



Հայաստանի կենսաբ. հանդես, հավելված 1 (66), 2014

ՍԱԼՄՈՆԵԼՈԶԻ ԺԱՄԱՆԱԿ ՄԻԿՐՈՖԼՈՐԱՅԻ ԽԱՆՏՈՒՄՆԵՐԸ ՇՃԱՏԵՍԱԿ ՍՊԵՑԻՖԻԿ ԵՆ

Մ.Ս. ՄԿՐՏՉԱՆ

ՀՀ ԳԱԱ Մոլեկուլային կենսաբանության ինստիտուտ
mkhitarmkrtchyan@gmail.com

Դասական մանրէաբանական մեթոդների միջոցով, օգտագործելով սելեկտիվ միջավայրեր ուսումնասիրվել է Հայաստանում տարածված *Salmonella typhimurium* և *S. enteritidis* շճատեսակներով հարուցված հիվանդների աղիքային միկրոֆլորայի որակական և քանակական կազմը: Ստացված արդյունքներից բխում է, որ երկու տարբեր շճատեսակներով հարուցված հիվանդների մոտ ի համեմատ առողջ ստուգիչների առկա է խորը դիսբիոզ, որի ընթացքում դիտվել է օգտակար բակտերիաների թվի կտրուկ նվազում և պաթոգենների քանակի խիստ ավելացում: Կիրառվել է դիսկրիմինանտ ֆունկցիոնալ անալիզ, որի կախյալ փոփոխականներ էին հանդիսանում հետազոտվողների 4 խմբեր, իսկ պրեդիկտորներն են եղել վիճակագրորեն հավաստի նորմայից շեղումներով դիսբիոզի աստիճանը և 7 բակտերիալ խմբեր: ԴԱ-ի արդյունքները վկայում են դիսբիոզի սպեցիֆիկության մասին կախված ինչպես շճատեսակից, այնպես էլ տարիքից:

Salmonella - սալմոնելոզ - միկրոֆլորա - դիսբիոզ - շճատեսակ

Исследован количественный и качественный состав микрофлоры больных сальмонеллезом, вызванным распространенными в Армении серотипами *Salmonella Typhimurium* и *S. Enteritidis*, методом классической микробиологии, с использованием селективных сред. По сравнению с контролем, у больных, инфицированных двумя разными серотипами, наблюдается глубокий дисбиоз, во время которого резко уменьшается число полезных бактерий и увеличивается количество патогенов. Проводился дискриминантный функциональный анализ, где зависимыми переменными были 4 группы обследованных, а предикторами являлись статистически значимые отклонения степени дисбиоза от нормы и 7 бактериальных групп. Результаты ДА свидетельствуют о специфичности дисбиоза, в зависимости как от серотипа, так и от возраста.

Salmonella - сальмонеллез - микрофлора - дисбиоз - серотип

With the use of classical microbiological methods and selective media were investigated quantitative and qualitative composition of gut microflora of patients infected with salmonellosis, caused by two serotypes prevalent in Armenia, *S. enteritidis* and *S. typhimurium*. The obtained data showed that in patients infected with two different serotypes, occurs deep dysbiosis, during which took place sharp decreasing of the number of beneficial bacteria and increasing of pathogens, compared to control. Discriminate functional analysis was performed, where the dependent variables were four investigated groups and the predictors- statistically significant deviated from norm degree of dysbiosis and 7 bacterial groups. The results of DA indicate the specificity of dysbiosis, depending both on the serotype and age.

Salmonell - salmonellosis - microflora - dysbiosis - serotype

Մարդու նորմալ միկրոֆլորայի ցանկացած տեսակի քանակական և որակական փոփոխությունները առաջացնում են դիսբիոզ: Դիսբակտերիոզի առաջացման պատճառ կարող են հանդիսանալ՝ հակաբիոտիկները, քիմիոթերապիան, ծանր ինֆեկցիաները, ծանր սոմատիկ հիվանդությունները և այլ վնասակար ազդեցությունները:

Միկրոէկոլոգիական ՖիտոտաններըՄՆ հանդիսանում են մի շարք պաթոլոգիաների պաթոգենետիկ գործոններից մեկը [8, 9]:

Աղետամոքսային տրակտի ինֆեկցիաների դեմ կոմենսալ միկրոբիոտայի և իմունային համակարգի համալիր ազդեցության մեխանիզմները դեռևս լիարժեք պարզաբանված չեն [5]:

Աղիքային ինֆեկցիաները, այդ թվում սալմոնելոզները, բազմագործոնային պրոցես են, որոնք ներառում են պաթոգենի բնութագիրը, տիրոջ աղիքային միկրոֆլորայի կազմը, իմունային կարգավիճակը և շրջակա միջավայրի գործոնները [7]:

Աղիքային ինֆեկցիայի ժամանակ զարգացող դիսբակտերիոզն ավելի է ծանրացնում հիվանդությունը և նպաստում է պրոցեսի քրոնիզացմանը, նվազեցնում է կիրառվող բուժման արդյունավետությունը և հիմք է ծառայում բազմաթիվ քրոնիկական հիվանդությունների զարգացման համար:

Մեր աշխատանքներում ցույց է տրվել, որ Հայաստանում *Salmonella enterica* ենթատեսակի երկու ամենատարածված շճատեսակներն են *S. enteritidis* և *S. typhimurium*, որոնք առավել հաճախակի պատճառ են հանդիսանում մարդկանց սուր գաստրոէնտերիտների առաջացմանը [4]:

Ելնելով վերը նշվածներից, աշխատանքի հիմնական նպատակն է ուսումնասիրել տարբեր շճատեսակներով հարուցված սալմոնելոզի դեպքում միկրոֆլորայի որակական և քանակական խախտումները, ինչը կնպաստի արդյունավետ բուժման ընտրությանը:

Նյութ և մեթոդ:

Հետազոտվել են "Նորթ" ինֆեկցիոն կլինիկական հիվանդանոցի կողմից տրամադրված 2013 թվականին գրանցված սալմոնելոզի սուր փուլում գտնվող 47 հիվանդների կղանքի նմուշներ՝ 16 *S. typhimurium* և 31 *S. enteritidis*, և 14 առողջ դոնորներ: Հետազոտությունները կատարվել են երկու տարիքային խմբերում. առաջինը՝ մինչև 4 տարեկան և երկրորդը՝ 4-ից մեծ:

Սալմոնելոզ ախտահիշող հաստատված է կլինիկական պատկերի և լաբորատոր ուսումնասիրման մեթոդների հիման վրա: Սալմոնելոզը ախտորոշվել է մանրէաբանական մեթոդով, օգտագործելով սելեկտիվ ագարներ, ինչպես նաև կենսաքիմիական և սերոլոգիական թեստեր անցկացնելով, Ուայտ-Կաուֆմանի ստանդարտի օգտագործմամբ:

Կուլտիվացվող բակտերիալ խմբերի որակա-քանակական կազմի որոշման համար կիրառվել են հետևյալ սելեկտիվ միջավայրերը. Էնդո ագար, քիսմոթ-սուլֆիդ, ՍՇԱ (սալմոնելա-շիգելային ագար), ԼԱԱ (լեդի-ադային ագար), արյան ագար, Սաբուրո ագար: Ցանքսի արդյունքները դիտարկվել են 24-72 ժ հետո:

Ստացված տվյալների վիճակագրական վերլուծությունը կատարվել է, օգտագործելով "GraphPad QuickCalcs: t test calculator" (GraphPad Software Inc., ԱՄՆ) ծրագրային փաթեթը և "SPSS Statistics 19" (SPSS Inc., Chicago, IL, ԱՄՆ) ծրագրի օգտագործմամբ իրականացվել է դիսկրիմինատ ֆունկցիոնալ անալիզ: Վիճակագրորեն հավաստի են համարվել այն արդյունքները, որոնց դեպքում $p \leq 0,05$:

Արդյունքներ և քննարկում:

Աղիքային միկրոֆլորայի հետազոտությունների արդյունքում հայտնաբերվել են խորը շեղումներ սալմոնելոզով հիվանդների մոտ՝ հարուցված տարբեր շճատեսակներով:

Ներկայումս պայմանականորեն առանձնացնում են աղիքային դիսբիոզի 4 աստիճան.

Առաջին՝ լատենտ, կոմպենսացված ձև. ընթանում է առանց պաթոլոգիական փոփոխությունների: Երկրորդ՝ սուբկոմպենսացված ձև. բնութագրվում է աղիքների լուրջ բորբոքումներով: *E. coli*-ի, քիֆիդոբակտերիաների քանակը նվազում է, իսկ

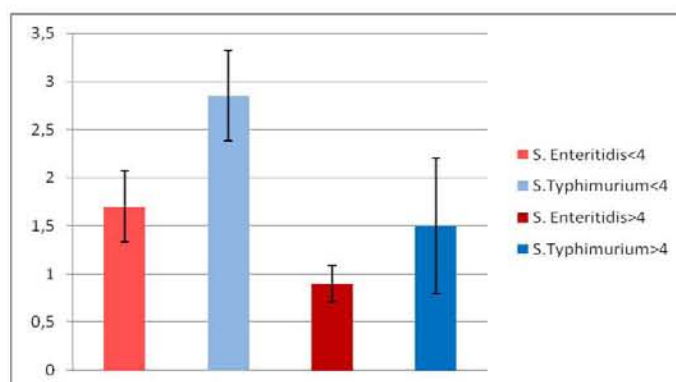
պայմանական պաթոգենների քանակն ավելանում է: Երրորդ՝ խորը դիսբիոզ. *E. coli*-ի, բիֆիդո և լակտոբակտերիաների քանակի զգալի նվազում, կլինիկական պատկերը բարդանում է, ինչպես նաև աճում է դեկոմպենսացիայի աստիճանը: Չորրորդ՝ բիֆիդո և լակտոբակտերիաները գրեթե բացակայում են, ինչպես նաև *E. coli*-ին, տեղի է ունենում աղիքային էպիթելի դեստրուկցիա, կարող է զարգանալ բակտերեմիա և սեպսիս, ի հայտ են գալիս ինֆեկցիայի նոր օջախներ [1, 3]:

Այս աշխատանքում ուսումնասիրվել է *S. enteritidis* և *S. typhimurium* հարուցված սալմոնելոզի սուր փուլով հիվանդների միկրոբիոտայի քանակակն և որակական կազմը: Բացահայտվել է խորը դիսբիոզ հիմնականում արտահայտված բիֆիդոբակտերիաների, լակտոբակտերիաների և աղիքային ցուպիկի կտրուկ նվազեցմամբ, ինչպես նաև լակտոզ բացասական էնտերոկոկների, *Candida* ցեղի սնկերի և աղիքային ֆլորայի պաթոգեն բակտերիաների քանակական շեղումներով (աղ. 1):

Աղյուսակ 1. Միկրոֆլորայի ներկայացուցիչների տոկոսային փոփոխությունները տարբեր շճատեսակներով հարուցված սալմոնելոզի դեպքում

Միկրոֆլորա		<i>S. typhimurium</i> Սուր ընթացք, %	<i>S. enteritidis</i> Սուր ընթացք, %
1	Աղիքային խմբի ախտածին մանրէներ	70	27.5
2	Աղիքային ցուպիկի ընդհանուր քանակը	53.3	42.5
3	Թույլ ֆերմենտային հատկություններով աղիքային ցուպիկ	0	7.5
4	Լակտոզբացասական էնտերոբակտերիաներ	56.6	22.5
5	Չեմոլիզող աղիքային ցուպիկ	30	22.5
6	Կոկային ձևերի տոկոսը ընդհանուր մանրէների քանակության մեջ	43.3	47.5
7	Չեմոլիզող ստաֆիլոկոկի տոկոսը կոկային ձևերի մեջ	0	0
8	Բիֆիդոբակտերիաներ	76.7	62.5
9	Լակտոբակտերիաներ	66.7	75
10	Էնտերոկոկեր	26.7	30
11	Պրոտեուս խմբի մանրէներ	0	0
12	Ոսկեգույն ստաֆիլոկոկ	0	0
13	Կանդիդա խմբի սնկեր	33.3	30
14	Անաերոբ կոկեր	0	0
15	Կլոստրիդիաներ	0	0

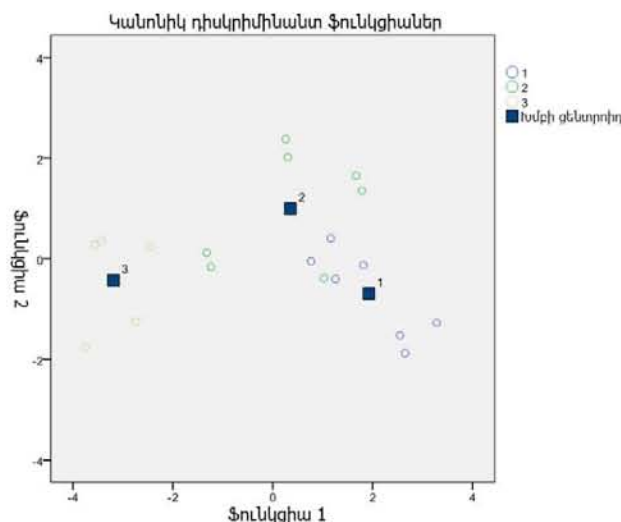
Իրականացվել են ստացված տվյալներին ինչպես ներխմբային, այնպես էլ միջխմբային համեմատական վերլուծություններ: Խախտումների քանակը, ըստ դիսբիոզի աստիճանի, *S. typhimurium* հարուցիչի դեպքում վիճակագրորեն հավաստի 2 անգամ ավելի բարձր է ի համեմատ *S. enteritidis*-ի (միջինը 2,2 և 1,2 համապատասխանաբար, $p=0.02$): Առավել արտահայտված է դիսբիոզը փոքր տարիքային խմբերում, ընդ որում *S. typhimurium* և *S. enteritidis* հարուցիչների միջև միջինը 2.9 և 1.6, $p=0.03$: Ներխմբային վերլուծության ժամանակ բացահայտվել է դիսբիոզի աստիճանի վիճակագրորեն հավաստի տարբերություն փոքր և մեծ տարիքային խմբերում, *S. enteritidis* հարուցիչի դեպքում (միջինը 1.7 և 0.9, $p=0.05$) (նկ. 1):



Նկ. 1. Դիսբիոզի կախվածությունը շճատեսակից և տարիքից

S. enteritidis < 4 և *S. typhimurium* < 4՝ 1-ին խումբ, *S. enteritidis* > 4 *S. typhimurium* > 4՝ 2-րդ խումբ:

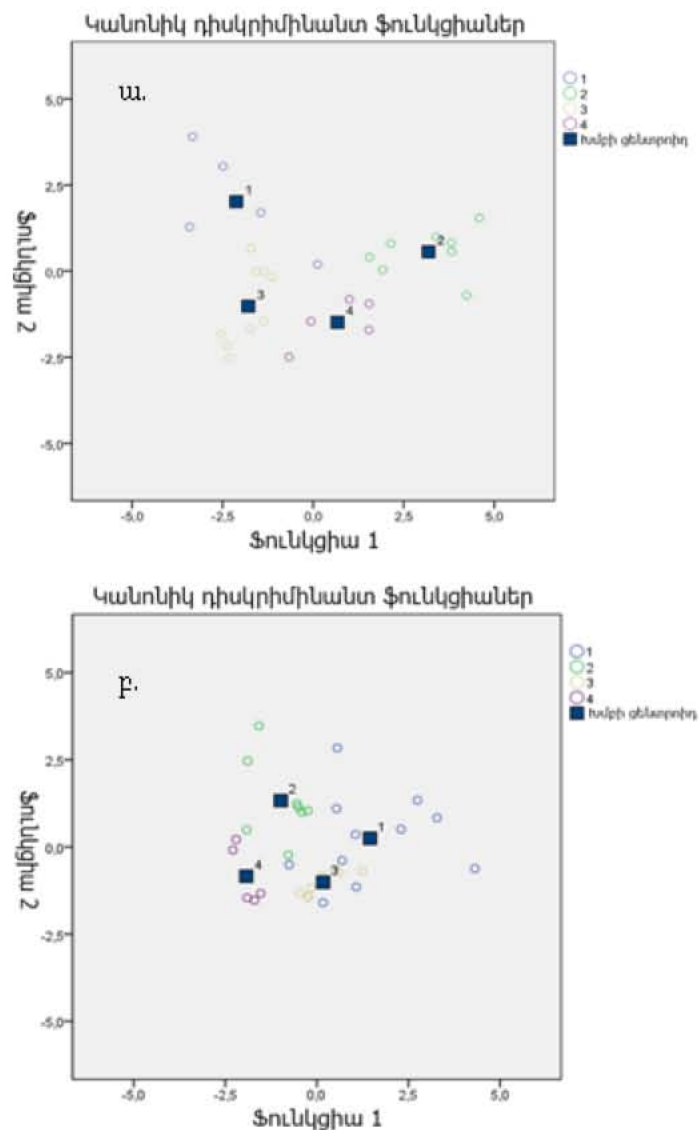
Հետազայում տվյալները ենթարկվել են բազմաչափ վիճակագրական վերլուծության սմուլների բաշխումը որոշելու համար: Կիրառվել է դիսկրիմինանտ անալիզ, որի կախյալ փոփոխականներն էին հանդիսանում հետազոտվողների 4 խմբեր, իսկ պրեդիկտորներն են եղել նորմայից շեղումներով դիսբիոզի աստիճանը և 7 բակտերիալ խմբեր՝ աղիքային ցուպիկ, բիֆիդոբակտերիաներ, լակտոբակտերիաներ, լակտոզ բացասական էնտերոկոկեր, կանդիդա ցեղի սկներ և աղիքային ֆլորայի պաթոգեն բակտերիաներ: ԴԱ-ի արդյունքները ապացուցեցին դիսբիոզի սպեցիֆիկությունը կախված ինչպես շճատեսակից (սկար 2), այնպես էլ տարիքից (Նկ. 3 ա, բ): ԴԱ-ի վիճակագրորեն հավաստիությունը հիմնված է Ուիլկոսի լյամբդա թեստի վրա:



Նկ. 2. *S. enteritidis* և *S. typhimurium* հարուցվածների առաջին տարիքային խմբի ԴԱ

Դասակարգման ճշտության տոկոսը՝ 84,2, Ուիլկոսի լյամբդան՝

0,1 (1- *S. Enteritidis*, 2- *S. typhimurium*, 3- դոնոր)



Նկ. 3. *S. typhimurium* (ա.) և *S. enteritidis* (բ.) հարուցված երկու տարիքային խմբերի դիսքրիմինացիոն ԴԱ

ա. Դասակարգման ճշտության տոկոսը՝ 89,3, Ուիլկոքսի լյամբդան՝ 0,031 (1- *S. typhimurium* 4 տարեկանից մեծ, 2- *S. typhimurium*՝ 4-ից փոքր, 3- դոնոր՝ 4-ից մեծ, 4- դոնոր՝ 4-ից փոքր)

բ. Դասակարգման ճշտության տոկոսը՝ 82, Ուիլկոքսի լյամբդան՝ 0,1 (1- *S. enteritidis* 4 տարեկանից մեծ, 2- *S. enteritidis*՝ 4-ից փոքր, 3- դոնոր՝ 4-ից մեծ, 4- դոնոր՝ 4-ից փոքր):

Ստացված տվյալները վկայում են, որ հետազոտված սալմոնելոզով հիվանդների միկրոբիոտան գերճնշված է, ի դեմ պայմանական պաթոգեն մանրէների աճի մեծացմանը: Աղիքային ցուպիկի նվազումը արգելք է հանդիսանում պայմանական պաթոգեն մանրէների արտահանմանը աղիներից: *E. coli*-ի, բիֆիդո և լակտոբակտերիաների քանակի ճնշվածությունը, ընդհուպ մինչև բացակայությունը, հանգեցնում է նորմալ միկրոֆլորայի ապակայունացմանը և նպաստում է օտար մանրէների բնակեցմանը: Բիֆիդոբակտերիայի դեֆիցիտը հանդիսանում է աղիքային խանգարումների պաթոգեն ֆակտոր: Լակտոբակտերիաների բացակայությունը նվազեցնում է իմուն պատասխանի

արդյունավետությունը: Հեմոլիզող բակտերիաների առկայությունը առաջացնում է ալերգիկ պրոբլեմներ: Լակտոզ բացասական բակտերիաների առկայությունը բերում է դիսպեպտիկ երևույթների: Երկու շճատեսակի վարակի դեպքում զարգանում է կանդիդոզ (աղյ. 1):

Ախտածնից ազատվելու գործում միկրոբիոտան վճռական դեր է խաղում: Համաձայն Blaser et al., միկրոբիոտայի տևական առկայությունը բերում է անհրաժեշտ տեր-միկրոբ փոխհարաբերությունների հավասարակշռությանը, սակայն այն միշտ էլ, որ կայուն է [6]:

Աղիքային միկրոբիոտայի պաշտպանական դերը ցույց է տրված *Vibrio cholerae*, պաթոգեն *Escherichia coli* շտամի, *Shigella spp.*, *Clostridium difficile* ինֆեկցիաների դեպքում [9]:

Հայտնի է, որ օգտակար բակտերիաների քանակի փոփոխությունը հանգեցնում է իմունոլոգիական բալանսի և հոմեոստազի խախտման [8, 10]:

Նախորդ աշխատանքներում ցույց էր տրվել, որ սալմոնելոզի ժամանակ բորբոքային պատասխանը շճատեսակ սպեցիֆիկ է [2]: Ներկա աշխատանքի արդյունքները նույնպես վկայում են սալմոնելոզի տեր-միկրոբ փոխազդեցության շճատեսակ սպեցիֆիկությունը: Չնայած *Salmonella* շճատեսակները գենետիկորեն շատ մոտ են, սակայն ինֆեկցիային տիրող պատասխանի և նրանց պաթոգեն պոտենցիալների միջև գոյություն ունեն զգալի տարբերություններ: Հետագա ուսումնասիրությունները անհրաժեշտ են ինֆեկցիայի սալմոնելաների տարբեր շճատեսակների գենոմում տարբեր կերպ արտահայտված գենների դերը պարզելու համար:

Այսպիսով, հետազոտության արդյունքները վկայում են, որ *Salmonella* վարակների տեր-միկրոբ փոխազդեցությունները տարբեր են: Տվյալները ցույց են տալիս, որ սպեցիֆիկությունը կախված է ինչպես շճատեսակից, այնպես էլ տարիքից:

ԳՐԱԿԱՆՈՒԹՅՈՒՆ

1. Бондаренко В.М., Боев Б.В., Лыкова Е.А., Воробьев А.А. Дисбактериозы желудочно-кишечного тракта; Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии, 1; 66-70; 1998.
2. Кцоян Ж.А., Казарян К.А., Мартirosян А.А., Мнацаканян А.А., Аракелова К.А., Геворкян З.У., Тамьян М.В., Оганисян А.И., Седракян А.М., Захарян М.К., Аракелян А.А., Бояджян А.С., Аминов Р.И. Профиль провоспалительного ответа при сальмонеллозе зависит от серотипа возбудителя; Цитокины и воспаление; 12; 1-2; 131-136; 2013.
3. Светлова И.О., Солдатова Г.С., Поспелова М.И. Микробиоценоз кишечника. Современные представления о норме и патологии. Принципы коррекции нарушений; Методические рекомендации для врачей; Новосибирск, 1998.
4. Седракян А.М., Геворкян З.У., Аракелова К.А., Кцоян Ж.А. Исследование кишечной микрофлоры больных сальмонеллозом; ДАН РА; 1; 84-91; 2008.
5. Barman M., Unold D., Shifley K., Amir E., Hung K., Bos N., Salzman N. Enteric salmonellosis disrupts the microbial ecology of the murine gastrointestinal tract; *Infect. Immun.*; 76; 3; 907-915; 2008.
6. Blaser M.J., Kirschner D. The equilibria that allow bacterial persistence in human hosts; *Nature*; 449; 18; 843-849; 2007.
7. Gordon M.A. Salmonella infections in immunocompromised adults; *J Infect*; 56; 6; 413-422; 2008.
8. Littman D.R., Pamer E.G. Role of the commensal microbiota in normal and pathogenic host immune responses; *Cell Host & Microbe*; 10; 4; 311-323; 2012.
9. Stecher B., Hardt W.D. The role of microbiota in infectious disease; *Trends Microbiol*; 16; 3; 107-114; 2008.
10. Zoetendal E.G., Rajilic-Stojanovic M., W.M. de Vos High-throughput diversity and functionality analysis of the gastrointestinal tract microbiota; *Gut*; 57; 11; 1605-1615; 2008.