

Розділ 9

ВЕТЕРИНАРНО-САНІТАРНА ЕКСПЕРТИЗА, СТАНДАРТИЗАЦІЯ, ГІГІЄНА І БЕЗПЕЧНІСТЬ ПРОДУКЦІЇ ТВАРИННИЦТВА

УДК 637.075: 579.62: 579.678: 579.842.11

МАРКЕРИ ПАТОГЕННОСТІ *E. coli* O157: H7 ТА ОСНОВНІ ГЕНИ-МІШЕНІ ДЛЯ ДІАГНОСТИКИ ЦЬОГО МІКРООРГАНІЗМУ В ЯЛОВИЧИНІ ТЕСТ- СИСТЕМОЮ ПЛР

Бергілевич О. М. д., вет. н. професор,
Касянчук В.В., д., вет. наук, професор
Єфімова О. М., аспірант, bergilevich@ukr.net
Сумський національний аграрний університет, м. Суми

Анотація. В статті наведено основні відомості про кишкову паличку O157:H7, яка викликає геморагічну діарею і вважається небезпечним харчовим патогеном. Більшість спалахів харчових отруєнь людей були пов'язані з вживанням яловичого фаршу. Основними факторами патогенності серовару *E. coli* O157:H7 - є веротоксини Stx1 та Stx2 (або тільки Stx2), білок інтимін, відповідальний за адгезію збудника до епітеліальних клітин кишечника, ентерогемолізін і джутиковий антиген H7. Гени *E. coli* O157:H7 *stx1*, *stx2*, *hly* і *flic* є основними генами-мішенями для діагностичних ПЛР-тест-систем, що використовуються при ідентифікації цього мікроорганізму.

Ключові слова: *E. coli* O157:H7, яловичина, гени-мішені, тест-система, ПЛР.

Актуальність проблеми. Як відомо, кишкова паличка (*E. coli*) - бактерія, яка зазвичай знаходиться в кишечнику людей і теплокровних тварин. Більшість штамів кишкової палички нешкідливі. Однак деякі штами, такі як ентерогеморагічна кишкова паличка (ЕНЕС), можуть викликати важкі хвороби харчового походження.

Спалахи отруєнь харчовими продуктами, що викликані найнебезпечнішим видом бактерій *E. coli* все частіше відбуваються в усьому світі. В 1982 вперше після виникнення спалахів незвичайних шлунково-кишкових захворювань, пов'язаних з харчовими продуктами в США була виділена кишкова паличка O157: H7, яка викликала геморагічну діарею. Отже, визнання ентерогеморагічної *E. coli* (ЕНЕС), як важливої проблеми суспільної охорони здоров'я була визнано в 1982 році, після спалаху захворювання в Сполучених Штатах Америки.

Цей мікроорганізм на даний час визнається в якості важливої причини хвороб харчового походження спочатку пов'язувався зі спалахами харчових отруєнь в США, Канаді та Великобританії. В 2003 році на північному заході Сполучених Штатів 4 людини померли і 700 захворіли через вживання недосмажених гамбургерів. За останні роки спалахи аналогічних харчових захворювань траплялися також в Африці, Австралії, Європі та Японії. В одних лише Сполучених Штатах *E. coli* O157:H7, можливо, служить причиною 20000 випадків захворювань і 250-500 смертей щорічно [2,3].

Більшість спалахів були пов'язані з вживанням яловичого фаршу або вживанням сирого молока (рідше). Крім того, є повідомлення про те, що свіжі та недостатньо помиті фрукти і овочі та контаміновані кишковою паличкою O157: H7 були причиною хвороб харчового походження. Детальне порівняння властивостей патогенних (діарейних) штамів кишкової палички дало

можливість виявити наступні чотири категорії (групи) цих мікроорганізмів, та які відносяться до небезпечних харчових патогенів:

- ентеропатогенна *E. coli* (EPECI),
- ентеротоксигенна *E. coli* (ETEC),
- ентероінвазивна *E. coli* (EIEC)
- ентерогеморагічна *E. coli* (EHEC).

Резервуаром даної інфекції є велика рогата худоба, кози і вівці. Забруднення харчових продуктів відбувається в процесі їх приготування при незадовільному стані гігієни на виробництві, а також при недостатній термічній обробці продуктів [1].

Люди хворіють ЕНЕС-інфекціями після вживання недоброякісних м'ясних продуктів, не пастеризованого молока, йогуртів, сиру, овочів, шпинату, різних салатів, пророщених зерен бобових, соків, інших харчових продуктів і води, всіяні ЕНЕС-бактеріями. Можливе зараження людей при контакті з сільськогосподарськими і домашніми тваринами, а також при безпосередньому контакті з хворими на цю інфекцію. Штами ЕНЕС представляють серйозну загрозу життю особливо для літніх людей і дітей до 5 років.

Мета та завдання дослідження. Теоретично обґрунтувати маркери патогенності *E. coli* O157: H7 та визначити основні гени-мішені для діагностики цього мікроорганізму в яловичині тест-системою ПЛР.

Методи дослідження. Теоретичні та аналітичні.

Результати дослідження. Фізичні та біохімічні властивості *E. coli* O157: H7. *E. coli* O157: H7 має характерні для більшості кишкових паличок ознаки, але в той же час, має особливі характеристики. Наприклад, *E. coli* O157: H7 не ферментує сорбіт протягом 24 год, не має бета-глюкуронідази, та погано росте або взагалі не росте при 44-45.5 °С. *E. coli* O157: H7 може рости в діапазоні температур від 7 °С до 50 °С, з оптимальною температурою +37 °С. Деякі ЕНЕС можуть рости в кислих продуктах, до рН 4,4, і в продуктах з мінімальною активністю води (Aw).

Таким чином цей мікроорганізм не має високої термостійкості; термічна обробка яловичого фаршу достатня для щоб убити типові штами кишкової палички O157: H7.

Маркери патогенності *E. coli* O157: H7 та основні гени-мішені для діагностичних ПЛР-тест-систем. Механізм патогенності *E. coli* O157: H7 повністю не з'ясований, але клінічні ізоляти виробляли один або декілька веротоксинів які, як вважають і є важливими факторами вірулентності.

Вчені вважають, що *E. coli* O157: H7 перетворилася з ентеропатогенної кишкової палички серотипу O55: H7, через послідовне набуття фага кодованого як Stx2, з великою плазмідною вірулентності і додаткових мутацій хромосом. Швидкість генетичної мутації показує, що загальний предок нинішнього кишкової палички O157: H7 ймовірно існували 20000 років тому [7,8].

Отже, *E. coli* O157: H7 виробляє токсини, відомий як веротоксин або шіготоксин за їх схожості з токсинами, виробленими шигелами дизентерії. Слід зазначити групу Ентерогеморагічних штамів *E. coli* (ЕНЕС) з високо патогенними сероварами O157: H7, O26, O103, O111, O145 та ін. Продукція веротоксину є найбільш загальним критерієм для визначення даної групи бактерій. Веротоксин можна класифікувати за основними групами: веротоксин 1 (VT1, SLT1, Stx1) і веротоксин 2 (VT2, SLT2, Stx2). Штами ЕНЕС здатні продукувати або тільки токсини першої (VT1) або другої групи (VT2), або обидві групи токсинів (VT1) і (VT2) одночасно.

Основними факторами патогенності сировару O157: H7 є веротоксин (шігоподібний токсини) Stx1 і Stx2 (або тільки Stx2), білок інтімін, відповідальний за адгезію збудника до епітеліальних клітин кишечника, ентерогемолізін і джгутиковий антиген H7. Перераховані фактори патогенності детермінуються відповідно генами stx1, stx2, eae, hly і flic. Зазначені гени, а також rfb-гени, відповідальні за синтез соматичного O-антигену, є основними генами-мішенями для діагностичних ПЛР-тест-систем, що використовуються при ідентифікації сировару *E. coli* O157: H7. Причиною геморагічного коліту і HUS у людини, крім сировару O:157: H7 можуть виступати ентерогеморагічні ешерихії інших серологічних O-груп, хоча їх питома вага в структурі STEC-інфекцій значно менше, ніж сировару O157: H7 В даний час вже налічується більше 25 таких сироварів *E. coli*. Серед цієї групи STEC-патогенів найчастіше від хворих виділяють ешерихії серогруп O26, O111, O55, O103, O45, O121, O113, O117 і O145. Група цих збудників, на відміну від сировара O157: H7 не має яких-небудь фенотипічних маркерів, які можна було б використовувати як селективних при висіві аналізованих зразків на поживні середовища. Ця обставина значно ускладнює виділення та ідентифікацію збудників геморагічного коліту і HUS, "не відносяться до O157: H7". У геномі цієї групи патогенів, як правило, виявляють гени синтезу інтіміна і гени веротоксин (шігоподібних токсинів) - stx1 і stx2 (або тільки stx1 або stx2). Тому реально діагностувати групу STEC-штамів, "не відносяться

Проблеми зооінженерії та ветеринарної медицини

до O157: H7, можливе або тільки по виявленні у них здатності продукувати шига-токсини, або по індикації у них генів *stx1* і *stx* [7,8].

Симптоми захворювання. Кишкова паличка O:157-H:7, викликає захворювання, як людей, так і тварин, і птахів. Зазвичай захворювання протікає гостро. Інкубаційний період триває від трьох до восьми днів, при середній тривалості три-чотири дні. Починається захворювання зі переймо - подібних абдомінальних болів і водянистої діареї, яка може супроводжуватися рясною домішкою крові (геморагічний коліт) протягом 24 годин. Лихоманка і блювота можуть також відбуватися. Хвороба, як правило має дуже серйозні наслідки для здоров'я, і може проявлятися трьома різними синдромами: геморагічний коліт, гемолітико-уремічний синдром і тромботична тромбоцитопенічна пурпура.

Більшість пацієнтів одужує протягом 10 днів, але в невеликій частині пацієнтів, (особливо дітей раннього віку і літніх людей), інфекція може призвести до небезпечної для життя хвороби, такі як гемолітичний уремічний синдром (ГУС), який в типових випадках виникає на 2-му тижні захворювання. Для ГУС характерні гостра ниркова недостатність, гемолітична анемія і тромбоцитопенія, жовтяниця, кровотечі з слизових оболонок [4,5,6]. За оцінками, до 10% пацієнтів з ЕНЕС інфекції може розвинути ГУС з коефіцієнтом летальності від 3 до 5%. У всьому світі ГУС є найпоширенішою причиною гострої ниркової недостатності у дітей раннього віку. Це може привести до неврологічних ускладнень (таким як конвульсії, інсульт і кома) у 25% пацієнтів та хронічних захворювань нирок, зазвичай нетяжким, приблизно у 50% тих пацієнтів, що вижили.

У тварин і птахів захворювання протікає у вигляді стійкої діареї з домішкою крові в фекаліях, посліді. Без медикаментозного лікування хвору тварину або птицю чекає летальний результат.

Токсин Шига має кілька варіантів (наприклад, *Stx1*, *Stx2*, *Stx2c*), і діє як токсин рослинного рицину шляхом інгібування синтезу білка в ендотеліальних та інших клітинах. На додаток до токсину Шига, кишкова паличка O157: H7 виробляє безліч інших факторів вірулентності, в тому числі таких білків, які допомагають в здатності колонізації бактерій до кишкової стінки (адгезія) і таких, які можуть викликати лізис еритроцитів і при цьому звільняти залізо, щоб допомогти підтримати метаболізм *E. coli* O157: H7. [4,5]

STEC має свої особливі вірулентності ознаки - здатність виробляти один або декілька Stx-токсини (варіанти *Stx1*, *Stx2* або *Stx2c*). Stx-токсини є токсичними для культивованих епітеліальних клітин товстої кишки і клубової кишки людини і ендотеліальних клітин [9]. Навіть за відсутності цитотоксичності, Stx-токсини можуть стимулювати вироблення вазоактивних факторів ендотеліальними клітинами. Таким чином, здатність виробляти STX, цілком правдоподібно, пов'язані з кишковими і позакишковими проявами інфекцій людини [8]. Дані досліджень підтверджують роль Stx як основної причини виникнення геморагічної діареї у людини. Цікавим є те, що шигели дизентерії, серотип 1, які не мають можливості виробляти STX, викликають негеморагічний понос у мавп (13). Таким чином, дослідники *E. coli* O157:H7 наполегливо закликають розробляти паралельні і взаємодоповнюючі тести, спрямовані на виявлення фенотипів і локусів, якими володіють ці мікроорганізми [9]. На жаль, на даний час в Україні цей небезпечний мікроорганізм дуже мало вивчений, тому даних щодо його розповсюдження та властивостей в нашій країні не має. Не має також і розроблених сучасних методів діагностики *E. coli* O157: H7. Тому проведення досліджень щодо вивчення *E. coli* O157: H7 дуже актуальні.

Висновки

1. Кишкова паличка O157: H7 викликає геморагічну діарею, тому вона класифікується як ентерогеморагічна *E. coli* (ЕНЕС) та відноситься до небезпечних харчових патогенів. Резервуаром даної інфекції є велика рогата худоба, кози і вівці. Більшість спалахів харчових отруєнь людей були пов'язані з живанням яловичого фаршу.

2. Основними факторами патогенності серовару *Escherichia coli* O157:H7 є веротоксини *Stx1* та *Stx2* (або тільки *Stx2*), білок інтимін, відповідальний за адгезію збудника до епітеліальних клітин кишечника, ентерогемолізін і джгутиковий антиген H7.

3. Фактори патогенності *Escherichia coli* O157:H7 визначаються відповідно генами *stx1*, *stx2*, *eae*, *hly* і *flic*. Зазначені гени *Escherichia coli* O157:H7 *stx1*, *stx2*, *hly* і *flic*, відповідальні за синтез соматичного O-антигену є основними генами-мішенями для діагностичних тест-систем ПЛР, що використовуються при ідентифікації вищезазначеного серовару *E. coli*.

Література

1. ISO 22174:2005. Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Полимеразная цепная реакция (ПЦР) для обнаружения патогенных микроорганизмов в пищевых продуктах. Общие требования и определения.
2. Commission decision of 8 June 2001 (2001/471/EC). OJEU L165, 48–53.

3. Heuvelink, A.E., Zwartkruis-Nahuis, J.T.M., van de Biggelaar, F.L.A.M., van Leeuwen, W.J. and de Boer, E. Isolation and characterization of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 from slaughter pigs and poultry. – Int J Food Microbiol №52 – 1999. – P. 67–75.
4. O'Brien A D, Lively T A, Chen M E, Rothman S W, Formal S B. *Escherichia coli* O157:H7 strains associated with haemorrhagic colitis in the United States produce a *Shigella dysenteriae* 1 (SHIGA) like cytotoxin. – Lancet. – 1983. – P.702.
5. Obrig T G. Interaction of Shiga toxins with endothelial cells. In: Kaper J B, O'Brien A D, editors. *Escherichia coli* O157:H7 and other Shiga toxin-producing *E. coli* strains. American Society for Microbiology. 1998. – P. 303–311.
6. Fontaine A, Arondel J, Sansonetti P J. Role of Shiga toxin in the pathogenesis of bacillary dysentery, studied by using a Tox⁻ mutant of *Shigella dysenteriae* 1. Infect Immun. – 1988. №56. – P. 3099–3109.
7. Mathusa E. C., Chen Y., Enache E., and Hontz L. Non-O157 Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* in Foods. Journal of Food Protection. – 2010. -№73, (9). – P.1721–1736
8. McNally, A., Roe, A.J., Simpson, S., Thomson-Carter, F.M., Hoey, D.E., Currie, C., Chakraborty, T., Smith, D.G. et al. Differences in levels of secreted locus of enterocyte effacement proteins between human disease-associated and bovine *Escherichia coli* O157. Infect Immun. – 2001. №69. – P.5107– 5114.
9. 25. Moyer M P, Dixon P S, Rothman S W, Brown J E. Cytotoxicity of Shiga toxin for primary cultures of human colonic and ileal epithelial cells. Infect Immun. – 1987. - №55. P. 1533–1535.
10. Schmidt H., Scheef J., Huppertz H. I., Frosch M., and Karch H. *Escherichia coli* O157:H7 and O157:H⁻ Strains That Do Not Produce Shiga Toxin: Phenotypic and Genetic Characterization of Isolates Associated with Diarrhea and Hemolytic-Uremic Syndrome J Clin Microbiol. – 1999. №37(11). – P. 3491–3496.

МАРКЕРЫ ПАТОГЕННОСТИ *E. COLI* O157: H7 И ОСНОВНЫЕ ГЕНЫ-МИШЕНИ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ЭТОГО МИКРООРГАНИЗМА В ГОВЯДИНЕ ТЕСТ-СИСТЕМОЙ ПЦР

Бергилевич А. Н. д. вет. н. профессор, Касянчук В.В., д. вет. наук, профессор, Ефимова О. Н., аспирант

bergilevich@ukr.net

Сумской национальный аграрный университет, г. Сумы

Аннотация. Обобщены теоретические данные про кишечную палочку O157: H7, которая практически не изучена и не диагностируется в Украине. *E. coli* вызывает геморрагическую диарею и относится к опасным пищевым патогенам. Наиболее часто пищевые отравления вызывает пищевые продукты из говяжьего фарша. Основными факторами патогенности серовара *Escherichia coli* O157:H7 являются веротоксины Stx1 и Stx2 (или только Stx2), белок интимин, энтерогемоллизин и жгутиковый антиген H7. Гены *E. coli* O157:H7 stx1, stx2, hly i flic, являются основными генами-мишенями для диагностических ПЛР-тест-систем для идентификации этого микроорганизма.

Ключевые слова: *E. coli* O157:H7, говядина, гены-мишени, тест-система, ПЦР.

MARKERS TO PATHOGENICITY *E. COLI* O157: H7 AND MAIN-TARGET FOR DIAGNOSTICS OF THIS MICROORGANISM IN BEEF WITH TEST-SYSTEM PLR

Berhilevych O., Doctor of the Veterinary sciences, Professor, Kasianchuk V., Doctor of the Veterinary sciences, Professor, Efimova O., PhD-student

Sumy National Agrarian University, Sumy

Summary. In the article summarizes theoretical data about *E. coli* O157: H7, which has not been studied and is not diagnosed in Ukraine. *E. coli* causes hemorrhagic diarrhea and classified as a dangerous food pathogens. Most often, food poisoning causes food ground beef products. The main factors of pathogenicity serovara *Escherichia coli* O157: H7 are verotoxins Stx1 and Stx2 (or only Stx2), intimin protein, and flagellar antigen enterogemolizin H7. Genes *E. coli* O157: H7 stx1, stx2, hly i flic, yavlyayutsya major target genes for diagnostic PLR-test systems for the identification of this organism.

Key words: *E. coli* O157: H7, beef, target genes, test system, PCR.