаще всего отмечается дефицит *Lactobacillus spp.* затем, *Bifidobacterium spp.*, в меньшей степени выражен дефицит *E. coli* и *Enterococcus spp.* На фоне содержания ниже нормы *E. coli* с нормальной ферментативной активностью отмечается увеличение выделения *E. coli* (Lac-) и *E.*

coli (Gem+) – у 19,12±7,7% и 7,35±8,2% пациентов с токсоплазмозом соответственно. Кроме того, *S. aureus* идентифицировались в 22,06±7,6%, отмечались единичные случаи обнаружения грибов рода *Candida*. Высеваемость бактерий семейства *Enterobacteriaceae* составила 36,76±6,8%, чаще идентифицировались представители родов *Klebsiella*, *Citrobacter* и *Enterobacter*, их высеваемость составила 21,32±7,6%, 7,35±8,2% и 4,41±8,3% соответственно. Это можно объяснить большим содержанием в ТК *E. coli* (Lac-), бактерий рода *Klebsiella*, а также ассоциациями грамотрицательных бактерий и *S. aureus*. У четверти пациентов с токсоплазмозом диагностировались микстинвазии, чаще регистрировались сочетания с токсокарозом и описторхозом, реже с лямблиозом и ИКБ.

Токсокароз, по сравнению с другими исследуемыми в регионе инвазиями, встречается не так часто. В составе микробиоценоза ТК кишечника при токсокарозе выявлен выраженный дефицит *Lactobacillus spp.*, который отмечен у 77,97±6,1% пациентов. Дефицит *Bifidobacterium spp.* зарегистрирован в 38,9±10,2% случаев. Содержание бактерий рода *Enterococcus spp.* ниже нормы отмечено у 22,03±11,5% пациентов, снижение *E. coli* с нормальной ферментативной активностью – у 33,9±10,6%. Таким образом, среди исследуемых представителей нормофлоры, чаще всего отмечается дефицит *Lactobacillus spp.* затем, *Bifidobacterium spp.*, в меньшей степени выражен дефицит *E. coli* и *Enterococcus spp.* На фоне снижения содержания *E. coli* с нормальной ферментативной активностью отмечается повышенное выделение *E. coli* (Lac-) и *E. coli* (Gem+) – у 25,42±11,2% и 15,25±12,0% пациентов, инвазированных токсокарами соответственно. Кроме того, *S. aureus* изолированы у 20,34±11,6% пациентов и единичные случаи обнаружения грибов рода *Candida*.

Из грамотрицательных УПМ чаще идентифицировались представители семейства *Enterobacteriaceae*, высеваемость их составила 27,12±11,1%. Чаще встречались представители родов *Klebsiella* и *Proteus*. Отмечались единичные случаи обнаружения бактерий родов *Citrobacter* и *Clostridium*. У пациентов с

токсокарозом микстинвазии выявились в $40,68 \pm 6,4\%$ случаев. Эта инвазия чаще сочетается с токсоплазмозом, реже с описторхозом и лямблиозом.

В составе микробиоценоза ТК при ИКБ (иксодовый клещевой боррелиоз), отмечался выраженный дефицит *Lactobacillus spp.*, который определялся у $82,05 \pm 6,8\%$ пациентов, дефицит *Bifidobacterium spp.* - у $58,97 \pm 10,3\%$. Содержание бактерий рода *Enterococcus* ниже нормы зарегистрировано у $17,95 \pm 14,5\%$ пациентов, снижение *E. coli* с нормальной ферментативной активностью отмечено у $25,64 \pm 13,8\%$. Таким образом, среди исследуемых нами представителей нормофлоры, чаще всего регистрировался дефицит *Lactobacillus spp.* и *Bifidobacterium spp.*, в меньшей степени выражен дефицит *E. coli* и бактерий рода *Enterococcus*. На фоне снижения содержания *E. coli* с нормальной ферментативной активностью отмечалось незначительное выделение *E. coli* (Lac-) и *E. coli* (Gem+), причем, в равных количествах - $7,69\%$. Частота обнаружения УПМ семейства *Enterobacteriaceae* составила $33,3 \pm 13,0\%$, преимущественно представители родов *Klebsiella* и *Proteus*. Бактерии *S. aureus* идентифицировались у $17,95 \pm 14,5\%$ пациентов, грибы рода *Candida* высевались редко. Почти у половины пациентов с диагнозом ИКБ диагностировались микстинвазии, сочетающиеся с лямблиозом и токсоплазмозом, в меньшей степени с токсокарозом, не зарегистрированы случаи микст-инфекций с описторхозом.

Анализ микробиоценоза содержимого толстой кишки, показал, что при различных паразитарных инвазиях наблюдался дефицит индигенной микробиоты. Все изучаемые нами инвазии, характеризовались дефицитом бактерий рода *Lactobacillus*, содержание их количества ниже нормы колебалось от $67,6 \pm 4,7\%$ при описторхозе до $82,0 \pm 6,8\%$ пациентов при ИКБ. Более выраженное снижение количества бактерий рода *Bifidobacterium* регистрировалось у пациентов с описторхозом, причем, отмечены статистически значимые различия по этому показателю при сравнении с лямблиозом ($p < 0,001$), токсоплазмозом ($p < 0,001$), токсокарозом ($p < 0,002$). Вместе с тем, при сравнении с токсоплазмозом, определены статистически значимые различия и по *Lactobacillus spp.* ($p < 0,002$). Описторхозная инвазия также отличалась от других тем, что дефицит *E. coli* с

нормальной ферментативной активностью и бактерий рода *Enterococcus spp.* выражен в равной степени, в то время как при других инвазиях дефицит *E. coli* на порядок выше.

Сопоставление состава *E. coli* с нормальной ферментативной активностью, *E. coli* (Lac-) и *E. coli* (Gem+), показало, что при тканевых паразитозах (токсоплазмозе и токсокарозе) содержание *E. coli* (Gem+), выше. Вместе с тем, дефицит *E. coli* с нормальной ферментативной активностью находился в прямой корреляционной зависимости с *E. coli* (Lac-), чего нельзя сказать о *E. coli* (Gem+).

Высеваемость УПМ из содержимого ТК пациентов, страдающих паразитарными инвазиями, свидетельствует о том, что лидирующее положение занимали бактерии семейства *Enterobacteriaceae*, преимущественно бактерии рода *Klebsiella*, причем, при лямблиозе и тканевых паразитозах (токсоплазмозе и токсокарозе) значительно чаще; при ИКБ - бактерии рода *Proteus*. Вторые позиции принадлежали бактериям *S. aureus*, затем, грибам рода *Candida*, статистически значимых различий в высеваемости указанных бактерий при различных паразитозах не выявлено. Однако можно сказать, что при лямблиозе и токсоплазмозе высеваемость бактерий семейства *Enterobacteriaceae* и *S. aureus* несколько выше, чем при других инвазиях.

Сопоставление функций нормальной микрофлоры ТК с ее количественным содержанием при паразитарных инвазиях выявило некоторые патогенетические механизмы. Высокую высеваемость УПМ можно объяснить тем, что функция колонизационной резистентности при выраженном дефиците нормофлоры (бактерий родов *Lactobacillus* и *Bifidobacterium*) снижена или отсутствует. Кроме того, дефицит бактерий родов *Lactobacillus* и *Bifidobacterium* в ТК пациентов с паразитозами объясняет факт интоксикации и сенсibilизации организма продуктами обмена и распада гельминтов, так как доказана роль *Lactobacillus spp.* в связывании и разрушении токсических веществ.

Как отмечалось выше, *E. coli* с нормальной ферментативной активностью, принимает участие в синтезе витаминов, обмене холестерина, билирубина, холина, желчных и жирных кислот. Таким образом, при дефиците ее в микробном

биоценозе кишечника в организме нарушаются обменные процессы и витаминобразование.

Оценка степени нарушений микробиоценоза ТК при всех паразитозах указывает на то, что более чем у 60 % пациентов регистрировались II и III степени. Отмеченные данные можно объяснить большим содержанием в толстой кишке бактерий семейства *Enterobacteriaceae*, родов *Klebsiella* и *Proteus*, а также ассоциаций грамотрицательных бактерий с *S. aureus* и грибами рода *Candida*.

Результаты, полученные на основе серотипирования методом полногеномного секвенирования, свидетельствуют о наличии у штаммов *E. coli*, изолированных от пациентов с паразитарными инвазиями и ВЗ ЖКТ, кластеров генов O- и H-серогрупп, относящихся к диареегенным - энтеротоксигенным (ЕТЕС) и энтероинвазивным (ЕИЕС). Также выявлены кластеры генов O-серогрупп внекишечных патогенных *E. coli* (ЕхРЕС), являющихся возбудителями инфекций мочевыводящих путей, бактериемий, менингитов. Треть исследуемых штаммов по O-антигену отнесены к патотипу ЕТЕС. Среди ЕТЕС чаще всего обнаруживался серотип O6, в основном при описторхозной инвазии (3 штамма из 10), а также серотипы O25, выделенные при описторхозной инвазии и ВЗ ЖКТ. У пациентов с описторхозом и лямблиозом обнаружены *E. coli*, носители генов серогрупп O144 и O28ab, относящихся к ЕИЕС. Среди серотипов, отнесенных к ЕхРЕС, были обнаружены кластеры антигенов O1, O2 и O9 серогрупп, чаще они встречались в группе пациентов с ВЗ ЖКТ. В группу прочих *E. coli* вошли серогруппы O12, O21, O73, O74, O81 и O169, которые чаще всего обнаруживались в группе пациентов с диагнозом лямблиоз. Кроме того, 4 штамма *E. coli*, выделенные при лямблиозной инвазии и ВЗ ЖКТ, оказались не серотипируемые по O-антигену. Показано, что 8 из 10 исследованных штаммов *E. coli*, изолированных при описторхозной инвазии, относились к группам: ЕТЕС - O6, O8, O25; ЕИЕС - O144; ЕхРЕС - O1, O2.

Результаты полногеномного секвенирования штаммов *E. coli*, изолированных от пациентов с паразитарными инвазиями и ВЗ ЖКТ, свидетельствовали о наличии у них 25 комплексов генов вирулентности:

адгезинов - *pic*, *sfaS*, *iha*, *lpfA*; инвазинов - *mchF*, *iroN*, *ireA*; токсинов - *astA*, *cnf1*, *vat*, *sat*, *senB*, *eilA*, *sigA*; бактериоцинов – *mchB*, *mchC*, *mcmA*, *cba*, *cma*, *selB*. Практически все штаммы (80%) обладали геном *increased serum survival (iss)* – ген повышенной выживаемости в сыворотке крови, а также *Glutamate decarboxylase (gad)* – ферментом, катализирующим процесс декарбоксилирования в микробной клетке. Ген *enteroaggregative immunoglobulin repeat protein (air)*, который все чаще признается причиной диарейных заболеваний, и ген *Salmonella HilA homolog (eilA)*, являющийся главным регулятором «острова патогенности», определены у 3-х штаммов *E. coli*. Выявлено, что 38,6% от всего количества идентифицированных комплексов генов, ассоциированных с вирулентностью, пришлось на штаммы *E. coli*, изолированные от пациентов при описторхозе и 39,3% - при ВЗ ЖКТ.

Таким образом, описторхозная инвазия в большей степени влияет на колонизацию организма человека штаммами *E. coli*, носителями кластеров генов патогенности и вирулентности, что возможно связано с нарушением иммунитета, либо более выраженным влиянием метаболитов *O. felineus*. Полагаем, что паразитарная инвазия и нарушения микробиоценоза ТК взаимосвязанные явления. Насколько важно обследование на паразитарные заболевания при дисбиозе, настолько и существенно обследование на микробиоценоз ТК при паразитарных болезнях. Своевременная коррекция дисбиоза ТК, развивающегося вследствие паразитарной инвазии, способствует не только уменьшению воспалительного процесса в кишечнике за счет уменьшения УПМ, но и косвенно влияет на уменьшение интоксикации и повышение защитных сил организма, кроме того, содействует профилактике возникновения воспалительных заболеваний ЖКТ.

Микробиоценоз кишечника при паразитарной инвазии значительно отягощает основное заболевание, требует длительного лечения – коррекции иммунитета и нормализации микробиоты кишечника. Вопросы изучения нарушений микробиоценоза кишечника, как в количественном, так и в качественном соотношении очень важны для раскрытия механизмов этих нарушений и их восстановления.

Под действием симбионтов (паразитов и/или бактерий) в условиях миграции патогенов и токсинов в различные биотопы происходит модификация факторов глубоких изменений. Детальное изучение дисбиоза кишечника с учетом роли микрофлоры в патогенезе паразитарных заболеваний будет способствовать эффективной дегельминтизации и минимизации сроков восстановления организма после перенесения инвазии.

В эксперименте *in vitro* при совместном культивировании в искусственной питательной среде 199 проведена оценка взаимовлияния бактерий *K. pneumoniae* и *S. aureus* с метаболитами марит *O. felineus*. Полная гибель марит в опытных группах произошла на восьмые сутки. Но при сокультивировании их с бактериями *K. pneumoniae* жизнеспособность была несколько выше. Жизнеспособность бактерий *K. pneumoniae* и *S. aureus* при культивировании их в среде 199 без марит (контрольные группы) сохранялась до конца наблюдения. При сокультивировании марит *O. felineus* и бактерий *K. pneumoniae* в питательной среде 199 (опытная группа 1) в течение первых четырех суток наблюдения жизнеспособность марит и микроорганизмов остается практически на первоначальном уровне и составляет в среднем 10 экземпляров и $5,1 \times 10^7$ КОЕ/мл соответственно. На 5 – 6 сут наблюдения количество бактерий *K. pneumoniae* в опыте снижалось до $2,9 \times 10^7$ КОЕ/мл, в то время как жизнеспособность марит *O. felineus* на 5-е сут еще сохранялась, а на 6-е и 7-е сут наблюдения в опыте остались единичные жизнеспособные мариты. При этом количество бактерий *K. pneumoniae* на 7 – 8 сут увеличивалось до $5,2 \times 10^7$ КОЕ/мл, а к 9 – 10 сут снижалось до $1,5 \times 10^7$ КОЕ/мл. Жизнеспособность *K. pneumoniae* в питательной среде без марит достоверно выше, чем с маритами (контрольная группа 1). По истечении 4-х сут наблюдения, так же как и в опытной группе 1, отмечалось снижение количества жизнеспособных клеток бактерий *K. pneumoniae* вплоть до 7-х сут.

Высеваемость бактерий *S. aureus* при их совместном культивировании с маритами *O. felineus* (вторая опытная групп) свидетельствовала о том, что резкое падение количества жизнеспособных бактерий отмечалось на 2-е сут наблюдения

с $7,5 \times 10^7$ до $0,6 \times 10^7$ КОЕ/мл. В контрольной группе 4 высеваемость бактерий *S. aureus* имела тенденцию к снижению на 5 – 6 сут и до конца наблюдения оставалась на уровне $1,8 \times 10^7$ КОЕ/мл.

Жизнеспособность марит *O. felineus* резко снижалась после 5-ти сут наблюдения и на 8 – 10-е сут жизнеспособных особей не оставалось. Эти данные получены во всех трех группах, характеризующих жизнеспособность марит – 1-й и 2-й опытных и 3 контрольной. Статистически значимых различий жизнеспособности марит *O. felineus* как в опытных группах, так и контрольной, не зарегистрировано.

В ходе эксперимента исследовалось влияние марит гельминта на изменение основных биохимических показателей, ферментов патогенности и чувствительности к антибиотикам бактерий *K. pneumoniae* и *S. aureus* в процессе их сокультивирования ежедневно в течение 10 сут наблюдения. Было установлено, что бактерии *K. pneumoniae* в процессе наблюдения не изменили своих биохимических свойств, за исключением разложения дульцита на 5-е сут вариант контроля «среда 199 + *K. pneumoniae*» и утилизации аргинина на вторые и третьи сутки в обоих вариантах. Изменения активности ферментов патогенности исследованных штаммов бактерий под воздействием метаболитов марит не отмечалось. Изучение чувствительности их к антибиотикам и специфическим бактериофагам также не выявило различий в показателях зоны подавления роста бактерий опытной и контрольной групп. Исследование указанных показателей бактерий *S. aureus* различий не выявило.

Результаты проведенных исследований свидетельствуют о том, что метаболиты марит *O. felineus* оказывают некоторое ингибирующее влияние на рост бактерий *K. pneumoniae* и *S. aureus*, причем последних в большей степени. Также при совместном культивировании *in vitro* *K. pneumoniae* и *S. aureus* не оказывают угнетающего влияния на марины *O. felineus*.

Вероятно, это может быть связано на первоначальном этапе с конкуренцией за питание, а также воздействием продуктов обмена марит на функционирование микроорганизмов. Поскольку этиологическим феноменом микропаразитоценоза

является симбионтная микрофлора и метаболиты марит *O. felineus*, нами будет продолжено изучение влияния метаболитов описторхов с применением современных технологий.

Проведенные исследования с позиции изучения закономерностей функционирования микропаразитоценозов позволяют объяснить патогенетические механизмы воздействия паразита на организм хозяина, в частности, выявить факторы, влияющие на состав кишечной микрофлоры и биологические свойства отдельных ее видов. Полученные данные являются основой для внедрения принципов медицинской паразитоценологии в исследовательскую работу и практику здравоохранения, открывают перспективы по разработке методов диагностики, терапии и профилактики инфекционных и паразитарных болезней на основе фундаментальных научных знаний о закономерностях функционирования конкретных микропаразитоценозов человека.

Для обоснования закономерностей функционирования микропаразитоценозов в паразитарной системе промежуточного и окончательного хозяев при описторхозе и раскрытия патогенетических механизмов воздействия паразита на организм хозяина для ликвидации его отрицательных последствий проведено исследование микробиоценоза моллюсков. Изучение микробиоценоза переднежаберных моллюсков битиниид - первых промежуточных хозяев *O. felineus* - и среды их обитания, свидетельствовали о широком спектре микробных популяций моллюска. Доминирующей флорой в их биоценозе являлись бактерии рода *Aeromonas*. Лидирующее место в структуре их видового состава занимают *A. veronii*, *A. hydrophila*, *A. ichthiosmia*. Важно подчеркнуть, что бактерии рода *Aeromonas* обнаруживались практически в каждой особи моллюска, причем от 2 до 6 видов.

При сравнении микробиоценоза моллюсков и среды их обитания по наличию *Aeromonas* выявлено, что спектр их видов в симбиозе моллюсков намного шире. Отмечено только 3 вида, которые выделены как из моллюсков, так и из среды их обитания. Изучение биологических свойств наиболее часто

встречающихся видов аэромонад, выделенных из моллюсков и мест их обитания показало, что все исследованные штаммы обладали гемолитической активностью и характеризовались отсутствием лизоцима и плазмокоагулазы, по лецитиназной активности отмечались некоторые статистически не значимые различия. Проведенные исследования позволили установить, что выраженность антилизоцимной активности и биопленкообразования бактерий рода *Aeromonas* варьировали в зависимости от источника выделения штаммов. Изменений вышеуказанных показателей в зависимости от их видовой принадлежности не выявлено. Штаммы, изолированные из битиниид, проявляли более высокие значения антилизоцимной активности, показатель составил $0,7 \pm 0,05$ мкг/мл*ОП, в то время как аналогичный показатель для водных штаммов *Aeromonas spp.* - $0,5 \pm 0,04$ мкг/мл*ОП. Что касается биопленкообразования, культуры, выделенные из воды, имели более высокие значения - $0,4 \pm 0,02$ OD450, по сравнению с подобными показателями у штаммов, изолированных из моллюсков - $0,3 \pm 0,01$ OD450.

Штаммы бактерий, выделенные из битиниид и идентифицированные как НГОБ, отличались большим разнообразием. По частоте обнаружения лидирующее положение занимали бактерии родов *Pseudomonas* и *Comamonas*. При этом, необходимо отметить, что к представителям этих родов отнесено более 50 % выделенных микроорганизмов, объединенных в этой группе. Далее следовали: бактерии родов *Acinetobacter*, *Shewanella*, *Delftia*, *Stenotrophomonas*, *Chryseobacterium*, *Empedobacter*. Самой многочисленной и разнообразной группой грамотрицательных бактерий, выделенных из битиниид, оказались бактерии рода *Pseudomonas*: в $20,62 \pm 9,05\%$ случаев идентифицировались бактерии *P. putida*, *P. mendocina* и *P. mosselii* составили по $14,43 \pm 9,4\%$ соответственно. Анализ микробиоценоза моллюсков и среды их обитания показал, что из 19 видов, обнаруженных как в моллюсках, так и в среде их обитания - водоеме, определены 2 общих вида: *P. putida* и *Shewanella putrefaciens*; и 1 общий вид бактерий *Acinetobacter junii* в пробах придонного грунта.

При анализе показателей АЛА, почти у трети штаммов определяются высокие значения у таких родов как *Acinetobacter*, *Delftia*, *Comamonas* и реже встречающихся – *Chriseobacterium*, *Empedobacter*. Среди бактерий, относящихся к родам *Shewanella*, *Stenotrichomonas*, *Pseudomonas*, встречались единичные штаммы с высокими показателями АЛА.

Таким образом, в структуре микробиоценоза моллюсков битиниид – первого промежуточного хозяина *O. felineus* лидирующее положение среди НГОБ занимали бактерии родов *Pseudomonas*, *Comamonas* и *Acinetobacter*; в структуре микробиоценоза их среды обитания – бактерии рода *Acinetobacter*. Штаммы с выраженной антилизозимной активностью преимущественно встречались среди бактерий родов *Acinetobacter*, *Delftia* и *Comamonas*. Показано, что показатель АЛА водных штаммов был на порядок выше штаммов, выделенных из моллюсков (2,13 и 0,9 соответственно). Разницы по свойству БПО не выявлено.

Бактерии семейства *Bacillaceae* в составе микросимбиоценоза битиниид характеризовались видовым разнообразием и представлены 6-тью родами: *Bacillus*, *Lysinibacillus*, *Exiguobacterium*, *Solibacillus*, *Paenibacillus* и *Brevibacillus*. Наиболее многочисленный и разнообразный по видовому составу род *Bacillus* (13 видов), на долю которого пришлось $78,9 \pm 3,8\%$ выделенных штаммов. Чаще всего определялись такие виды как *B. pumilus* (20 штаммов), *B. licheniformis* (19 шт.), *B. megaterium* (9 шт.), *B. cereus* (6 шт.). На долю бактерий рода *Lysinibacillus* пришлось $6,48 \pm 2,37\%$, которые составили два вида *L. fusiformis* и *L. sphaericus*. Среди бактерий рода *Brevibacillus* идентифицировались три вида: *B. berstelensis*, *B. centrosporus*, *B. agri* и в структуре составили $1,8 \pm 1,3\%$. На бактерии родов *Paenibacillus* (*P. macerans* и *P. amylolyticus*) и *Exiguobacterium* (*E. aurantiacum*.) приходится равное количество - по $3,53\%$ соответственно. Из воды идентифицировано 5 видов, относящихся к семейству *Bacillaceae*. К роду *Bacillus* причислены виды *B. pumilus*, *B. thuringiensis*, *B. weihenstephanensis*, *B. arsenicus*, к роду *Exiguobacterium* - один вид *E. aurantiacum*. В исследуемых пробах грунта водоема в местах сбора моллюсков идентифицировались наиболее часто встречающиеся в микробиоценозе моллюсков и воды водоема виды *B. pumilus* и

B. megaterium и, не встречающийся в указанных объектах, вид *B. flexus*. Кроме того, были идентифицированы бациллы *Exiguobacterium aurantiacum*, которые присутствовали как в структуре микробиоценоза моллюсков, так и в водной среде их обитания.

В структуре микробиоценоза моллюсков битиниид бактерии семейства *Enterobacteriaceae* представлены 13 родами: *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Plesiomonas*, *Serratia*, *Escherichia*, *Raoultella*, *Pectobacterium*, *Edwardsiella*, *Morganella*, *Hafnia*, *Achromobacter*, *Kluuyvera* и 20 видами. По частоте обнаружения представителей этого семейства в микробиоценозе битиниид более 50 % всех выделенных штаммов составили бактерии родов *Enterobacter*, *Citrobacter* – по $25,81 \pm 4,5\%$ соответственно. Далее следовали бактерии рода *Klebsiella* ($19,35 \pm 4,1\%$) и *Plesiomonas shigelloides* ($15,05 \pm 3,7\%$). По разнообразию видов отличался род *Enterobacter*: *E. asburiae*, *E. cloacae*, *E. kobei*, *E. ludwigii*. Род *Citrobacter* представлен видами *C. freundii* и *C. braakii*. Среди бактерий рода *Klebsiella* преимущественно идентифицировались *K. pneumoniae*, реже *K. oxytoca*. Представители рода *Serratia* не многочисленны, идентифицировались два вида *S. marcescens* и *S. fonticola*. Двумя видами также представлен род *Raoultella* - *R. ornithinolytica* и *R. planticola*. Среди единичных находок были штаммы *Escherichia coli*, *Pectobacterium betavascuorum*, *Edwardsiella tarda*, *Morganella morganii*, *Hafnia alvei*.

Микробный пейзаж водоема отличался большим видовым разнообразием и представлен 24 видами, относящимися к 14 родам семейства *Enterobacteriaceae*: *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Plesiomonas*, *Serratia*, *Escherichia*, *Raoultella*, *Pectobacterium*, *Erwinia*, *Morganella*, *Hafnia*, *Rahnella*, *Pantoea*, *Dickeya*. Наибольшим разнообразием видов также отличались бактерии рода *Enterobacter*: *E. asburiae*, *E. cloacae*, *E. kobei*, *E. ludwigii*, *E. pyrinus*. В воде водоема обнаруживались виды, которые не были идентифицированы из моллюсков: *E. pyrinus*, *C. kozeri*, *S. liquefaciens*, *P. carotovorum*, *Erwinia persicina*, *Rahnella aquatilis*, *Pantoea agglomerans*, *Dickeya zeae*, *Dickeya chrysanthemi*.

Таким образом, сравнительная характеристика микробиоценоза моллюсков с микробным пейзажем места их обитания свидетельствует о том, что водная среда их обитания имеет более разнообразный спектр представителей семейства *Enterobacteriaceae*, в то время как грунт водоема в отношении бактерий этого семейства очень скуден, выделены 6 штаммов.

Значение свойств АЛА и БПО изучены у бактерий семейства *Enterobacteriaceae*, составляющих микробиоценоз моллюсков, следующих родов: *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Plesiomonas*, *Serratia*, *Escherichia*, *Raoultella*, *Morganella*, *Hafnia*, *Kluuvera*. Среди водных штаммов энтеробактерий указанные характеристики определялись у представителей всех выше перечисленных родов, кроме *Plesiomonas*. Исследованные штаммы, выделенные из грунта, относились к родам *Enterobacter*, *Escherichia*, *Plesiomonas*.

Среднее значение показателя АЛА всех исследованных штаммов семейства *Enterobacteriaceae* составило $0,51 \pm 0,001$ мкг/мл*ОП, при том, что штаммы, выделенные из моллюсков и воды водоема, имели одинаковые показатели - $0,45 \pm 0,002$ мкг/мл*ОП. Значение АЛА энтеробактерий, выделенных из грунта, достоверно выше ($p < 0,01$), в среднем составило $1,79 \pm 0,001$ мкг/мл*ОП. Что касается функции БПО, то среднее значение этого показателя для всех энтеробактерий составило $0,27 \pm 0,02$ OD450. Более высокими показателями БПО отличались штаммы, изолированные из воды водоема - $0,29 \pm 0,02$ OD450. Средние значения БПО штаммов, выделенных из моллюсков и придонного грунта, составили $0,26 \pm 0,02$ и $0,13 \pm 0,02$ OD450 соответственно.

Наиболее выраженной АЛА среди представителей микробиоценоза моллюсков битиниид, обладали энтеробактерии родов *Raoultella* ($2,00 \pm 0,001$), *Plesiomonas* ($1,40 \pm 0,001$), *Serratia* ($0,95 \pm 0,001$). По показателю БПО наибольшие значения регистрировались у бактерий рода *Klebsiella* ($0,62 \pm 0,03$), а также *Morganella* ($0,40 \pm 0,04$) и *Plesiomonas* ($0,37 \pm 0,01$). Среди водных штаммов более высокие показатели АЛА отмечались у штаммов родов *Serratia* ($1,18 \pm 0,001$) и *Morganella* ($0,92 \pm 0,001$), по значениям БПО - бактерии рода *Kluuvera* - $0,78 \pm 0,01$ OD450. Штаммы, изолированные из придонного грунта, имели высокие

показатели АЛА (бактерий родов *Escherichia* и *Enterobacter*) и слабо выраженные свойства БПО.

В микробиоценозе водоема и грунта (места обитания моллюсков) преобладали бактерии семейства *Enterobacteriaceae*. Результаты исследования микробных сообществ моллюсков и среды их обитания, указывают на то, что спектр популяций микробиоты моллюска по видовому составу шире в сравнении с микробиоценозом почвы и воды. Результаты наших исследований показали, что в структуре микробиоценоза моллюсков представители семейства *Enterobacteriaceae* составили $13,87 \pm 3,03\%$. Вместе с тем, в микробиоценозе водоема и грунта в местах обитания моллюсков, бактерии семейства *Enterobacteriaceae* выделялись в $63,2 \pm 5,1\%$ и $9,2 \pm 3,0\%$ случаев соответственно. Бактерии семейства *Bacillaceae* в структуре микробиоценоза моллюсков встречались в $22,9 \pm 2,96\%$ случаев, в то время как в микробном пейзаже водоема были выделены единичные штаммы.

Сравнение средних значений АЛА бактерий семейства *Enterobacteriaceae* свидетельствует о том, что штаммы, выделенные из моллюсков и водной среды их обитания, практически не отличались по этому показателю.

Анализ показателей БПО энтеробактерий с учетом места их выделения, показал, что более высокие показатели регистрировались у водных штаммов – $0,29 \pm 0,002$ OD450, принадлежащих к родам *Kluuyvera* и *Citrobacter*. Несколько ниже показатели БПО регистрировались у штаммов, изолированных из моллюсков и принадлежали к родам *Klebsiella*, *Morganella* и *Plesiomonas*. Значения БПО штаммов, выделенных из грунта водоема, были очень низкими.

Таким образом, можно сделать вывод о том, что моллюск имеет резидентную (аутохтонную) и аллохтонную (транзиторную) микробиоту, которая, безусловно, оказывает влияние на его защитные механизмы. Известно, что иммунный статус организма беспозвоночного животного зависит не только от состава его микробиоты, участвующей в выработке иммунных комплексов, но и от ее биологических свойств, в частности персистентных характеристик (антилизоцимной активности и биопленкообразования).

Сезонные колебания структуры микробиоценоза моллюсков увеличивают экологическую емкость микробных сообществ, и разнообразие ниш во времени. Оценка сезонной динамики бактерий рода *Aeromonas* показала, что максимальное их количество ($42,5 \pm 3,2\%$) обнаруживалось в составе микробиоты моллюска в конце мая - начале июня. В июле и августе регистрировалось снижение количества этих микроорганизмов до $33,3 \pm 3,8\%$ и $14,41 \pm 2,4\%$ соответственно. То есть, прослеживается тенденция снижения количества *Aeromonas spp.* в микробиоценозе моллюска в течение летнего сезона. Статистически значимые результаты ($p < 0,01$) получены при сравнении указанных показателей в июне и августе.

В отличие от бактерий рода *Aeromonas*, в течение летних месяцев в структуре микробиоты моллюска происходит постепенное увеличение количества штаммов, относящихся к группе НГОб. Анализ помесечной динамики выделения бактерий родов *Acinetobacter*, *Comamonas*, *Shewanella*, *Pseudomonas* и других бактерий, включенных в эту группу, не выявил статистически значимых различий. Однако при объединении родов, прослеживается статистически значимая динамика нарастания их в августе ($p < 0,01$). Так, в июне высеваемость этих бактерий регистрировалась в $32,08 \pm 3,0\%$ случаев, в июле – $29,9 \pm 3,7\%$, в августе $59,01 \pm 3,3\%$. Отмеченная динамика наблюдалась преимущественно за счет бактерий родов *Pseudomonas* и *Comamonas*.

Доля бактерий семейства *Bacillaceae* в структуре микробиоты моллюсков в июне и августе составила $18,75 \pm 2,5$ и $18,02 \pm 2,6\%$ соответственно, в то время как в июле регистрировалось снижение этого показателя до $2,7 \pm 1,3\%$, при этом статистически значимых различий показателей не выявлено.

Бактерии семейства *Enterobacteriaceae* в июне и августе в структуре микробиоты моллюска составили незначительную часть ($5,4 \pm 1,5\%$ и $8,56 \pm 1,9\%$ соответственно). Существенное увеличение их отмечалось в июле - до $34,00 \pm 3,9\%$, при этом, статистически значимые различия регистрировались при сравнении показателей июня и августа с показателями июля ($p < 0,01$). Наличие энтеробактерий в водном объекте и в составе микробиоценоза моллюсков

отражает уровень фекального загрязнения биоценоза окружающей среды. В самый теплый летний месяц – июль – антропогенное фекальное загрязнение максимальное, что определяет возрастание доли бактерий семейства *Enterobacteriaceae* в структуре микробиоты моллюсков.

Таким образом, в начале эпидсезона в структуре микробиоты преобладают бактерии рода *Aeromonas* как в целом, так и по видовому разнообразию, которые к концу лета «замещаются» НГОБ. Важно отметить, что *Aeromonas* в начале летнего сезона, имея преимущество по разнообразию видов и количеству в структуре микробиоты, отличаются невысокими показателями антилизотимной активности (0,7 мкг/мл ОП), в то же время бактерии группы НГОБ, накапливаясь к августу, обладают более выраженной антилизотимной активностью (1,54 мкг/мл ОП). То есть в период максимальной пораженности моллюсков личинками *O. felineus* его микробиота обладает минимальной антилизотимной активностью.

Полученные результаты показали пик «активных» микроорганизмов, в период, когда, по данным исследователей Тюменского научно-исследовательского института краевой инфекционной патологии, регистрируется максимальная пораженность моллюсков личинками *O. felineus*. Это позволило обосновать гипотезу о влиянии микробиоценоза моллюска на приживаемость яиц в его организме.

Поскольку микробиота любого живого организма участвует во всех биохимических процессах и влияет на иммунный статус, можно полагать, что микробиоценоз моллюска оказывает влияние на приживаемость яйца в его организме. Кроме того, микрофлора, формируя колонизационную резистентность, препятствует физиологической адаптации яйца в организме моллюска, и как следствие – запуску цикла развития *O. felineus*. Сезонная изменчивость микробиоты моллюсков увеличивает экологическую емкость микробных сообществ и разнообразие ниш во времени. Изучение сезонной изменчивости, помимо чисто теоретического интереса, имеет важное практическое значение, связанное с закономерностями структуры и динамики микробиоты моллюсков.

Повышенные концентрации аэромонад в водных экосистемах в теплые месяцы создают возможность для их воздействия на организм рыб, животных и человека. Микробиологическое исследование воды открытых водоемов показало наличие *Aeromonas spp.* в $59,1 \pm 10,5\%$ проб.

По результатам бактериологического исследования проб лечебной грязи (в 1 г) в $32,2 \pm 7,5\%$ случаев были обнаружены бактерии рода *Aeromonas spp.* При этом, только $4,2\%$ проб не соответствовали допустимым значениям по микробиологическим показателям

В результате исследования рыб семейства карповых установлена их зараженность жизнеспособными личинками *O. felineus*. Количество метацеркарий в 1 г мышц язя (*Leuciscus idus* семейства *Cyprinidae*) варьировало от 2 до 42 личинок и в среднем составило 15 личинок на особь. Зараженность этого вида рыб была наибольшей – $82,4 \pm 9,2\%$ со средней интенсивностью инвазии 143 личинки в 1 экземпляре рыбы. Количество метацеркарий в 1 г мышц в среднем составило $14,7 \pm 3,2$ личинки и варьировало от 2 до 42 личинок. Экстенсивность инвазии плотвы личинками *O. felineus* установлена в $30,8 \pm 7,4\%$ со средним количеством личинок $4,5 \pm 2,6$ в 1 г мышц. Из 10 исследованных экземпляров уклей, заражена метацеркариями *O. felineus* была лишь одна особь.

Микробиоценоз кишечного содержимого рыб был представлен ассоциациями бактерий семейства *Enterobacteriaceae* (53,3 %) и *Aeromonadaceae* (46,7 %). В структуре бактерий семейства *Enterobacteriaceae* идентифицировались штаммы родов *Klebsiella* (43,75%), *Citrobacter* (25,0 %), *Serratia* (18,75 %), *Raoultella* и *Enterobacter* (6,25% соответственно). Семейство *Aeromonadaceae* представлено видами *A. salmonicida* (35,7%), *A. hydrophila* и *A. bestiarum* (21,4% соответственно); *A. ichthiosmia*, *A. eucrenophila* и *A. veronii* (7,1% соответственно).

Сравнительный анализ контаминации бактериями замороженной и свежесловленной рыбы свидетельствовал о том, что на 1 экземпляр свежей рыбы приходится 2,2 штамма бактерий, в то время как на 1 экземпляр замороженной рыбы приходится 1,6 штаммов. Что касается контаминации

бактериями рода *Aeromonas*, то на 1 экземпляр замороженной рыбы их приходилось 0,1 (6 штаммов аэромонад на 53 экземпляра рыб), а свежевывловленной рыбы – 0,6 штаммов бактерий (20 штаммов аэромонад на 31 экземпляр).

Таким образом, полученные результаты исследования свидетельствуют о высокой контаминации микроорганизмами рыб, не подвергающейся низкотемпературной обработке до употребления в пищу. Микроорганизмы, изолированные из рыб, инвазированных личинками возбудителя описторхоза, относятся к условно-патогенным бактериям и играют роль в этиологии воспалительных заболеваний кожи рыб, что влияет на качество пищевой рыбной продукции. Поэтому, при обработке рыбы (чистка, потрошение, разделывание) необходимо предотвращать контаминацию рук, разделочных досок и рабочих поверхностей. Соблюдение условий хранения и режима обработки рыбы позволит минимизировать риски заражения биогельминтозами, передающимися через рыбу, и бактериальными инфекциями ЖКТ у населения.

Анализ случаев выделения бактерий рода *Aeromonas* из клинического материала пациентов показал, что чаще всего они изолировались из мочи – 53,9% штаммов, в 17,65% проб обнаруживались в мазках со слизистой зева, в 12,7% - при проведении исследований кишечного микробиоценоза. Кроме того, единичные штаммы *Aeromonas spp.* были выделены со слизистой носа, из бронхов, мокроты, цервикального канала, влагалища, грудного молока, кисты семенного канатика, уха, раневого отделяемого и при патологоанатомическом исследовании трахеи. Видовая характеристика бактерий рода *Aeromonas*, изолированных из различных проб биоматериала характеризовалась разнообразием: выделено и идентифицировано 9 видов. Наиболее часто идентифицировались *A. caviae* и *A. hydrophila*.

Анализ сезонности выделения *Aeromonas spp.* из клинического материала по месяцам, показал два «пика» подъема - апрель и сентябрь. Причем сезонные подъемы высеваемости были характерны как для южных районов Тюменской области, так и ХМАО-Югры, показатель корреляционной зависимости

помесячной динамики обнаружения аэромонад в биоматериале пациентов указанных регионов составил – 0,81.

Проведенные исследования показали, что в 48,04% проб биоматериала бактерии рода *Aeromonas* изолировались в монокультуре, в остальных пробах аэромонады выделялись в ассоциациях: 34,3% проб – 2 культуры микроорганизмов, 12,74% - 3 культуры и 4,9% - 4 вида бактерий. В одной пробе биоматериала было обнаружено 5 видов микроорганизмов (из наружного слухового прохода). В ассоциациях с *Aeromonas spp.* высевались бактерии родов *Acinetobacter*, *Enterobacter*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* и другие условно-патогенные микроорганизмы. Кроме того, важно отметить, что выделенные из биоматериала бактерии рода *Aeromonas* в 90% случаев обладали гемолитической активностью независимо от вида, локуса выделения, ассоциации или монокультуры.

Исследование чувствительности к антибактериальным препаратам *Aeromonas spp.* методом серийных разведений показало, что по минимальной ингибирующей концентрации (МИК) выявлена резистентность к тикарциллин/клавуланату (группа пенициллинов + ингибитор β-лактомаз) и колистину (группа полимиксинов).

Сравнительный анализ дендрограмм клинических штаммов *A. hydrophila*, *A. salmonicida* и *A. veronii* со штаммами, выделенными из воды и рыб, а также высокий коэффициент корреляции их белковых спектров, свидетельствовал о том, что воду и рыбу можно рассматривать как факторы передачи при аэромонадной инфекции. Вместе с тем, в структуре клинических штаммов рода *Aeromonas*, изолированных из различных локусов, преимущественно определялись *A. caviae*. В исследование взято 8 штаммов этого вида, выделенных от пациентов, проживающих в городах юга Тюменской, Свердловской областей, а также ХМАО-Югры. Среди них максимальное подобие белковых спектров отмечено у штаммов, изолированных из мочи. Важно подчеркнуть, что эти штаммы выделены от пациентов, проживающих на географически отдаленных

территориях, что подчеркивает их штаммоспецифичность и указывает на широкое распространение бактерий рода *Aeromonas*.

Для протеомного анализа подобия штаммов бактерий рода *Aeromonas*, изолированных из различных объектов окружающей среды и клинического материала, применен способ расшифровки вспышек бактериальных инфекций и определения источника заражения (Патент 2696101 РФ. Способ расшифровки вспышек бактериальных инфекций и определения источника заражения / Катаева Л. В., Колотова О. Н., Степанова Т. Ф., (RU) - № 2018127230/04; заявл. 24.07.2018; опубл. 31.07.2019. Бюл. № 22). В соответствии с изобретением, выделенные классическим бактериологическим методом штаммы бактерий идентифицируют методом масс-спектрометрии, в результате которого получают их протеинограммы – белковые спектры. Протеинограммы подвергают кластерному и корреляционному анализу. Корреляционный и кластерный анализ выполняют в программном обеспечении MALDI Biotyper прибора MICROFLEX, Bruker Daltonics. Кластерный анализ показывает однородность анализируемых штаммов бактерий. Корреляционному анализу подвергаются белковые спектры штаммов выборки, определяются коэффициенты корреляции, по которым вычисляется показатель корреляционной зависимости - это среднее значение коэффициентов корреляции всех сравниваемых протеинограмм штаммов бактерий с учетом стандартной ошибки среднего.

Обнаружение бактерий рода *Aeromonas* в клиническом материале из различных локусов пациентов лечебных организаций, их видовое разнообразие, выделение в монокультуре и ассоциациях, резистентность к антибиотикам и весенне-осенние подъёмы свидетельствуют об этиологической значимости их в инфекционном процессе. Для совершенствования биологической безопасности водных биотопов актуальным является изучение их микробиоценоза, в частности циркуляции бактерий рода *Aeromonas*, с целью получения информации о патогенных свойствах, антибиотикорезистентности, сезонных колебаниях. Для предотвращения распространения инфекций *Aeromonas* необходимо проведение

микробиологических исследований водных объектов, объектов окружающей среды, а также пищевой рыбной продукции.

ВЫВОДЫ

1. Установлены нарушения кишечного микробиоценоза пациентов с паразитарными инвазиями, связанные с дефицитом индигенной микробиоты: *Bifidobacterium spp.* менее 10^8 КОЕ/г при описторхозе (72,3%); *Lactobacillus spp.* менее 10^6 КОЕ/г - лямблиозе, токсоплазмозе, токсокарозе и иксодовом клещевом боррелиозе (74,7%). Снижение количественного содержания *Bifidobacterium spp.* обуславливает частоту обнаружения бактерий рода *Klebsiella* (33,4%) и *S. aureus* (20,4%).
2. Выявлено влияние описторхозной инвазии на колонизацию толстого кишечника человека энтеропатогенными штаммами *E. coli* (ЕТЕС - О6, О8, О25; ЕІЕС – О144), носителями кластеров О-антигенов (80,0%) и генов, ассоциированных с вирулентностью (38,6%).
3. Метаболиты марит *O. felineus* (*in vitro*) оказывают ингибирующее влияние на персистенцию бактерий *K. pneumoniae* и *S. aureus*, которое подтверждается снижением их количества с $5,1 \times 10^7$ до $1,5 \times 10^7$ КОЕ/мл и с $7,5 \times 10^7$ до $0,6 \times 10^7$ КОЕ/мл соответственно.
4. Определена структура микробиоценоза первых промежуточных хозяев *O. felineus*, которая представлена бактериями рода *Aeromonas* (39,6%), неферментирующие грамотрицательные бактерии (35,0%), бактериями семейств *Enterobacteriaceae* (13,9%) и *Bacillaceae* (11,5%).
5. Сезонная динамика микробиоценоза моллюсков характеризуется преобладанием в начале лета *Aeromonas spp.* (42,5%) с низким показателем антилизосимной активности (0,7 мкг/мл ОП), к окончанию летнего сезона их количество снижается (14,4%), при этом повышается частота обнаружения неферментирующих грамотрицательных бактерий (59,01%) с высокой антилизосимной активностью (1,54 мкг/мл ОП).
6. В период максимальной пораженности моллюсков личинками *O. felineus* микробиота его обладает слабо выраженной антилизосимной активностью. Пик

микроорганизмов, обладающих выраженными свойствами персистенции, совпадает с максимальной пораженностью моллюсков.

7. Отмечена контаминация рыб семейства *Cyprinidae*, инвазированных личинками *O. felineus*, ассоциациями бактерий семейства *Enterobacteriaceae* (53,3%) и *Aeromonadaceae* (46,7%); превалирование штаммов родов *Klebsiella* (43,75%), *Citrobacter* (25,0%), *A. salmonicida* (35,7%), *A. hydrophila* (21,4%) и *A. bestiarum* (21,4%).

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Комплекс диагностических тестов при обследовании на наличие паразитарной инвазии должен включать исследование микробиоценоза толстой кишки, результаты которого позволят провести коррекцию нарушений и профилактику воспалительных заболеваний желудочно-кишечного тракта, вызванной дегельминтизацией пациента.

Схемы лечения паразитарных инвазий должны содержать назначения пробиотиков на основе: *Bifidobacterium spp.* при описторхозе; бактерий рода *Lactobacillus* - лямблиозе, токсоплазмозе, токсокарозе и иксодовом клещевом боррелиозе.

Контаминация карповых видов рыб, являющихся вторым промежуточным хозяином *O. felineus*, бактериями семейств *Enterobacteriaceae* и *Aeromonadaceae*, может свидетельствовать о инвазированности рыб личинками паразита и влиять на микробиологические и паразитологические показатели при оценке качества рыбной продукции.

Представляется целесообразным для идентификации видового разнообразия бактерий рода *Aeromonas* использовать метод масс-спектрометрии при проведении бактериологического исследования мочи с целью улучшения диагностики урогенитальной инфекции.

С целью расшифровки вспышек бактериальных инфекций и определения источника заражения целесообразно проведение протеомного анализа подобия штаммов бактерий, изолированных из различных объектов окружающей среды и клинического материала.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

Дальнейшее продолжение исследований считаем необходимым направить на изучение микропаразитоценозов, опирающееся на результаты метагеномного анализа микробиоты толстой кишки в эксперименте на лабораторных животных – золотистых хомячках, инвазированных возбудителем описторхоза, которое позволит нивелировать факторы, оказывающие влияние на микробиоценоз кишечника окончательного хозяина. Сравнительный анализ данных метагеномного исследования микробиоты лабораторных животных опытных и контрольных групп позволит выявить маркеры инвазии, на основе которых возможна разработка праймеров для создания диагностического набора, выявляющего возбудителя *O. felineus* методом полимеразной цепной реакции.

Созданная рабочая коллекция штаммов бактерий, изолированных от пациентов с паразитозами, требует дальнейшего расширения и углубленного биоинформационного анализа для создания национальной базы данных, в рамках формирования системы микробиологического мониторинга.

Необходимо дальнейшее изучение комплекса взаимоотношений микроорганизмов в кишечном биотопе и в объектах окружающей среды, которое с учетом вовлечения в процесс промежуточных и окончательных хозяев паразита, дополнит фундаментальные знания о закономерностях их взаимовлияния в микропаразитоценозе.

С целью минимизации рисков распространения бактериальных инфекций, факторами передачи которых являются объекты окружающей среды (вода, грунт, рыбная продукция), необходимо дальнейшее совершенствование микробиологического мониторинга, включающего контроль циркуляции бактерий рода *Aeromonas*.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- Абс – абсолютное число
- АЛА – антилизоцимная активность
- АМП – антимикробные препараты
- БПО - биопленкообразование
- ЖКТ – желудочно-кишечный тракт
- ИКБ – иксодовый клещевой боррелиоз
- КА – кровяной агар
- КОЕ – колонии образующие единицы
- КР – колонизационная резистентность
- МПА – мясо-пептонный агар
- МПБ – мясо-пептонный бульон
- НГОБ – неферментирующие грамотрицательные бактерии
- нм - нанометр
- УПМ – условно-патогенные микроорганизмы
- АИЕС - адгезивно-инвазивная *E.coli*
- air – enteroaggregative immunoglobulin repeat protein
- AMR – антимикробная резистентность
- astA – EAST-1 heat-stable toxin
- cba – Colicin B
- cma – Colicin M
- cnf – Cytotoxic necrotizing factor
- E.coli* (Dem+) – гемолитические *E.coli*
- E.coli* (Gem+) – гемолитические *E.coli*
- E.coli* (Лас-) – лактозонегативные *E.coli*
- E.coli* (Лас-) лактозонегативные *E.coli*
- ЕАЕС - энтероагрегационная *E.coli*
- ЕНЕС - интерогеморрагическая *E.coli*
- ЕИЕС - энтероинвазивная *E.coli*
- ЕИЕС – энтероинвазивные *E.coli*
- eilA – Salmonella Hila homolog
- ЕРЕС - энтеропатогенная *E.coli*
- ЕТЕС - энтеротоксигенная *E.coli*
- ЕТЕС – энтеротоксигенные *E.coli*
- ЕхРЕС - внекишечная патогенная *E.coli*
- ЕхРЕС – внекишечные патогенные *E.coli*
- gad – dlutamate decarboxylase

IgM – иммуноглобулины М
iha – Adherence protein
ireA – Siderophore receptor
iroN – Enterobactin siderophore receptor protein
iss – increased serum survival
Lg – десятичный логариф
lpfA – Long polar fimbriae
mchB – Microcin H47 part of colicin H
mchC - MchC protein
mchF – ABC transporter protein
mcmA - microcin M part of colicin H
O-AGC - кластер O-антигена
pic – Serine protease autotransporters of Enterobacteriaceae
sat – Secreted autotransporter toxin
selB – Endonuclease colicin E2
senB – Plasmid-encoded enterotoxin
sfaS – S-fimbriae minor subunit
sigA – Shigella IgA-like protease homologue
Slt - Shiga-like toxin
SNP – однонуклеотидные последовательности
vat – Vacuolating autotransporter toxin

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Айжигайтканова, С. К. Подходы к медикаментозному лечению дисбактериоза кишечника / С. К. Айжигайтканова // Русский медицинский журнал. - 2007.- Т. 9, № 2. - С. 73-77.
2. Алексеев, Г. А. Памяти Дмитрия Леонидовича Романовского (К 120-летию со дня рождения) / Г. А. Алексеев, Д. Н. Засухин // Проблемы гематологии и переливания крови. - 1981. - Т. 26, № 3. - С. 59.
3. Алимова, Н. М. Клинико-неврологическая и иммунологическая характеристика больных с судорожным синдромом при гименолепидозе и лямблиозе / Н. М. Алимова, Г. К. Садыкова, Х. Ю. Ахмедова // Врач-аспирант. - 2010. - № 1 (38). - С. 4-8.
4. Алешкин, В. А. Микробиоценоз кишечника / В. А. Алешкин, А. В. Алешкин, С. С. Афанасьев, А. В. Караулов, Е. А. Воропаева, М. С. Афанасьев, Ю. В., Несвижский, Е. О. Рубальский // Вопр. диетологии. - 2015. - № 4 (5). - С. 15-52.
5. Андреева, И. В. Доказательства обоснованности профилактического применения пробиотиков / И. В. Андреева // Фарматека. - 2006. - № 6. - С. 56-62.
6. Андреева, И. В. Потенциальные возможности применения пробиотиков в клинической практике / И. В. Андреева // Клиническая микробиология и антимикробная терапия. – 2006. – Т. 8, № 2. – С. 151-172.
7. Анохин, В. А. Роль основных представителей анаэробной кишечной флоры в норме и патологии / В. А. Анохин, Ю. А. Тюрин // Казанский медицинский журнал. - 2001.- № 2. - С. 149- 151.
8. Апатенко, В. М. Основы паразитоценологии / В. М. Апатенко, В. А. Головки // Ветеринарная патология. - 2005. - № 2. - С. 4-22.
9. Ардатская, М. Д. Дисбактериоз кишечника / М. Д. Ардатская // *Materia Medica*. – 2003. - № 2-3. - С. 52-76.
10. Ардатская, М. Д. Дисбактериоз кишечника: эволюция взглядов. Современные принципы диагностики и фармакологической коррекции / М. Д. Ардатская, О. Н.

- Минушкин // Гастроэнтерология (Прил. к журн. *Consilium medicum*). - 2006. - № 2. - С. 4-17.
11. Атлас человеческих глист / Сост. Н. А. Холодковский, проф. Имп. Воен.-мед. акад. Вып. 1-3. – СПб.: тип. Имп. Акад. наук, 1898-1899. - С. 36.
12. Бандурина, Т. Ю. Лямблиоз у детей / Т. Ю. Бандурина, Г. Ю. Кнорринг // Лечащий врач. - 2004. - № 4. - С. 60-62.
13. Беклемишев, В. Н. Биоценологические основы сравнительной паразитологии / В. Н. Беклемишев; ред. К. А. Бреев. - М.: Наука, 1970. - 502 с.
14. Беленева, И. А. Таксономический состав микрофлоры, ассоциированной с культивируемыми моллюсками *Crassostrea Lugubris* и *Perna Viridis* и с водой в лагуне залива Нячанг, Вьетнам / И. А. Беленева, Н. В. Жукова, Ле Лан Х., Нгуен Тран Д.Х. // Микробиология. - 2007.- Т. 76, № 2. - С. 253-262.
15. Белобородова, Э. И. Особенности течения язвенной болезни двенадцатиперстной кишки, ассоциированной с инфекцией *Helicobacter pylori* в сочетании с хроническим описторхозом / Э. И. Белобородова, Т. Ю. Наумова, Н. Г. Крицкая, Т. А. Загромава, Е. К. Гладилина, Т. И. Наумова, С. Ю. Стан, М. Ю. Кречмер, И. А. Святенко // Медицинская паразитология и паразитарные болезни. - 2006. - № 4.- С. 49-51.
16. Беляева, М. И. Эколого-биологические особенности формирования эндемичных очагов описторхоза в Западной Сибири: автореф. дис. ... д-ра биол. наук: 03.02.11 / Беляева Маргарита Ивановна. – Москва, 2016. – 43 с.
17. Беляева, Т. В. Токсокароз / Т. В. Беляева, М. М. Антонов // Новые Санкт-Петербургские врачебные Ведомости: Всероссийский журнал врача общей практики. - 2004. - № 2. - С.52-54.
18. Беляков, В. Д. Саморегуляция паразитарных систем (молекулярно-генетические механизмы) / В. Д. Беляков, Д. Б. Голубев, Г. Д. Каминский, В. И. Тец. - Ленинград: Медицина, 1987. - 240 с.
19. Бердичевский, Б. А. Аутофлора как самостоятельная система защиты организма человека / Б. А. Бердичевский, В. Е. Цветчих, Р. А. Султанбаев, А. А. Овчинников, А. В. Мурычев, О. О. Гостюхина, С. В. Недоризанюк, М. С.

- Макарова, И. В. Ипполитов, Е. Г. Чеснокова, Н. Г. Леонтьев // Научный вестник Тюменской медицинской академии. - Тюмень, 2004. - № 4. - С. 11.
- 20.Безр, С. А. Биология возбудителя описторхоза / С. А. Безр. - Москва, 2005. - 336 с.
- 21.Безр, С. А. О реальности борьбы с моллюсками в деле ликвидации описторхоза / С. А. Безр // Вопросы краевой инфекционной патологии. - Тюмень, 1973. - С. 191-193.
- 22.Безр, С. А. Функциональные особенности ультраструктуры внешних оболочек яиц описторхид. Сообщение 2. Механизмы удержания яиц на субстратах / С. А. Безр, Ш. С. Бисариева, С. М. Герман, О. Дитрих, М. Гибода // Медицинская паразитология и паразитарные болезни. - 1991. - № 6. - С. 32-36.
- 23.Биргер, М. О. Справочник по микробиологическим и вирусологическим методам исследования / М. О. Биргер. - М.: Медицина, 1982. - 463 с.
- 24.Бозиев, В. Б. Антилизосимная активность энтеробактерий: автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.00.07 / Бозиев Валерий Борисович.- Ростов на Дону, 1995. - 16 с.
- 25.Бондаренко, В. М. Идеи И. И. Мечникова и современная микроэкология кишечника человека / В. М. Бондаренко, В. Г. Лиходед // Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. - 2008. - № 5. - С. 23-29.
- 26.Бондаренко, В. М. Роль транслокации кишечной бактериальной аутофлоры и ее токсических биомолекул в патологии человека / В. М. Бондаренко, Е. В. Рябиченко // Гастроэнтерология. – 2007. - № 5. – С. 86-92.
- 27.Бондаренко, В. М. Секретируемые факторы патогенности энтеробактерий / В. М. Бондаренко, А. Р. Мавзютов // Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. -2002. - №1. - С. 84-90.
- 28.Бондарь, В. И. Гельминтозы и заболеваемость детей / В. И. Бондарь // Terra medica nova. – 2007. - № 2. - С. 8-10.
- 29.Бондарь, Т. П. Морфофункциональное состояние эозинофилов у больных токсоплазмозом / Т. П. Бондарь, Н. М. Ишкова, О.И. Запорожцева // Клиническая лабораторная диагностика. – 2010. - № 9. – С.53.

- 30.Бочков, А. И. Некоторые актуальные вопросы микробной экологии человека в клинической микробиологии / А. И. Бочков // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. – 2008. - № 5. - С. 31-35.
- 31.Бриттов, В. А. Возбудители трихинеллеза / В. А. Бриттов. - Москва: Наука, 1982. - 271 с.
- 32.Бриттов, В. А. Симбионты гельминтов и их роль в патогенезе гельминтозов / В. А. Бриттов, М. Г. Василюкин. – Владивосток, 1986. - 40 с.
- 33.Бронштейн, А. М. Гельминтозы органов пищеварения: проблемы диагностики и лечения / А. М. Бронштейн, Н. А. Малышев, В. И. Лучшев // Русский медицинский журнал.- 2005. - Т. 7, № 2. - С. 67-69.
- 34.Бронштейн, А. М. Кишечные нематодозы: клиника, диагностика, лечение / А. М. Бронштейн // Качество жизни. Медицина. - 2004. - № 1. - С. 16-22.
- 35.Брускин, Б. Р. Некоторые вопросы биологии моллюска *Bithynia leachi Shepp* / Б. Р. Брускин // Тр. Омского мед. института. – Омск, 1956. – Вып. 19. – С. 81–89.
- 36.Бузолева, Л. С. Адаптация патогенных бактерий к абиотическим факторам окружающей среды: автореф. дис. ... д-ра биол. наук: 03.00.07 / Бузолева Любовь Степановна. - Владивосток, 2001. - 48 с.
- 37.Буйкин, В. Ф. Клиническая характеристика резидуальных форм описторхоза / В. Ф. Буйкин, В. П. Шурыгин // Актуальные проблемы описторхоза: тезисы III совещания Координационного совета межотраслевой целевой комплексной научной программы "Описторхоз" и науч.-практич. конф. по проблеме; Томск 25-27 ноября 1986г. - Томск: Томский мед. институт, 1986. - С. 82-83.
- 38.Бухарин, О. В. Фотометрическое определение антилизозимной активности микроорганизмов / О. В. Бухарин, А. В. Валышев, Н. Н. Елагина, Ю. Б. Иванов, С. В. Черкасов // Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. - 1997. - № 4. - С. 117-120.
- 39.Бухарин, О. В. Персистенция патогенных бактерий / О. В. Бухарин. - М.: Медицина, 1999. - 366 с.

- 40.Бухарин, О. В. Микробные ингибиторы лизоцима / О. В. Бухарин, А. В. Вальшев // Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. - 2006. - № 4. - С. 8-13.
- 41.Бухарин, О. В. Изменение популяционной структуры бактерий по антилизоцимному признаку под влиянием гексилрезорцина / О. В. Бухарин, Н. Б. Перунова, С. В. Явнова // Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. - 2008. - № 6. - С. 7-10.
- 42.Бухарин, О. В. Симбиоз и его роль в инфекции: монография / О. В. Бухарин, Е. С. Лобакова, Н. Б. Перунова, Б. Я. Усвяцов, С. В. Черкасов. – Екатеринбург: УрО РАН. - 2011. - 300 с.
- 43.Бухарин, О. В. Микросимбиоз: монография / О. В. Бухарин, Н. Б. Перунова. - Екатеринбург: УрО РАН, 2014. - 260 с.
- 44.Бухарин, О. В. Бифидофлора при ассоциативном симбиозе человека / О. В. Бухарин, Н. Б. Перунова, Е. В. Иванова. - Екатеринбург: ИКВС, 2014. – 210 с.
- 45.Бычков, В. Г. Молекулярно-генетические подходы в паразитологии (на примере описторхоза) / В. Г. Бычков, В. П. Сергиев, А. Х. Сабилов, Г. Г. Крылов, Е. Д. Хадиева, Т. В. Бычкова // Медицинская паразитология и паразитарные болезни. – 2007. - № 2. - С. 3-6.
- 46.Бычков, В. Г. Симбионты паразитов, их роль в патогенезе болезней / В. Г. Бычков, Сергиев В. П., Плотников А. О., Крылов Г. Г., Суховой Ю. Г., Сабилов А. Х., Варницына В. В., Николенко М. В.// Медицинская паразитология и паразитарные болезни. - 2008. - № 2. - С. 3-8
- 47.Васерин, Ю. И. Влияние последствий стихийных бедствий на циркуляцию возбудителей паразитозов / Ю. И. Васерин, Е. П. Хроменкова, Л. Л. Димидова, Т. И. Твердохлебова, С. А. Нагорный, Л. В. Прокопова, О. С. Думбадзе, Н. Е. Мурашов, Т. М. Бутаев, А. Х. Агиров, С. В. Осмоловский, Л. Б. Папаценко, М. В. Солдатова // Медицинская паразитология и паразитарные болезни. - 2005. - № 4. - С. 8-12.
- 48.Васильев, Д. А. Детекция *Aeromonas hydrophila* в пищевой продукции из гидробионтов с применением биосенсоров на основе гомологичных

бактериофагов / Д. А. Васильев, Д. А. Викторов, И. Р. Насибуллин, С. Н. Золотухин, А. А. Нафеев, И. Г. Горшков, Н. Г. Куклина, Н. Г. Барт // *Фундаментальные исследования*. - 2014. - № 5-1. - С. 50-54.

49.Васильева, Л. И. Микробный биоценоз у новорожденных в норме и при септических заболеваниях / Л. И. Васильева // *Педиатрия*. - 1991. - № 5. - С. 27-30.

50.Виноградова, Л. А. Индикация биоценоза потенциально патогенных, индикаторных и патогенных бактерий в водных объектах окружающей среды / Л. А. Виноградова // *Методы индикации биоценоза патогенных и потенциально патогенных микроорганизмов в объектах окружающей среды*. - М.: МНИИГ, 1985. - С. 42-53.

51.Воробьев, А. А. Популяционно-генетические аспекты микробиологического фенотипа кишечника здорового человека / А. А. Воробьев, Ю. В. Несвижский, Е. В. Буданова, Л. О. Иноземцева // *Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. - 1995. - № 4. – С. 30-35.

52.Воробьев, А. А. Бактерии нормальной микрофлоры: биологические свойства и защитные функции / А. А. Воробьев, Е. А. Лыкова // *Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. - 1999. - № 6. – С. 102-105.

53.Герман, С. М. Различия в восприимчивости моллюсков из разных популяций к экспериментальному заражению *Opisthorchis felineus* / С. М. Герман, С. А. Беэр // *Паразитология*. - Вып. 3. – С. 504-508.

54.Глазунова, Л. В. Токсокароз у детей / Л. В. Глазунова, Р. Г. Артамонова, Е. Г. Бекташянц, Е. В. Кубышева, О. Л. Шиц, Н. И. Кирнус, Е. Ю. Иванова // *Лечебное дело*. - 2008. - № 1. - С. 69-73.

55.Гланц, С. Медико-биологическая статистика / С. Гланц // М. – 1999. – 460 с.

56.Горохов, В. В. Экологические основы борьбы с вредоносными моллюсками / В. В. Горохов. - М.: Колос, 1983. – С. 207.

57.ГОСТ 33215-2014 Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила оборудования помещений и организации процедур. Методические рекомендации по содержанию лабораторных животных в вивариях научно-исследовательских институтов и учебных заведений.

- 58.Грачева, Н. М. Возможности коррекции дисбактериоза кишечника у детей / Н. М. Грачева, М. С. Петрова, Т. Н. Москалева, А. В. Алешкин, А. И. Соловьева, С. С. Бочкарева // Инфекционные болезни. – 2006. - Т. 4, № 4. - С. 62-66.
- 59.Гречаная, Б.Н. Некоторые особенности существования условно – патогенной микрофлоры при дисбиотических процессах у больных / Б.Н. Гречаная // Научный вестник Тюменской государственной медицинской академии. - 1999. - № 3-4. - С. 107.
- 60.Григорьева, И. Н. Клинико-эпидемиологическая характеристика описторхоза / И. Н. Григорьева // Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы. - 2012. - № 4. - С. 39-43.
- 61.Гузеева, М. В. Современная ситуация по токсокарозу в Москве / М. В. Гузеева // Медицинская паразитология и паразитарные болезни. - 2009. - № 1. - С. 49-51.
- 62.Гуторова, Л. Д. Кишечная микрофлора детей при лямблиозной инвазии / Л. Д. Гуторова, В. Ф. Бурмакина, К. Н. Клочко // Медицинская паразитология и паразитарные болезни. - 1971. - № 2. - С. 72-74.
- 63.Диагностика, профилактика и лечение дисбактериозов кишечника: метод. реком.; МЗ СССР № 10 – 11/4. - М., 1991. – 15 с.
- 64.Директива 2010/63/EU Европейского парламента и совета европейского союза по охране животных, используемых в научных целях. – Санкт-Петербур., - 2010. – 48 с.
- 65.Догель, В. А. Общая паразитология / В. А. Догель. – Ленинград, 1962. - 463 с.
- 66.Долгих, Т. И. Клинико-лабораторный мониторинг врожденного и приобретенного токсоплазмоза у детей / Т. И. Долгих, Т. Ф. Соколова, М. М. Мироненко, Н. С. Запарий, Н. Е. Турок, Ф. В. Носкова, Н. А. Магда // Российский педиатрический журнал. – 2010. - № 6. - С. 29-33.
- 67.Дроздов, В. Н. Изыскание мер борьбы с трематодами человека в эксперименте и природных условиях / В. Н. Дроздов // Проблема описторхоза в Западной Сибири: сб. науч. работ. – Ленинград, 1977. - С. 34-39.

- 68.Залипаева, Т. Л. Клинические проявления лямблиозной инвазии у детей / Т. Л. Залипаева // Медицинская паразитология и паразитарные болезни. - 2002. - № 3. - С. 29-32.
- 69.Звержановский, М. И. Паразитоценоз шакала (*canis aureus L.*) с участием нематоды *Dirofilaria immitis* (Lecdy, 1856) в трофико-эпизоотологических цепях предгорной зоны Краснодарского края / М. И. Звержановский, Н. Ю. Басова, А. В. Тулов // Теория и практика паразитарных болезней животных: материалы докл. науч. конф. – М., 2011. – С. 212-214.
- 70.Здвижкова, И. А., Андриющенко С. В. Скрининг генетических детерминант патогенного потенциала энтеробактерий / И. А. Здвижкова, С. В. Андриющенко // Вестник Оренбургского государственного университета. - 2017. - № 9 (209). - С. 57-61.
- 71.Змеева, Т. А. Повышение эффективности методов санитарно-микробиологических исследований воды с использованием современных мембранных технологий и способов детекции: автореф. дис. ... канд. мед. наук / Змеева Татьяна Алексеевна. – Санкт-Петербург, 2017. - 24 с.
- 72.Иванова, Е. И. Выявление генов патогенности, кодирующих способность к токсинообразованию, у штаммов *Escherichia coli*, выделенных из кишечного биотопа детей / Е. И. Иванова, С. М. Попкова, Ю. П. Джиоев, Е. Б. Ракова // Бюллетень Восточно-Сибирского научного центра СО РАМН. - 2013. - № 2 (90). - С. 111-114.
- 73.Иванова, Е. И. Детекция некоторых генов, кодирующих факторы патогенности у типичных изолятов *Escherichia coli* / Е. И. Иванова, С. М. Попкова, Ю. П. Джиоев, В. В. Долгих, Е. Б. Ракова, Е. В. Бухарова // Бюллетень Восточно-Сибирского научного центра СО РАМН. - 2014. - № 5 (99). - С. 89-94.
- 74.Иванюк, В. П. Изменения микробиоценоза кишечника свиней при гельминтозах / В. П. Иванюк, Г. Н. Бобкова // Вестник Брянской гос. с.-х. акад. – 2017. – № 1. – С. 19-22.
- 75.Ильинских, Е. Н. Аккумуляция некоторых токсических микроэлементов в ткани печени и гельминтах, полученных от больных инвазией *Opisthorchis felineus*

(Rivolta, 1984) *Metorchis bilis* (Braun, 1890) / Е. Н. Ильинских, В. В. Новицкий, Н. Н. Ильинских, А. В. Лепехин // Медицинская паразитология и паразитарные болезни. - 2006. - № 4. - С. 37-39.

76.Ильинских, Е. Н. Характеристика клеточного иммунного ответа в зависимости от интенсивности инвазии у больных хроническим описторхозом / Е. Н. Ильинских, Н. Н. Ильинских, И. Н. Ильинских, А. В. Лепехин, А. Ю. Юркин, Н. С. Бужак // Бюллетень сибирской медицины. – 2010. - № 1. – С. 40-44.

77.Инструкция по санитарно-микробиологическому контролю производства пищевой продукции из рыбы и морских беспозвоночных. - № 5319. – 1991.

78.Камалов, А. А. Факторы риска развития инфекционно-воспалительного процесса нижних мочевых путей / А. А. Камалов, Л. А. Холдырева, А. А. Дударева, А. Н. Низова // Вестник дерматологии и венерологии. – 2015. – № 2.- С. 63–67.

79.Канаева, Т. И. Выделение и идентификация *Aeromonas hydrophilia* из пищевых продуктов / Т. И. Канаева, Э. А. Афонин // Вопросы нормативно-правового регулирования в ветеринарии. - 2009. - № 4. - С. 86-87.

80.Канаева, Т. И. Разработка методов выделения и идентификации бактерий *Aeromonas hydrophila*: автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.00.23 / Канаева Татьяна Ивановна. - Саратов, 2009. - 19 с.

81.Карпеева, Е.А. Ильина Н.А., Красноперова Ю.Ю. Частота встречаемости генов патогенности при сокультивировании *Escherichia coli* с простейшими *Blastocystis hominis* / Е. А. Карпеева, Н. А. Ильина, Ю. Ю. Красноперова // Педагогико-психологические и медико-биологические проблемы физической культуры и спорта. - 2015. - Т. 10, № 1. - С. 47-54.

82.Катков, А. Е. Особенности микробиоценоза кишечника на фоне стронгилоидной инвазии / А. Е. Катков, Е. М. Романова // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. - 2007. - С. 61-66.

83.Коваленко, А. А. Дисбактериоз кишечника у детей и пути его коррекции / А. А. Коваленко, Н. С. Жихарева // Русский медицинский журнал. – 2007. - Т. 5, № 1. - С. 43-47.

- 84.Коваленко, Ф. П. Экспериментальное обоснование новой концепции становления инвазии *Opisthorchis felineus* у окончательного хозяина / Ф. П. Коваленко, Е. А. Чернова, В. Ю. Михелев, Г. А. Шатверян // Паразитология. – 2005. - Т. 39, № 3. - С. 257-261.
- 85.Кондинский, Г. В. Динамика размножения брюшнотифозных бактерий в описторхисах при их совместном культивировании / Г. В. Кондинский, Н. В. Брон // Вопросы краевой инфекционной патологии. – Тюмень, 1973. – С. 82-85.
- 86.Кондинский, Г. В. Эколого-эпидемиологический анализ смешанных инфекций-инвазий (модель «брюшной тиф-описторхоз»): автореф. дис. ... д-ра мед. наук: 14.00.30 / Кондинский Герман Владимирович. – Киев, 1984. – 40 с.
- 87.Кондинский, Г. В. Медицинская паразитоценология / Г. В. Кондинский, Е. С. Шульман // Паразитоценология. Теоретические и прикладные проблемы / Под общ. ред. А. П. Маркевич. - Киев: Наукова думка, 1985. - С. 36-40.
- 88.Кондинский, Г. В. Химический состав метаболитов половозрелых описторхов / Г. В. Кондинский, Г. Г. Рункова, Н. Н. Петрова, Е. Н. Панков, В. Г. Филатов, Г. Н. Пекло, В. Е. Моисеев, Т. В. Козлова, В. М. Петрова, З. Л. Степанова / Актуальные проблемы описторхоза: тез. III совещания Координационного совета межотраслевой целевой комплексной науч. программы "Описторхоз" и науч.-практич. конф. по проблеме; Томск 25-27 ноября 1986г. - Томск: Томский мед. институт, 1986. - С. 14-16.
- 89.Кондинский, Г. В. Новое о природе описторхозной инвазии / Г. В. Кондинский, Г. Н. Пекло, В. Г. Бычков, Т. Ф. Постникова // Новые аспекты проблемы описторхоза: тез. докл. в науч.-практич. конф. и IV совещания координационного совета всесоюзной программы "Описторхоз" 24-26 ноября 1987 года, г. Курган. - Курган: Советское Зауралье, 1987. - С. 57-59.
- 90.Корвякова, Е. Р. Применение «ударных» доз бифидумбактерина форте для лечения больных острыми кишечными инфекциями / Е. Р. Корвякова // Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. - 2000. - № 6. - С. 58-61.

- 91.Корниенко, Е. А. Диагностика и лечение лямблиоза у детей / Е. А. Корниенко, С. Н. Минина, С. А. Фаина, Н. М. Калинина, А. Н. Суворов // Инфекционные болезни. - 2009. - Т. 7, № 1. - С. 43-48.
- 92.Корниенко, Е. А. Современные диагностика и лечение лямблиоза у детей / Е. А. Корниенко, С. Н. Минина, С. А. Фаина, М. М. Калинина, А. Н. Суворов // Педиатрия. Приложение к журналу Concilium medicum, - 2010. - № 1. – С. 109-113.
- 93.Коровина, Н. А. Диагностика и лечение лямблиоза у детей / Н. А. Коровина, И. Н. Захарова, Н. Е. Малова // Российский вестник перинатологии и педиатрии. - 2005. - № 1. - С. 38-41.
- 94.Король, Е. В. Взаимодействие *Burkholderia cepacia* с ресничными инфузориями вида *Tetrahymena pyriformis* / Е. В. Король, Г. С. Макаров, М. Р. Шамуков, М. О. Нехезина, Л. К. Меринова // Фундаментальные и прикладные аспекты анализа риска здоровью населения: Материалы всероссийской науч.-практич. конф. молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора: Пермь, 16-18 мая 2012 года: сб. ст. 2012. – Т. 1. – С. 313-316.
- 95.Коршунов, В. М. Характеристика биологических препаратов и пищевых добавок для функционального питания и коррекции микрофлоры кишечника / В. М. Коршунов, Б. А. Ефимов, А. П. Пикина // Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. - 2000. - № 3. - С. 86-91.
- 96.Коршунов, В. М. Качественный состав нормальной микрофлоры кишечника у лиц различных возрастных групп / В. М. Коршунов, Л. В. Поташник, Б. А. Ефимов, О. В. Коршунова, В. В. Смянов, К. Гур, R. Frei // Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. - 2001. – № 2. – С. 57-61.
- 97.Коршунов, В. М. Микроэкология кишечника взрослого населения Монголии, Швейцарии и России / В. М. Коршунов, Л. В. Поташник, Б. А. Ефимов, О. В. Коршунова, В. В. Смянов, К. Гур, R. Frei // Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2001. - № 1. - С. 71-73.
- 98.Костылев, С. Г. Паразитарная система при описторхозе и перспективы ее планомерной регуляции // Проблема описторхоза в Западной Сибири: сб. науч. работ / отв. ред. А. П. Кузовлев. - Ленинград, 1977. - С. 40-42.

99. Красиков, А. П. Понятие паразитоценозов, смешанных и ассоциативных инфекций животных / А. П. Красиков, Н. В. Рудаков, М. В. Заболотных // Вестник Омского государственного аграрного университета. – 2016. - № 4 (24). – С. 158-165.
100. Кривенко, В. В. Экологические основы борьбы с описторхозом / В. В. Кривенко, А. Г. Гиновкер, Н. А. Романенко, В. Г. Филатов. - Новосибирск: Наука, 1989. - 136 с.
101. Кривенко, В. В. Экологическая этиология, биоэкологическая этиология и санитарная паразитоценология / В. В. Кривенко. – Тюмень, 1991. – 50 с.
102. Кузнецова, Л. В. Результаты испытаний бактерий псевдомонас путида и хищных грибов Артроботрис в качестве биологических агентов для обеззараживания яиц описторхов / Л. В. Кузнецова, Л. В. Ставертий // Научные основы оздоровительной работы при гельминтозах и некоторых арбовирусных инфекциях: сб. науч. тр. – Омск, 1989. - С. 274-277.
103. Кузнецова, Т. В. Токсоплазмоз / Т. В. Кузнецова, Н. Г. Ленская, Д. Б. Утешев // Лечебное дело. - 2008. - № 4. – С. 88-93.
104. Куклина, Н. Г. Разработка бактериологической схемы выделения и идентификации бактерий *Aeromonas salmonicida* / Н. Г. Куклина, Д. А. Васильев, А. А. Нафеев // Международный научно-исследовательский журнал. - 2017. - № 4. С. 27-30.
105. Курапатенко, М. В. Паразитозы, лямблиоз и аллергические заболевания в детском возрасте / М. В. Курапатенко, Т. Ю. Бандурина, Н. А. Безушкина // Детская гастроэнтерология и нутрициология. – 2003. – Т. 11, № 3. - С. 143-145.
106. Кучеря, Т. В. Гельминтозы у детей – возможные варианты симбиоза / Т. В. Кучеря // Гастроэнтерология. – 2010. - № 1. – С. 76-79.
107. Леванова, Л. А. Дисбактериозы кишечника у населения разных возрастных групп г. Кемерово / Л. А. Леванова, Е. В. Сурикова // Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. - 2001. - № 1. - С. 69-71.
108. Леванова, Л. А. Состояние нормальной микрофлоры кишечника у детей дошкольного возраста, проживающих в экологически неблагоприятном регионе /

- Л. А. Леванова, В. А. Алешкин, А. А. Воробьев, С. С. Афонасьев, Е. В. Сурикова, А. В. Алешкин // Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2002. - № 1.- С. 64-67.
109. Логачев, Е. Д. Эволюционная гельминтология и паразитоценология / Е. Д. Логачев // VI науч. конф., посвященная теоретическим и практическим вопросам экологической паразитологии: Кемерово, ноябрь 1981 года: тез. докл. - 1981 - С. 8-9.
110. Лыкова, Е. А. Бактериальная эндотоксинемия у детей с дисбактериозом кишечника / Е. А. Лыкова, В. М. Бондаренко, А. А. Воробьев, Е. В. Суджан, В. И. Минаев, В. Е. Маликов // Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. - 1999. - № 3. - С. 67-70.
111. Мавзютов, А. Р. Факторы патогенности оппортунистических энтеробактерий и их роль в развитии диареи / А. Р. Мавзютов, В. М. Бондаренко, Н. Ю. Жеребцова, Д. А. Валишин // Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. - 2007. - № 1. - С. 89-97.
112. Майер, В. А. Эпидемиология и профилактика дизентерии на Крайнем Севере: автореф. дис. ... канд. мед. наук / Майер Виктор Андреевич. - М., 1975. - 26 с.
113. Маркевич, А. П. Паразитоценоз / А. П. Маркевич // Большая медицинская энциклопедия. – 3-е изд. – М., 1982. – Т. 18. – С. 300-301.
114. Маркевич, А. П. Паразитоценология. Теоретические и прикладные проблемы / Под общ. ред. А. П. Маркевич. – Киев: Наукова Думка, 1985. – 248 с.
115. Мартусевич, А. К. Роль физико-химических процессов в системе «микроорганизм-человек» / А. К. Мартусевич, Ю. В. Зимин // Вестник Санкт-Петербургской государственной медицинской академии им. И. И. Мечникова. – 2008. - № 3 (28). – С. 112-115.
116. Мерзлова, Н. Б. Токсокароз в сочетании с другими паразитозами у детей с соматической патологией / Н. Б. Мерзлова, А. А. Шепелева, В. И. Батурин, Е. А. Вагнера // Детские инфекции. – 2007. - № 2. - С. 29-33.

117. Мефодьев, В. В. Актуальные проблемы сочетанных инфекций и инвазий Западной Сибири / В. В. Мефодьев // Медицинский альманах. - 2018. - № 4 (55). - С. 67-69.
118. МР № ФЦ/4022 Методы микробиологического контроля почвы. [4.1 Методы контроля. Биологические и микробиологические факторы]: метод. рекомендации. - М.: Техкнига-Сервис, 2011. - 23 с.
119. МУ 3.2.1882-04 Профилактика лямблиоза [3.2. Профилактика паразитарных болезней]: метод. указания. – Москва, 2005. - 36 с.
120. МУ № 142-9/316-17 Методические указания по санитарно-микробиологическому анализу лечебных грязей: метод. указания. - М.: Техкнига-Сервис, 2011. - 20 с.
121. МУК 4.2.1890-04 Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам [4.2 Методы контроля. Биологические и микробиологические факторы]: метод. указания. – М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2004. - 91 с.
122. МУК 4.2.2793-10 Санитарно-микробиологический и санитарно-паразитологический анализ воды поверхностных водных объектов: метод. указания. - М.: Технорматив, 2013. - 3 с.
123. МУК 4.2.2794-10 Санитарно-микробиологический анализ питьевой воды: метод. указания. - М.: Технорматив, 2013. - 5 с.
124. МУК 3.2.988-00 «Методы санитарно-паразитологической экспертизы рыбы, моллюсков, ракообразных, земноводных, пресмыкающихся и продуктов их переработки» (Москва, Федеральный центр госсанэпиднадзора Минздрава России, 2001).
125. Мурашова, А. О. Бифидогенные факторы как лекарственные препараты / А. О. Мурашова, О. Б. Лисицына, Н. А. Абрамов // Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 1999. - № 5. - С. 56-61.
126. Нагоев, Б. С. Цитокиновый статус больных с приобретенным токсоплазмозом / Б. С. Нагоев, Ю. Ф. Архагов, Ж. Х. Сабанчиева // Вестник новых медицинских технологий. – 2011. – Т. 8, № 4. – С. 224-226.

127. Немцева, Н. В. Гидробиоценозы – модельная система ассоциативного симбиоза / Н. В. Немцева // Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2015. - № 4. - С. 49-54.
128. Несчисляев, В. А. Арсенал пробиотиков XXI века: Лактобактерин-БИЛС и Микростим / В. А. Несчисляев // Terra medica nova. – 2007. - № 6. - С. 23-25.
129. Нефедова, Е. М. Роль лизоцима гидробионтов в процессах самоочищения водоемов: автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.00.16 / Нефедова Екатерина Михайловна. - Оренбург, 2001. - 22 с.
130. Нивин, Е. А. Характеристика внутриклеточных симбионтов из пульмотрематод / Е. А. Нивин // Материалы X научно-практической конференции, посвященной теоретическим и практическим вопросам общей и экологической паразитологии: Кемерово, июнь 1992 года: сб. ст. - 1992. – С. 32-33.
131. Нилова, Л. Ю. К вопросу о применении пробиотиков для коррекции дисбактериоза толстого кишечника / Л. Ю. Нилова, А. Г. Бойцов, Е. А. Оришак // Вестник Санкт-Петербургской государственной медицинской академии им. И. И. Мечникова. – 2008. - № 3 (28). – С. 154-157.
132. Новицкий, В. В. Реактивность эозинофилов и лимфоцитов периферической крови при инвазии *Opisthorchis felineus* / В. В. Новицкий, Н. В. Рязанцева, Л. С. Литвинова, Н. П. Чернышова, О. Б. Жукова, Н. Ю. Часовских, Ю. В. Колобовникова, Е. С. Григорьева, Е. В. Суворова // Медицинская паразитология и паразитарные болезни. – 2006. - № 3. - С. 23-27.
133. Новосельцев, В. Н. Теория управления и биосистемы. Анализ сохрнительных свойств / В. Н. Новосельцев. – М.: Наука, 1978. – 320 с.
134. Овсянникова, Г. В. Эритродермия при токсокарозе / Г. В. Овсянникова, В. А. Молочков, Л. П. Пелепец, А. В. Федоровская // Российский журнал кожных и венерических болезней. – 2010. - № 5. – С. 26-30.
135. Овсянникова, Е. В. Моллюски как возможные индикаторы окружающей среды / Е. В. Овсянникова, Н. Н. Федорова, В. Ф. Зайцев // Успехи современного естествознания. – 2003. – № 2. – С. 14–16.

136. Одинец, А. А. Экология человеческого тела / А. А. Одинец, В. Е. Сераджи, В. И. Одинец // Современная медицина. Теория и практика. – 2003. - № 6. - С. 29-32.
137. Одинцева, В. Е. Методы диагностики и лечения глистно-протозойных инвазий у детей с заболеваниями желудочно-кишечного тракта / В. Е. Одинцева, В. А. Александрова // Детские инфекции. – 2010. - № 2. – С. 58-61.
138. Озерецковская, Н. Н. Органная патология в острой стадии тканевых гельминтов: роль эозинофилии крови и тканей, иммуноглобулинемии E₄ и факторов, индуцирующих иммунный ответ / Н. Н. Озерецковская // Медицинская паразитология и паразитарные болезни. – 2000. - № 3. - С. 3-7.
139. Онищенко, Г. Г. Молекулярно-генетическая характеристика шига-токсин продуцирующих *Escherichia coli*, выделенных при вспышке пищевой инфекции в Санкт-Петербурге в 2013 году / Г. Г. Онищенко, И. А. Дятлов, Э. А. Светоч, Н. В. Воложанцев, В. А. Баннов, Н. Н. Карцев, В. Н. Борзенков, Н. К. Фурсова, И. Г. Шемякин, А. Г. Богун, А. А. Кисличкина, А. В. Попова, В. П. Мякина, М. Г. Теймуразов, О. В. Полосенко, Л. А. Кафтырева, М.А. Макарова, З. Н. Матвеева, Т. А. Гречанинова, Н. С. Григорьева, Е. В. Кича, Г. В. Забалуева, Т. Б. Кутасова, Ю. Н. Коржаев, Н. С. Башкетова, О. Н. Бушманова, А. В. Сталевская, И. Г. Чхинджерия, А. Б. Жебрун // Вестник Российской академии медицинских наук. - 2015. - Т. 70, № 1. - С. 70-81.
140. Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам: клинические рекомендации: утв. Межрегиональной ассоциацией по клинической микробиологии и антимикробной химиотерапии (Москва, - 2015. – 206 с.
141. Осипенко, М. Ф. Применение пробиотиков в лечении патологии внутренних органов / М. Ф. Осипенко // Фарматека. – 2005. - № 14. - С. 16-20.
142. Осмолловская, Е. А. К вопросу о классификации лямблиоза у детей / Е. А. Осмолловская, В. П. Новикова, М. К. Бехтерева // Вопросы детской диетологии. – 2012. – Т. 10, № 2. – С. 57-58.

143. Остапенко, Н. А. Сравнительная характеристика эпидемиологических процессов при дифиллоботриозе и описторхозе в Ханты-Мансийском автономном округе – Югре / Н. А. Остапенко, Т. М. Гусеева // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. – 2012. - № 2 (63). - С. 52-57.
144. Отраслевой стандарт «Протокол ведения больных. Дисбактериоз кишечника»: Приказ № 231 от 9.06.2003. - С. 65.
145. Павловский, Е. Н. Руководство по паразитологии человека / Е. Н. Павловский. - Т.1.- М.: Изд-во АН СССР, 1946. – 32 с.
146. Павловский, Е. Н. Современное состояние учения о природной очаговости болезней человека / Е. Н. Павловский // Природные болезни человека. – М: Медгиз, 1960. - С. 6-41.
147. Павловский, Е. Н. Основные положения учения о природной очаговости болезней человека / Е. Н. Павловский // Руководство по микробиологии, клинике, эпидемиологии инфекционных болезней. - Т. 5. - М.: Медицина, 1965. - С. 286 - 308.
148. Панасюк, Д. И. Закономерности взаимоотношений сочленов паразитоценоза / Д. И. Панасюк // Паразитоценозы и ассоциативные болезни: сб. науч. тр. – М.: Колос, 1984. - С. 27-45.
149. Перунова, Н. Б. Микробная регуляция биологических свойств бактерий кишечного микросимбиоза человека / Н. Б. Перунова, Е. В. Иванова, О. В. Бухарин // Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2010. - № 6. – С. 76-80.
150. Пикина, А. П. Первичный скрининг штаммов бифидобактерий и лактобактерий с целью разработки на их основе эффективных препаратов-пробиотиков / А. П. Пикина, В. В. Смеянов, Б. А. Ефимов, Н. А. Войнов, I. Brook, G. Reeves, В. М. Коршунов // Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 1999. - № 6. – С. 34-38.
151. Погорельчук, Т.Я., Олейник В.А. Паразитарные болезни в структуре острых кишечных заболеваний / Т.Я. Погорельчук, В.А. Олейник // Медицинская паразитология и паразитарные болезни. - 2003. - № 1. – С. 23-27.

152. Покровский, В. И. Медицинская микробиология / В. И. Покровский, О.К. Поздеев// ГЭОТАР Медицина. Москва. – 1999. – С. 352.
153. Полетаева, О. Г. Учет результатов иммуноферментного анализа при тканевых гельминтозах в антительных единицах / О. Г. Полетаева, Т. В. Старкова, Е. А. Коврова, Н. Н. Красовская // Медицинская паразитология и паразитарные болезни. - 2007. - № 4. - С. 24-26.
154. Приказ Минздрава сощразвития РФ от 23.08.2010 № 708 н «Об утверждении правил лабораторной практики (зарегистрировано в Минюсте РФ 13.10.2010 № 18713). – 2010. – 22 с.
155. Приказ Минздрава СССР от 22.04.1985 № 535 «Об унификации микробиологических (бактериологических) методов исследования, применяемых в клинико-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений» при посеве на соответствующие питательные среды». – М., 1985. – 94 с.
156. Ратникова, Л. И. Клинические и лабораторные проявления токсокароза / Л. И. Ратникова, К. К. Козочкина, Н. Н. Лаврентьева // Российский медицинский журнал. – 2012. - № 1. – С. 29-30.
157. Ройтман, В. А. Паразитизм как форма симбиотических отношений / В. А. Ройтман, С. А. Беэр. - Москва. - 2008. - 310 с.
158. Русенек, О. Т. Новые данные об Иркутском очаге описторхоза и о необходимости его изучения / О. Т. Русенек, Т. Я. Ситникова, Ю. Л. Кондратичков // Медицинская паразитология и паразитарные болезни. – 2012. - № 2. - С.15-17.
159. Сайгушева, Л. А. Идентификация и значение бактерий рода *Lactobacillus* в биоценозе кишечника у жителей севера / Л. А. Сайгушева, А. В. Куяров, Е.Ф. Дудко, А. А. Куяров // Инфекция и иммунитет: Материалы X съезда Всероссийского научно-практического общества эпидемиологов, микробиологов и паразитологов «Итоги и перспективы обеспечения эпидемиологического благополучия населения Российской Федерации». – 2012. –Т. 2, № 1-2. - С. 319-320.

160. Семина, Н. А. Эпидемиологические особенности инфекций, вызываемых условно-патогенными микроорганизмами / Н. А. Семина, Е. Л. Ковалева, В. Г. Акимкин // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. - 2008. - № 1. - С.10-12.
161. Сергиев, В. П. Новые и возвращающиеся гельминтозы, как потенциальный фактор социально-эпидемических осложнений в России / В. П. Сергиев, А. В. Успенский, Н. А. Романенко, В. В. Горохов, В. Г. Супряга, Т. В. Старкова, Е. Н. Морозов, Е. А. Черникова // Медицинская паразитология и паразитарные болезни. – 2005. - № 4. - С. 6-8.
162. Сидорова, О. И. Влияние дефицита источников питания на антилизоцимную активность и биопленкообразование бифидобактерий / О. И. Сидорова, Е. В. Иванова, Н. Б. Перунова // Бюллетень Оренбургского научного центра УрО РАН (электронный журнал). – 2014. - № 3. – С. 1-6.
163. Скрыбин, К. И. Симбиоз и паразитизм в природе. Введение и изучение биологических основ паразитизма / К. И. Скрыбин. - Петроград, 1923. - 205с.
164. Скрыбин, К. И. Избранные труды / К. И. Скрыбин. – М.: Агропромиздат, 1991. – С. 105-109.
165. Смирнова, Л. М. Вопросы клиники, диагностики и лечения описторхозного колита / Л. М. Смирнова, Л. Д. Костерина // Научные основы оздоровительной работы при гельминтозах и некоторых арбовирусных инфекциях: сб. науч. тр. – Омск, 1989. – С. 121-125.
166. Смолянская, А. З. Дисбактериоз – инфекционный процесс смешанной этиологии / А. З. Смолянская // Антибиотики и медицинская биотехнология. - 1987. – Т. 32, № 3. - С. 186-190.
167. Старостина, О. Ю. Распространение эндемичных гельминтозов и протозоозов на юге Западной Сибири (Омская область) / О. Ю. Старостина, И. И. Панюшкина, Т. Б. Емцова, Е. Л. Тишкова // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. – 2010. - № 1. – С. 33-38.
168. Степанова, Т. Ф. Особенности описторхоза у коренного и пришлого населения сибирского севера / Т. Ф. Степанова. - Тюмень: Изд-во ТГУ, 2001. - 100 с.

169. Степанова, Т. Ф. Описторхоз. Новые взгляды на инвазионную болезнь, основы клинической реабилитации, методологию крупномасштабных оздоровительных работ: монография / Т. Ф. Степанова. - Тюмень: Изд-во ТГУ, 2002. - 196 с.
170. Степанова, Т. Ф. Паразитоценотические аспекты инвазионно-инфекционной патологии (описторхоз и туберкулез) / Т. Ф. Степанова, Л. Ф. Подклетнова. - Тюмень: Изд-во ТГУ, 2002. - 112 с.
171. Степанова, Т. Ф. Описторхоз и токсоплазмоз / Т. Ф. Степанова, К. Б. Степанова, А. Ю. Мастерских, И. А. Кононова, Е. И. Швед // Актуальные аспекты паразитарных заболеваний в современный период: тез. докл. - Тюмень, 2008. - С. 205-206.
172. Стругова, А. С. Биоэлиментаторы свободноживущих жизненных фаз возбудителя описторхоза (в условиях срединного региона Обь-Иртышского бассейна): дис. ... канд. биол. наук: 03.00.19 / Стругова Альфия Сафуановна. - М., 1994. - 172 с.
173. Толкачева, Т.В. Изменение биоценоза зева как показатель развития дисбактериоза кишечника / Т.В. Толкачева, Г.Л. Ермакова, В.А. Мартынова // Лабораторное дело. - 1983. - № 7. - С. 53-55.
174. Урсова, Н. И. Современные технологии в коррекции дисбактериозов кишечника у детей / Н. И. Урсова // Фарматека. – 2008. - № 2. - С. 19 - 24.
175. Усвяцов, Б. Я. Роль факторов персистенции и вирулентности при микрoэкологических изменениях в организме человека / Б. Я. Усвяцов, Л. М. Хуснутдинова, Л. И. Паршута, Е. А. Ханина, В. А. Долгов, В. В. Паршина // Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. - 2006. - № 4. - С. 58-61.
176. Устинова, Г. М. Характеристика макрофитно-бактериальных взаимоотношений в водных биоценозах: автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.00.16 / Устинова Галина Михайловна. – Оренбург, 2004. - 23 с.
177. Фаттахoв, Р. Г. Эпизоотологическая характеристика очагов трематодозов в экосистеме р. Амур на территории Хабаровского края / Р. Г. Фаттахoв, А. В.

- Ушаков, Т. Ф. Степанова, О. Е. Троценко, И. Б. Иванова, А. Г. Драгомерецкая // Медицинская паразитология и паразитарные болезни. - 2015. - № 2. - С. 16-20.
178. Филатов, В. Г. Общая лоймологическая характеристика Обь-Иртышского очага описторхоза и факторы, ее обуславливающие / В. Г. Филатов, Н. И. Скарედнов // Региональные особенности описторхоза: сб. науч. работ / отв. за выпуск В. В. Звягина; ред.: А. В. Доронин, Г. В. Кондинский. - Омск, 1985. - С. 8-19.
179. Федеральные клинические рекомендации. Определение дисбиотических изменений желудочно-кишечного тракта по маркерам содержимого кишечника / В. А. Алешкин, Е. П. Селькова А. М. Затевалов, А. Ю. Миронов, А. Л. Волчецкий, Н. В. Гудова – Нижний Новгород, 2016. – 40 с.
180. Хавкин, А. И. Микробиоценоз кишечника и иммунитет / А. И. Хавкин // Русский медицинский журнал. - 2003. - Т. 11, № 3. - С. 122-125.
181. Хазиев, Г. З. Пётр Паллас - «русский немец» / Г. З. Хазиев, В. Л. Баиматов // Вестник Российской академии наук. - 1996. - Т. 66, № 1. - С. 73-77.
182. Хасанова, Е. Е. Лямблиоз у детей. Оптимизация диагностики и лечения / Е. Е. Хасанова // Практическая медицина. - 2011. - № 1 (48). – С. 227-229.
183. Холодняк, Г. Е. Клинико-лабораторные проявления токсокароза у детей в условиях комплексной терапии / Г. Е. Холодняк // Вестник новых медицинских технологий. – 2008. – Т. 15, № 2. – С. 61-63.
184. Циммерман, Я. С. Дисбиоз (дисбактериоз) кишечника и/или «синдром избыточного бактериального роста» / Я. С. Циммерман // Клиническая медицина. - 2005. - Т. 83, № 4. - С. 14-22.
185. Червинец, Ю. В. Бактериоциногенные высокоантигенистические штаммы лактобацилл / Ю. В. Червинец, В. М. Бондаренко, Н. А. Шабанова, А. М. Самоукина, В. М. Червинец // Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2006. - № 7. - С. 78-82.
186. Шендеров, Б. А. Нормальная микрофлора и ее роль в поддержании здоровья человека // Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. – 1998. - № 1. - С. 61-65.

187. Штыкова, Ю. Р. Симбионтная и ассоциированная микрофлора кишечника байкальских брюхоногих моллюсков: автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03. 02.08 / Штыкова Юлия Рафиковна. – Иркутск, 2013. - 20 с.
188. Шульпекова, Ю. О. Кишечные бактерии, пробиотики и перспективы их применения для лечения заболеваний желудочно-кишечного тракта / Ю. О. Шульпекова // Фарматека. – 2008. - № 2. - С. 46-51.
189. Щербаков, П. Л. Микроэкология кишечника у детей и ее нарушения / П. Л. Щербаков, А. А. Нижевич, В. В. Логиновская, М. Ю. Щербакова, Л. В. Кудрявцева, С. Д. Митрохин, Н. М. Нуртдинова, Р. А. Очилова // Фарматека. - 2007. - № 14. - С. 28-34.
190. Эйберман, А. С. Достижения и проблемы диагностики и лечения дисбиозов / А. С. Эйберман // Детская гастроэнтерология. - 2002. - № 4. - С. 26-29.
191. Яковенко, Э. П. Метаболические заболевания печени как системные проявления дисбактериоза кишечника. Роль пробиотиков в нормализации кишечной микрофлоры / Э. П. Яковенко, А. Н. Иванов, Н. А. Яковенко, Н. А. Агафонова, Б. И. Обуховский, А. С. Прянишникова, О. А. Каргина, Т. А. Гусаимова, О. Ю. Похальская, А. В. Колганова, И. П. Солуянова, Н. И. Овчинникова, И. В. Васильев // Русский медицинский журнал. - 2008. - Т. 16, № 6. - С. 396-401.
192. Янковский, Д. С. Состав и функции микробиоценозов различных биотопов человека / Д. С. Янковский // Венерология и микробиология. – 2004. - № 10. - С. 53-69.
193. Яфаев, Р. Х. Некоторые нерешенные аспекты проблемы паразитизма / Р. Х. Яфаев // Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. - 2003. - № 5. – С. 96-101.
194. Adema, C. M. Schistosomicidal activitis of *Lymnaea stagnalis* haemocytes: The role of oxyden radicals / C. M. Adema, , E. C. Deutekom-Mulder, van Knaup W. P. W., van der Sminia T. // Parasitology. – 1994. - Vol. 9, N 4. - P. 479-485.

195. Alonso, M. Z. Isolation of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* from chicken and chicken-derived products / M. Z. Alonso, M. E. Sanz, K. Irino, A. Kruger, P. M. A. Lucchesi, N. I. Padola // Br Poult Sci. - 2016. - Vol. 57(2). – P. 161-164.
196. Azpiroz, M. F. Modular structure of Microcin H47 and Colicin V / M. F. Azpiroz, M. Laviña // Antimicrob Agents Chemother. - 2007. - Vol. 51(7). - P. 2412-2419.
197. Azpiroz, M. F. The Structure, function, and origin of the Microcin H47 ATP-binding cassette exporter indicate its relatedness to that of Colicin V / M. F. Azpiroz, E. Rodríguez, M. Laviña // Antimicrob Agents Chemother. - 2001. - Vol. 45, N 3. - P. 969-972.
198. Balan, D., Aspectos imunológicos e parasitológicos em *Biomphalaria tenagophila* infectadas por *Schistosoma mansoni* e outros diginea / D. Balan, L. A. Magalhaes, A. Piedrabuena // Rev. saude publ.- 1993. - Vol. 27, N 6. - P. 421-429.
199. Barbara, G. Interactions between commensal bacteria and gut sensorimotor function in health and disease / G. Barbara, V. Stanghellini, G. Brandi, C. Cremon, G. D. Nardo, R. D. Giorgio, R. Corinaldesi // Am. J. Gastroenterol. – 2005. – Vol. 100. - P. 2560-2568.
200. Baron, S. *Aeromonas* diversity and antimicrobial susceptibility in freshwater—an attempt to set generic epidemiological cut-off values / S. Baron, S. A. Granier, E. Larvor, E. Jouy, M. Cineux, A. Wihelm, B. Gassillound, S. L. Bouquin, I. Kempt, C. Chauvin // Front Microbiol. – 2017. - N 8. - P. 503.
201. Bayne, C. L. *Schistosoma mansoni* cytotoxicity of hemocytes from susceptible snail host for sporocysts in plasma from resistant *Biomphalaria glabrata* / C. L. Bayne, P. M. Buckley, P. C. De Wan // Exp. Parasitol. – 1980. - Vol. 50, N 3. - P. 409-416.
202. Biavati, B. *Bifidobacteria*: history, ecology, physiology and applications / B. Biavati, M. Vescovo, S. Torriani, V. Bottazzi // Annals of Microbiology. – 2000. – Vol. 50. - P. 117-131.
203. Bounnik, Y. Administration of transgalacto-oligosaccharides increases fecal bifidobacteria and modifies colonic fermentation metabolism in healthy humans / Y. Bounnik, B. Flourié, L. D'Agay-Abensour, P. Pochart, G. Gramet, M. Durand, J. C. Rambaud // J Nutr. – 1997. - Vol. 127(3). - P. 444-448.

204. Cameron, A. Bacteriocin occurrence and activity in *Escherichia coli* isolated from bovines and wastewater / A. Cameron, R. Zaheer, E. H. Adator, R. Barbieri, T. Reuter, T. A. McAllister // *Toxins*. - 2019. - Vol. 11, N 8. - P. 475.
205. Capitani, G. Crystal structure and functional analysis of *Escherichia coli* glutamate decarboxylase / G. Capitani, D. De Biase, C. Aurizi, H. Gut, F. Bossa, M. G. Grütter // *EMBO J*. - 2003. - Vol. 22, N 16. - P. 4027-4037.
206. Chen, Y. S. Skin and soft-tissue manifestations of *Shewanella putrefaciens* infection / Y. S. Chen, Y. C. Liu, M. Y. Yen, J. H. Wang, S. R. Wang, D. L. Cheng // *Clin. Infect. Dis.* – 1997. – Vol. 25. - P. 225-229.
207. Chotikanatis, K. Intravascular-catheter-related bacteremia caused by *Delftia acidovorans* in a hemodialysis patient / K. Chotikanatis, M. Backer, G. Rosas-Garcia, M. R. Hammerschlag // *J Clin. Microbiol.* – 2011. - Vol. 49(9). - P. 3418-3421.
208. Ciesielczuk, H. Trends in ExPEC serogroups in the UK and their significance / H. Ciesielczuk, C. Jenkins, M. Chattaway, M. Doumith, R. Hope, N. Wodford, D. W. Wareham // *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* – 2016. – Vol. 35. – P. 1661-1666.
209. Crofts, A. A. Enterotoxigenic *E. coli* virulence gene regulation in human infections / A. A. Crofts, S. M. Giovanetti, E. J. Rubin, F. M. Poly, R. L. Gutiérrez // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* - 2018. - Vol. 115, N 38. - P. 8968-8976.
210. Dautin, N. Serine protease autotransporters of *Enterobacteriaceae* (SPATEs): biogenesis and function / N. Dautin // *Toxins (Basel)*. - 2010. - Vol. 2(6). - P. 1179-1206.
211. DebRoy, C. Correction: comparison of O-antigen gene clusters of all O-serogroups of *Escherichia coli* and proposal for adopting a new nomenclature for O-typing / C. DebRoy, P. M. Fratamico, X. Yan, G. Baranzoni, Y. liu // *PLOS ONE*/ - 2016. – Vol. 11(1): e0147434.<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0147434>.
212. Delannoy, S. The *Escherichia coli* serogroup O1 and O2 lipopolysaccharides are encoded by multiple O-antigen gene clusters / S. Delannoy, L. Beutin, P. Mariani-Kurkdjian, A. Fleiss, S. Bonacorsi, P. Fach // *Front. Cell. Infect. Microbiol.* – 2017. - Vol. 7. – P. 7-30.

213. Ducklow, N. W. Bacterial flora of the schistostoma vector snail *Biomphalaria glabrata*. / N. W. Ducklow, P. J. Boyle, P.W. Maugel // Appl. and Environ. Microbiol, - 1979. - Vol. 38, N 4. - P. 667 – 673.
214. Eckburg, P. B. Diversity of the human intestinal microbial flora / P. B. Eckburg, E. M. Bik, C. N. Bernstein, E. Purdom, L. Dethlefsen, M. Sargent, S. R. Gill, K. E. Nelson, D. A. Relman // Science. – 2005. - Vol. 208. - P. 1635-1638.
215. Emamghorashi, F. The prevalence of O serogroups of *Escherichia coli* strains causing acute urinary tract infection in children in Iran / F. Emamghorashi, S. Farshad, M. Kalani, S. Rajabi, M. Hoseini // Saudi J Kidney Dis Transpl. – 2011. - Vol. 22. - P. 597-601.
216. Feldmann, F. The Salmochelin siderophore receptor IroN contributes to invasion of urothelial cells by extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* in vitro / F. Feldmann, L. J. Sorsa, K. Hildinger, S. Schubert // Infect. Immun. - 2007. - Vol. 75, N 6. - P. 3183-3187.
217. Fratamico, P. M. Advances in molecular serotyping and subtyping of *Escherichia coli* / P. M. Fratamico, C. Debroy, Y. Liu, D. S. Needleman, G. M. Baranzoni, P. Feng // Front. Microbiol. - 2016 |<https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00644>.
218. Garcia, T. A. Cytotoxic necrotizing factor 1 and hemolysin from uropathogenic *Escherichia coli* elicit different host responses in the murine bladder / T. A. Garcia, L. Christy. C. L. Ventura, M. A. Smith, D. S. Merrell, A. D. O'Brien // Infect. Immun. - 2013. - Vol. 81, N 1. - P. 99-109.
219. Gardan, L. Elevation of three subspecies of *Pectobacterium carotovorum* to species level: *Pectobacterium atrosepticum* sp. nov., *Pectobacterium betavasculorum* sp. nov. and *Pectobacterium wasabiae* sp. nov. / L. Gardan, C. Gouy, R. Christen, R. Samson // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. – 2003. – Vol. 53(Pt 2). - P. 381-391.
220. Geeta, S. *Lactobacillus casei* as a probiotic in malnourished *Giardia lamblia*-infected mice: a biochemical and histopathological study / S. Geeta, K. S. Ramandeep // Canadian Journal of Microbiology. – 2011. - Vol. 57(2). - P. 127-135.

221. Geoffrey C Nguyen, M. D. Editorial: bugs and drugs: insights into the pathogenesis of inflammatory bowel disease / M. D. Geoffrey C Nguyen // *Am J Gastroenterol.* – 2011. - Vol. 106. - P. 2143-2145.
222. Ginn, A. Draft Genome Sequence of an *Escherichia coli* O8:H19 Sequence Type 708 Strain Isolated from a Holstein Dairy Cow with Metritis / A. Ginn, Z. Ma , K. N. Galvao, K. C. Jeong // *Genome Announc.* – 2016. - Vol. 4(2): e00261-16.
223. Govorin, I. A. The role of bivalve mollusks in the cleansing of the marine environment from bacterial contamination / I. A. Govorin // *Marine Biology.* – 2000. - Vol. 26, N 2. - P. 77-85.
224. Guarner, F. Gut flora in health and disease / F. Guarner, J. Malagelada // *Lancet.* - 2003. - Vol. 361. - P. 512-519.
225. Gupta, A. Anaerobic fermentation of glycerol in *Paenibacillus macerans*: metabolic pathways and environmental determinants / A. Gupta, A. Murarka, P. Campbell, R. Gonzalez // *Microbiol.* – 2009. - Vol. 75, N 18. - P. 5871-5883.
226. Haffaressas, Y. The genus *Aeromonas* / Y. Haffaressas // Вестник совета молодых ученых и специалистов Челябинской области. - 2017. - Т.3, N 2(17). - С. 80-83.
227. Hanevik, K. Development of functional gastrointestinal disorders after *Giardia lamblia* infection / K. Hanevik, V. Dizdar, N. Langeland, T. Hausken // *BMC Gastroenterol.* – 2009. - Vol. 21. - P. 9-27.
228. Harrel, L. J. *Rahnella aquatilis*, an unusual gram-negative rod isolated from the bronchial washing of patient with acquired immunodeficiency syndrome / L. J. Harrel, M. L. Cameron, C. M. O'Hara // *J Clin Microbiol.* – 1989. - Vol. 27(7). - P. 1671-1672.
229. Harrington, S. M. The Pic protease of enteroaggregative *Escherichia coli* promotes intestinal colonization and growth in the presence of mucin / S. M. Harrington, J. Sheikh, I. R. Henderson, F. Ruiz-Perez, P. S. Cohen, J. P. Nataro // *Infect. Immun.* - 2009. - Vol. 77, N 6. - P. 2465-2473.
230. Hatje, E. Interaction of *Aeromonas* strains with lactic acid bacteria via Caco-2 cells / E. Hatje, C. Neuman, M. Katouli // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2014. - Vol. 80(2). - P. 681-686.

231. Hattori, M. The human intestinal microbiome: a new frontier of human biology / M. Hattori, T. Taylor // DNA Res. – 2009. - Vol. 16. - P. 1-12.
232. Hebbelstrup, J. B. Epidemiology and clinical manifestations of enteroaggregative *Escherichia coli* / J. B. Hebbelstrup, K. E. Olsen, C. Struve, K. A. Krogfelt, A. M. Petersen // Clin. Microbiol. Rev. - 2014. - Vol. 27, N 3. - P. 614-630.
233. Herold, S. Differential effects of short-chain fatty acids and iron on expression of *iha* in Shiga-toxigenic *Escherichia coli* / S. Herold, J. C. Paton, P. Srimanote, A. W. Paton // Microbiology. - 2009. – N 155. - P. 3554-3563.
234. Hilsenbeck, J. L. Crystal structure of the cytotoxic bacterial protein colicin B at 2.5 Å resolution / J. L. Hilsenbeck, H. Park H., G. Chen, B. Youn., K. Postle, C. Kang // Mol. Microbiol. - 2004. - Vol. 51, N 3. - P. 711-720.
235. Hosseini, N. H. Virulence Gene Profile and Multilocus Variable-Number Tandem-Repeat Analysis (MLVA) of Enteroinvasive *Escherichia coli* (EIEC) Isolates From Patients With Diarrhea in Kerman, Iran / N. H. Hosseini, S. Mansouri, M. T. Moghadam, M. Moradi // Jundishapur J. Microbiol. - 2016. - Vol. 9, N 6. - e33529.
236. Hosseini, N. H. Distribution of genes encoding virulence factors and multilocus variable-number tandem-repeat analysis (MLVA) of entero-aggregative *Escherichia coli* (EAEC) isolated in Iran from patients with diarrhoea / N. H. Hosseini, S. M. Samareh, M. Lashkari, M. A. Ravari, Z. Hashemizadeh, M. F. Seqyedi, F. Mohseni // J. Med. Microbiol. - 2018. - Vol. 67, N 9. - P. 1334-1339.
237. Hüttener, M. HilA-like regulators in *Escherichia coli* pathotypes: the YgeH protein from the enteroaggregative strain 042 / M. Hüttener, M. Dietrich, S. Paytubi, A. Juárez // BMC Microbiol. - 2014. – N 14. - P. 268.
238. Ingrassia, I. *Lactobacillus casei* DN-114 001 Inhibits the Ability of Adherent-Invasive *Escherichia coli* Isolated from Crohn's Disease Patients To Adhere to and To Invade Intestinal Epithelial Cells. / I. Ingrassia, A. Leplingard, A. Darfeuille-Michaud // Appl Environ Microbiol. – 2005. - Vol. 71(6). - P. 2880–2887.
239. Janda, J. M. The Genus *Aeromonas*: Taxonomy, Pathogenicity, and Infection / J. M. Janda, L. A. Sharon // Clinical Microbiology Reviews. – 2010. - Vol. 23, N 1. - P. 35-73.

240. Jeong, H. Genome sequence of *Lysinibacillus sphaericus* strain KCTC 3346T / H. Jeong, D. E. Jeong, Y. M. Sim, S. H. Park, S. K. Choi // Genome Announc. – 2013. - Vol. 1(4): e00625-13.
241. Johnson, T. J. Evolution of the *iss* Gene in *Escherichia coli* / T. J. Johnson, Y. M. Wannemuehler, L. K. Nolan // Appl. Environ. Microbiol. - 2008. - Vol. 74, N 8. - P. 2360-2369.
242. Johnson-Henry, K. C. *Lactobacillus rhamnosus* strain GG prevents enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7-induced changes in epithelial barrier function / K. C. Johnson-Henry, K. A. Donato, G. Shen-Tu, M. Gordanpour, P. M. Sherman // Infect Immun. – 2008. - Vol. 76(4). - P. 1340–1348.
243. Jordan, D. M. Long polar fimbriae contribute to colonization by *Escherichia coli* O157:H7 in vivo / D. M. Jordan, N. Cornick, A. G. Torres, E. A. Dean-Nystrom, J. B. Kaper, H. W. Moon // Infect. Immun. - 2004. - Vol. 72(10). - P. 6168-6171.
244. Kamalam, J. N. Effect of pyrotechnic chemicals in digestive tract microflora and proximate composition in fish *Oreochromis mossambicus*. / J. N. Kamalam, J. Anburaj, C. Sundaravadivelan, P. Kumar, T. Kuberan, P. Dhasarathan // Advances in Applied Science Research. – 2013. - Vol. 4(1). - P. 188-194.
245. Kamenšek, S. Global transcriptional responses to the bacteriocin colicin M in *Escherichia coli* / S. Kamenšek, D. Žgur-Bertok // BMC Microbiol. - 2013. - Vol. 13, N 42. doi:10.1186/1471-2180-13-42
246. Kämpfer, P. Description of *Wautersiella falsenii* gen. nov., sp. nov., to accommodate clinical isolates phenotypically resembling members of the genera *Chryseobacterium* and *Empedobacter* / P. Kämpfer, V. Avesani, M. Janssens, J. Charlier, T. De Baere, M. Vanechoutte // Int J Syst Evol Microbiol. – 2006. - Vol. 56 (Pt 10). - P. 2323-2329.
247. Kevin, C. K. Clinical features, epidemiology, and treatment of *Plesiomonas shigelloides* diarrhea / C. K. Kevin, M. T. Kelly // J. Clin. Microbiol. - 1989. - Vol. 31. - P. 998-1001.

248. Khajuria, A. First report of *bla*_{NDM-1} in *Raoultella ornithinolytica* / A. Khajuria, A. K. Praharaj, N. Grover, K. M. Mahadevan // *Antimicrob Agents Chemother.* – 2013 - Vol. 57(2). - P. 1092-1093.
249. Khan, A. S. Functional analysis of the minor subunits of S fimbrial adhesion (SfaI) in pathogenic *Escherichia coli* / A. S. Khan, I. Mühldorfer, V. Demuth, U. Wallner, T.K. Korhonen, J. Hacker // *Mol. Gen. Genet.* - 2000. - Vol. 263(1). - P. 96-105.
250. Khan, W. Gut motor function: immunological control in enteric infection and inflammation / W. Khan, S. Collins S // *Clin. Exp. Immunol.* – 2006. – Vol. 143. - P. 389-397.
251. King, S. Trematodes of the family *Opisthorchiidae*: a minireview / S. King, T. Scholz // *Korean J Parasitol.* – 2001. – N 39(3). - P. 209–221.
252. Kirby, J. T. Antimicrobial susceptibility and epidemiology of a worldwide collection of *Chryseobacterium spp.*: Report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997-2001) / J. T. Kirby, H. S. Sader, T. R. Walsh, R. N. Jones // *J Clin. Microbiol.* – 2004. - Vol. 42(1). - P. 445-448.
253. Kolloffel, W. J. Токсоплазмоз. / W. J. Kolloffel, J. A. Каан // *Русский мед. журнал.* – 1995. - Т. 1, N 5. – С. 37-41.
254. Le'veille, S. Iha from an *Escherichia coli* urinary tract infection outbreak clonal group a strain is expressed in vivo in the mouse urinary tract and functions as a catecholate siderophore receptor / S. Le'veille, M. Caza, J. R. Johnson, C. C. Connie, M. Sabri, C. M. Dozois // *Infect. Immun.* - 2006. - Vol. 74, N 6. - P. 3427-3436.
255. Li, B. Genome Sequence of the rice pathogen *Dickeya zeaе* Strain ZJU1202 / B. Li, Y. Shi, M. Ibrahim, H. Liu, C. Shan, Y. Wang, M. Kube, G. Xie, G. Sun // *J. Microbiol.* – 2012. - Vol. 194, N 16. - P. 4452-4453.
256. Li, F. Distribution, virulence-associated genes and antimicrobial resistance of *Aeromonas* isolates from diarrheal patients and water, China / F. Li, W. Wang, Z. Zhu, A. Chen, P. Du, R. Wang, H. Chen, Y. Hu, J. Li, B. Kan, D. Wang // *J. Infect.* – 2015. – Vol. 70(6). - P. 600-608.

257. Liberto, M. C. Six cases of sepsis caused by *Pantoea agglomerans* in a teaching hospital / M. C. Liberto, G. Matera, R. Puccio, T. L. Russo, L. Colosimo, E. Focà // *New Microbiologica*. – 2009. – Vol. 32. - P. 119-123.
258. Liévin-Le, M. V. Secreted autotransporter toxin (Sat) triggers autophagy in epithelial cells that relies on cell detachment / M. V. Liévin-Le, Y. Comenge, V. Ruby, R. Amsellem, V. Nicolas, A. L. Servin. // *Cell. Microbiol.* - 2011. - Vol. 13(7). - P. 992-1013.
259. Lima, I. F. Prevalence of enteroaggregative *Escherichia coli* and its virulence-related genes in a case–control study among children from north-eastern Brazil / I. F. Lima, N. Boisen, J. S. Quetz, A. Havt, E. B. de Carvalho, A. M. Soares, N.L. Lima, R. M. Mota, J. P. Nataro, R. L. Guerrant, A. B. Lima // *J. Med. Microbiol.* - 2013. - Vol. 62 (Pt 5). - P. 683-693.
260. Logan, N. A. *Bacillus* and relatives in foodborne illness / N. A. Logan, // *J. of Applied Microbiology*. – 2011. – Vol. 11. - P. 417-429.
261. Ma, Y. The complete genome of *Comamonas testosteroni* reveals its genetic adaptations to changing environments / Y. Ma, Y. Zhang, J. Zhang, D. Chen, Y. Zhu, H. zheng, S. Wang, C. Jiang, G. Zhao, S. Liu // *Appl Environ Microbiol.* – 2009. – Vol. 75(21). - P. 6812-6819.
262. Manchanda, V. Multidrug resistant *Acinetobacter* / V. Manchanda, S. Sanchaita, N.P. Singh // *J Glob. Infect. Dis.* – 2010. – Vol. 2(3). - P. 291-304.
263. Maraki, S. Surgical wound infection caused by *Rahnella aquatilis* / S. Maraki, G. Samonis, E. Marnelakis, Y. Tselentis // *J. of Clinical Microbiology*. – 1994. – N 11. - P. 2706-2708.
264. Marsollier, L. Aquatic snails, passive hosts of *Mycobacterium ulcerans* / L. Marsollier, T. Severin, J. Aubry, R. W. Merritt, J. P. Saint Andre // *Appl Environ Microbiol.* – 2004. – Vol. 70. - P. 6296–6298.
265. Ménard, L. P. Enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1 (EAST1): a new toxin with an old twist / L. P. Ménard, J. D. Dubreuil // *Crit. Rev. Microbiol.* - 2002. - Vol. 28(1). - P. 43-60.

266. Million, M. Correlation between body mass index and gut concentrations of *Lactobacillus reuteri*, *Bifidobacterium animalis*, *Methanobrevibacter smithii* and *Escherichia coli* / M. Million, E. Angelakis, M. Maraninchi, M. Henry, R. Giorgi, R. Valero, B. Vialettes, D. Raoult // Int J Obes (Lond). – 2013. - Vol. 37(11). - P. 1460-1466.
267. Mirzarazi, M. Occurrence of genes encoding enterotoxins in uropathogenic *Escherichia coli* isolates / M. Mirzarazi, S. E. Rezatofighi, M. Pourmahdi, M. R. Mohajeri // Braz. J. Microbiol. - 2015. - Vol. 46(1). - P. 155-159.
268. Mobley, Harry L. T. Pathogenic *Escherichia coli* / L. T. Mobley, Harry, J. P. Nataro, J. B. Kaper // Nature Reviews Microbiology. – 2004. - N 2. - P. 123–140.
269. Moosavian, M. First investigation of the presence of *SPATE* genes in *Shigella* species isolated from children with diarrhea infection in Ahvaz, southwest Iran / M. Moosavian, G. H. Ghaderiyan, M. Shahin, N. T. Tahereh // Infect. Drug. Resist. - 2019. – N 12. - P. 795-804.
270. Morais, V. P. Enteric fever-like syndrome caused by *Raoultella ornithinolytica* (*Klebsiella ornithinolytica*) / V. P. Morais, , M. T. Daporta , A. F. Bao, M. G. Campello // J. Clin Microbiol. – 2009. – Vol. 47(3). - P. 868-869.
271. Nataro J. P. Identification and cloning of a novel plasmid-encoded enterotoxin of enteroinvasive *Escherichia coli* and *Shigella* strains / J. P. Nataro, J. Seriwatana, A. Fasano, D. R. Maneval, L. D. Guers, F. Noriega, F. Dubovsky, M. M. Levine, J. G. Morris // Infect. Immun. - 1995. - Vol. 63(12). - P. 4721-4728.
272. Neish, A. Microbes in gastrointestinal health and disease / A. Neish // Gastroenterology. – 2009. – Vol. 136. - P. 65-80.
273. Nichols, K. B., Molecular characterization of the vacuolating autotransporter toxin in uropathogenic *Escherichia coli* / K. B. Nichols, M. Totsika, D. G. Moriel, A. W. Lo, J. Yang, D. J. Wurpel, A. E. Rossiter, R. A. Strugnell, I. R. Henderson, G. C. Ulett, S. A. Beatson, M. A. Schembri // J. Bacteriol. - 2016. - Vol. 198, N 10. - P. 1487-1498.
274. O'Hara, A. M. Functional modulation of human intestinal epithelial cell responses by *Bifidobacterium infantis* and *Lactobacillus salivarius* / A. M. O'Hara, P. O'Regan, A.

- Fanning, C. O'Mahony, J. Macsharry, A. Lyons, J. Bienenstock, L. O'Mahony, F. Shanahan // *Immunology*. – 2006. – Vol. 118(2). - P. 202-215.
275. O'Toole, G., Kaplan H.B., Kolter R. Biofilm formation as microbial development / G. O'Toole, H.B. Kaplan, R. Kolter // *Annu Rev Microbiol*. – 2000. – Vol. 54. – P. 49-79.
276. Palmer, C. Development of the human infantintestinal microbiota / C. Palmer, E. Bik, D. DiGiulio, D. A. Relman, P. O. Brown // *PloS Biol*. – 2007. - Vol. 5. – P. 177.
277. Parvathi, A. Biochemical and molecular characterization of *Bacillus pumilus* isolated from coastal environment in Cochin, India / A. Parvathi, K. Krishna, J. Jose, N. Joseph, S. Nair // *Braz. J. Microbiol*. – 2009. - Vol. 40, N 2. - P. 269-275.
278. Pattabiraman, V. Genome wide characterization of enterotoxigenic *Escherichia coli* serogroup O6 isolates from multiple outbreaks and sporadic infections from 1975-2016 / V. Pattabiraman, L. S. Katz, J. C. Chen, A. C. McCullough, E. Trees // *PLoS ONE*. – 2018. – Vol. 13(12). - e0208735.
279. Penrose, A. Infectious causation of chronic disease: examining the relationship between *Giardia lamblia* infection and irritable bowel syndrome / A. Penrose, E. Wells, A. Aiello // *World J Gastroenterol*. – 2007. – Vol. 14, 13(34). - P. 4574-4578.
280. Pitt, T. L. Characterisation of *Exiguobacterium aurantiacum* isolates from blood cultures of six patients / T. L. Pitt, H. Malnick, J. Shah, M. A. Chattaway, C. J. Keys, F. J. Cooke, H. N. Shah // *Clin. Microbiol. Infect*. – 2007. – Vol. 13(9). - P. 946-948.
281. Pujalte, M. J. Aerobic and facultative anaerobic heterotrophic bacteria associated to mediterranean oysters and seawater / M. J. Pujalte, M. Ortigosa, M. C. Macián, E. Garay E // *Int Microbiol*. – 1999. – Vol. 2(4). - P. 259-266.
282. Qin, H. *L. plantarum* prevents enteroinvasive *Escherichia coli* - induced tight junction proteins changes in intestinal epithelial cells / H. Qin, Z. Zhang, X. Hang, Y. Jiang // *BMC Microbiol*. – 2009. - Vol. 9. - P. 63-69.
283. Quigley, E. Микробиота и моторика кишечника / E. Quigley // *Клиническая фармакология и терапия*. – 2013. - Vol. 22(1). - С. 16-22.
284. Quigley, E. Small intestinal bacterial overgrowth / E. Quigley, A. Abu-Shanab // *Infect. Dis. Clin. North Am*. – 2010. – Vol. 24. - P. 943-959.

285. Raman, S. An interesting case of *Empedobacter brevis* bacteremia after right knee cellulitis / S. Raman, H. Shaaban, J. W. Sensakovic, G. Perez // J Glob. Infect. Dis. – 2012. – Vol. 4(2). - P. 136-137.
286. Randall, S. S. Urinary tract infections attributed to diverse ExPEC strains in food animals: evidence and data gaps / S.S. Randall // Front. Microbiol. – 2015. - Vol. 4. – P. 6-28.
287. Reis, S. M. Acao da inoculacao de hemolimfa no mecanismo de defesa de *Biomphalaria tenagophila* / S. M.Reis, L. A. Magalhies, J. F Carvalho // Rev. saude publ. – 1995. - Vol. 29, N 4. - P. 259-264.
288. Resta-Lenert, S. Live probiotics protect intestinal epithelial cells from the effects of infection with enteroinvasive *Escherichia coli* (EIEC) / S. Resta-Lenert, K. Barrett // Gut. – 2003. – Vol. 52(7). - P. 988-997.
289. Romanenko, L. A. Isolation, phylogenetic analysis and screening of marine mollusc-associated bacteria for antimicrobial, hemolytic and surface activities / L. A. Romanenko, M. Uchino, N. I. Kalinovskaya, V. V. Mikhailov // Microbiological Research. – 2008. –Vol. 163. - P. 633-644.
290. Rousseaux, C. *Lactobacillus acidophilus* modulates intestinal pain and induces opioid and cannabinoid receptors / C. Rousseaux, X. Thuru, A. Gelot, N. Barnich, C. Neut, L. Dubuquoy, C. Dubuquoy, E. Merour, K. Geboes, M. Chamailard, A. Ouwehand, G. Leyer, D. Carcano, J. F. Colombel, D. Ardid, P. Desreumaux // Nature Med. – 2007. – Vol. 13(1). - P. 35-37.
291. Russo, T. A. Identification of a new iron-regulated virulence gene, *irea*, in an extraintestinal pathogenic isolate of *Escherichia coli* / T. A. Russo, U. B. Carlino, J. R. Johnson // Infect. Immun. - 2001. - Vol. 69(10). - P. 6209-6216.
292. Russo, T. A. IronN Functions as a siderophore receptor and is a urovirulence factor in an extraintestinal pathogenic isolate of *Escherichia coli* / T. A. Russo, C. D. McFadden, U. B. Carlino-MacDonald, J. M. Beanan, T. J. Barnard, J. R. Johnson // Infect. Immun. - 2002. - Vol. 70, N 12. - P. 7156-7160.
293. Schaller, K. Colicin E2 is DNA endonuclease / K. Schaller, M. Nomura // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. - 1976. - Vol. 73, N 11. - P. 3989-3993.

294. Sharma, K. K. Emerging infections: *Shewanella* – a series of five cases / K. K. Sharma, U. Kalawat // J Lab. Physicians. – 2010. – Vol. 2(2). - P. 61-65.
295. Sheikh, J. EilA, a HilA-like regulator in enteroaggregative *Escherichia coli* / J. Sheikh, E. G. Dudley, B. Sui, B. Tamboura, A. Suleman, J. P. Nataro // Mol. Microbiol. - 2006. - Vol. 61, N 2. - P. 338-350.
296. Skwor, T. *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas veronii* predominate among potentially pathogenic ciprofloxacin- and tetracycline-resistant *Aeromonas* isolates from Lake Erie / T. Skwor, J. Shinko, A. Augustyniak, C. Gee, G. Andraso // Appl. Environ Microbiol. – 2014. – Vol. 80(3). - P. 841-848.
297. Soler, L. Evaluation of two miniaturized systems, MicroScan W/A and BBL Crystal E/NF, for identification of clinical isolates of *Aeromonas spp* / L. Soler, F. Marco, J. Vila, M. R. Chacón, J. Guarro, M. J. Figueras // J Clin Microbiol. – 2003. – Vol. 12. - P. 5732–5734.
298. Stead, D. E. The first record of *Dickeya zea* in the UK / D. E. Stead, N. Parkinson, J. Bew, J. Hennessy, J. K. Wilson, J. G. Elphinstone // New Disease Reports. – 2009. – Vol. 19. - P. 24.
299. Stenutz, R. The structures of *Escherichia coli* O-polysaccharide antigens / R. Stenutz, A. Weintraub, G. Widmalm // FEMS Microbiol Rev. – 2006. – Vol. 30(3). – P. 382-403.
300. Stock, I. Natural antimicrobial susceptibility patterns of *Kluyvera ascorbata* and *Kluyvera cryocrescens* strains and review of the clinical efficacy of antimicrobial agents used for the treatment of *Kluyvera* infections / I. Stock // J Chemother. – 2005. – Vol. 17(2). - P. 143 - 160.
301. Šyvokienė, J. Change in the intestinal microflora of molluscs from the Neris river depending on pollution / J. Šyvokienė, L. Mickėnienė // Acta Zoologica Lituanica. – 2002. – Vol. 12(1). - P. 76-81.
302. Takashi, A. Probiotic *Bifidobacteria* protect mice from lethal infection with shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 / A. Takashi, S. Kensuke, N. Koji, N. Takashi, O. Ayako, T. Yoshifumi // Infect Immun. - 2004 – Vol. 72(4). - P. 2240–2247.

303. Tash, K. *Rahnella aquatilis* Bacteremia from a Suspected Urinary Source / K. Tash // J.Clin. Microbiol. – 2005. – Vol. 43(5). - P. 2526-2528.
304. Toloza, L. The secreted autotransporter toxin (Sat) does not act as a virulence factor in the probiotic *Escherichia coli* strain Nissle 1917 / L. Toloza, R. Giménez, M. J. Fábrega, C. S. Alvarez, L. Aguilera, M. A. Cacas, R. Martín-Venegas, J. Badia, L. Baldoma // BMC Microbiol. - 2015. – N 15. - P. 250-271.
305. Torres, A. G. Genes related to long polar fimbriae of pathogenic *Escherichia coli* strains as reliable markers to identify virulent isolates / A. G. Torres, M. Blanco, P. Valenzuela, T. M. Slater, S. D. Patel, G. Dahbi, C. Lypez, X. F. Barriga, J. E. Blanco, T. A. Gomes, R. Vidal, J. Blanco // J. Clinical. Microbiology. - 2009. - Vol. 47, N 8. - P. 442-2451.
306. Tzu-Ling, C. Persistent gut barrier damage and commensal bacterial influx following eradication of *Giardia* infection in mice / C. Tzu-Ling, C. Shin, W. Hsiu-Wei, L. Tsung-Chun, L. Yen-Zhen, W. Li-Ling, N. Yen-Hsuan, S. Chin-Hung, Y. Wei-Hsuan, A. G. Buret, L. Y. Chia-Hui // Gut Pathogens. – 2013. - P. 5-26.
307. Usui, M. Use of *Aeromonas spp.* as general indicators of antimicrobial susceptibility among bacteria in aquatic environments in Thailand / M. Usui, C. Tagaki, A. Fukuda // Front. Microbiol. – 2016. - N 7. - P. 710.
308. Varela, A. R. Quinolone resistant *Aeromonas spp.* as carriers and potential tracers of acquired antibiotic resistance in hospital and municipal wastewater / A. R. Varela, O. C. Nunes, C. M. Manaia // Sci. Total Environ. – 2016. - Vol. 542. - P. 665–671.
309. Vizoso Pinto, M. G. *Lactobacilli* stimulate the innate immune response and modulate the TLR expression of HT29 intestinal epithelial cells in vitro / M. G. Vizoso Pinto, G. M. Rodriguez, S. Seifert., B. Watzl, W. H. Holzapfel, C. M. Franz // Int J Food Microbiol. – 2009. – Vol. 31, N 133(1-2). - P. 86-93.
310. Weiglmeier, P. R., Rösch P., Berkner H. Cure and curse: *E.coli* heat-stable enterotoxin and its receptor guanylyl cyclase C / P. R. Weiglmeier, P. Rösch, H. Berkner // Toxins (Basel). - 2010. - Vol. 2(9). – P. 2213-2229.
311. Wenzler, E. Severe sepsis secondary to persistent *Lysinibacillus sphaericus*, *Lysinibacillus fusiformis* and *Paenibacillus amylolyticus* bacteremia / E. Wenzler, K.

Kamboj, Joan-Miquel Balada-Llasat // International Journal of Infectious Diseases. – 2015. - P. 93–95.

312. Xu, W. Y. Different loci and mRNA copy number of the increased serum survival gene of *Escherichia coli* / W. Y. Xu, Y.J. Li, C. Fan // Can. J. Microbiol. - 2018. - Vol. 64, N 2. - P. 147-154.

313. Yujun, J. . *Lactobacillus acidophilus* induces cytokine and chemokine production via NF- κ B and p38 mitogen-activated protein kinase signaling pathways in intestinal epithelial cells / J. Yujun, , X. Lü, C. Man, L. Han, Y. Shan, X. Qu, Y. Liu, S. Yang, Y. Xue, Y. Zhang. // Clin. Vaccine Immunol. – 2012. – Vol. 19(4). - P. 603-608.

ПРИЛОЖЕНИЕ 1*Перечень полученных архивов сырых ридов*

1. E-coli-1654-1_R1.fastq.gz и E-coli-1654-1_R2.fastq.gz
2. E-coli-1654-2_R1.fastq.gz и E-coli-1654-2_R2.fastq.gz
3. E-coli-1338_R1.fastq.gz и E-coli-1338_R2.fastq.gz
4. E-coli-2688_R1.fastq.gz и E-coli-2688_R2.fastq.gz
5. E-coli-93_R1.fastq.gz и E-coli-93_R2.fastq.gz; E-coli-93_rep_R1.fastq.gz и E-coli-93_rep_R2.fastq.gz
6. E-coli-29_R1.fastq.gz и E-coli-29_R2.fastq.gz
7. E-coli-199_R1.fastq.gz и E-coli-199_R2.fastq.gz
8. E-coli-3639_R1.fastq.gz и E-coli-3639_R2.fastq.gz; E-coli-3639_rep_R1.fastq.gz и E-coli-3639_rep_R2.fastq.gz
9. E-coli-3422_R1.fastq.gz и E-coli-3422_R2.fastq.gz; E-coli-3422_rep_R1.fastq.gz и E-coli-3422_rep_R2.fastq.gz
10. E-coli-167_R1.fastq.gz и E-coli-167_R2.fastq.gz
11. E-coli-1625_R1.fastq.gz и E-coli-1625_R2.fastq.gz
12. E-coli-2756_R1.fastq.gz и E-coli-2756_R2.fastq.gz
13. E-coli-2718_R1.fastq.gz и E-coli-2718_R2.fastq.gz
14. E-coli-2057_R1.fastq.gz и E-coli-2057_R2.fastq.gz
15. E-coli-2841_R1.fastq.gz и E-coli-2841_R2.fastq.gz
16. E-coli-3420_R1.fastq.gz и E-coli-3420_R2.fastq.gz
17. E-coli-2280_R1.fastq.gz и E-coli-2280_R2.fastq.gz
18. E-coli-2554_R1.fastq.gz и E-coli-2554_R2.fastq.gz
19. E-coli-3463_R1.fastq.gz и E-coli-3463_R2.fastq.gz
20. E-coli-329_R1.fastq.gz и E-coli-329_R2.fastq.gz
21. E-coli-118_R1.fastq.gz и E-coli-118_R2.fastq.gz
22. E-coli-2_R1.fastq.gz и E-coli-2_R2.fastq.gz
23. E-coli-3_R1.fastq.gz и E-coli-3_R2.fastq.gz
24. E-coli-83_R1.fastq.gz и E-coli-83_R2.fastq.gz
25. E-coli-24_R1.fastq.gz и E-coli-24_R2.fastq.gz
26. E-coli-44_R1.fastq.gz и E-coli-44_R2.fastq.gz
27. E-coli-45-1_R1.fastq.gz и E-coli-45-1_R2.fastq.gz
28. E-coli-45-2_R1.fastq.gz и E-coli-45-2_R2.fastq.gz
29. E-coli-46_R1.fastq.gz и E-coli-46_R2.fastq.gz
30. E-coli-49_R1.fastq.gz и E-coli-49_R2.fastq.gz

ПРИЛОЖЕНИЕ 2

Штамм-идентифицирующая информация *E.coli*, представляющая GenBank (01.04.2020)

Strain name	Isolation source	SCPM ID	GenBank accession no.	SRR	Genome size (bp)	No. of contigs	No. of genes
3	feces	SCPM-O-B-8790	JAATUW010000001	SRR11426061	5122473	121	4945
83	feces	SCPM-O-B-8793	JAATVC010000001	SRR11426065	5169026	90	5020
46	feces	SCPM-O-B-8792	JAATVB010000001	SRR11426066	4934606	136	4832
3420	feces	SCPM-O-B-8798	JAATUX010000001	SRR11426060	5155993	191	5041
2	feces	SCPM-O-B-8789	JAATUS010000001	SRR11426067	5075575	118	4874
3463	feces	SCPM-O-B-8799	JAATUY010000001	SRR11426059	5095563	168	4961
2280	feces	SCPM-O-B-8795	JAATUT010000001	SRR11426064	5228283	201	5166
2718	feces	SCPM-O-B-8797	JAATUV010000001	SRR11426062	4909113	159	4729
1654-1	feces	SCPM-O-B-8794	JAATUR010000001	SRR11426068	4309690	110	4193
45-1	feces	SCPM-O-B-8791	JAATVA010000001	SRR11426057	5136154	377	5234
3639	feces	SCPM-O-B-8800	JAATUZ010000001	SRR11426058	5232389	479	5404
2688	feces	SCPM-O-B-8796	JAATUU010000001	SRR11426063	4867910	379	4861

Штамм-идентифицирующая информация *A. baumannii*, представляющая GenBank (15.04.2019)

Strain name	Isolation source	SCPM ID	GenBank accession no.	SRR	Genome size (bp)	No. of contigs	No. of genes
136	water	SCPM-O-B-8557	STGR00000000.1	SRR8926368	3,838,422	32	3,641