

**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ЧЕРНІВЕЦЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ ЮРІЯ ФЕДЬКОВИЧА**

**Навчально-науковий інститут біології, хімії та біоресурсів
Кафедра біохімії та біотехнології**

**ОСОБЛИВОСТІ ІДЕНТИФІКАЦІЇ ДІАРЕЄГЕННИХ *E.COLI*
У ДІТЕЙ РАННЬОГО ВІКУ**

Кваліфікаційна робота

Рівень вищої освіти – другий (магістерський)

Виконала:

студентка 6 курсу, 611М групи

Кирничішин Ольга Романівна

Керівник:

кандидат біологічних наук,

доцент **Васіна Л.М.**

*До захисту допущено
на засіданні кафедри*

протокол № _____ від _____ 2022 р.

Зав. кафедрою _____ проф. Копильчук Г.П.

Чернівці – 2022

Анотація

Магістерська робота присвячена ідентифікації патогенних (діареєгенних) штамів кишкової палички у новонароджених та дітей раннього віку.

Умовно-патогенні бактерії ідентифіковані як збудники кишкових інфекцій у 72% проаналізованих випадків. Патогенні діареєгенні *E.coli* були причиною розвитку гострих кишкових інфекцій у 28% випадків. Найпоширенішою причиною виникнення гострих ентероколітів у дітей грудного віку були ентеропатологічні *E.coli*, частка ентеротоксичних була незначною, а ентероінвазивних кишечних паличок не виявлено. У дітей віком 3-6 років зафіксовані випадки інфікування ентеротоксичними, ентероінвазивними та ентерогеморагічними *E.coli*, що складами відповідно 2.6, 6.7 та 12.5 % проаналізованих хвороб. У розвитку важких клінічних проявів кишкової інфекції домінували *E.coli* серогруп O18ab, O111ab, O126, O25.

Дослідження проводили у 2021-2022 роках на базі центральної лабораторії Львівської обласної клінічної лікарні (дитяче відділення).

Ключові слова: *E.coli*, середовища культивування, антигени, фактори патогенності, дисбіоз.

Abstract

The master's thesis is devoted to the study of the identification features of pathogenic (diarrheogenic) strains of *Escherichia coli* in newborns and young children.

Conditionally pathogenic *Escherichia coli* were identified as causative agents of escherichia in 72% of analyzed cases. Pathogenic diarrheogenic *E.coli* were the cause of acute intestinal infections in 28% of cases. The most common cause of acute enterocolitis in infants was enteropathogenic *E.coli*, the share of enterotoxigenic ones was insignificant, and no enteroinvasive *Escherichia coli* was found. In children aged 3-6 years, cases of infection with enterotoxigenic, enteroinvasive and enterohemorrhagic *E.coli* were recorded, which accounted for 2.6, 6.7 and 12.5% of the analyzed diseases, respectively. *E.coli* serogroups O18ab, O111ab, O126, O25 dominated the development of severe clinical manifestations of intestinal infection.

The research was conducted in 2021-2022 on the basis of the Lviv Regional Clinical Hospital (children's department).

Keywords: *E.coli*, culture media, antigens, pathogenicity factors, dysbiosis.

Кваліфікаційна робота містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів наукових досліджень інших авторів мають посилання на відповідне джерело.

О.Р. Кирничішин
(підпис)

ЗМІСТ

ВСТУП.....	5
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	7
1.1. Загальна характеристика аутомікрофлори організму людини.....	7
1.2. Особливості організації та життєдіяльності <i>E.coli</i>	14
1.2.1. Морфолого-культуральні властивості <i>E.coli</i>	14
1.2.2. Біохімічні властивості <i>E.coli</i>	16
1.2.3. Характеристика антигенів і факторів патогенності <i>E.coli</i>	17
1.3. Причини та методи корекції дисбіотичних станів	21
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ	25
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ.....	30
ВИСНОВКИ.....	48
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	49
ДОДАТКИ.....	51

ВСТУП

Організм людини підтримує існування широкої різноманітності мікроорганізмів, які складають динамічну функціональну систему, що синергетично розвивається. Мікроби, які потрапляють у організм людини вертикальним, горизонтальним шляхом чи з навколишнього середовища, а також їхні метаболіти мають потенціал для формування траєкторій розвитку з наслідками для здоров'я впродовж усього життя, оскільки все більше не лише гострих, а й хронічних запальних і метаболічних захворювань, неврологічних розладів, онкохвороб пов'язують з функціональними порушеннями мікробіому [1]. Вони можуть виникати або локально в місці прояву захворювання, або у віддалених ділянках, що спричиняє метаболічні та імунологічні зміни в організмі.

Покращення ефективності та точності секвенування ДНК геномів мікробних угруповань доповнене аналізом транскриптомів, протеомів, метаболомів та імуномів, а також експериментальними дослідженнями у модельних системах, значно покращило розуміння структури і функцій мікробіому як у здорових людей, так і за розвитку патологій.

Велика кількість зовнішніх і внутрішніх факторів, включаючи особливості харчування, побуту, шкідливих звичок, професійної діяльності, кліматично-географічні, застосування препаратів, операційних втручань та реактивність організму, впливають на мікробіом людини, зокрема на мікробіом кишечника, де виявляють найбільшу якісно-кількісну різноманітність мікробів. У свою чергу, біологічно активні продукти мікробіому локально чи дистанційно діють на власні клітини організму людини [2].

Мікрофлора формується в ранньому віці. Найкритичними вважають два етапи її становлення – пологи та спосіб годування. У випадку природних пологів та вигодовуванням грудним молоком з наявними у йому біфідогенними факторами у здорових, доношених дітей уже через 7-10 у біотопах переважає анаеробна складова – насамперед представники родів *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, а в іншому випадку становлення повноцінної мікрофлори

кишечнику гальмується і фактично розвивається дисбіоз. При цьому часто виникають різноманітні кишкові інфекції, причиною яких можуть виступати патогенні *E.coli*

Тому, метою даної роботи було дослідження частоти виявлення діареєгенних *E.coli* в організмі дітей раннього віку.

Відповідно до мети поставлені завдання:

1. Здійснити морфолого-культуральну, тинкторіальну, біохімічну ідентифікацію *E.coli* у біологічному матеріалі дітей раннього віку.
2. Встановити наявність антигенних структур, характерних для діареєгенних серотипів *E.coli* шляхом реакції аглютинації.
3. Проаналізувати частоту виявлення збудників гострої кишкової інфекції (патогенних *E.coli*) у дітей (новонароджені, немовлята віком до 2 років, діти віком 2-6 роки).

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Загальна характеристика аутомікрофлори організму людини

Усю сукупність мікроорганізмів в організмі людини описують терміном «мікрофлора» чи «мікробіота». Як і у будь-якому середовищі існування, мікрофлору людини диференціюють на аутохтонну (постійну) та алохтонну (випадкову). Загалом, кількість мікроорганізмів надзвичайно велика. Дослідження впродовж останніх десятиліть вказували, що у людському організмі, що містить біля 10^{13} власних клітин, наявно близько 10^{14} клітин мікроорганізмів [1]. На сьогодні, це співвідношення вважається меншим і описується як 1:1,3. Мікробіом активно досліджується [2]. Наймасштабнішими проєктами є – Human Microbiome Project (HMP) у США, дослідження діабету 2 типу у Китаї, MetaHIT у Євросоюзі. Об'єднані дані MetaHit і проєкту Human Microbiome забезпечили найбільш повне уявлення про мікробіоту людського організму. Ідентифіковано понад 50 типів бактерій, 2172 види, з яких 93,5% належали до Proteobacteria, Firmicutes, Actinobacteria та Bacteroidetes. Три з ідентифікованих типів містили лише один вид, включаючи кишковопорожнинний *Akkermansia muciniphila*, єдиний відомий представник роду *Verrucomicrobia*. 386 ідентифікованих видів є строго анаеробними, що виявляються в слизових оболонках ротової порожнини та шлунково-кишкового тракту.

Якісно-кількісний склад мікробіоти значною мірою визначається віком, типом місцевості та проживання, традиціями у харчуванні, побуті, одязі, станом нервової та ендокринної систем, фізичного та психічного здоров'я, гігієни, способом життя, впливом ксенобіотиків і зовнішніх факторів.

Хоча мікроби, асоційовані з макроорганізмами, імовірно, отримані з навколишнього середовища, склад мікробіоти ссавців, особливо в кишечнику, відрізняється від консорціумів вільноживучих мікробів. Навпаки, бактеріальні спільноти з середовищ, які зазвичай вважаються екстремальними, таких як кислі гарячі джерела та гідротермальні джерела, подібні до спільнот у багатьох інших середовищах [3]. Це свідчить про те, що коєволюція між хребетними та їхніми

мікробними консорціумами протягом сотень мільйонів років призвела до вибору спеціалізованої групи мікроорганізмів (бактерій, архей, найпростіших, мікроскопічних грибів), які домінують у теплому, евтрофному та стабільному середовищі кишечника.

Різноманітність індивідів щодо мікробіомів є величезною, порівняно з варіаціями генома: окремі люди приблизно на 99,9% ідентичні один одному з точки зору генома господаря, але можуть відрізнятися один від одного на 80-90% з точки зору мікробіомів їхніх рук [4] або кишечника.

Часто мікробіоту описують як окремий орган, для якого притаманні певна локалізація, структура, функції. Зокрема: а) мікрофлора розміщена на шкірі та слизових оболонках тих органів, що контактують з навколишнім середовищем (при цьому кожен біотоп відрізняється своєю специфічністю – концентрацією нутрієнтних чи інгібуючих речовин, рівнем рН, вологості, температури); б) у біотопах (слизових оболонках) мікроорганізми утворюють біоплівки (прояв *quorum sensing*), де розміщення кожного виду чітко структуризоване; в) основна функція аутохтонної мікрофлори – забезпечення колонізаційної резистентності.

Формування мікрофлори організму людини здійснюється у кілька етапів. Під час ембріонального розвитку організм людини стерильний через наявність, насамперед, плацентарного бар'єру, проте внаслідок травми, хвороби матері та відсутності чи дефіциту факторів специфічного та неспецифічного захисту дитини можливе внутрішньоутробне інфікування плоду [5].

Найважливішою та найчисельнішою є мікрофлора травного тракту, особливо визначальна її роль у дитячому віці. Становлення її передчас два критичні періоди: 1) пологи та перші дні, коли розпочинається колонізація стерильного кишечника, 2) відлучення дитини від грудного годування. Під час природних пологів шкіра та слизові дитини контактують із мікрофлорою пологових шляхів матері, повітря, рук медичного персоналу, тому мікрофлора перших днів життя представлена аеробними мікроорганізмами, що при грудному годуванні поступово замінюються анаеробами, переважно біфідобактеріями [6].

У випадку кесаревого розтину чи штучного годування у немовлят становлення еубіозу гальмується відсутністю біфідогенних факторів та іншими чинниками. Кесарів розтин асоціюється зі збільшенням кількості бактерій-опортуністів *Bacteroides* spp., *Haemophilus* spp., *Enterobacter cancerogenus* / *hormaechei*, *Veillonella dispar* / *parvula*, *Staphylococcus* spp.. Ці мікроби продовжують зберігатися принаймні протягом першого року життя [5].

Годування також виявляє сильний селективний тиск на мікробіом [7]. Наприклад, олігосахариди жіночого молока можуть використовуватися як єдине джерело вуглецю лише невеликою кількістю видів *Bifidobacterium* і *Bacteroides*.

Дослідження мікробіомів у немовлят дозволяє зрозуміти причини захворювань у дорослому віці та дає можливість ідентифікувати групи ризику, для вчасної профілактики чи лікування захворювання (наприклад підвищені концентрації N-оксиду триметиламіну, що утворюються при бактеріальній трансформації фосфатидилхоліну пов'язані з розвитком артросклерозу, а оксиліпін 12,13-diHOME, утворений бактеріальною епоксигідролазою, є маркером алергічних запалень дихальних шляхів).

Фекальна мікробіота 72% немовлят, народжених шляхом вагінальних пологів, нагадує мікробіоту фекалій їхніх матерів, у дітей, народжених за допомогою кесаревого розтину, цей відсоток зменшується до 41% [8, 9].

На ранніх етапах розвитку мікробіота, як правило, відрізняється незначним розмаїттям і в ній домінують два основних типи, актинобактерії та протеобактерії. Впродовж першого року життя мікробне різноманіття зростає, а склад мікробіоти наближується до мікробного профілю дорослого, з тимчасовими варіаціями, унікальними для кожної дитини [5, 10]. У 2,5 роки склад, різноманітність і функціональні можливості мікробіоти нагадують мікробіоти дорослих [11, 12].

Незважаючи на те, що в дорослому віці склад мікробіоти кишечника є відносно стабільним, зміна його можлива за дії ендо-та екзогенних факторів. В людей старшого віку (понад 65 років) мікрофлора змінюється через збільшення кількості *Bacteroidetes* та *Clostridium* кластер IV, а у людей старечого віку -

факультативних анаеробів (наприклад, *Escherichia coli*) і перегрупуванням профілю продуцентів бутирату (наприклад, зменшення *Faecalibacterium prausnitzii*) [3]. Слід зазначити, що з віком знижується здатність до продукції коротколанцюгових жирних кислот та амілоліз, але зростає протеолітична активність мікробіоти [8].

Основні мікробіоценози організму людини:

1. Шкіра. Мікробіота характеризується постійним складом, що значно залежить від зволоженості поверхні, температури, товщини шару жирів на поверхні. Більшість мікроорганізмів знаходяться на поверхневих шарах і у верхніх частинах волосяних фолікулів, менша частина мікрофлори розміщена глибше, є недоступною для дезінфекції та слугує своєрідним резервуаром для відновлення після видалення поверхневих бактерій [13]. Переважають грампозитивні бактерії родів *Corynebacterium*, *Staphylococcus*, *Micrococcus*, *Propionibacterium*.

2. Ротова порожнина. Наявна різноманітна мікрофлора – *Streptococcus*, *Neisseria*, *Leptotrichia*, *Bordetella*, різноманітністю понад 300 видів [14].

3. Верхні дихальні шляхи контаміновані *Corynebacterium*, *Neisseria*, коагулазо-негативними *Staphylococcus*, альфа-гемолітичними *Streptococcus*, транзиторними видами є *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, бета-гемолітичні стрептококи. Нижні дихальні шляхи у нормі мають бути стерильними [15].

4. Шлунково-кишковий тракт. У шлунку зустрічаються ацидофіли, серед яких хелікобактерії.

Швидка перистальтика і наявність жовчі спричиняють відносно малі кількості мікроорганізмів у верхньому відділі тонкого кишечника. В зоні ілеоцекального клапана їх виявлено 10^6 - 10^8 /мл з переважанням біфідобактерій, лактобактерій, стрептококів, бактероїдів [16].

У товстому кишечнику визначають 10^9 - 10^{11} бактерій/г вмісту, серед близько 400 видів яких 95-99% є анаеробами – біфідобактерії, лактобактерії, еубактерії, пептострептококи, бактероїди, клостридії. Переважаючими є представники двох родів *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, що разом об'єднують як

ГАЦАБ (грампозитивні анаеробні цукролітичні аспорогенні бактерії). Генетичне різноманіття мікробіоти нашого кишечника дозволяє перетравлювати сполуки через метаболічні шляхи, незакодовані в геномі ссавців, що значно збільшує здатність отримувати енергію з різноманітних субстратів [17, 18].

Впродовж першого року життя склад мікробіоти кишечника є простим і відрізняється широкими міжіндивідуальними варіаціями. Вважається, що початкова колонізація кишечника відіграє важливу роль у формуванні складу мікробіоти кишечника дорослої людини. Мікробіота кишечника немовляти зазнає ряд змін, які пов'язані зі зміною режиму годування від грудного або штучного вигодовування до відлучення від грудей і введення твердої їжі [5, 12]. Незважаючи на відносну подібність кишкової мікробіоти у матерів та їхніх нащадків, вона може відрізнитися залежно від впливу факторів:

- зовнішніх – мікробіота найближчого оточення, тип їжі та харчові звички, температура;
- внутрішні фактори – рН кишечника, мікробні взаємодії, перистальтика; природні інгібітори (жовчні кислоти), імунні фактори, наявність бактеріальних рецепторів слизової оболонки [19].

Не дивлячись на дію багатьох факторів, склад мікрофлори кишечника характеризується стабільністю, з притаманним переважанням *Bacteroidetes* і *Firmicutes* у різних співвідношеннях. Однією з причин цього є селективний тиск господаря та середовища для підтримки певних функцій, що забезпечують бактерії головних типів. Розподіл бактерій у ШКТ – нерівномірний, починаючи з 10^3 /г у шлунку до 10^4 - 10^7 /г у тонкій кишці, досягаючи 10^{11} - 10^{12} /г у товстій кишці. Значну роль при цьому відіграє і мікросередовище, і ступінь близькості до епітеліоцитів: *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Ruminococcus* виявляються в екскрементах, що робить їх репрезентативними для просвітної мікрофлори, а *Lactobacillus*, *Clostridium*, *Enterococcus* були виявлені в шарі слизу та епітеліальних криптах тонкої кишки [20].

Вважаючи на значну кількість генів, мікроорганізми здійснюють різноманітні метаболічні функції, які людський організм не здатен або виконує

лише обмежено. Кишкові бактерії здатні виробляти різноманітні вітаміни, синтезувати всі незамінні та замінні амінокислоти, здійснювати біотрансформацію жовчі, забезпечувати біохімічні шляхи для метаболізму неперетравлюваних вуглеводів (целюлози, геміцелюлози, пектинів, камедей, ксилану, манану, ксилоглюкану, окремих олігосахаридів), етанолу, муцинів. Кишкова мікробіота створює ефект бар'єру або конкурентного виключення через заповненість сайтів прикріплення, використання нутрієнтів, продукцію факторів антагонізму, запобігаючи розмноженню патогенів [21].

Аутохтонні бактерії є основними продуцентами коротколанцюгових жирних кислот (КЛЖК, SCFA, ацетат, пропіонат, бутират, валеріат), що не лише призводять до зниження рН середовищ та гальмування розвитку патогенів, а виявляють трофічно-енергетичний (для ентероцитів), протипухлинний, імуномодуючий, протівірусний ефекти. Поява корисних родів на ранньому етапі життя сприяє імунній толерантності та, може послабити або скасувати аутоімунні захворювання [16].

Серед основних сполук, окрім КЛЖК, що утворюються аутохтонними мікроорганізмами слід відзначити наступні: вітаміни B1, B2, B3, B5, B6, B7, B9-11, B12, K2, поліаміни, амінокислоти, індол та його похідні, метаболіти жовчних кислот, похідні холіну, фенолу. K2, який в анаеробних умовах синтезують *Bacteroides fragilis*, *Eubacterium lentum*, *Enterobacter agglomerans*, *Serratia marcescens* і *Enterococcus faecium* є необхідним для зниження судинної кальцифікації, підвищення ЛПВЩ і зменшення рівня холестерину, що сприяє зниженню ризику серцево-судинних захворювань. B5 і B12, що утворюються лише мікроорганізмами кишечника, є коферментами багатьох біохімічних реакцій організму, включаючи формування ацетилхоліну та кортизолу, необхідних для нормального функціонування нервової системи, а дефіцит їх призводить до розвитку шлунково-кишкового дискомфорту, безсоння, нейропсихологічних та гематологічних розладів [22].

Мікрофлора активно задіяна у перетворенні жовчних кислот, що у кількості 95% реабсорбується в дистальному відділі клубової кишки людини. 5%

неабсорбованих первинних жовчних кислот надалі біоконвертуються або декон'югуються у вторинні жовчні кислоти за допомогою гідролаз жовчних солей, що виділяються *Clostridium perfringens* і *Clostridium scindens* з наступною частковою реабсорбцією в товстій кишці та транспортуванням у печінку. І первинні, і вторинні жовчні кислоти здатні активувати ядерну передачу сигналів FXR (регулює виробництво жовчних кислот, метаболізм глюкози та розвиток печінкової аутофагії). Вторинні жовчні кислоти служать потужним активатором TGR5 (члена родопсиноподібної підродини GPCR), який широко експресується в різних тканинах, включаючи жовчний міхур, печінку, селезінку, кишечник та імунні клітини, що в свою чергу стимулюватиме синтез цАМФ і наступну цАМФ-залежну низхідну передачу сигналів, індукуючи експресію безлічі генів, а також проявляють антимікробну дію, що змінює цілісність мембрани мікробної клітини, пригнічуючи ріст відповідних мікроорганізмів [23].

Доведена участь кишкової мікробіоти у розвитку імунітету та регуляції імунної відповіді як на місцевому, так і на системному рівнях ((гемопоезу – вродженого імунітет) і лімфоцитопоезу (адаптивного імунітету)). Розвиток імунної відповіді з наступним вивільнення захисних пептидів, цитокінів і лейкоцитів здійснюється внаслідок зв'язування бактеріальних молекул з Toll-рецепторами ентероцитів. Результатом може бути захисна реакція на бактерії-коменсали, запальна реакція на патогени або запуск загибелі клітини господаря. Для захисту та підтримання гомеостазу, шлунково-кишковий тракт обмежує вплив мікробіоти на імунну систему хазяїна шляхом залучення багатфакторного та динамічного кишкового бар'єру, що включає фізичні (епітеліальний і слизовий шари), біохімічні (ферменти та протимікробні білки) та імунологічні (IgA та епітеліально-асоційовані імунні клітини) компоненти. Тривалість існування окремого мікроба визначається тим, чи задіяний він у виконанні важливих функцій, від яких залежить життєдіяльність людини [24].

Велика роль кишкових бактерій у профілактиці алергічних реакцій, що полягає у стимуляції імунної системи і пропорційному реагуванні на

різноманітні антигени. Змінений склад кишкової мікробіоти в ранньому віці може призвести до недостатньої реактивності імунної системи, що часто надмірно реагує на антигени [25, 26].

Виявлено нову функцію мікробіоти господаря та їх SCFA у регуляції дозрівання та функціональності мікроглії, тканинних макрофагів ЦНС та зв'язок ЕНС (ентеральної нервової системи) з ЦНС через вісь «кишечник-мозок». Ця вісь – комунікаційна двонаправлена система, яка об'єднує нейронні, гормональні та імунологічні сигнали. Основні клітини ЕНС – ентимальні гліальні клітини (EGC) утворюють мережу, яка регулює різноманітні функції шлунково-кишкового тракту, включаючи екзокринну/ендокринну секрецію, моторику кишечника, кровотік, імунозапальні реакції (за допомогою складного репертуару кальційзалежної сигналізації), а дисфункції ЕНС та EGC призводять не лише до шлунково-кишкових розладів, а нейродегенеративних розладів [27-29].

5. Вагіна – мікробіоценоз мінливого видового складу, що регулюється вагінальним рН і рівнем гормонів (у дівчаток першого місяця життя та після настання статевої зрілості переважають лактобацили, корінебактерії, пептострептококи, стафілококи [1].

1.2. Особливості організації та життєдіяльності *E.coli*

1.2.1. Морфолого-культуральні властивості *E.coli*

E. coli належить до роду *Escherichia*, родини *Enterobacteriaceae*, відділу *Gracilicutes*. Згідно класифікації за Берджі, родина входить до групи грамнегативних факультативно-анаеробних паличок разом з родинами *Vibrionaceae* та *Pasteurellaceae*. Родина *Enterobacteriaceae* включає 30 родів, більшість з яких патогенні для людини, насамперед *Escherichia*, *Salmonella*, *Shigella*, *Proteus*, *Klebsiella*.

Escherichia coli, що є найпоширенішою моделлю біохімічних і генетичних досліджень та продуцентом широкомасштабного виробництва рекомбінантних білків, є одним із найбільш інтенсивно досліджуваних мікроорганізмів.

E. coli – аспорогенна дрібна паличка з закругленими кінцями, перитрих (хоча зустрічаються нерухомі варіанти), розміром 1,1–1,5×2,0–6,0 мкм. Є факультативним анаеробом, мезофілом, прототрофом (легко культивуються на МПА та МПБ). Деякі види мають виражену капсулу чи мікрокапсулу. Здатні утворювати колонії S- і R-форми.

Формують опуклі колонії з рівним чи хвилястим краєм на твердому поживному середовищі (діаметром 3-5 мм), при культивуванні у рідких – викликають помутніння та осад [30].

Геном бактерії розшифрований у 1997 році. Помилково вважати *E.coli* однорідним видом. Більшість генів, навіть ті, що кодують збережені метаболічні функції, є поліморфними, з кількома алелями, виявленими серед різних ізолятів. Склад геному *E.coli* також відрізняється високою динамікою. Повністю секвенований геном лабораторного штаму K-12 демонструє надзвичайну пластичність.

Для вивчення особливостей бактерій використовують диференційно-діагностичні середовища Ендо, Левіна (ЕМС) та Плоскірева. Ешерихії розщеплюють лактозу з накопиченням кислоти, внаслідок чого змінюється забарвлення індикатора, при цьому колонії яскраво забарвлюються: у малиновий з металічним блиском чи без нього – на середовищі Ендо, у темно-фіолетовий з металічним блиском чи без нього – на середовищі ЕМС (Левіна), у червоно-жовтий – на середовищі Плоскірева [31].

Найкраще розвиваються за температури 37 °С, рН 7,2–7,8. Бактеріям притаманна відносно висока стійкість у середовищах довкілля (з цим пов'язана їх санітарно-показова індикаторність) – здатні виживати впродовж 2–3 міс, а в молоці та інших харчових продуктах не тільки зберігаються, а й розмножуються. Проте *E. coli* чутливі до високої температури (при 100 °С гинуть за 1 хв, при 60 °С – за 15 хв), дезінфектантів (за дії 3 % розчину хлораміну гинуть через 20-30 хв, дуже чутливі до діамантового зеленого).

Кишкові палички широко розповсюджені у природі. Їх виявляють у кишечнику майже усіх ссавців, птахів, рептилій, риб, окремих безхребетних, у

воді, ґрунті та інших об'єктах довкілля. На сьогодні вважаються найчисельнішою групою додаткової ланки нормобіоти, що сприяє стимуляції імунореактивності організму за рахунок постійного антигенного подразнення системи локального імунітету. Кишкова паличка синтезує вітаміни В, К, коліцини, мікроцини, КЛЖК. У перші 40 год життя дані бактерії колонізують кишечник, потрапляючи з їжею або від осіб, що контактують з дитиною, і зберігаються протягом життя на рівні 10^6 – 10^8 КУО/г вмісту товстої кишки [32].

Основний метод лабораторної діагностики – бактеріологічний. До уваги беруть видові характеристики – морфолого-культуральні та фізіолого-біохімічні особливості – відсутність забарвлення за Грамом, паличкоподібну форму, оксидазонегативність, здатність ферментувати глюкозу з утворенням кислот, газу, індолу, неможливість утворення сірководню.

Надалі визначають належність до серогрупи на основі характеристики О-антигенів, що дозволяє відрізнити умовно-патогенні та патогенні *E.coli*. Внутрішньовидова ідентифікація, що має епідеміологічне значення, полягає у визначенні серовара за допомогою діагностичних адсорбованих імунних сироваток на основі характеристики Н-антигенів [33].

Можуть використовуватися й додаткові методи ідентифікації, зокрема здійснюють ПЛР та імунологічні спостереження, зокрема ІФА.

1.2.2. Біохімічні властивості *E.coli*

Enterobacteriaceae характеризуються високою біохімічною активністю внаслідок широкого спектру ферментів – як конститутивних, так і індукцибельних. Окремі з них мають важливе таксономічне значення і використовуються для родової, видової диференціації, а також для визначення окремих біоварів в межах виду. Найважливі ознаки, що дають можливість розрізнити п'ять основних родів патогенів включають:

- особливості кінцевих продуктів, що утворюються при зброджуванні глюкози – кислоти, газу, бутандіол, їх суміш;
- реакція з метиленовим червоним;

- утворення ацетилметилкарбінола (реакція Фогеса-Проскауера);
- відновлення нітратів;
- утворення уреаз;
- ріст при наявності KCN;
- ферментація вуглеводів [30].

E. coli притаманна здатність утилізувати різноманітні вуглеводи, тобто вони проявляють цукролітичну активність (здатні перетворювати моносахариди (як гексози – глюкозу, так і пентози – арабінозу), дисахариди (мальтозу, сахарозу, лактозу), манітол, сорбітол, з утворенням кислоти та газу (проте здатність використовувати сахарозу й лактозу є варіабельною, залежить від штаму кишкової палички)). Катаболізм глюкози до пірувату можливий двома шляхами – Ембдена-Мейєргофа-Парнасу та Ентнера-Дудорова. Енергію отримують в результаті бродіння – мурашинокислого чи змішаного типу, або дихання в аеробних умовах. Їх висока газоутворююча здатність пов'язана з розщепленням форміату ліазою на вуглекислий газ і молекулярний водень. Здатні синтезувати гемопротеїни.

Бактерії відновлюють нітрати до нітритів. Їх протеолітичні властивості виражені слабо, посилюються при аеробізмі (при перетворенні амінокислот з'являються розгалужені органічні кислоти). Здатні утворювати індол, не утворюють сірководень, не розріджують желатин. Не володіють цитратлізуючою, уреазною активностями. Окремі біовари здатні декарбоксилювати лізин, але в жодному разі не виявляють здатність кишкових паличок здійснювати дезамінування фенілаланіну. *E. coli* є оксидазо-негативними й каталазопозитивними [32].

1.2.3. Характеристика антигенів та факторів патогенності *E.coli*

Кишкова паличка є умовно-патогенним представником мікрофлори кишечника теплокровних тварин, плазунів, риб і комах. Впродовж перших 40 год життя людини вона з'являється у товстому кишечнику, надалі кількість її зростає до 1% мікроорганізмів біотопу [25]. Проявляє антагоністичний ефект щодо

патогенних кишкових бактерій, гнильних бактерій і *Candida*, а завдяки високій ензиматичній активності синтезує широкий спектр біологічно активних сполук. При потраплянні за межі біотопу та зниженому імунному статусі є причиною виникнення неспецифічних гнійно-запальних захворювань, що розповсюджуються аліментарним, контактно-побутовим шляхом. Накопичення ешерихій у харчових продуктах призводить до харчових токсикоінфекцій.

Характеризується наявністю кількох антигенів [30, 34]:

- О – соматичного (більше 170 варіантів, визначає належність до серогрупи).
- Н – джгутикового (більше 50 варіантів) – білкової природи, термолабільний (визначає належність до серотипу, має важливе епідеміологічне значення),
- К – капсульного (більше 100 варіантів, найінформативніші А, М – істиннокапсульні, В, L - мікрокапсульні, які відрізняються за чутливістю до температури і хімічних речовин). А – найбільш термостабільний, руйнується при 2-годинному кип'ятінні, L – термолабільний, легко руйнується при одногодинному кип'ятінні. Найбільше практичне значення має В-компонент. К-антиген здатен маскувати О-антиген, зумовлюючи феномен О-інаглютинабельності (для виявлення О-антигену термічно руйнують К-антиген).

Для встановлення антигенної формули культури проводять реакції аглютинації – до прикладу, культура характеризується позитивною аглютинацією щодо ОК-сироватки 018:K76 (В6) і Н6 сироватки, тому її антигенна формула позначатиметься як 018:В6:Н6. Встановлено, що ешерихії, які є представниками нормальної мікрофлори та ті, які є збудниками небезпечних захворювань, не відрізняються за культуральними, морфологічними, тинкторіальними і біохімічними властивостями, а лише відмінні за антигенними детермінантами [31].

Для встановлення епідемічної ситуації здійснюють ще й визначення фаговаріанту, окрім серотипу. Можливе ще проведення коліциногенотипування і коліцинотипування, оскільки дані бактерії продукують бактеріоцини (коліцини) [32].

Escherichia coli є збудником інфекційних хвороб – ешерихіозів, що поділяються на 2 типи [34]:

- ентеральні (екзогенні інфекції) – гострі інфекційні хвороби ШКТ, що викликаються патогенними діареєгенними штамами *E. coli*. Джерело інфекції – хворі чи бактеріоносії;
- парентеральні (ендогенні інфекції) – викликаються кишковими умовно-патогенними штамами *E. coli*, вражають будь-який орган (розвивається сепсис, ендометрит, перитоніт, цистит, пієліт, холецистит).

Фактори патогенності діареєгенних *E. coli* заковані у генах хромосом, плазмід і помірних фагів. Тому патогенні варіанти можуть виникнути з непатогенних внаслідок горизонтального перенесення генів. До факторів патогенності відносять [35]:

- ендотоксин (ЛПС), якому притаманна ентеротропна (порушення водно-сольового обміну), нейротропна та пірогенна дія, провокує розвиток ендотоксикозу;
- екзотоксини – ентеротоксини і цитотоксини. Ентеротоксини мають білкову природу, відрізняються чутливістю до температури (LT (термолабільний), ST (термостабільний), кодуються Eнт-плазмідною) і спричиняють порушення водно-сольового обміну, що супроводжується виведенням з клітин йонів натрію, калію, хлору, бікарбонату та розвитку гіперсекреції рідини клітинами кишечника (діареї). Цитотоксини зумовлюють руйнування клітин ендотелію капілярів і стінки кишечника (CDT, Cif, CNF);
- пілі/фімбрії, афібріальні адгезини (наприклад фібрилярний Afa), білки зовнішньої мембрани (наприклад – інтиміни EHEC), ЛПС (через контакт з TLR4), джгутики (через контакт з TLR5), що забезпечують адгезію, колонізацію (CFA/I, CFA/III), розвиток запальної реакції;
- інвазивний фактор, що сприяє проникненню бактерій всередину клітин;
- мікрокапсула, що перешкоджає фагоцитозу.

Патотипи *E. coli* демонструють велику різноманітність механізмів патогенності та профілів факторів вірулентності. Вони залишаються серйозною

проблемою для громадського здоров'я та безпеки харчових продуктів [36]. Відомо 8 типів *E. coli*, що викликають кишкові інфекції. Найдетальніше вивчено 4 з них [37]:

- **Ентеротоксигенні (ентеротоксичні) кишкові палички, ЕТЕС (холероподібні інфекції)** - різноманітні за антигенним складом кишкові палички, що утворюють колонізуючий фактор, термолабільний та термостабільний ентеротоксини. Розрізняють близько 80 серогруп за соматичним О-антигеном (наприклад О6, О8, О43, О78, О128, О153, О159) і більше 30 за джгутиковим Н-антигеном. Вражають дітей перших п'яти років, старшого віку та дорослих. Висока захворюваність спостерігається переважно у країнах, що розвиваються, а у розвинених фіксують спалахи, пов'язані з аліментарним фактором передачі інфекції. Інфікуюча доза 10^6 - 10^9 бактерій.

- **Ентероінвазивні кишкові палички, ЕІКП, ЕІЕС (дизентерієподібні інфекції)** – схожі до штамів шигел. Найчастіше виявляють варіанти О151, О144, О124, О32, О28. Захворіти можуть люди різного віку, особливо часто інфікуються діти віком до 6-ти років. Збудник потрапляє в організм аліментарним шляхом – через споживання інфікованої води або тваринних продуктів (м'яса, непастеризованого молока). Можлива передача інфекції й при контактуванні з хворими. Мінімальна доза інфікування – 10^6 - 10^{10} .

- **Ентерогеморагічні кишкові палички, ЕГКП, ЕНЕС** – можуть викликати геморагічний коліт і гемолітико-уремічний синдром (ГУС). Відносять серотипи О157, О145, О128, О121, О118, О117, О113, О111, О104, О103, О91, О26. Зустрічаються усюди як спорадичні, рідше масові випадки (окрім Антарктики). Інфікуватися можна аліментарним шляхом, вживаючи неправильно термічно оброблену їжу тваринного походження – м'ясо, молоко, а також овочі та фрукти, контаміновані збудником в процесі вирощування чи обробки. Інфікуюча доза найнижча серед інших патогенних *E. coli* – 10-100 [38].

- **Ентеропатогенні кишкові палички, ЕПКП, ЕРЕС (сальмонелоподібні інфекції)** – найпоширеніші збудники кишкових інфекцій у дітей перших двох років життя. Найчастіше збудниками важких кишечних інфекцій є

серотипи O111, O55, O26, O18. Інфікуватися можна, як і в інших випадках (ЕГКП, ЕТКП), споживаючи необроблені термічно продукти рослинного та тваринного походження. Для дітей грудного віку, а також новонароджених домінуючим є контактний шлях передачі інфекції (нерідко для них саме ці бактерії є причиною виникнення нозокоміальних хвороб). Інфікуюча доза складає 10^8 - 10^{10} [35].

- **Ентероагрегативні кишкові палички, ЕАКП, ЕАЕС** - викликають холероподібні захворювання в дорослих і дітей. Характеризуються значною антигенною гетерогенністю і більшість штамів не типується за О-антигеном O166:H15, O92:H33. Захворювання, що спричиняється даними бактеріями є прикладом антропонозної (передавання збудника від хворого чи бактеріоносія) та зоонозної інфекції (джерело інфекції – хворі тварини – свині, коні, корови). Фактор передачі – необроблена вода й продукти харчування.
- **Ентероагрегативні кишкові палички, здатні продукувати токсин Шига (STEАЕС) – збудник O104:H4.**
- **Дифузно-адгерентні кишкові палички, ДАКП, DAЕС** найчастіше викликають захворювання у дітей.
- **Адгерентні інвазивні кишкові палички, АІКП, АІЕС** – ці бактерії, після адгезії та пенетрації епітеліоцитів, проникають у товщу стінки кишечника. Можуть тривалий час колонізувати клітини людини та виживати, обумовлюючи хронічний запальний процес, що супроводжується грануломатозними змінами [39].

1.3. Причини та методи корекції дисбіотичних станів

Дисбіоз (в англomовній літературі користуються терміном *intestinal bacterial overgrowth*) гостре або хронічне порушення нормальної мікрофлори кишечника. Співвідношення кількості різних мікроорганізмів досить постійне, але внаслідок ослаблення імунітету, нераціональної терапії антибіотиками, променевої і хіміотерапії, вроджених дефектів ферментів баланс порушується. Спостерігається зменшення кількості або відсутність деяких представників

нормальної мікрофлори (біфідобактерії, молочнокислі бактерії) і з'являються представники патогенних родів (нетипові ешерихії, кандиди, стафілококи, протей, синьогнійна паличка). Виникає клінічний синдром, для якого характерні пронос, стеаторея, зниження ваги і анемія. При різкому ослабленні захисних сил, імунітету може розвинутилася генералізована форма ендогенної інфекції аж до сепсису. Дисбіоз у мікробіомі асоціюється з численними захворюваннями, включаючи запальні захворювання кишечника, розсіяний склероз, діабет (типи 1 і 2), алергію, астму, аутизм і рак [32].

Існує кілька класифікацій дисбіотичних станів. Одна з них передбачає 4 стадії дисбактеріозу: I стадія – зміна кількості ешерихій і незначне зменшення кількості біфідо- і лактобактерій (на 1-2 порядки); II стадія – зростання кількості умовно-патогенної флори на фоні зниження на 3-4 порядки біфідо- і лактобактерій; III стадія – зниження біфідо- і лактобактерій до 10^5 – 10^6 й переважання аеробної мікрофлори; для IV стадії характерна повна відсутність біфідобактерій, значне зниження лактобактерій і типових ешерихій, глибокі зміни кількісного співвідношення облигатних і факультативних мікроорганізмів. При компенсованій формі дисбактеріозу (I стадія) відсутня виражена реакція макроорганізму на зміни мікробіоценозу, при субкомпенсованій (II стадія) – з'являються прояви локального запального процесу, при некомпенсованій формі (III стадія) запальний процес поширюється на всі відділи травного тракту на фоні різкого зниження резистентності організму. При хронічному запальному процесі (IV стадія) в кишечнику накопичується велика кількість продуктів різного походження, що мають мутагенну дію, продукти метаболізму та токсини, які продукуються умовно-патогенними мікроорганізмами та знижують детоксикаційну здатність печінки, посилюють симптоми інтоксикації, пригнічують регенерацію слизової оболонки кишки, гальмують перистальтику, пролонгують диспептичний синдром [24].

Домінування в кишечнику гнильних і патогенних бактерій призводить до зростання вмісту аміаку, амінів, нітросоамінів, фенолів, крезолу, індолу, вторинних жовчних кислот, окремі з яких є канцерогенами. З іншого боку

бактеріальні ензими (α - і β - глюкозидази, β - глюкуронідази, 7- α -дегідроксилази, 7- α -стероїддегідрогенази, нітроредуктази, азоредуктази) нетипових представників (ешерихії, бактероїди, клостридії, гемофільні бактерії) активують реакції перетворення багатьох непрямих канцерогенів в прямі канцерогени, в той час як представники нормальної аутохтонної мікрофлори здійснюють їх інактивацію [17].

Одним із шляхів корекції дисбіотичних станів є застосування пробіотиків. Згідно з означенням, запропонованим ВООЗ, пробіотики – це живі мікроорганізми, які при введенні в адекватних кількостях виявляють корисний вплив на організм. Позитивна роль продемонстрована для штамів родів *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Saccharomyces*, *Enterococcus*, *Bacillus*. Важливо підкреслити, що біологічні ефекти пробіотиків визначаються саме штамом і користь/шкоду одного штаму виду не можна екстраполювати на інший штам. Для ідентифікації пробіотичного штаму використовують цілий арсенал методів, зокрема генетичні (аналіз послідовності 16S рРНК), молекулярні, біохімічні (ферментація цукрів та виявлення кінцевих продуктів бродіння) [18]. До того ж, сприятливий ефект пробіотиків може бути продемонстрований лише дослідженнями *in vivo*, а дослідження *in vitro* або використання модельних організмів можуть бути застосовані для характеристики можливого механізму дії та визначення безпеки пробіотичних мікроорганізмів.

До найважливіших властивостей пробіотиків відносять наступні: безпека застосування, стійкість до природних інгібіторів та антибіотиків (шлункового соку, жовчних кислот), високий адгезивний й антагоністичний потенціал щодо патогенів та умовно-патогенних мікроорганізмів, швидка реактивація біомаси у біотопах, стимулююча дія на розвиток індигенної мікрофлори.

Для профілактики та корекції дисбіотичних станів часто використовують моно чи полікомпонентні пробіотичні препарати, створені на основі *Lactobacillus* та *Bifidobacterium*. Відомо, що в організмі людини зустрічаються *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. plantarum*, *L. fermentum*, *L. brevis* і *L. salivarius*, наявність яких у ШКТ, зазвичай, пов'язана з транслокацією з ротової порожнини чи

ферментованих продуктів. Як пробіотичні засоби апробовані *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. paracasei*, *L. rhamnosus*, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L. brevis*, *L. johnsonii*, *L. plantarum* і *L. fermentum*. Окрім вищезазначених позитивних властивостей з лактобацилами пов'язують зниження вмісту холестеролу, зменшення вірусно-асоційованого пошкодження легень шляхом контролю імунокоагуляційних відповідей, запобігання рецидивним інфекціям сечовивідних шляхів [10].

Уже на ранніх етапах постембріонального розвитку значну роль у встановленні еубіозу відіграють біфідобактерії. В організмі людини, серед відомих понад 30 видів, зустрічаються 5 – *B. bifidum*, *B. longum*, *B. adolescentis*, *B. infantis* та *B. breve* [17]. Декілька пробіотичних штамів мікроорганізмів ефективні щодо збудників діареї зокрема *Escherichia coli* (7 типів), *Campylobacter jejuni* та *Shigella*.

Найбільш часто використовуваними пробіотичними мікроорганізмами проти цих збудників є: *Lactobacillus acidophilus*, *L. rhamnosus* GG, *Saccharomyces boulardii*, *Bifidobacterium bifidum* і *Bacillus coagulans*. *Bifidobacterium lactis* DN-173 010 і *Lactobacillus casei rhamnosus* Lcr35 безпечні для дітей та вагітних, не впливають на частоту кесаревого розтину, вагу при народженні чи гестаційний вік, не викликають вад розвитку. *S. boulardii* часто застосовується як пробіотик у ліофілізованій формі для лікування діареї, запальних захворювань кишечника та виразкового коліту, проте може викликати фунгемію або локалізовані інфекції в людей з ослабленим імунітетом [11].

Серед ешерихій є один штам, що характеризується пробіотичними властивостями – *Escherichia coli* Nissle 1917 (EcN). Застосовують його для полегшення протікання шлунково-кишкових розладів, виразкового коліту, хвороби Крона, раку товстої кишки [29].

2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Дослідження проводили на базі центральної лабораторії Львівської обласної клінічної лікарні (дитяче відділення). Для діагностики ешерихіозів, що спричиняються екзогенними патогенними діареєгенними *E. coli* застосовували мікробіологічні (бактеріоскопічний, бактеріологічний), серологічний та біохімічні методи з чітким дотриманням відповідних інструкцій [33].

Аналізували біоматеріал (випорожнення, блювотні маси), отриманий з організму дітей віком кілька днів – 6 років, які були направлені у лікарняний заклад.

Відбір фекалій проводять негайно після випорожнення. При цьому і посуд, і інструменти (палички) потребують ретельної дезінфекції. При наявності домішок (гною, слизу, пластівців) пробу також використовують. Інокуляцію біоматеріалу необхідно здійснювати не пізніше ніж через 2 год від часу отримання проби. Попередньо біоматеріал розводять у співвідношенні 1:5 або 1:10 ізотонічним розчином хлориду натрію, надалі проводять відстоювання впродовж години. Біологічний матеріал розшаровується: великі фрагменти осідають, а менші, що містять факультно-анаеробних представників родини *Enterobacteriaceae* зосереджуються на поверхні. Посів здійснюють бактеріологічною петлею, піпеткою чи голкою (залежно від типу середовища), наносячи кілька крапель бактеріальної суспензії на підсушену поверхню твердих поживних середовищ (позбавлених конденсату) [40].

У стерильний посуд збирають й блювотні маси, надалі їх також розводять розчином хлориду натрію.

Виділення чистої культури збудника та її ідентифікацію здійснюють у кілька етапів [41].

1. Досліджуваний матеріал засівають на/в елективні та диференційно-діагностичні середовища, що дозволяють виокремити *E. coli* від інших ентеробактерій.

Мікроорганізми культивують у термостаті за температури 37 °C 18–24 год.

При цьому використовують наступні поживні середовища:

- Ендо (виробник «Дослідне підприємство бактеріальних заквасок ТІММ УАНН»), компонентний склад якого представлений (г/л) – лактоза – 10, фуксин лужний – 0.5, гідрофосфат калію – 3.5, сульфід натрію – 2.5, пептичний перевар тканин тварин – 15, агар – 15;
- ЕМС або середовище Левіна, що містить (г/л) – лактоза – 10, пептон – 10, метиленовий синій – 0.06, еозин Y – 0.4, гідрофосфат калію – 1, хлорид натрію – 1, агар – 10;
- Плоскірева (виробник «Дослідне підприємство бактеріальних заквасок ТІММ УАНН»), компонентний склад якого представлений (г/л) – лактоза – 7.3, панкреатичний гідролізат кілки – 10.4, натрієві солі жовчних кислот – 3.46, сухий поживний бульйон – 8.6, гідроцитрат натрію – 8.5, нейтральний червоний – 0.05, діамантовий зелений – 0.002, сода кальцинова – 2.4, гідрофосфат натрію – 2.1, сульфід натрію – 5.1, йод – 0.13, агар – 6.97;
- вісмут-сульфід агар наступного складу (г/л) – глюкоза – 5, пептон – 17, цитрат вісмуту – 2, дріжджовий екстракт – 1, діамантовий зелений – 0.025, сіль Мора – 1, фосфат натрію – 4, сульфід натрію – 5, агар – 15;
- селенітовий бульйон або середовище Лейфсона, що містить (г/л) – пептон – 5, маніт – 4, гідрофосфат натрію – 7.5, дигідрофосфат натрію – 7.5, селеніт натрію – 4;
- жовчний бульйон, що містить жовч, кристалічний фіолетовий, пептон, дріжджовий екстракт і лактозу.

На чашки Петрі посів проводять бактеріологічною петлею. Його слід здійснювати на 2-3 чашки Петрі, щоразу набираючи біологічний матеріал. Інкубація триває 18-24 год за температури 37 °С – **1 день**.

2. Характеристика колоній. На середовищі Ендо патогени формують колонії S-форми малинового кольору з характерним металічним блиском чи без нього внаслідок розщеплення лактози з наступною зміною рН середовища та наявності фуксину. На середовищі Левіна спостерігають колонії синього кольору за наявності метиленового синього. Непатогенні *E. coli* на середовищі

Плоскірева утворюють колонії рожевого кольору, умовно-патогенні – кремові. Через 48 год на вісмут-сульфіт агарі виявляють колонії зеленуватого кольору.

Здійснюють визначення тинкторіальних властивостей мікроорганізмів (забарвлення за Грамом). *E. coli* – не забарвлюється за Грамом, у мазках виявляють паличкоподібні бактерії рожевого кольору.

Вважаючи на мікроскопічний аналіз, надалі здійснюють відбір 10 ідентичних колоній. Саме з ними проводять реакцію аглютинації з ОК-полівалентною сироваткою на склі. У випадку констатації позитивної реакції аглютинації в 5 та більше колоній – продовжують дослідження. Негативний результат фіксують, якщо кількість позитивних реакцій аглютинації буде меншою за 5.

Пересівають колонії на скошений МПА, виділяють чисту культуру мікроорганізмів. Інкують у термостаті за температури 37 °C 18–24 год – **2 день**.

Здійснюють ще раз мікроскопічний аналіз за Грамом для підтвердження чистоти культури зі скошеного МПА. У разі підтвердження наявності паличкоподібних грамнегативних бактерій проводять подальшу ідентифікацію культури мікроорганізмів.

3. Здійснюють проведення біохімічних тестів, що вказують на здатність культур ферментувати вуглеводи, органічні кислоти та спирти, утворювати індол, сірководень та інші гази, наявність желатинази, уреаз, фенілаланіндезамінази, лізиндекарбоксилази, аргініндегідролази.

Проводять посів мікроорганізмів на диференційно-діагностичні середовища для визначення цукролітичної та протеолітичної активності – **3 день**:
- Гісса, що обов'язково містить (г/л) пептон – 3.7, хлорид натрію – 3, гідрофосфат натрію – 0.5, бромкрезоловий пурпурний – 0.02, агар – 2.5 та відповідні вуглеводи (спирти) – 3.7 – ксилозу, лактозу, глюкозу, маніт, сахарозу, мальтозу, інозит, рамнозу, сорбіт та ін.;
- МПБ,

- Сіммонса (виробник Державний експериментальний завод медпрепаратів ІБОНХ НАНУ, м.Київ), що включає (г/л) цитрат натрію як єдине джерело карбону – 2.5, хлорид натрію – 5, дигідрофосфат калію – 1.5, фосфат амонію – 0.7, сульфат магнію – 0.2, бромтимоловий синій – 0,08, агар – 10;
- Олькеницького (виробник ТОВ «Фармактив»), що є залізовмісним агаром наступного складу (г/л): пептон – 5, м'ясний екстракт – 3, дріжджовий екстракт – 3, хлорид натрію – 5, лактоза – 10, сахароза – 10, глюкоза – 1, залізо-аміачний цитрат – 0.5, феноловий червоний – 0,08, агар – 12.

3. Проводять орієнтовну реакцію аглютинації. Серологічну ідентифікацію здійснювали, використовуючи діагностичні ешерихіозні ОК полівалентні сироватки (виробник АООТ «Біомед» ім. І.І. Мечнікова) та дотримуючись інструкції. Використовували полівалентні сироватки ОКА, сироватки вужчого спектру дії ОКВ, ОКС, ОКД, ОКЕ, а також діагностичні імуноглобуліни, які входять до складу полівалентної сироватки.

Отримані результати підтверджували адсорбованими груповими О-сироватками в реакції на склі з культурою ешерихій, прогрітою протягом 1 години при 100°C для інактивації К-антигену.

Аглютинація з живою культурою має орієнтовне значення, тому здійснюють розгорнуту реакцію аглютинації з нагрітою та живою культурою (наявність живої культури необхідна для ідентифікації К-антигену, оскільки йому притаманні інгібування О-аглютинабельності та термолабільність, а нагрітої – для визначення О-антигену). Для цього у скошений агар наливають 3–5 мл стерильного фізрозчину, змивають культуру, надалі змив поділяють на 2 частини, одну з яких підігрівують на водяній бані впродовж 40 хв.

Проводять розгорнуту реакцію аглютинації у двох рядах пробірок. При цьому сироватку розводять у співвідношенні 1:50–1:100. У всі пробірки, крім контрольної сироватки, вноситься по 2 краплі антигену. Спостерігають помутніння дослідних проб, а контрольні проби залишаються прозорими. Після ретельного струшування пробірки інкубують у термостаті впродовж 2 год за 37 °С, а надалі витримують при кімнатній температурі до 20 год. По закінченню

відзначеного часу аналізують пробірки, проглядаючи неозброєним оком або за допомогою лупи. При позитивному результаті виявляють осадження аглютинату як «парасольки», а рідина над осадом прояснюється. Для вивчення величини і характеру осаду вміст пробірок трохи струшують. Розрізняють дрібнозернисту (О-аглютинація при роботі з О-сироватками) і пластівчасту (Н-аглютинація при роботі з Н-сироватками) аглютинацію – **3 день**.

4. Аналіз результатів. Беруть до уваги розщеплення вуглеводів *E. coli* до кислоти і газу (за винятком сахарози) у середовищі Гісса, а у розгорнутій реакції аглютинації титр нагрітої культури повинен бути вище за титр живої (до прикладу, титр живої культури 1:400, нагрітої – 1:1600). За розвитку загальної позитивної реакції здійснюють реакції аглютинації імуноглобулінами, що входять до складу полівалентної сироватки для визначення серовару *E. coli* – **4 день**.

При аналізі результатів враховували вік дитини, тип пологів та годування.

Дані опрацьовували статистично з використанням методів дескриптивної статистики (вираховування стандартних відхилень для відносних частот, стандартної похибки).

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Як свідчать дані ВООЗ, в етіологічній структурі кишкових інфекцій перших 5 років життя ешерихії складають 7-15%, що спричиняє високу летальність (понад 200000 дітей гине щороку) [37].

Нами проводилося дослідження біоматеріалу, отриманого у дітей віком від кількох днів до 6 років. За період лабораторних спостережень нами безпосередньо проведена діагностика біоматеріалу 20 дітей, загалом проаналізовано дані 120 хворих дітей.

На першому етапі лабораторної діагностики з метою виявлення збудників гострих колієнтеритів у дітей здійснювали посів біоматеріалу на елективні поживні середовища для виокремлення *E. coli*: Ендо, Плоскірева, Левіна (рН 7,2–7,8). Усі вони містять лактозу, яку здатні розщеплювати *Escherichia*, але не здатні перетворювати *Salmonella*, *Shigella*, *Proteus*. Слід відзначити, що впродовж усього досліджуваного періоду нами не виявлено представників інших, окрім *Escherichia*, ентеропатогенних родів.

Через 18-24 год культивування за температури 37 °С відбирали колонії мікроорганізмів S-форми, що викликали зміни забарвлення індикаторів, наявних у конкретних елективних середовищах і за своїми морфолого-культуральними особливостями характеризували рід *Escherichia*. Зокрема – із середовища Ендо виокремлювали колонії, що забарвлювалися у малиновий колір часто з характерним металічним блиском; із середовища Левіна – колонії темно-фіолетового кольору часто з металічним блиском; на середовищі Плоскірева – колонії кремово-жовті (рис. 3.1.).

Бактерії відзначених колоній забарвлювали за Грамом з метою визначення тинкторіальних властивостей (рис. 3.2). На мікропрепаратах, при використанні імерсійної системи збільшення, фіксували наявність коротких, з округлими кінцями паличок, забарвлених у рожевий колір.

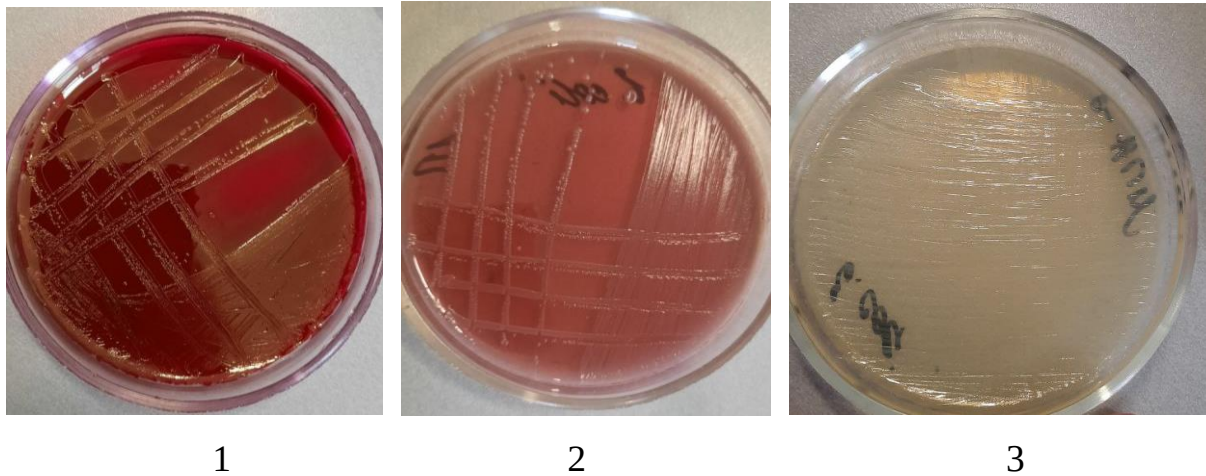


Рис. 3.1. Культуральні властивості *E. coli* (1 – середовище Ендо, 2 – середовище Плоскірева, 3 – МПА)

Цього ж дня проводили попередню реакцію аглютинації на склі з матеріалом окремих колоній та сумішами ОК-сироваток. При наявності позитивного результату – продовжували дослідження.

Другий етап ідентифікації патогенних кишечних паличок передбачав виділення чистої культури збудника. Для цього використовували поживне середовище загального типу – МПА. Опісля 18-24 годинного культивування за температури 37 °C підтверджували чистоту виділеної культури, здійснюючи повторне забарвлення за Грамом та біохімічну ідентифікацію. На МПА кишечна паличка формує блискучі, вологі, середнього розміру, випуклі, круглі з рівним краєм колонії сіруватого кольору S-форми або плоскі, з хвилястим краєм R-форми (рис. 3.1).

Визначення біохімічних властивостей культури проводили на третьому етапі спостережень, використовуючи різноманітні рідкі та тверді (щільні) диференційно-діагностичні середовища, що дозволяють констатувати цукролітичну, протеолітичну та інші активності виділеної культури (рис. 3.3). Зокрема, можливість утилізації вуглеводів та спиртів вивчали на середовищі Гісса, що містить бромкрезоловий пурпурний, який при розщепленні одного конкретного вуглеводу (спирту) і виділенні кислоти, змінює забарвлення з фіолетового на жовтий, що свідчить про здатність бактерій зброджувати даний вуглевод (спирт).



Рис. 3.2. Тинкторіальні (зabarвлення за Грамом) та біохімічні властивості *E. coli* (ріст чистої культури у середовищах Сіммонса (неможливість утилізації цитрату) та Олькеницького (здатність розщеплювати глюкозу із виділенням газу))

Виділені бактерії, що були представниками виду *E. coli* здатні розщеплювати лактозу, перетворювати глюкозу з утворення кислоти та газу, утилізувати гліцерол, маніт, ацетат, їм притаманна β -галактозидазна активність. Вони володіли варіабельною рухливістю (викликали помутніння окремих ділянок агару біля місця інокуляції) та лізизиндекарбоксилюючою активністю, здатністю утворювати індол. Дані бактерії не здатні утилізувати цитрат, сечовину, адоніт, інозит, їм не властива фенілаланіндезаміназна та колагеназна активності. Неоднозначні дані виявлені при внесенні у середовища арабінози, дульциту, ксилози, мальтози, рамнози, рафінози, сахарози, сорбіту.

Нами відзначено, що кількісний вміст *E. coli* у біоматеріалі усіх хворих дітей суттєво відрізнявся від нормофізіологічних значень, характерних для даного віку, що свідчить про розвиток дисбіозу зі збільшенням частки факультативно-анаеробного складової кишкової мікрофлори.

Відомо, що грамнегативна факультативно-анаеробна бактеріальна флора, основним представником якої є *E. coli* (1% загальної бактеріальної біомаси кишечника) займає провідне місце в порожнинній мікрофлорі кишечника. У нормі, кількість *E. coli* у фекаліях варіює в межах 10^5 – 10^8 КУО/г, а співвідношення з представниками анаеробної мікрофлори складає 1:100–1000

[37]. Фізіологічне значення ешерихій полягає у забезпеченні колонізаційної резистентності через активацію імунної системи, участю у процесах травлення за рахунок морфокінетичної дії, метаболічних реакціях макроорганізму, пов'язаних з обмінними процесами (обмін холестерину, білірубину, холіну, жовчевих і жирних кислот, всмоктування заліза і кальцію) і синтезі вітамінів (тіамін, рибофлавін, нікотинова та пантотенова кислоти, піридоксин, біотин, фолієва кислота, ціанокобаламін і вітамін К), здійсненні процесів детоксикації, вилученні з просвіту кишки кисню, що є шкідливим для біфідо- і лактобактерій [28, 32].

У новонароджених констатують кілька чинників, що спричиняють порушення нормо-фізіологічних функцій мікрофлори кишечника: хвороби матері (бактеріальний вагіноз і мастит), низька оцінка за шкалою Апгар, наявність реанімаційних заходів у новонародженого, пізнє прикладання до грудей, тривале перебування в пологовому будинку; фізіологічна незрілість моторної функції кишечника, наявність малих гнійних інфекцій, непереносимість грудного молока, синдром мальабсорбції, первинний імунодефіцит.

У дітей грудного та раннього віку чинниками порушення якісного-кількісного складу мікрофлори є: несприятливий перебіг періоду новонародженості (в анамнезі), раннє штучне вигодовування, диспептичні порушення, часті гострі респіраторно-вірусні інфекції, рахіт, анемії, гіпотрофії, зміни в психоневрологічному статусі дитини, алергічний дерматит [5, 11, 12].

Проникаючи в інші органи, навіть нешкідливі кишкові палички можуть викликати запальний процес, зокрема органів сечостатевої та респіраторної систем. Патогенні різновиди кишкової палички здатні викликати гострі кишкові захворювання. Найпоширеніший механізм зараження – фекально-оральний через недотримання елементарних гігієнічних правил [32].

Після зараження патогенні кишкові палички починають активно розмножуватися, приводячи до порушення травлення і до запалення слизових оболонок кишечника. Внаслідок цього спостерігається основний симптом

зараження – діарея (з домішками слизу і крові) та інші ознаки: нудота, блювота, підвищення температури тіла, загальна слабкість, відсутність апетиту, біль у животі.

Найбільш небезпечним наслідком отруєння кишковою паличкою, що супроводжується частим проносом і блювотою, є втрата організмом рідини і солей. Дитячий організм має більш низьку опірність до інфекційних збудників.

Основні ознаки, що відрізняють патогенних представників родини *Enterobacteriaceae* представлені у таблиці 1.

Таблиця 1

Диференційно-діагностичні ознаки бактерій родини *Enterobacteriaceae*

Ознака	<i>Escherichia</i>	<i>Shigella</i>	<i>Salmonella</i>
Ферментація глюкози з утворенням газу	+	-	+
Ферментація лактози	+	-	-
Ферментація сахарози	+/-	-	-
Ферментація маніта	+	+/-	+
β -галактозидазна активність	+	+/-	+/-
Уреазна активність	-	-	-
Утилізація цитрату	-	-	+
Декарбоксилювання лізину	+/-	-	+
Дезамінування фенілаланіну	-	-	-
Утворення сірководню	-	-	+
Утворення індолу	+	+/-	-
Рухливість	+	-	+

Оскільки за морфолого-культуральними, фізіолого-біохімічними характеристиками непатогенні та патогенні кишкові палички не відрізняються, пошук патогенних форм проводився на тлі значного росту непатогенних *E. coli*, що викликало певні труднощі.

На наступному етапі досліджень застосовували серологічні методи та визначали належність виділених *E. coli* до відповідної серогрупи (врахування специфічності О-антигену й К-антигену), а також серотипу (із врахуванням ще й Н-антигену).

Ліпополісахариди, що містяться у зовнішній мембрані клітинної стінки усіх грамнегативних бактерій, містять варіабельну кількість олігосахаридів (кожен складається з 2-7 звичайних, рідкісних чи похідних моносахаридів), що ідентифікується як антигени О. Вони є не лише важливими факторами вірулентності, мішенями дії факторів вродженого та адаптованого імунного захисту, а й відіграють значну роль у взаємодії хазяїн-патоген та важливі для класифікації штамів *E. coli*, епідеміологічних досліджень, відстеження джерел спалахів шлунково-кишкових інфекцій. Деякі антигени О містять підгрупи, такі як О9 і О9а в антигені О9 О, О18ab і О18ac в антигені О18 О, О28ab і О28ac в антигені О28 О та О112ab і О112ac в антигені О112 О [41].

К-антигени відмінні за молекулярною масою, гідродинамічними властивостями, хімічним складом (можуть містити глюкуронову, галактуронову N-ацетилнейрамінову, 2-кето-3-деоксиманооктанінову кислоти, повторювані три- чи гексасахаридні одиниці).

Слід відзначити, що орієнтовну реакцію аглютинації проводять на склі з відповідними сумішами чи типоспецифічними ОК-сироватками, розгорнуту реакцію аглютинації – у пробірках до титра/половини титра К-антитіл (з живими бактеріями) і О-антитіл (нагріта культура). Серологічне типування по Н-антигену культури (з гліцеринового агару) здійснюють в тесті на склі спочатку з полівалентними, а далі з моновалентними Н-сироватками [30, 42].

Результати проведеного аналізу вказують наступне:

- Причиною 72 % недомогань у дітей було порушення якісно-кількісного складу мікрофлори ШКТ (дисбіоз), а 28% (стандартне відхилення для відносних частот складає 0,45, стандартна похибка – 0,04) важких колієнтеритів у новонароджених та дітей раннього віку спричинені діареєгенними *E. coli* (рис. 3.3).
- Причиною більшості виявлених випадків гострих ентероколітів у дітей віком 2-6 років були ентерогеморагічні *E. coli*. Серед цієї ж вікової категорії відзначена велика кількість випадків інфекційної хвороби, спричиненої ентероінвазивними *E. coli* – 8. Відзначені випадки інфікування дітей віком до

6 років відповідно складала 6,7% (ентероінвазивні *E. coli*) та 12,5 % (ентерогеморагічні *E. coli*) усіх проаналізованих випадків або 24% (стандартне відхилення для відносних частот складає 0,43, стандартна похибка – 0,07) та 44% (стандартне відхилення для відносних частот складає 0,5, стандартна похибка – 0,08) щодо кількості зафіксованих патотипів *E. coli* (рис. 3.4);

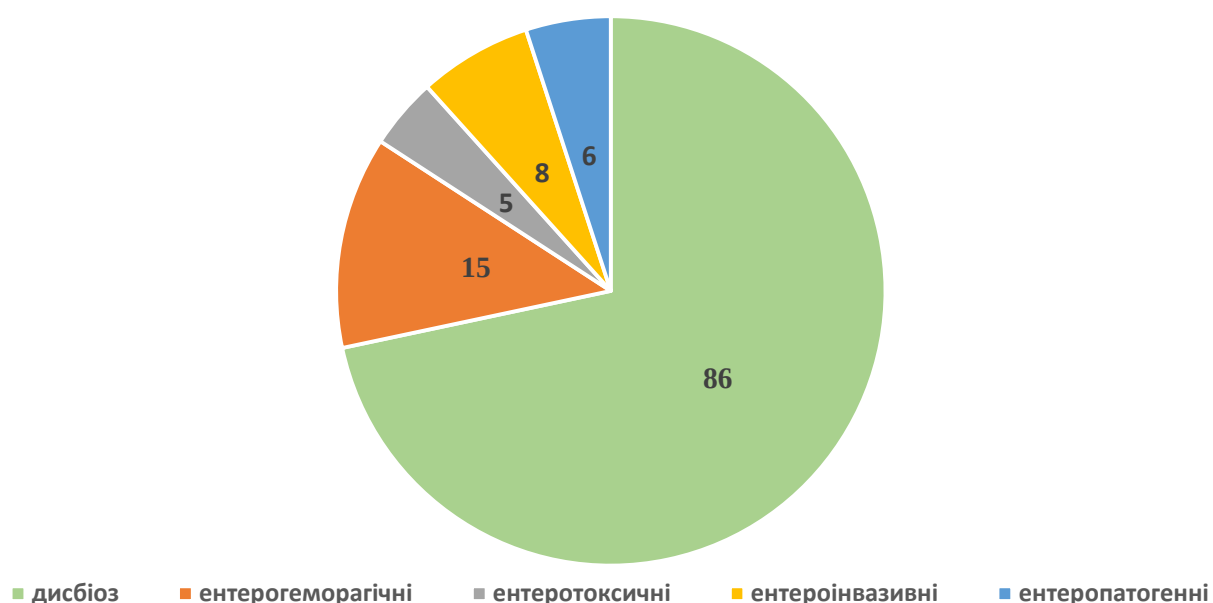


Рис. 3.3. Абсолютна кількість колієнтеритів, спричинених діареєгенними *E. coli* у дітей раннього віку

- Діареєгенні патогенні *E. coli* стали причиною розвитку важких ентероколітів у новонароджених (до 28 днів життя) та немовлят віком до 24 місяців (ентеропатогенні – 6 хворих дітей, ентеротоксичні – 2 хворих дітей).
- Причиною виникнення гострих ешерихіозів у дітей перших років життя найчастіше є діареєгенні ентеропатогенні кишкові палички – 5% проаналізованих випадків (3 новонароджених та 3 немовлят) або 17% (стандартне відхилення для відносних частот складає 0,38, стандартна похибка – 0,06) щодо наявних патотипів (рис. 3.3, 3.4);

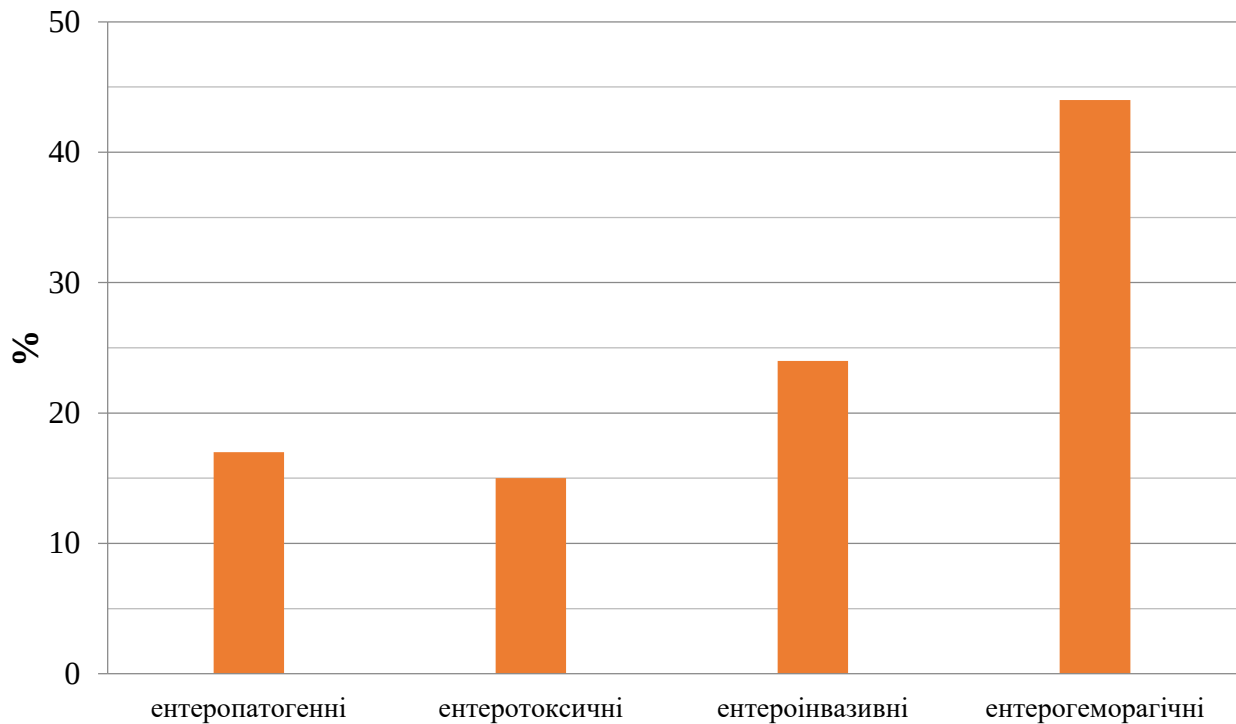


Рис. 3.4. Відносна частота виявлення діареегенних патотипів *E. coli* у дітей раннього віку

- збудниками гострих ентероколітів новонароджених виступали ентеропатогенні *E. coli* серогруп O18ab (рис. 3.5). У дітей до 2-х років у рівній мірі виявляли *E. coli* серогруп O119, O20, O55. Для усіх зазначених серогруп характерні ряд спільних особливостей: варіабельна здатність до зброджування арабінози (за винятком O18, для цих бактерій вона конститутивна), адоніту, дульциту, інозиту, маніту (за винятком O18 та O20, для цих бактерій вона конститутивна), ксилози, мальтози, рамнози (за винятком O18, для цих бактерій вона конститутивна), саліцину, сахарози, сорбіту;
- ентеротоксичні *E. coli* як збудники гострих кишкових інфекцій зафіксовані у 2 немовлят та 3 дітей, віком 4 роки, всього – 4% проаналізованих випадків або 15% випадків виявлених патотипів (стандартне відхилення для відносних частот складає 0,36, стандартна похибка – 0,06)).

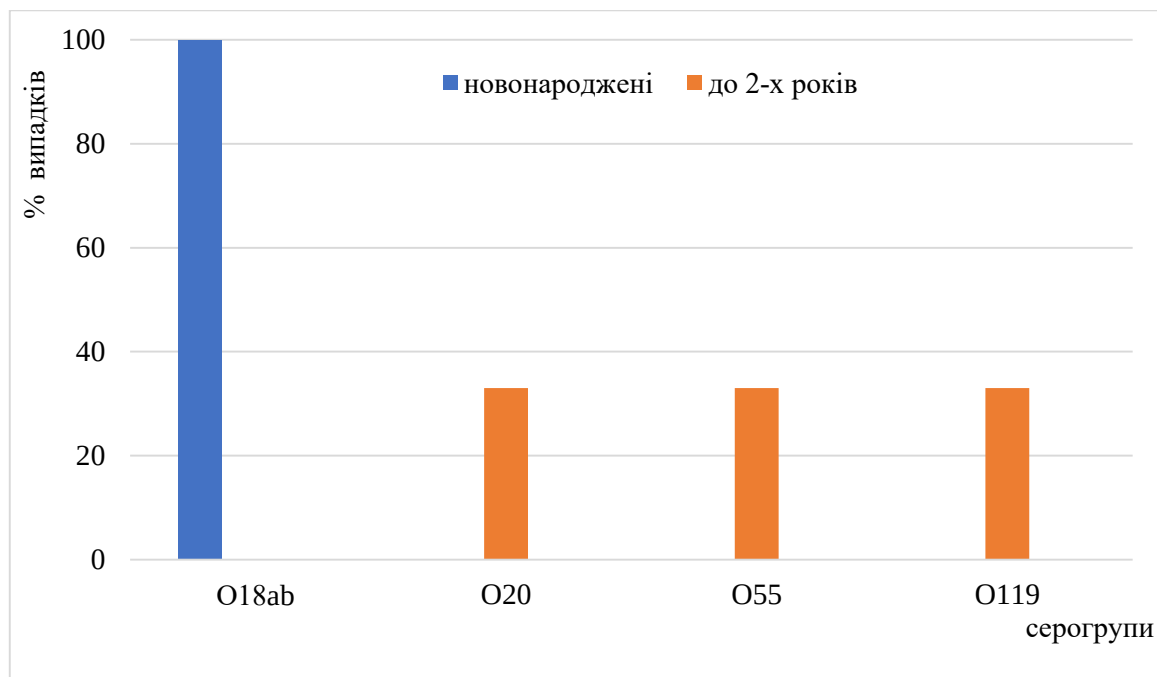


Рис. 3.5. Відносна частота виявлення ентеропатогенних *E. coli* у немовлят

- Ентеротоксичні *E. coli*, що спричили хворобу обох немовлят, належали до серотипів O6:H16, а дітей дошкільного віку – O6:H16, O8:H9, O78:H11 (рис. 3.6). Для цих патотипів характерно перетворення арабінози, ксилози, глюкози, мальтози, маніту, рамнози, саліцину та рухливість.

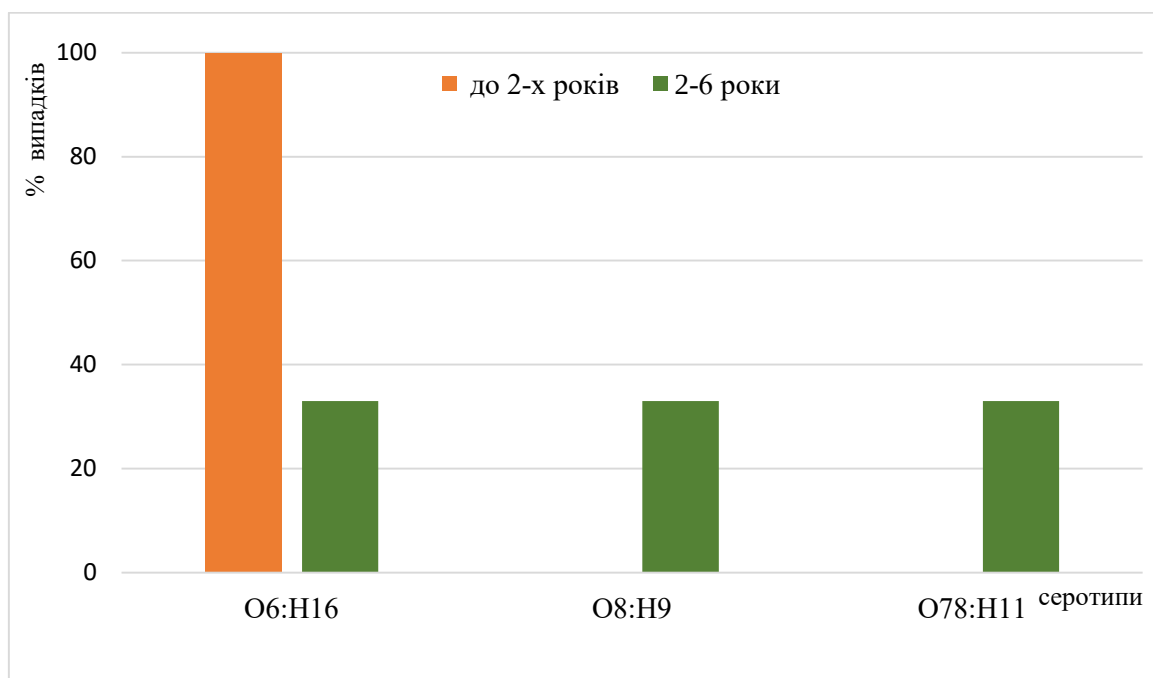


Рис. 3.6. Відносна частота виявлення ентеротоксичних *E. coli* у дітей раннього віку

- у 6 виявлених випадків інфікування ентероінвазивними кишковими паличками у дітей дошкільного віку причиною були *E. coli*, що належали до серогрупи O25, а у 2 – O124 (рис. 3.7). Дані патотипи володіли широкою цукролітичною активністю, проте проявляли варіабельність щодо рухливості;

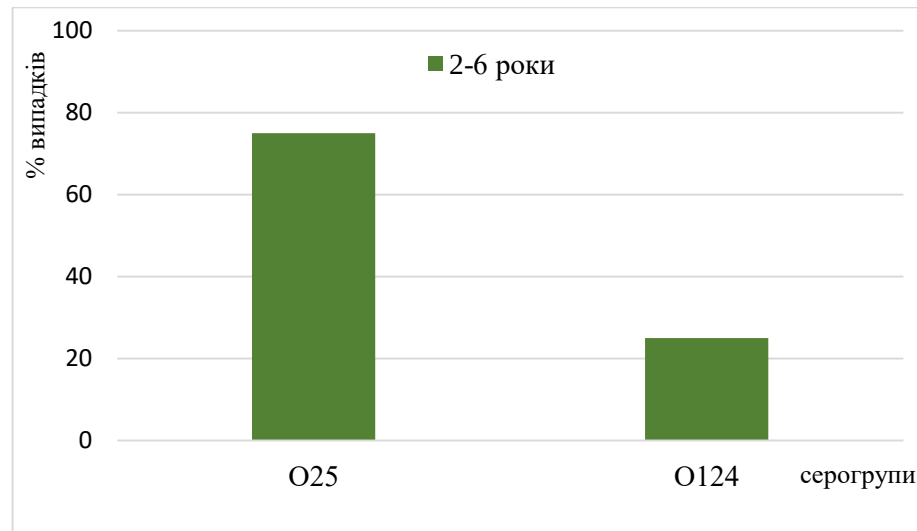


Рис. 3.7. Відносна частота виявлення ентероінвазивних *E. coli* у дітей раннього віку

- Серед 15 виявлених випадків геморагічного ентероколіту у дітей віком до 6 років домінуючою причиною були *E. coli*, що належали до серогрупи O111ab, меншою мірою фіксували наявність O126 (рис. 3.8). Для даних патотипів встановлена варіабельність щодо перетворення адоніту, дульциту, рамнози, сахарози;
- у немовлят, які перебували на штучному годуванні та дітей, народжених шляхом кесаревого розтину, загалом, вищий відсоток інфікування патогенними *E. coli*, ніж у дітей народжених природним шляхом та перебувалих на природному годуванні. Зокрема, 3 новонароджених, інфікованих O18ab, народилися шляхом кесаревого розтину, а решта немовлят рано перешли на годування штучними сумішами.

Відомо, що ЕПКП колонізують тонкий відділ кишечника. Основні гени ЕПКП, що кодують фактори вірулентності, розташовані на хромосомному острові патогенності (PAI) розміром 35,62 кб в межах 41 відкритої рамки

зчитування (ORF) та плазмідному PAI (локус видалення ентероцитів (LEE) і фактор адгезії EAF). Інший PAI ЕПКП називається EspC, що кодує однойменний ген ентеротоксину. Це єдиний токсин, який вивільняється ЕПКП і може призвести до некрозу епітеліальних клітин [43].

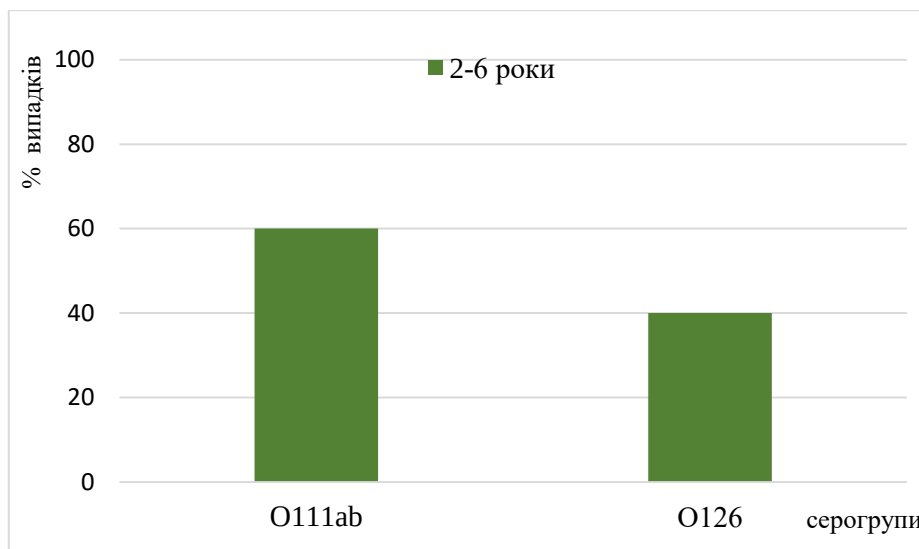


Рис. 3.8. Відносна частота виявлення ентерогеморагічних *E. coli* у дітей раннього віку

Основним фактором, що відповідає за адгезію ЕПКП є BFP, представник родини фімбрій типу IV, який кодується плазмідною EAF.

Патогістологічною ознакою інфекції є утворення кишкових уражень, спричинених здатністю бактеріальних клітин тісно прикріплюватися до клітинної мембрани, руйнувати мікрроворсинки та індукувати утворення чашоподібних п'єдесталів, що складаються з цитоскелетних білків (полімеризованого актину). Ця здатність, відома як «прикріплення/стирання», спостерігається *in vitro* та в дуоденальних і ректальних біоптатах немовлят з ЕПКП-інфекцією за дії локусу видалення ентероцитів (LEE). Гени LEE PAI кодують білок зовнішньої мембрани інтимін, систему секреції III типу (наприклад, Tir, що є транслокованим рецептором інтиміну). При цьому адгезія бактерій супроводжується не лише пошкодженням мікрроворсинок ентероцитів на місці їх прикріплення з утворенням виразок, запалення, а й посиленням

активності протеїнкінази C, фосфоліпази C_γ, кінази легкого ланцюга міозину, мітоген-активованої протеїнкінази.

Дані бактерії не здійснюють інвазію. Патогени фагоцитуються в Пейєрових бляшках і звільняються з лімфоцитів після їх руйнування, яке відбувається за участю гемолізину, що продукується ешерихіями. При загибелі бактерій вивільняється ЛПС, що викликає системну запальну реакцію. Як конкретно розвивається діарея при контамінації ЕРЕС, на сьогодні, достеменно невідомо. Припускають існування кількох механізмів, причому основна роль належить змінам проникності мембрани, транслокації катіонів та аніонів, мальабсорбції.

Слід зазначити, що тривалість інкубаційного періоду – варіабельна від 30 хв до 20 діб. Розвиток хвороби у дітей, зазвичай, розпочинався гостро: зростала температура тіла до субфебрильної, спостерігалася водяниста діарея, що надалі посилювалася іншими симптомами інтоксикації, блюванням, здуттям та болями в животі, ускладнювалася млявістю, припиненням сечовипускання, сплутаністю свідомості, судомами. Втрата рідини асоціюється з клінічними проявами ексикозу. Специфічні симптоми максимально проявлялися на 5-7-й день хвороби. Серед проаналізованих випадків хвороби не виявлено затяжного перебігу діареї впродовж кількох тижнів та розвитку складних септичних варіантів інфекції з генералізацією збудника.

ЕТКП колонізують ворсинки нижніх відділів тонкої кишки без їх ушкодження. ЕТКП спочатку прилипають до епітеліальних клітин тонкої кишки через поверхневі структури, а потім виділяють ентеротоксини. Колонізація відіграє фундаментальну роль на початковому етапі механізму патогенезу бактерій [44].

Хвороба має перебіг за типом холероподібної діареї. Бактерії утворюють колонізуючий фактор (CFs), термолабільний (heat-labile, LT) та термостабільний (heat-stable, ST) ентеротоксини, що кодуються плазмідами (різні штами можуть продукувати обидва токсини, або лише якийсь один з них). CFs забезпечує приєднання та ріст колоній на поверхні слизової оболонки тонкого кишечника за

допомогою фімбріальних та фібрилярних структур. Джгутики сприяють первинному прикріпленню та колонізації до епітеліоцитів кишечника. EtpA, що секретується ЕТКП, є глікопротеїном, що містить N-ацетилгалактозамін, тому спостерігають розвиток важчих діарейних захворювань у людей з I-ю групою крові (A) [39]. Термолабільний ентеротоксин характеризується структурно-функціональною схожістю з холерним ентеротоксином. Білок містить 2 компоненти: В - зв'язуючий, з 5 субодиниць, забезпечує приєднання до гангліозидів клітинної поверхні GM1 чи GD1b; А - активний, після проникнення у клітину, володіє АДФ-рибозилтрансферазною активністю, переносить АДФ-рибозильний фрагмент від НАД до α -субодиниці G-білку, який регулює аденілатциклазу. Це призводить до зростання концентрації цАМФ, активації цАМФ-залежних кіназ, що в свою чергу викликає посилену секрецію йонів хлору та знижену абсорбцію йонів натрію. Термостабільний ентеротоксин натомість взаємодіє з гуанілатциклазою, викликаючи збільшення концентрації цГМФ. Це в свою чергу призводить до зростання активності цГМФ-залежних кіназ, регуляторного білка-транспортера та відповідного порушення процесів секреції/абсорбції електролітів [37]. Відомо 2 класи ST – Sta та STb. Для людей актуальною є дія першого, що є однопептидним токсином з 18-19 амінокислот, серед яких 6 залишків цистеїну.

У випадку розвитку важких кишкових хвороб причинених ЕТЕС спостерігають секреторний характер діареї. Тривалість інкубаційного періоду незначна – 6-72 год. Хвороба розпочинається гостро, причому окрім нетипових випорожнень відзначають нудоту та блювання. Симптоми проявляються, зазвичай, впродовж 3-4 днів.

ЕІКП колонізують, проникають і розмножуються всередині колоноцитів товстої кишки, наслідком чого є коліт з утворенням виразок. Інфекція починається з проникнення збудника в епітеліальні клітини товстої кишки, з наступним потраплянням у підслизову оболонку за допомогою механізму трансцитозу (залучаються мікрофіламенти). Розрив і пошкодження щільних контактів, спричинені запаленням, також створюють ЕІКП доступ до підслизової

оболонки [43]. Бактерії поглинається макрофагами, де лізують ендосому. Після вивільнення з мертвих макрофагів, патогени занурюються з базолатеральної сторони у колоноцити, виживають (синтезують фактори протиімунного захисту) і розмножуються внутрішньоклітинно, рухаються напрямлено через цитоплазму та поширюються на сусідні епітеліальні клітини [36]. Вірулентність цього патогену, в основному, зумовлена факторами, що кодують плазміді розміром 220 кб, включаючи комплекс T3SS, шаперони, регулятори транскрипції, транслокатори та понад 25 ефекторних білків [35]. Хвороба проявляється болем у животі, водянистою діареєю з домішками крові. Хоча й симптоми дещо нагадають шигельози, протікання хвороби відбувається легше та менш тривало. Зазвичай, тривалість інкубаційного періоду складає 12-72 год. Хвороба розпочинається гостро. При аналізі випорожнень часто виявляють формені елементи крові (еритроцити, лейкоцити). Через 5-7 днів спостерігають одужання.

ЕГКП вражають сліпу, висхідну і поперечну кишки товстого кишечника. Бактерії руйнують клітини ендотелію дрібних кровоносних судин. Наслідком цього є кровотеча, утворення згустків крові, порушення кровообігу. Все це призводить до ішемії і некрозу у кишечній стінці. Важливою особливістю бактерій є здатність продукувати специфічний екзотоксин – Stx, що є ідентичним до токсину Шига *Shigella dysenteriae* (STEC). Stx1 і Stx2, дві найпоширеніші форми токсину, виявлені в штаммах ЕГЕК, патогенних для людини, кодуються близькоспорідненими бактеріофагами. Кожен токсин складається з однієї субодиниці А, нековалентно пов'язаної з пентамером, що містить ідентичні субодиниці В. В-субодиниці специфічно зв'язуються з гліколіпідом глоботріоацилцерамідом (Gb3) і спорідненими гліколіпідами на клітинах-господарях. Субодиниця А поглинається ендцитозом і транспортується до ендоплазматичного ретикулуму. Мішенню дії токсину є 28S рРНК, яка депуринізується токсином у специфічному залишку аденіну, що призводить до припинення синтезу білка та загибелі інфікованих клітин шляхом апоптозу. Можуть вражатися різноманітні клітини з наявними рецепторами Gb3, але найчастіше страждають ендотеліоцити ниркових клубочків, що проявляється

появою мікроангіопатій, тромбоцитопенії, гемолітичної анемії [42]. У 2-15% пацієнтів інфекція ускладнюється уремичним геморагічним синдромом. Інкубаційний період триває, в середньому, 3-4 дні. Захворювання розвивається поступово. У продромальний період проявляється діарея, фіксують відсутність/зниження апетиту, загальну слабкість. Наступні дні характеризуються підвищенням температури тіла, виражені симптоми інтоксикації, гемоколіт, болі в животі [45].

Основним методом лікування була регідраційна терапія. Грудне вигодовування для немовлят зберігалось. Переважно застосовували ентеральне введення низькоосмолярних розчинів (містять глюкозу та необхідні солі). При важких проявах хвороби (порушення свідомості, шок, прояви ацидозу) можливе внутрішньовенне введення розчинів. У окремих випадках застосовувалися антибіотичні засоби – триденно азитроміцин дозою 10 мг/кг/доба чи п'ятиденно цефіксим дозою 8 мг/кг/доба [31].

Усім хворим дітям рекомендовано застосування ентеросорбентів, пробіотиків (*L. rhamnosus* LGG та *S. boulardii*) та рацекадотрілу (інгібітор ферменту енкефалінази для зменшення патологічних втрат рідини). Доведена участь цих представників кишкової мікробіоти у епітеліальному гомеостазі, зокрема оновленні клітин, загоєнні ран (*Lactobacillus rhamnosus*), формуванні цілісності епітелію та товщини слизу (*Lactobacillus plantarum*) [10].

Після перенесеної хвороби розвивається нестійкий імунітет. На розвиток імунної системи господаря впливає безперервна та динамічна взаємодія з кишковою мікробіотою та її метаболітами. Бактерії є невід'ємною частиною раннього розвитку кишково-слизової імунної системи, як з точки зору її фізичних компонентів, так і її функції, і продовжують відігравати значну роль у подальшому житті.

З іншого боку відомо, що імунна система людини задіяна у формуванні кишкової мікробіоти, хоча цей вплив обмежується стратифікацією та компартменталізацією бактерій, щоб уникнути умовно-патогенної інвазії в тканини. У шлунково-кишковому тракті клітини Панета виробляють

антимікробні речовини через PRR-опосередкований механізм, наприклад такі пептиди як ангіогенін 4, α -дефензини, кателіцидини, гістатини, ліпополісахарид-зв'язуючий білок, лізоцими, секреторну фосфоліпазу A2 та лектини, такі як REGIII α/γ , мішенню дії яких, зазвичай, є клітинна стінка чи ЦПМ [43]. Ці білки локалізовані в слизовому шарі і практично відсутні в просвіті. Секреторний IgA (SIgA), що локалізується у зовнішньому шарі слизу допомагає обмежити вплив бактерій на поверхню епітеліальних клітин через комбіновану взаємодію з муцинами та кишковими бактеріями, таким чином забезпечуючи імунний захист від патогенів, зберігаючи при цьому взаємовигідні відносини з коменсалами. Вважається, що SIgA є посередником у формуванні бактеріальної біоплівки через зв'язування з рецепторами SIgA на бактеріях.

Природний захист у дітей раннього віку зумовлений IgM, які синтезуються в організмі дитини, а у немовлят ще й IgA, що передаються з материнським молоком, а також біфідумфлорою. Постінфекційний імунітет до специфічного серовара, який спричинив інфекцію, нестійкий [23].

Сучасні дослідження вказують, що харчування має великий вплив на мікробіоту кишечника [3]. Метатранскриптомічні дослідження показали, що мікробіота клубової кишки керується здатністю метаболізувати прості цукри, що відображає адаптацію мікробіоти до наявності поживних речовин у тонкій кишці. Формування мікробіоти товстої кишки залежить від наявності доступних для мікробіоти вуглеводів, які містяться в харчових волокнах [26].

Спосіб годування може впливати на чисельність деяких груп бактерій у мікробіоті кишечника немовлят. Наприклад, фукозилзовані олігосахариди, присутні в жіночому молоці, можуть використовуватися *Bifidobacterium longum* і кількома видами *Bacteroides*, що обумовлює їх домінування над *E. coli* і *Clostridium perfringens* [11], а у немовлят, які перебувають на штучному вигодовуванні мікрофлора різноманітніша з наявними *E. coli*, *Clostridium difficile*, *Bacteroides fragilis* [12].

Кишковий слиз також є джерелом вуглеводів для кишкової мікробіоти [28]. Шари кишкового слизу побудовані навколо великого

високоглікозилізованого гелеутворюючого муцину MUC2, який секретується келихоподібними клітинами. Гліканові структури, присутні в муцинах, різноманітні та складні та базуються на чотирьох основних O – гліканах, що містять N-ацетилгалактозамін, галактозу, N-ацетилглюкозамін та залишками фукози й сілової кислоти. Слиз присутній у всьому шлунково-кишковому тракті і є найгустішим у товстій кишці, де він має вирішальне значення для забезпечення зв'язків між господарем і мікробіотою. Тут у ньому вирізняють два шари – щільний і непроникний внутрішній та пухкий зовнішній, що містить сайти зв'язування для коменсальних бактерій (залежить від типу O-глікозилування, що визначається експресією глікозилтрансфераз і місцем їх розташування в апараті Гольджі). Розташування зовнішнього шару слизу забезпечує унікальну нішу, в якій види бактерій демонструють різні моделі проліферації та використання ресурсів порівняно з їхніми аналогами в просвіті та дозволяє вибрати найбільш оптимальні мікробні види для забезпечення здоров'я господаря [27] .

Здатність кишкових бактерій використовувати різноманітні субстрати продиктована репертуаром глікозид гідролаз (GH) і полісахаридних ліаз (PL), закодованих їхніми геномами. *Bacteroidetes* кодують набагато більше ферментів, що розщеплюють глікан (137,1 генів GH і PL на геном), ніж представники *Firmicutes* (39,6 генів GH і PL на геном) [21].

Розподіл жовчних кислот у тонкій і товстій кишці також може впливати на динаміку бактеріальної спільноти. Первинні жовчні кислоти, такі як таурохолат, можуть надавати сигнали самонаведення кишковим бактеріям і сприяти проростанню спор, а також відновленню мікробіоти після дисбактеріозу [2].

Визначна роль у селекції мікрофлори залежить також від продукції ними органічних кислот. Три переважаючі КЛЖК пропіонат, бутират і ацетат, як правило, зустрічаються в пропорції 1:1:3 у шлунково-кишковому тракті [7]. Ці SCFA швидко поглинаються епітеліальними клітинами шлунково-кишкового тракту, де вони беруть участь у регуляції клітинних процесів, таких як експресія генів, хемотаксис, диференціація, проліферація та апоптоз. Ацетат виробляється

більшістю кишкових анаеробів, тоді як пропіонат – переважно *Bacteroidetes*, бутират – переважно *Firmicutes*. Пропіонат в основному поглинається печінкою, тоді як ацетат виділяється в периферійні тканини. Бутират відомий своєю протизапальною та протираковою дією, є важливим джерелом енергії для колоноцитів [22]. Припускають, що зменшення градієнта бутирату від просвіту до крипт контролює епітеліальний обмін і гомеостаз кишечника шляхом сприяння проліферації колоноцитів на дні крипт, одночасно посилюючи апоптоз і відлущування клітин ближче до просвіту. Бутират може послабити бактеріальну транслокацію та посилити функцію кишкового бар'єру, впливаючи на щільні контакти та синтез муцину. У печінці пропіонат може активувати глюконеогенез, тоді як ацетат і бутират є ліпогенними. SCFA також відіграють важливу роль у регуляції імунної системи та запальної реакції. Вони впливають на виробництво цитокінів, наприклад, стимулюючи виробництво IL-18, інтерлейкіну, який бере участь у підтримці та відновленні цілісності епітелію. Бутират і пропіонат є інгібіторами гістондеацетилаз, які епігенетично регулюють експресію генів. Доведено, що SCFA модулюють регуляцію апетиту – наприклад, пропіонат впливає на функцію β -клітин [16] і послаблює харчову поведінку.

Отже, у дітей раннього віку біля третини проаналізованих випадків гострих кишкових захворювань обумовленні патогенними діареєгенними *E. coli*. При порівнянні з літературними даними, які засвідчують частоту виникнення колієнтеритів у передковідний період (до 2020 року) – ця величина є значнішою [31, 37]. У новонароджених та немовлят переважаючими патогенами були ентеропатогенні та ентеротоксичні кишкові палички, а у дошкільнят – ентероінвазивні та ентеротоксичні.

ВИСНОВКИ

1. Застосування мікробіологічних, біохімічних, серологічних методів дозволило ідентифікувати в організмі дітей раннього віку діареєгенні *E. coli*. Частота виявлених гострих колієнтеритів, спричинених даними патотипами, складала 28%.
2. Найпоширенішою причиною виникнення важких кишкових інфекцій у дітей віком до 2-х років були ентеропатогенні *E.coli*, частка ентеротоксичних була незначною, ентероінвазивних та ентерогеморагічних кишечних паличок не виявлено. У дітей віком 3-6 років зафіксовано інфікування ентеротоксичними, ентероінвазивними та ентерогеморагічними *E.coli*, що складало відповідно 4, 6 та 12,5 % проаналізованих випадків.
3. Серед ідентифікованих діареєгенних *E.coli* домінували патотипи, що належали до серогруп O18ab, O111ab, O126, O25.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Gilbert J., Blaser M. J., Caporaso J. G. et al. Current understanding of the human microbiome. *Nature Medicine*. 2018. Vol. 24. P.392–400
2. Rackaityte E., Lynch S.V. The human microbiome in the 21st century. *Nature Communications*. 2020. Vol.11. <https://www.nature.com/articles/s41467-020-18983-8>
3. Panthee B., Gyawali S., Panthee P., Techato K. Environmental and Human Microbiome for Health. *Life*. 2022. Vol. 12. P.456. <https://doi.org/10.3390/life12030456>
4. Sender R., Fuchs S., Milo R. Revised Estimates for the Number of Human and Bacteria Cells in the Body. *PLOS Biol*. 2016. Vol. 14.
5. Milani C., Duranti S., Bottacini F. et.al. The First Microbial Colonizers of the Human Gut: Composition, Activities, and Health Implications of the Infant Gut Microbiota. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2017. Vol.81
6. Kelley S.T., Gilbert J.A. Studying the microbiology of the indoor environment. *Genome Biol*. 2013. Vol. 14. P. 202.
7. Ursell L.K., Clemente J.C., Rideout J.R. et al. The interpersonal and intrapersonal diversity of human-associated microbiota in key body sites. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2012. Vol. 129. P. 1204–1208.
8. Marco M.L. Defining how microorganisms benefit human health. *Microb. Biotechnol.* 2021. Vol. 14. P.35–40.
9. Zong X., Fu J., Xu B. et.al. Interplay between gut microbiota and antimicrobial peptides. *Anim. Nutr.* 2020. Vol. 6. P.389–396.
10. Бережний В.В., Маменко М.Є. Мікробіота кишечника новонародженої дитини: вплив на стан здоров'я та фізіологічні підходи до корекції порушень. *Дитячий лікар*. 2016. Т.3 (48). С.14-20
11. Бережний В.В., Маменко М.Є. Особливості мікробіоти кишечника новонародженої дитини та корекція її порушень. *Современная педиатрия*. 2016. Т.2 (74). С.125-128

12. Koenig J.E., Spor A., Scalfone N. et.al. Succession of microbial consortia in the developing infant gut microbiome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2011. Vol. 108 (1). P.4578–4585.
13. Timm C.M., Loomis K., Stone W. et.al. Isolation and characterization of diverse microbial representatives from the human skin microbiome. *Microbiome*. 2020. Vol. 8. P.58.
14. Lu M., Xuan S., Wang Z. Oral microbiota: A new view of body health. *Food Sci. Hum. Wellness*. 2019. Vol. 8. P.8–15.
15. Kumpitsch C., Koskinen K., Schöpf V., Moissl-Eichinger C. The microbiome of the upper respiratory tract in health and disease. *BMC Biol*. 2019. Vol. 17. P.87.
16. Rinninella E., Raoul P., Cintoni M. et.al. What Is the Healthy Gut Microbiota Composition? A Changing Ecosystem across Age, Environment, Diet, and Diseases. *Microorganisms*. 2019. Vol. 7. P. 14.
17. O’Callaghan A., Van Sinderen D. Bifidobacteria and Their Role as Members of the Human Gut Microbiota. *Front. Microbiol*. 2016. Vol. 7. P.925.
18. Hassan M.U., Nayab H., Shafique F. et.al. Probiotic Properties of *Lactobacillus helveticus* and *Lactobacillus plantarum* isolated from traditional pakistani yoghurt. *BioMed Res. Int*. 2020. 8889198.
19. Can Our Connection to the Natural World Shape Our Microbiome?// <https://www.ifm.org/news-insights/can-connection-natural-world-shape-microbiome/>
20. Gacesa R., Kurilshikov A., Vila A. V. Environmental factors shaping the gut microbiome in a Dutch population *Nature*. 2022. Vol. 604. P.732–739/
21. Ursell L.K., Metcalf J.L., Parfrey L.W., Knight R. Defining the Human Microbiome. *Nutr Rev*. 2012. Vol. 70 (1). P.38–S44.
22. Lloyd-Price J., Abu-Ali G., Huttenhower C. The healthy human microbiome. *Genome Medicine*. 2016;
<https://genomemedicine.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13073-016-0307-y>
23. Kho Z.Y., Lal S.K. The Human Gut Microbiome – A Potential Controller of Wellness and Disease *Front. Microbiol*. 2018
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01835>

24. Amato K.R. The human gut microbiome and health inequities. *Integr Med (Encinitas)*. Part 1: The Human Gut Microbiome in Health and Disease. 2014. Vol.13 (6). P.17–22.
25. Thursby E., Juge N. Introduction to the human gut microbiota. *Biochem J*. 2017. Vol. 474(11). P.1823–1836.
26. Valdes A. M., Walter J., Segal E., Spector T. D. Role of the gut microbiota in nutrition and health. *BMJ*. 2018. doi: <https://doi.org/10.1136/bmj.k2179>
27. Cani P.D. Human gut microbiome: hopes, threats and promises. *BMJ*. 2018. <https://gut.bmj.com/content/67/9/1716>
28. Visconti A., Roy C.I. Le, Rosaet F. et.al. Interplay between the human gut microbiome and host metabolism. *Nature Communications*. 2019. Vol. 10. P. 4505
29. Fan Y., Pedersen O. Gut microbiota in human metabolic health and disease. *Nature Reviews Microbiology*. 2021. Vol.19. P. 55–71
30. Janda M., Abbott S.L. The Enterobacteria. 2006. ASM Press. P.23-58
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1128/9781555817541.ch4>
31. Крамарьов С.О., Євтушенко В.В. Ешерихіози: сучасний погляд на проблему // <https://health-ua.com/article/5425-esherihozi-suchasnij-poglyad-na-problemu>
32. Тимків М. З. Біологічні властивості *E.coli*, виділених від хворих з неінфекційними захворюваннями товстої кишки. Дис. канд. мед. наук 03.00.07 – мікробіологія. Львів, 2016. 169 с.
33. Осолодченко Т.П. Адгезивні властивості мікроорганізмів та методи їх визначення: метод. рек. / укл. Т.П. Осолодченко [та ін.] ; МОЗ України, АМН України, Укр.центр НМІ та ПЛР. К.: Знання України, 2009. 19 с.
34. Donnenberg M.S., Whittam T.S. Pathogenesis and evolution of virulence in enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *J Clin Invest*. 2001. Vol. 107(5). P.539–548.
35. Pakbin B., Brück W.M., Rossen J.W. A. Virulence Factors of Enteric Pathogenic *Escherichia coli*: A Review. *Int J Mol Sci*. 2021. Vol. 22(18). P. 9922.
36. Johnson J. R. Evolution of pathogenic *Escherichia coli*. *Escherichia Coli*

Virulence Mechanisms of a Versatile Pathogen 2002. P. 55-77.

37. Braz V. S, Melchior K., Moreira C. G. *Escherichia coli* as a multifaceted pathogenic and versatile bacterium. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2020. Vol. 21 <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcimb.2020.548492/full>
38. Ameer M. A., Wasey A., Salen P. *Escherichia Coli* (E Coli 0157 H7). 2022. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK507845/>
39. Kaper J. B., Nataro J. P., Mobley H.L.T. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology*. 2004. Vol. 2. P.123–140
40. Симулик В.Д. Гострі кишкові інфекції у дітей. Ужгород: УжНУ. 2013.122с.
41. Liu B., Furevi A., Perepelov A.V. et.al. Structure and genetics of *Escherichia coli* O antigens. *FEMS Microbiology Reviews*. 2020. Vol. 44 (1). P.655–683
42. Родина кишкових бактерій / упор. Мінухін В.В., Коваленко Н.І., Замазій Т.М. Харків: ХНМУ. 2014. 44 с.
43. Nguyen Y., Sperandio V. Enterohemorrhagic E. coli (EHEC) pathogenesis. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2012. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcimb.2012.00090/full>
44. Govindarajan D.K., Viswalingam N., Meganathan Y., Kandaswamy K. Adherence patterns of *Escherichia coli* in the intestine and its role in pathogenesis. *Medicine in Microecology*. 2020. Vol. 5. 100025
45. Roussel C., Cordonnie C., Livrelli V. et.al. Enterotoxigenic and Enterohemorrhagic *Escherichia coli*: Survival and Modulation of Virulence in the Human Gastrointestinal Tract. *Escherichia coli – Recent Advances on Physiology, Pathogenesis and Biotechnological Applications*. 2017. <https://www.intechopen.com/chapters/54926>

ДОДАТКИ

ДОДАТОК А

Правила роботи і техніка безпеки в лабораторіях мікробіологічного та біохімічного профілів

1. Забороняється входити у верхньому одязі та класти на столи сумки, портфелі й інші особисті речі, які можуть заважати роботі.
2. У приміщенні лабораторії необхідно підтримувати порядок і чистоту, працювати в халатах.
3. Робоче місце має бути обладнане усім необхідним для проведення лабораторних занять: мікроскопом, лампою, штативом для пробірок з культурами, бактеріологічною петлею тощо.
4. Інструменти, які використовували для роботи з культурами мікроорганізмів (петля, пінцет), необхідно прожарювати на вогні.
5. У лабораторії заборонено споживати їжу, пити воду.
6. У випадку попадання досліджуваного матеріалу на шкіру, халат, стіл необхідно негайно повідомити про це викладача і під його контролем провести дезінфекцію.
7. Усі живі препарати після мікроскопіювання, а також піпетки і шпателі, якими користувалися, необхідно занурити у склянку з дезінфікуючою рідиною (2%–ний розчин хлораміну).
8. Після закінчення занять необхідно навести порядок на робочому місці та провести стерилізацію використаного посуду, інструментів та елімінацію бактеріальних культур.

Вимоги безпеки під час виконання роботи

Дозволяється працювати тільки на заземлених об'єктах. Забороняється встановлювати запобіжники, що не відповідають номінальному значенню; виконувати заміну запобіжників при включеному обладнанні; виконувати ремонтні роботи об'єкту без зняття з нього напруги живлення.

При роботі на центрифугах: не працювати при частоті обертання, вищій максимальної для даного ротору; не працювати з неповними та нерівномірно

заповненими стаканами роторів типу РПУ К та з неповністю завантаженим ротором РЗ–21Т; не центрифугувати препарат з густиною, більшою за $1,2 \cdot 10^3$ кг/м³ на максимальній частоті обертанні ротору; не працювати з роторами, що відпрацювали свій термін експлуатації.

Не запускати ні одного приладу без попередньої перевірки. Не залишати діючий прилад без догляду.

Для попередження нещасних випадків через можливий викид реакційної суміші не заглядати в пробірку або колбу зверху. Не виносити із лабораторії прилади, посуд та реактиви. Роботу з отруйними речовинами проводити у витяжній шафі. Дотримуватись запобіжних заходів при роботі з вибуховими та легкозаймистими речовинами. Не виливати у раковину залишки кислот, лугів вогнебезпечних рідин та ін. Зливати ці речовини у спеціальні склянки, що знаходяться під витяжною шафою. Розчини, що містять кислоти та луги, перед тим, як вилити у каналізаційну систему, необхідно нейтралізувати. Різко пахнучі та отруйні речовини повинні бути знешкоджені хімічною обробкою або спалені в спеціально відведеному місці за межами лабораторії, бажано на повітрі. Не залишати ніяких речовин у посуді без етикеток.

Вимоги безпеки в аварійних ситуаціях

При виникненні пожежі негайно вимкнути газ у всій лабораторії, прибрати із помешкання всі горючі речовини, засипати піском або накрити ковдрою вогнище і повідомити черговому пожежної охорони про те, що сталося (тел.— 101). Якщо в лабораторії за якихось причин пролита значна кількість легкозаймистої рідини, то необхідно загасити всі пальники та електронагрівачі прилади, відчинити вікна та зібрати пролиту рідину ганчіркою або рушником, місце розливу засипати піском, потім зібрати його дерев'яною лопаткою і винести у спеціально відведене місце.

При легких термічних опіках шкіру слід обмити спиртом, а потім змазати гліцерином або вазеліном. При більш сильних опіках обпечене місце після промивання концентрованим розчином перманганату калію та спиртом, необхідно змастити засобом від опіків (наприклад, сульфідіновою емульсією).

При опіках міцними кислотами потрібно промити обпалене місце великою кількістю води, а потім 3% розчином соди. При опіках міцними лугами, шкіру потрібно промити водою, а потім нейтралізувати 1% розчином борної кислоти. Аміак майже не діє на шкіру, але при попаданні в очі може викликати сильне пошкодження і навіть сліпоту.

При випадковому попаданні реактивів всередину, рекомендується випити побільше води. Поряд з цим необхідно: а) при отруєнні кислотами випити склянку 2% вуглекислої соди; б) при отруєнні лугами випити склянку 2% оцтової або лимонної кислоти.

При необережному згинанні трубок, вставленні трубок або термометра в отвір колби, можливі порізи та поранення. При порізах в першу чергу потрібно видалити з рани уламки скла, краї рани продезинфікувати 3% спиртовим розчином йоду, а потім накласти стерильну пов'язку.

У випадку загоряння горючої рідини слід погасити всі пальники, прикрити полум'я азбестовим рушником або засипати його піском, або скористатися вогнегасником з вуглекислим газом. Розчинні у воді вогнебезпечні речовини, такі як спирт, ацетон та інші, можна гасити водою. Якщо горить нерозчинна у воді речовина (наприклад: ефір, бензол, бензин, скипидар), то використовувати воду для гасіння пожежі не можна, оскільки пожежа не ліквідується, а навпаки може збільшитись. У цьому випадку полум'я слід гасити піском та використовувати вогнегасник.

Вимоги безпеки після закінчення роботи

По закінченню тієї чи іншої операції, необхідно вимкнути газ і електроприлади, що використовувалися при виконанні даної роботи.

По закінченню роботи потрібно: привести до порядку робоче місце, прилади та апаратуру; виключити головний газовий кран, головний електрорубильник, вентиляцію та світло; перевірити, чи видалені з приміщення лабораторії надлишки горючих та легкозаймистих речовин, відпрацьовані рідини, сміття, промаслене ганчір'я; перевірити, чи весь посуд з реактивами закритий корками та поставлений на відведені місця.

