

ГЛАВА 3.9.10.

ВЕРОТОКСИКОГЕННАЯ *E. COLI*

РЕЗЮМЕ

В норме кишечная палочка (E. coli) всегда присутствует в желудочно-кишечном тракте животных и человека. Некоторые штаммы настолько эффективно приспособились к среде, что способны вызывать диарею и ряд внекишечных болезней. С 1977 года было установлено, что некоторые вызывающие диарею штаммы E. coli производят токсины, оказывающие необратимое цитопатическое действие на культивируемые клетки Vero. Такие веротоксикогенные E. coli (VT E. coli) принадлежат к свыше 100 различным серотипам. Серотип O157:H7 E. coli представляет собой преобладающий и самый вирулентный серотип в ряду патогенных веротоксикогенных E. coli, именуемый энтерогеморрагическим штаммом E. coli (ЭГ E. coli). Это название связано со способностью данных палочек вызывать геморрагический колит и гемолитико-уремический синдром у людей, производить вероцитотоксины, вызывать побочные поражения клеток эпителия, а также с наличием в них характерной крупной плазмиды. За прошедшие два десятилетия серотип O157:H7 веротоксикогенной E. coli стал серьезной проблемой для всемирного здравоохранения. Другие серологические группы, не относящиеся к типу O157, включая O26, O91, O103, O104, O111, O113, O117, O118, O121, O128 и O145, были связаны со случайными вспышками болезней у людей, а прочие могут быть связаны со спорадическими случаями. Жвачные животные являются основными естественными хозяевами веротоксикогенной E. coli и, как правило, здоровыми носителями этих организмов. Также VT E. coli выделялась в организме свиней, кошек, собак, кур и диких птиц. Крупный рогатый скот считается основным резервуаром O157:H7 E. coli для людей. Несмотря на патогенное действие серотипа O157:H7 E. coli на организм человека, заражение инфекцией животных всегда протекает бессимптомно. В отличие от этого штамма, серологические группы ЭГ E. coli, O26, O111 и O103 могут оказывать патогенное действие, как на людей, так и на животных. Наличие VT E. coli в экскрементах животных создает для данных организмов потенциальную возможность попадания в пищевую цепь через заражение экскрементами молочных продуктов, заражение мяса содержимым кишечника в процессе забоя скота или посредством заражения фруктов и овощей в результате контакта с инфицированным навозом. Также VT E. coli передается через зараженную воду и в результате прямого контакта с инфицированными людьми или животными.

Идентификация возбудителя: *Процедуры диагностики VT E. coli разрабатывались в первую очередь для серотипа O157:H7 E. coli и ориентированы на преодоление проблем, связанных с выделением небольших количеств целевых организмов из комплексных матриц, таких как экскременты животных, пища и клинические образцы. Идентификация серотипа O157:H7 E. coli у животных, являющихся скрытыми носителями, зависит от обогащения образцов экскрементов в жидкой среде, обычно в забуференной пептонной воде, содержащей или не содержащей в качестве добавок ванкомицин, цефсулодин и цефиксим, в течение 6 часов при температуре 37°C, после которого осуществляется иммуномагнитная сепарация с использованием имеющихся в продаже парамагнитных частиц или сфер, покрытых антителами к липополисахариду O157. Сферы со связанными бактериями помещаются в емкости с селективным агаром, обычно агаром МакКонки с 1% сорбита, содержащим цефиксим и теллурид калия, и инкубируются в течение 18 часов при температуре 37°C. С помощью биохимического*

анализа подтверждается, что несорбитные ферментирующие колонии представляют собой *E. coli*, а наличие в них соматического антигена O157 и/или флагеллярного антигена H7 устанавливается при помощи реакции сывоточной агглютинации или реакции латекс-агглютинации. Потенциальная вирулентность для людей подтверждается путем демонстрации факта производства вероцитотоксина с помощью анализа с использованием клеток Vero, твердофазного иммуноферментного анализа (твердофазного ИФА) или реакция агглютинации, а также посредством демонстрации генов, кодирующих вероцитотоксин, с помощью метода полимеразной цепной реакции. Обнаружение VT *E. coli*, не содержащих O157, основано на прямом анализе колоний, проводимом на неселективной твердой среде различными методами, например, иммуноблоттинге или исследования ДНК на предмет производства вероцитотоксина. Различные иммунологические реакции и реакции, основанные на распознавании нуклеиновой кислоты, описывались с целью более быстрой предварительной диагностики VT *E. coli*, и многие комплекты для данных реакций имеются в продаже. Методы фаготипирования и гель-электрофореза в пульсирующем поле широко используются референтными лабораториями для субтипирования VT *E. coli* O157 в целях эпидемиологических исследований.

Серологические реакции: Использование серологических реакций не является обычной практикой при диагностировании VT *E. coli* у животных, однако было продемонстрировано, что крупный рогатый скот, зараженный VT *E. coli*, производит сывоточные антитела к липополисахариду O157, что может быть обнаружено методом твердофазного ИФА.

Требования к вакцинам: В настоящее время не существует вакцин против инфекционных заболеваний, вызываемых VT *E. coli* у животных и людей, однако разрабатываются различные экспериментальные вакцины.

А. ВВЕДЕНИЕ

В норме кишечная палочка (*E. coli*) всегда присутствует в желудочно-кишечном тракте животных и человека. Некоторые штаммы настолько эффективно приспособились к среде, что способны вызывать диарею и ряд внекишечных болезней. *E. coli* обычно характеризуется методом серологической идентификации соматического антигена O, флагеллярного антигена H и капсульного антигена K. Тем не менее, в то время как некоторые серотипы имеют тесную взаимосвязь с определенными клиническими синдромами, дифференциация патогенных штаммов среди нормальной микрофлоры зависит от идентификации вирулентных характеристик. С 1977 года было установлено, что некоторые вызывающие диарею штаммы *E. coli* производят токсины, оказывающие необратимое цитопатическое действие на культивируемые клетки Vero (Konowalchuk *et al.*, 1977). Было продемонстрировано, что такая веротоксикогенная *E. coli* (VT *E. coli*) принадлежит к свыше 100 различным серотипам (Johnson *et al.*, 1996a; Strockbine *et al.*, 1998). Также данная палочка описывается как *E. coli*, производящая токсин Шига (ТШ *E. coli*), что связано со схожестью между вероцитотоксинами (VT) и токсинами Шига (ТШ), производимыми дизентерийной палочкой (*Shigella dysenteriae*) (O'Brien & Laveck, 1983). За прошедшие два десятилетия серотип O157:H7 веротоксикогенной *E. coli* стал серьезной проблемой для всемирного здравоохранения. Серотип O157:H7 *E. coli* представляет собой преобладающий и самый вирулентный серотип в ряду патогенных веротоксикогенных *E. coli*, именуемый энтерогеморрагическим штаммом *E. coli* (ЭГ *E. coli*). Это название связано со способностью данных палочек вызывать геморрагический колит и гемолитико-уремический синдром у людей, производить вероцитотоксины, вызывать побочные поражения клеток эпителия, а также с наличием в них характерной крупной плазмиды (Nataro & Karer, 1998). Другие серотипы, не относящиеся к O157, включая O26:H11,

O104:H21, O111:H– and O145:H–, были связаны со случайными вспышками болезни у людей, а другие – со спорадическими случаями заболевания (Johnson *et al.*, 1996a).

Жвачные животные являются основными естественными хозяевами ВТ *E. coli* и, как правило, здоровыми носителями этих организмов. Также ВТ *E. coli* выделялась в организме свиней, кошек, собак, кур и диких птиц; эти виды могут быть кратковременно колонизироваться микроорганизмами (Beutin *et al.*, 1993; Johnson *et al.*, 1996a). Исследования показали, что штаммы O157 в норме составляют меньшинство среди ВТ *E. coli*, колонизирующих кишечный тракт животных. Наличие ВТ *E. coli* в экскрементах животных создает для данных организмов потенциальную возможность попадания в пищевую цепь через заражение экскрементами молочных продуктов, заражение мяса содержимым кишечника в процессе забоя скота или посредством заражения фруктов и овощей в результате контакта с инфицированными навозом. Также ВТ *E. coli* передается через зараженную воду и в результате прямого контакта с инфицированными людьми, животными или экскрементами животных. Зараженная вода, используемая для полива или мытья овощей, также может являться источником заражения людей и животных. Крупный рогатый скот считается основным резервуаром штамма O157:H7 *E. coli* для людей, хотя этот микроорганизм выделяли и в организме различных используемых в сельском хозяйстве животных, лошадей, собак, кроликов, птиц и мух. Несмотря на свою способность вызывать тяжелое заболевание у человека (Paton & Paton, 1998), заражение животных штаммом O157:H7 *E. coli* всегда протекает бессимптомно. Некоторые серотипы, не содержащие антиген O157, тем не менее, являются патогенными для животных и человека, включая O26:H11; O103:H2; O111:H– (Bettelheim, 2000; Johnson *et al.*, 1996a).

ВТ *E. coli* также связана с развитием отечной болезни у поросят, и четыре серотипа данной палочки являются причиной большинства вспышек этой болезни во всем мире. Этими серотипами являются O45:K+, O138:K81, O139:K82 и O141:K–. Главными факторами вирулентности являются фимбриальный адгезин, F18, участвующий в процессе образования колоний, токсин VT2e, являющийся причиной развития клинических проявлений болезни. Была продемонстрирована высокая степень генетического родства между штаммами O101 генов stx2e человека и свиньи. Роль свиней как скрытых носителей ТШ *E. coli* в эпидемиологии болезни человека нуждается в дальнейшем исследовании.

Поскольку *E. coli* O157:H7 стала преобладающей ВТ *E. coli*, были разработаны методы диагностики для селективного обнаружения этого серотипа у человека в клинических случаях (Strockbine *et al.*, 1998), а также в источниках пищи (Vernozy-Rozand, 1997). Для последнего случая существует утвержденный и соответствующий международному стандарту метод обнаружения (EN ISO 16654:2001). Тем не менее, в этой главе делается акцент на выделении O157 и других ВТ *E. coli* в организме животных-носителей (Clifton-Hadley, 2000)

В. ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

1. Идентификация возбудителя болезни

1.1. Образцы

В большинстве случаев образцы, взятые у животных с целью выделения ВТ *E. coli*, являются экскрементами, собранными в целях проведения исследований или как часть отслеживаемого эпидемиологического исследования, проводящегося после вспышки болезни у людей. Образцы могут быть взяты из прямой кишки, из свежих экскрементов на ферме или из содержимого кишечника после убоя. Различные ВТ *E. coli* присутствуют в организме здоровых животных, но не все из них считаются патогенными для человека. *E.*

coli O157:H7, являющаяся наиболее значимой среди ВТ *E. coli*, способствующих развитию болезни у человека, переносится животными бессимптомно. Крупный рогатый скот является самым главным резервуаром этого серотипа. Наличие палочки выявляется только у определенной доли животных в зараженном стаде; микроорганизм обычно присутствует у носителей в небольшом количестве и периодически выводится с экскрементами. На выведение микроорганизма влияет возраст животного, диета, наличие стресса, плотность популяции, географическое положение и время года (Meyer-Broseta *et al.*, 2001). Считается, что некоторые животные в непропорциональной мере участвуют в передаче инфекции, и по этой причине они были объединены под термином «суперраспространители» (Matthews *et al.*, 2006). Высеваемость может быть улучшена путем взятия образцов экскрементов предпочтительно с помощью ректальных мазков, путем увеличения размера образцов, путем увеличения числа особей, у которых берутся образцы, а также путем повторного забора образцов. Имеются сообщения о том, что использование ректо-анальных мазков со слизистой оболочки повышает эффективность обнаружения колонизированных животных как отличающихся от временного зараженных особей крупного рогатого скота (Rice *et al.*, 2003). Необходимо соблюдать меры предосторожности во избежание перекрестного заражения образцов в процессе транспортировки и в лаборатории. Образцы необходимо хранить в прохладных условиях и культивировать в кратчайшие сроки после сбора.

1.2. Безопасность

Во время манипуляций с ВТ *E. coli*-положительными образцами необходимо соблюдать осторожность, поскольку инфицирующая доза, способная вызвать тяжелое заболевание у человека, может быть низкой (возможно, 100 микроорганизмов в случае с ВТ *E. coli* O157:H7); также сообщалось о случаях внутрилабораторной инфекции (см. главу 1.1.4 *Биобезопасность и биосохранность: Стандарты управления биологическим риском в ветеринарной лаборатории и помещениях для содержания животных*).

1.3. Выделение

1.3.1. Жидкая среда обогащения

В соответствии со стандартной методикой, клинические образцы высеваются непосредственно на твердую среду с целью выделения *E. coli*, однако количество целевых ВТ *E. coli* в экскрементах, полученных у здоровых носителей, обычно является низким, и обогащение в жидкой среде повышает эффективность выделения микроорганизмов. Обычно в качестве среды обогащения используется забуференная пептонная вода, которая либо не содержит никаких добавок (что позволяет повысить эффективность выделения), либо содержит 8 мг/литр ванкомицина, 10 мг/литр цефсулодина и 0,05 мг/литр цефиксима (BPW-VCC), добавляемых с целью подавления роста грамположительных микроорганизмов, аэромонад (*Aeromonas*) и бактерий протеус (*Proteus*); модифицированный триптиказо-соевый бульон (мТСБ) с добавлением 20 мг/литр новобиоцина или 10 мг/литр акрифлавина с целью снижения роста грамположительных микроорганизмов; или модифицированный бульон с *E. coli* с добавлением 20 мг/литр новобиоцина (mEC+n). При температуре 44°C наблюдается очень слабый рост ЭГ *E. coli*. Оптимальными условиями инкубации коровьих экскрементов, необходимыми для минимизации чрезмерного роста других организмов, являются 6 часов при температуре 37°C. Обогащение образцов мяса осуществляется в течение 6 часов при температуре 41–42°C, а воды и молочных продуктов – в течение 24 часов при температуре 41–42°C. Неселективное предварительное обогащение необходимо для эффективного выделения

небольшого количества подвергшихся стрессу *E. coli* O157. Обогащенные бульоны должны быть предварительно нагреты во избежание переохлаждения организмов и замедления их начального роста; если микроорганизмы находятся в состоянии стресса, 24-часовая инкубация может повысить эффективность выделения.

1.3.2. Иммуномагнитная сепарация

Иммуномагнитная сепарация (ИМС) используется в качестве техники селективной концентрации с целью повышения эффективности выделения *E. coli* O157:H7 в тех случаях, когда количество организмов является низким (Charman *et al.*, 1994). Имеющиеся в продаже парамагнитные частицы или сферы, покрытые антителом к липополисахариду (ЛПС), смешиваются с аликвотой инкубированного бульона. Сферы со связанными бактериями отделяются от надосадочной жидкости с помощью магнитного поля и после промывки высеваются в селективный агар и инкубируются в течение 18 часов при температуре 37°C с целью выделения потенциальных колоний. Данная техника ориентирована на определенные серологические группы. В продаже имеются системы для ручной или автоматической сепарации (Charman & Cudjoe, 2001). На эффективность выделения может повлиять соотношение между количеством сфер и организмов (оптимальным соотношением является соотношение 3:1), используемый обогащенный бульон и проблема неспецифической адсорбции *E. coli* магнитными сферами (которая может быть снижена с помощью раствора низкой ионной силы во время выполнения процедуры ИМС и осторожного промывания). Эти факторы необходимо принимать во внимание во время осуществления попыток максимизировать чувствительность техники по определению целевой *E. coli*.

1.3.3. Селективная культура для *E. coli* O157

Не существует биохимических характеристик, отличающих большинство веротоксикогенных *E. coli* (ВТ *E. coli*) от других видов *E. coli*. Несмотря на это, неспособность большинства штаммов *E. coli* O157:H7 быстро ферментировать D-сорбит, а также их недостаточная бета-глюкуронидазная деятельность могут использоваться для выделения и идентификации этих микроорганизмов. Тем не менее, менее распространенные варианты, способные ферментировать сорбит и бета-глюкуронидаза-положительные варианты *E. coli* O157:H (неподвижные по причине недостаточности экспрессии антигена H7), не могут быть идентифицированы путем выделения в таких селективных средах, выбранных для этих биохимических характеристик (Karch & Wielaszewska, 2001). Агар МакКонки, содержащий 1% D-сорбита вместо лактозы (SMAC) является полезной и недорогой средой, в которой *E. coli*, не ферментирующие сорбит, создают небольшие круглые серовато-белые колонии. Селективная способность повышается путем добавления 0,5% рамнозы, а добавление 0,05 мг/литр цефиксима (CR-SMAC) замедляет чрезмерное размножение бактерии протейс (*Proteus*). В то время как меньшее число предполагаемых колоний требует проведения испытания в этой среде, рамноза является дорогостоящей добавкой. В качестве альтернативы может быть добавлено 2,5 мг/литр теллурита калия вместе с цефиксимом (CT-SMAC), оказывающим более значительное замедляющее действие на *E. coli*, не содержащие O157, и другие несорбитные ферменты, такие как *Aeromonas*, *Plesiomonas*, *Morganella* и *Providencia*, чем на *E. coli* O157 (O'Brien & Laveck, 1983). В настоящее время данная среда является наиболее часто используемой средой для выделения *E. coli* O157.

Среды, содержащие флуорогенные или хромогенные глюкурониды используются для идентификации *E. coli* O157:H7, не производящей бета-глюкуронидазу среди *E. coli*, производящих бета-глюкуронидазу. Гидролиз 4-метилумбеллиферил-бета-D-глюкуронида

(МУГ) в результате бета-глюкуронидазной деятельности способствует производству флуоресцентного соединения, видимого в ультрафиолетовом свете. Добавление 0,1 г/литр 5-бromo-4-хлоро-3-индоксил-бета-D-глюкуронида (БХТГ) в SMAC позволяет дифференцировать белые колонии *E. coli* O157:H7 среди зелено-синих колоний сорбит-отрицательных, бета-глюкуронидаза-положительных организмов. Имеющиеся в продаже хромогенные и флуорогенные среды можно найти по ссылкам в каталогах сред. В то время как преимуществами использования добавок являются повышение селективности сред относительно *E. coli* O157:H7, на высеваемость, в частности, организмов, оказавшихся под воздействием стресса, добавки могут оказывать негативное воздействие. С целью смягчения такого негативного воздействия, добавление выделяющих агентов, таких как 1% пируват натрия в триптонно-соевый агар или обеспечение отсроченного воздействия на подвергшиеся стрессовому воздействию клетки селективных агентов может повысить эффективность процедуры выделения микроорганизмов и упростить ее (Blackburn. & McCarthy, 2000).

Сорбит-ферментирующая (СФ) *E. coli* O157:H выделялась в организме пациентов с диареей и гемолитико-уремическим синдромом (ГУС), однако эпидемиология этой инфекции понимается плохо, и только в редких случаях удавалось выделить эту палочку в организме животных, включая крупный рогатый скот (Lee & Choi, 2006). Большинство изолятов СФ *E. coli* O157:H восприимчивы к теллуриду и не могут быть идентифицированы on CT-SMAC. Микробиологический анализ этих организмов является трудоемкой процедурой и требует высеваания организмов, отделенных с помощью ИМС, в SMAC и испытания отдельных СФ-колоний методом латекс-агглютинации с целью обнаружения антигена O157. В качестве альтернативы, образцы колоний могут испытываться методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) на наличие в них *vt2*, *eae*, *rfbO157* и *sfpA* (см. ниже). Достаточно дистанцированные колонии среди колоний с положительными показателями роста, установленными методом ПЦР, затем испытываются методом гибридизации колоний с анализом на наличие *vt2*, *eae* и *sfpA* или методом иммуноблота колоний с использованием специфического антитела (Karch & Bielaszewska, 2001; Lee & Choi, 2006).

1.3.4. Выделение другой веротоксигенной *E. coli*

Не содержащие O157 ВТ *E. coli* хорошо растут в среде, позволяющей рост *E. coli*, такой как кровяной агар или агар МакКонки, и большинство микроорганизмов может быть только дифференцировано среди других *E. coli* по их способности производить веротоксин. Большое число различных серотипов ВТ *E. coli* препятствует использованию O-антисыворотки для регулярного скрининга и предварительной идентификации колоний в этих средах. ИМС может использоваться для селективной концентрации серологических групп O26, O103, O111 и O145 из предварительного обогащенного образца, как и в случае со штаммами O157. Эти серологические группы представляют собой не содержащие O157 ВТ *E. coli*, которые наиболее часто связаны с болезнью людей, а необходимые сферы в настоящее время имеются в продаже.

Неспособность штаммов O26 ферментировать рамнозу привела к недавнему созданию сред, которые могут оказаться полезными для дифференцирования O26 *E. coli* среди других кишечных микроорганизмов. Первой такой средой является агар МакКонки с рамнозой (АМКР), в котором лактоза в среде МакКонки замещена 10 г/литр рамнозы. Сообщается о том, что добавление 2,5 мг/литр теллурита калия и 0,05 мг/литр цефиксима (СТ-RMAC) повышают специфичность. Второй средой является а хромогенный рамнозный агар, включающий в себя 10 г/литр рамнозы и 0,02 г/литр фенолового красного в агаре кишечной палочки (среда-индикатор активности бета-галактоидазы), в который

добавляется 0,5 мг/литр теллуриата калия и 0,05 мг/литр цеффиксима. Согласно сообщениям, в этой среде колонии O26 имеют цвет от темно-синего до черного, другие серотипы *E. coli* имеют зеленый цвет, а энтеробактерии, за исключением *E. coli*, имеют зеленый, желтый цвет или бесцветны. Одним потенциально полезным маркером вирулентности для VT *E. coli* является производство энтерогемолизина, являющееся причиной гемолиза отмытых овечьих эритроцитов после их инкубации на протяжении ночи в кровяном агаре с добавлением кальция. Этой характеристикой обладает 90% производящих веротоксины *E. coli*, выделенных в организме инфицированных людей. Тем не менее, вывод о том, что доля болезнетворных VT *E. coli* может быть отрицательной с точки зрения производства энтерогемолизина, снижает ценность энтерогемолизинного агара как экрана.

Вследствие этого, в большинстве случаев изоляция VT *E. coli* опирается на прямой анализ колоний на планшетах методом иммуноблота или исследование ДНК на предмет производства VT с целью идентификации колоний для их дальнейшей характеристики. Колонии сначала реплицируются таким образом, чтобы положительные колонии могли быть выделены после испытания репликатов. Колонии могут блотироваться на соответствующих мембранах (из нитроцеллюлозы или нейлона), на которых они реплицируются или переносятся на 96-луночные микротитрационные планшеты, содержащие бульон для репликации, перед переносом аликвот на определенные фильтры. Затем осуществляется анализ колоний с использованием зондов на основе нуклеиновой кислоты или антител с целью идентификации любых VT *E. coli* (Strockbine *et al.*, 1998). Был разработан иммуноблотный анализ с использованием митомицина для определения наличия VT *E. coli* в экскрементах, который был достаточно простым для использования его в стандартных диагностических лабораториях (Hull *et al.*, 1993). Последовательные разведения экскрементов в бульоне инокулируются на планшетах в агаре МакКонки и инкубируются в течение ночи при температуре 37°C. Используя стандартные методы чашечных отпечатков (чашечные методы реплик), выращиваемые микроорганизмы с планшета, содержащего приблизительно 200 колоний, переносятся на два нитроцеллюлозных фильтра с диаметром пор 0,45 мкм, помещенных в агар Синказа с добавлением 25 нг митомицина/мл. Эта среда способствует вегетативному росту бактериофагов, переносящих гены VT, и усиливает экспрессию токсина. (В качестве альтернативы, можно поместить суспензии из бактерий или экскрементов непосредственно на фильтры.) Планшеты инкубируются в течение ночи при температуре 37°C. После роста в течение ночи фильтры удаляются с планшетов, на 15 минут погружаются в ванну с хлороформом, затем блокируются на 1 час 5% нежирным молоком в 10 мМ Трис, 150 мМ NaCl и 0,05% эмульгатора Твин (pH 8) (ТНТ). Фильтры инкубируются в течение 1 часа в антисыворотках к VT1 или VT2, затем производится три 5-минутных промывания фильтров в ТНТ, после чего они инкубируются в течение 1 часа с антииммуноглобулином G, конъюгированным щелочной фосфатазой; затем производится еще три 5-минутных промывания в ТНТ. Любая реакция визуализируется с помощью цвета, производимого нитросиней и 5-бromo-4-хлоро-3-индолил-фосфатазой. VT1-, VT2- и VT-отрицательные контрольные *E. coli* испытываются параллельно. Использование поликлональных антител приводит к возникновению ряда ложноположительных реакций, которые нейтрализуются с помощью моноклональных антител. При сравнении исследования ДНК с иммуноблотным анализом колоний с использованием митомицина было продемонстрировано, что их результаты являются сопоставимыми. Преимущество иммуноблотного анализа заключается в большей простоте его выполнения в сравнении с исследованием ДНК. Чаши с митомицином имеют длительный срок хранения при условии их хранения в темном помещении при температуре 4°C.

Иммуноблотный анализ или исследование (зондирование) колоний являются трудоемкими методами и могут с большей эффективностью использоваться для анализа образцов, в результате скрининга которых было показано, что они являются положительными в присутствии ВТ или генов ВТ, при помощи, например, твердофазного иммуноферментного анализа (твердофазного ИФА) или ПЦР.

1.4. Идентификация и характеристика потенциальных колоний

Тот факт, что выращиваемые в твердой среде колонии, являющиеся потенциальными колониями ВТ *E. coli*, являются *E. coli*, должен быть подтвержден биохимическим или генотипическим (например, с помощью ПЦР с использованием *антител к декарбоксилазе глутаминовой кислоты*) методами. Соматический «О» и флагеллярный «Н» антигены идентифицируются серологически. Не все ВТ *E. coli*, выделенные в организме животных, считаются патогенными для людей. Некоторые *E. coli* O157, выделенные, в частности, в организме свиней, не являются вероцитотоксикогенными и патогенными для человека. Диагноз, таким образом, должен включать в себя демонстрацию известных факторов вирулентности в выделенных микроорганизмах. Данные факторы включают в себя вероцитотоксины VT1 (Stx1) и VT2 (Stx2), а также их гены и наружный адгезивный белок мембраны, связанный с возникновением поверхностных поражений, а также интимин, кодируемым геном *eae* (Law, 2000). Методы субтипирования, необходимые для проведения эпидемиологических исследований и применимые к штаммам ВТ *E. coli* O157, имеются в референтных лабораториях.

1.4.1. Биохимические реакции

ВТ *E. coli* биохимически схожи с другими *E. coli*. Штаммы ВТ *E. coli* O157:H7 отличаются неспособностью ферментирования сорбита, неспособностью производить бета-глюкуронидазу и ферментировать рафинозу и дульцит. *E. coli* можно отличить от палочки *E. hermannii* по недостаточному росту в присутствии цианида калия, а также по неспособности ферментировать целлобиозу. Палочка *Escherichia hermannii* показывает положительный результат в обоих испытаниях. Девяносто восемь процентов штаммов *E. hermannii* имеют характерную желтую окраску в питательном агаре, которая отсутствует у ВТ *E. coli*. *E. coli* можно сравнить путем демонстрации активности триптофана и бета-галактозидазы (см. ниже) или с помощью имеющихся в продаже индикаторных полосок для биохимических проб.

1.4.2. Серологические реакции

В продаже имеются латексные комплекты для идентификации O157, O26, O91, O103, O111, O128, O145 и H7. Испытания должны проводиться в соответствии с инструкциями производителя и должны включать в себя положительные и отрицательные контрольные организмы, а также контрольный латекс. Предварительный диагноз также может проводиться с использованием реакции агглютинации на предметном стекле или в пробирке с помощью антисыворотки к О LPS (имеются антисыворотки к антигенам 181 О). Было продемонстрировано, что антисыворотка O157 вступает в перекрестные реакции с другими организмами, включая *E. hermannii* (часто обнаруживаемой в пище), *Salmonella* O группы N, *Yersinia enterocolitica* серотипа O9 и *Citrobacter freundii*, что говорит о необходимости подтверждения того факта, что потенциальные колонии ВТ *E. coli* относятся к *E. coli*. Выделенные микроорганизмы могут испытываться на наличие флагеллярного антигена (выработалась антисыворотка к антигенам 56 Н), однако это может потребовать пассажа через среду для определения подвижности. Некоторые патогенные микроорганизмы являются неподвижными.

1.4.3. Производство вероцитотоксина в анализе с использованием клеток Vero

Анализ с использованием клеток Vero продолжает оставаться стандартным методом подтверждения факта производства ВТ (см. ниже). Клетки Vero имеют высокую концентрацию токсин-связывающих рецепторов глоботриаозилцерамида (Gb3) и глоботетраозилцерамида (Gb4) в мембранах плазмы и обычно могут определять все варианты ВТ. Испытания могут проводиться на суспензиях экскрементов, фильтрах культур или на живых культурах. В смешанных культурах, содержащихся в экскрементах, чувствительность методов анализа повышается путем добавления в суспензию полимиксина В или митомицина с целью высвобождения связанного с клетками токсина. В то время как данный метод испытания является высокочувствительным, он недоступен для большинства стандартных диагностических лабораторий. Метод является трудоемким, и для получения результатов может потребоваться 3–4 дня после инокуляции культуры клеток. В тех случаях, когда средства, необходимые для проведения испытаний с использованием тканевых культур, недоступны, для определения факта производства ВТ могут использоваться другие методы, включая твердофазный ИФА или агглютинацию, а с помощью ПЦР можно обнаружить гены *vt*. В настоящее время доступны все комплекты для применения данных методов.

1.4.4. Субтипирование *E. coli* O157 для проведения эпидемиологических исследований

В референтных лабораториях имеется множество разнообразных методов, помогающих установить различие между штаммами *E. coli* O157:H7, что позволяет различать болезни во время эпидемиологических исследований вспышек заболеваемости людей (Hopkins & Hilton, 2000; Strockbine *et al.*, 1998). Эти методы различаются по своей технической сложности, и для надлежащей дифференциации болезней требуется использовать более одного метода. Данные методы включают в себя фаготипирование, биотипирование и испытания на чувствительность к противомикробным препаратам (при необычно высокой устойчивости, демонстрируемой штаммами из различных стран мира), профилирование плазмиды, анализ полиморфизма длин рестрикционных фрагментов, риботипирование, метод гель-электрофореза в пульсирующем поле (ГЭПП) и различные методы анализа, основанные на ПЦР (метод случайной амплификации полиморфной ДНК; ПЦР элементов ДНК с повторяющимися последовательностями; анализ полиморфизма длины амплифицированных фрагментов). Среди указанных методов широко используются только фаготипирование и ГЭПП. Несмотря на некоторые сложности с интерпретацией профилей, ГЭПП стал стандартным методом, используемым референтными лабораториями системы здравоохранения для субтипирования ВТ *E. coli* O157 благодаря высокому уровню демонстрации различий (дифференциации), высокой точности и воспроизводимости. Данный метод используется сетью лабораторий «Pulsenet», применяющей стандартизированный метод ГЭПП, позволяющий сравнивать обзорные пептидные хроматограммы, хранящиеся в электронной базе данных Санитарно-эпидемиологических центров США (<http://www.cdc.gov/pulsenet/>). Действующая на территории Евросоюза система «Enter-net», предназначенная для исследования микроорганизмов *Salmonella* и ВТ *E. coli* основана, главным образом, на фаготипировании и субтипировании штаммов *E. coli* O157:H7. Метод субтипирования генов интимина и ВТ зарекомендовал себя как ценный метод эпидемиологических исследований и установления источника (Beutin *et al.*, 2004; 2007). Методы субтипирования серотипов, не содержащих O157, исследованы менее основательно, однако к ним могут применяться аналогичные молекулярные подходы, применяемые к ВТ *E. coli* O157.

1.5. Некультуральные методы обнаружения ВТ *E. coli*

Хотя окончательная диагностика наличия ВТ *E. coli* основана на выделении и характеристике чистых культур, культуральные методы обнаружения ВТ *E. coli* являются времязатратными и трудоемкими. Это обстоятельство привело к разработке целого ряда иммунологических испытаний и испытаний (тестов) на гибридизацию нуклеиновой кислоты, используемых для быстрой идентификации антигенов О и Н, ВТ или генов, связанных с производством ВТ в образце. Поскольку данные испытания имеют предельный уровень обнаружения, превышающий значения, при которых целевые микроорганизмы присутствуют в экскрементах при нормальных условиях, необходим этап обогащения (предпочтительно неселективного обогащения с целью выделения поврежденных или подвергшихся стрессовому воздействию бактерий), позволяющий повысить данные значения перед проведением испытаний.

1.5.1. Иммунологические методы

Иммунологические (иммунохимические) анализы для идентификации антигенов О и Н и ВТ могут использоваться с целью подтверждения наличия идентифицированных микроорганизмов, выделенных в клинических образцах, образцах пищи или образцах из окружающей среды, в то время как другие методы, включая технологии с использованием индикаторных полосок и мембран, микропланшетные анализы, иммуноблоттинг колоний, иммунофлюоресценцию и твердофазный ИФА, используются в качестве методов быстрого установления факта наличия потенциальных патогенов в образцах перед процедурой выделения, что позволяет сократить время, необходимое для предварительной диагностики. Большинство анализов на наличие соматических и флагеллярных антигенов разработано с целью обнаружения флагеллярных антигенов O157 LPS и H7. Преимуществом анализов на наличие токсинов является возможность обнаружения всех ВТ *E. coli*. Комплекты для осуществления иммунохимических анализов на наличие ферментов для обнаружения O157 и ВТ, визуальных иммунохимических анализов на обнаружение O157 и реакций агглютинации для обнаружения O157, H7 и ВТ имеются в продаже (De Boer & Neuveldink, 2001; Clifton-Hadley, 2000; Nataro & Kaper, 1998; Strockbine *et al.*, 1998). Не все методы утверждены для проведения анализов с использованием экскрементов. Также доступны реагенты специального назначения, в которых антитела к липополисахариду O157 соединены с флюоресцеином, пероксидазой или фосфотазой. Наиболее часто используемым методом среди иммунохимических анализов на обнаружение ферментов является сэндвич-анализ. Антитело связывается с поверхностью носителя, что позволяет улавливать специфический антиген ВТ *E. coli*. После добавления соответствующего субстрата второе антитело с ферментной меткой связывается с этим антигеном и производит цветную реакцию. Комплекты для осуществления анализов утверждены вместе со специальными протоколами предварительного обогащения и реагентами, обеспечивающими воспроизводимость результатов. В некоторых случаях используются образцы, прошедшие температурную обработку, благодаря чему повышается безопасность испытания, а иногда осуществляется внедрение системы автоматической обработки, позволяющей осуществлять скрининг большого числа образцов. Другие исследователи/лаборанты используют твердофазный ИФА, разработанный для исследования колоний на наличие антигена O157. Преимущество имеющихся в продаже комплектов заключается в простоте проведения анализов в условиях стандартных лабораторий. Все анализы и испытания должны проводиться в соответствии с инструкциями производителей. Недостатком комплектов, утвержденных для анализа образцов пищи и туш животных или клинических образцов материалов человека, может являться слишком низкая чувствительность, недостаточная для анализа образцов экскрементов животных. Иммунологические анализы позволяют получить

только предварительный результат, который должен быть подтвержден путем выделения и характеристик микроорганизмов, производящих антиген O157 или токсин. Ассортимент имеющихся в продаже комплектов постоянно меняется, и Референтные лаборатории МЭБ должны предоставлять самую последнюю информацию, касающуюся диагностических комплектов, утвержденных для использования.

1.5.2. Методы распознавания нуклеиновой кислоты

i) *Анализы методом гибридизации колоний*

Гибридизация колоний является полезным средством обнаружения ВТ *E. coli* в смешанных культурах для ее последующей характеристики. ДНК-пробы (ДНК-зонды) и синтетические олигонуклеотиды, меченные дигоксигенином или биотином, имеются в продаже и, таким образом, подходят для их использования в условиях стандартных диагностических лабораторий. Описаны анализы для обнаружения генов *VT* и плазмиды 60 MDa в *E. coli* O157, а также гена *eae*, как отдельно, так и в различных комбинациях (Nataro & Kaper, 1998; Paton & Paton, 1998; Strockbine *et al.*, 1998). Анализы методом гибридизации обладают более низкой чувствительностью при обнаружении ВТ *E. coli* в бульонных культурах или в экстракте экскрементов.

ii) *ПЦР для обнаружения генов ВТ и других маркеров вирулентности*

В литературе имеется описание многих ПЦР, используемых с целью обнаружения вариантов генов *VT1*, *VT2* и *VT2* (Nataro & Kaper, 1998; Paton & Paton, 1998; Strockbine *et al.*, 1998). Несколько из данных методов ПЦР с типированием токсинов в недавнем времени сравнивались (Ziebell *et al.*, 2002). Демонстрация генов, связанных с производством ВТ не является подтверждением экспрессии гена и, таким образом, производства токсина. ПЦР может использоваться для анализа чистых или смешанных культур на твердой среде или бульонных культур, а также экстрактов пищи или экскрементов. Также данный метод может использоваться для обнаружения генов в нежизнеспособных организмах. Наряду со своей ролью в диагностике, метод ПЦР имеет необходимый потенциал для его использования в скрининге образцов с целью обнаружения ВТ *E. coli* при проведении эпидемиологических исследований. Амплификация генов-мишеней (целевых генов) в экстрактах бактериальной ДНК, полученных из экскрементов, является менее эффективной, чем амплификация генов-мишеней в чистых культурах, и для повышения чувствительности метода требуется тщательная подготовка образца. Экскременты содержат неспецифические ПЦР-ингибиторы, и ни один из существующих методов их удаления не является идеальным. Повышение чувствительности метода осуществляется путем неселективного обогащения перед проведением анализа, однако его чувствительность остается более низкой, чем в случае с использованием ИМС и более низкой, чем чувствительность реакции цитотоксичности с использованием клеток Vero. Комплекты для выполнения данных анализов имеются в продаже.

ДНК-пробы, анализы методом ПЦР и микроматричные анализы были разработаны также с целью обнаружения других генов в ВТ *E. coli*, демонстрирующих связь с вирулентностью для человека, включая *eae* (ген, кодирующий интимин), *ehx* (ген, кодирующий производство энтерогемолизина), *fliC* (ген, кодирующий антиген H7), O157 *rfb* (ген, кодирующий липополисахарид O157), *uidA* (мутантный ген глюкуронидазы в бета-глюкуронидаза-отрицательной *E. coli* O157:H7) и *katP* (ген, переносимый кропной плазмидой *E. coli* O157:H7, кодирующий новую каталазу и пероксидазу) (Bekal *et al.*, 2003; Nataro & Kaper, 1998; Paton & Paton, 1998; Strockbine *et al.*, 1998). С целью

одновременного обнаружения нескольких генов был разработан целый ряд различных мультиплексных анализов. Эти анализы представляют ценность при характеристике чистых культур. В смешанных популяциях бактерий в образцах пищи или экскрементов они могут использоваться для идентификации образцов, к которым должны применяться процедуры выделения.

1.6. Скрининг экскрементов с целью обнаружения *E. coli* O157:H7

E. coli O157:H7 представляет собой ВТ *E. coli*, представляющую высочайшую угрозу для здоровья в большинстве стран мира. Наличие этой палочки в кишечнике здоровых животных-носителей, в частности, крупного рогатого скота, создает источник прямого и опосредованного заражения людей. Метод скрининга основан на культуральных техниках, разработанных с целью преодоления существующих проблем, связанных с выделением небольшого числа организмов, возможно находящихся в стрессовом состоянии, в конкурирующей флоре, вслед за которым осуществляется идентификация предполагаемых колоний и демонстрация известных характеристики вирулентности. Эти методы используются и в настоящее время. Ниже приводится описание данных методов, на регулярной основе используемых одной национальной ветеринарной лабораторией. Во избежание заражения людей необходимо соблюдать соответствующие меры предосторожности (см. главу 1.1.4).

1.6.1. Предварительное обогащение

- i) Транспортировка образцов экскрементов должна осуществляться в стерильных, герметичных, закрытых контейнерах при температуре 4°C, и данные образцы должны культивироваться в кратчайший срок, предпочтительно, в течение 2 часов после их сбора. Экскременты, которые предполагается хранить в течение длительного времени, должны быть заморожены при температуре -70°C.
- ii) Разведите экскременты в 1/10 подогретой забуференной пептонной воды (ЗПВ) в контейнере с соответствующей маркировкой.
- iii) Инкубируйте образцы при температуре 37°C ± 2°C в течение 6 часов.
- iv) Включите в анализ положительные и отрицательные контрольные культуры.

1.6.2. Иммуномагнитная сепарация

- i) Используемый комплект для анализа Dynabeads® anti-*E. coli* O157 product 710.04 (производства компании Dynal Biotech, ASA, Осло, Норвегия) отвечает требованиям Французской ассоциации по стандартизации (AFNOR) (идентификационный номер документа: 16/02-0696 и 10167). Данный метод указан в Руководстве по проведению бактериологических анализов Управления по контролю пищевых продуктов и лекарственных средств США, внесен в Перечень методов анализа Министерства здравоохранения Канады, и является официальным методом анализа Министерства здравоохранения Японии.
- ii) Следуя инструкциям производителей, выполните иммуномагнитную сепарацию (ИМС) предварительно обогащенных образцов, используя ручной метод (MIMS) или автоматический метод (AIMS). Необходимо соблюдать осторожность при смешивании сфер перед использованием во избежание перекрестного загрязнения подготовленных

пробирок. При использовании ручного метода необходимо строго соблюдать инструкции по аккуратной промывке комплексов, состоящих из сфер и бактерий.

iii) По завершении заключительного этапа промывки с помощью микропипетки перенесите 50 мкл каждой суспензии из сфер и бактерий в маркированную емкость с агаром МакКонки с сорбитом, содержащим цефиксим и теллурид калия (CT-SMAC) (Zadik *et al.*, 1993), принимая соответствующие меры по предотвращению перекрестного загрязнения.

iv) С помощью стерильного тампона нанесите каплю суспензии на площадь поверхности предметного стекла, составляющую от одной трети до половины всей площади поверхности, осуществляя разделение комплексов. Используя стерильную петлю объемом 10 мкл, осуществляйте дальнейшее разведение комплексов из сфер и бактерий на одной четвертой площади поверхности, нанося суспензию под прямым углом к площади предыдущего нанесения. С помощью второй стерильной петли под прямым углом перенесите нанесенную на этот участок поверхности суспензию на последнюю четверть поверхности предметного стекла, на которую суспензия еще не была нанесена. Таким образом, получена единая колония. Инкубируйте образцы при температуре $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ в течение 16–18 часов (колонии, ферментирующие сорбит, теряют окраску по истечении указанного времени и могут быть приняты за колонии *E. coli* O157, не ферментирующие сорбит). Альтернативным методом выделения сорбит-отрицательных колоний является распределение всего инокулума по поверхности сухого стекла CT-SMAC с помощью стерильного изогнутого прутика.

1.6.3. Идентификация колонии

i) Соберите до 10 белых сорбит-отрицательных колоний на стекло и проведите их анализ методом латекс-агглютинации O157, следуя инструкциям производителя (включите в анализ соответствующие положительные и отрицательные контрольные организмы и контрольный образец латекса).

ii) Пассируйте колонии, демонстрирующие положительную реакцию агглютинации, на твердую среду без антибиотиков (например, 5% агар овечьей крови). Наносите образцы таким образом, чтобы образовались единые колонии. Инкубируйте образцы при температуре $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ в течение ночи.

1.6.4. Подтверждение наличия *E. coli*

i) Инокулируйте бульон из О-нитрофенил-бета-D- галактопиранозида (ОНГП). Включите в анализ положительные и отрицательные контрольные образцы. Инкубируйте в течение ночи аэробно при температуре 37°C . При наличии *E. coli* результат будет положительным, что будет идентифицироваться по изменению окраски на желтую, подтверждающую активность бета-галактозидазы.

ii) С помощью стерильного пинцета поместите круг диаметром 0,45 мкм мембранной фильтровальной бумаги из нитроцеллюлозы на стекло с триптонно-желчным агаром (ТЖА). С помощью петли объемом 1 мкл отберите образец культуры, подлежащей анализу, в размере полного объема петли и нанесите его на область размером с горошину поверхности миллипорового фильтра. Включите в анализ положительные и отрицательные контрольные образцы. Инкубируйте при температуре 44°C в течение не менее 17 часов. Перенесите мембрану на фильтровальную бумагу, пропитанную реагентом

индола, и использующуюся для установления наличия триптофана. В случае наличия *E. coli* положительная реакция будет выражаться в виде пурпурной или розовой окраски.

iii) В продаже имеется реагент для обнаружения индола. Этот реагент необходимо нанести на фильтровальную бумагу, после чего втереть отобранный образец колонии в место, пропитанное реагентом. Продолжительность данной процедуры составляет менее 5 минут. Данная процедура может быть продублирована описанным способом, если предполагаемые колонии продемонстрируют отрицательную реакцию. Индоловая среда также имеется в продаже.

iv) Для подтверждения наличия *E. coli* в качестве альтернативы могут использоваться имеющиеся в продаже комплекты для проведения биохимических анализов.

1.6.5. Соматический способ определения (Matthews *et al.*, 2006)

i) С помощью стерильной петли возьмите одну колонию, полученную методом идентификации колоний, описанным в пункте «с» выше, и пассируйте ее в 4 мл бульона Шлехта (Ring & Schlecht, 1970). Инкубируйте при температуре $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ в течение ночи.

ii) Кипятите бульон Шлехта в течение не менее 1 часа при температуре 100°C .

iii) Налейте 25 мкл соляного раствора концентрацией 0,85% в лунки (со 2-ой по 12-ую), микротитрационного планшета с подковообразным дном. Налейте 50 мкл антисыворотки O157 в 1-ую лунку. Сделайте дублирующую серию растворов антисыворотки в пропорции 1/1024 и отлейте 25 мкл раствора после тщательного перемешивания. Добавьте 50 мкл суспензии из прокипяченного бульона в лунки с 1-ой по 12-ую. Накройте планшет, чтобы предотвратить испарение, и инкубируйте образцы при температуре 37°C в течение 6 часов. Для определения реакции агглютинации в лунках используйте подложку (фон) черного цвета.

1.6.6. Анализ с использованием клеток Vero

i) С помощью стерильной петли возьмите одну колонию, полученную методом идентификации колоний, описанным в пункте «с» выше, и пассируйте ее в 4 мл бульона Мюнделля (Mundell *et al.* (1976)). Инкубируйте при температуре $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ в течение ночи.

ii) Добавьте в бульоны контрольные штаммы организмов, не производящих токсины, термолабильный энтеротоксин (ТЛЭ), цитотоксический некротизирующий фактор (ЦНФ) и вероцитотоксин (ВТ). Инкубируйте при температуре $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ в течение ночи.

iii) Поместите клетки Vero (клетки почки африканской зеленой мартышки, референтный номер ATCC CCL81, норма посева культуры 2×10^5 /мл) в планшеты для микроанализа с плоскодонными лунками, по 200 мкл в каждую лунку, на 24 часа до инокуляции. Инкубируйте при температуре $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ в присутствии 5% CO_2 в течение 24 часов.

iv) Добавьте 100 мкл раствора полимиксин-В-сульфата в концентрации 400 000 единиц/мл стерильной дистиллированной воды в каждую бульонную культуру, инкубированную в течение ночи. Инкубируйте при температуре $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ в течение 5 часов.

vi) Центрифугируйте бульоны со скоростью 3 000 оборотов в минуту в течение 30 минут.

vii) Перенесите надосадочную жидкость в маркированные стерильные контейнеры (необходимый объем контейнера – приблизительно 1,5 мл).

viii) Поместите планшет с клетками Vero на пронумерованный рабочий лист для идентификации каждой лунки. Пассируйте 10 мкл подготовленной надосадочной в соответствующую лунку с клетками Vero. Снова поместите клетки Vero в инкубатор с CO₂-средой и инкубируйте в течение 3 дней.

ix) Исследуйте клетки по истечении 24 часов, 48 часов и 72 часов на предмет наличия каких-либо признаков цитопатического действия. Сравните результаты с положительными и отрицательными контрольными образцами. В ВТ-положительных образцах в промежутке между 24 и 72 часами клеточный пласт становится неоднородным и в нем появляются почерневшие высохшие клетки.

1.6.7. Мультикомплексная ПЦР для обнаружения генов VT1, VT2 и eae (Beebakhee *et al.*, 1992; Jackson *et al.*, 1987; Strockbine *et al.*, 1988)

Метод мультикомплексной ПЦР используется для подтверждения наличия показателей вирулентности с помощью праймеров, как показано ниже:

Ген-мишень	Номер доступа	Последовательность праймера	Позиция нуклеотида	Размер ампликона (п.о.)
VT1	M19437	F (5'-CGC-TCT-GCA-ATA-GGT-ACT-CC-3')	287–306	256
		R (5'-CGC-TGT-TGT-ACC-TGG-AAA-GG-3')	522–541	
VT2	X07865	F (5'-TCC-ATG-ACA-ACG-GAC-AGC-AG-3')	623–642	185
		R (5'-GC-TTC-TGC-TGT-GAC-AGT-GAC-3')	788–807	
eaeA	X60439	F (5'-GC-TTA-GTG-CTG-GTT-TAG-GAT-TG-3')	271–293	618
		R (5'-CCA-GTG-AAC-TAC-CGT-CAA-AG-3')	871–890	

i) С помощью стерильной петли возьмите одну колонию, полученную методом идентификации колоний, описанным в пункте «с» выше, и пассируйте ее в 1 мл бульона Лурия-Бертани. Подготовьте три соответствующих контрольных бульона. Инкубируйте при температуре 37°C ± 2°C в течение ночи.

ii) Кипятите бульоны в течение 15 минут при температуре 100°C. Снимите бульоны с водной бани и дайте им остыть.

iii) Подготовьте мастер-микс следующего состава объемом 48 мкл на каждый образец: 1 × буфер Саики (Saiki) (50 ммоль KCl; 10 ммоль Трис, pH 8,5; 100 мкг/мл желатина); 3 ммоль MgCl₂; 0,5 ДНК-полимеразы U-Taq; 25 пмоль каждого праймера (прямые и обратные праймеры для генов VT1, VT2 и eaeA); 0,2 ммоль каждого из следующих компонентов: дезоксиаденозина трифосфат (dATP), дезоксицитидин трифосфат (dCTP), дезоксигуанозина трифосфат (dGTP) и дезокситимидинтрифосфат (dTTP).

iv) Перемешайте путем переворачивания пробирок и внесите по 48 мкл в каждую пробирку для анализа методом ПЦР.

v) Добавьте 2 мкл прокипяченной культуры (сырого экстракта ДНК) на дно каждой пробирки для реакций (включая три контрольных экстракта и массовую пробу).

vi) Проводите анализ методом ПЦР, используя циклически изменяющиеся параметры начальной денатурации, при температуре 94°C в течение 2 минут; 25 циклов: при температуре 94°C в течение 1 минут, при температуре 62°C – в течение 1,5 минут и при температуре 72°C – в течение 2 минут; конечная элонгация – в течение минут при температуре 72°C. Реакция осуществляется при температуре 4°C до получения показателей, необходимых для электрофореза.

vii) Выполните процедуру электрофореза 15 мкл каждого образца ПЦР в 1,5% агарозном геле с буфером E (10× концентрированный раствор, изготовленный путем добавления в дистиллированную воду следующих компонентов в следующем порядке: 109 г/литр Трис, 55,6 г/литр ортоборной кислоты, 9,3 г ЭТДК, доведите объем до 1 литра с помощью дистиллированной воды и доведите уровень pH до 8,0 с помощью 10 мл концентрированной соляной хлористоводородной кислоты разведенной в перед использованием в дистиллированной воде). Используйте 100 п.о. маркер молекулярного веса для сравнения.

ix) Нанесите бромид этидия и осуществляйте наблюдение с помощью метода диафаноскопии (трансиллюминации).

x) Исследуйте контрольные линии с целью установления позиций ампликонов VT1, VT2 и eae. Сравните с показателями, представленными линиями образцов. Запишите результаты.

2. Серологические реакции

Серологическая диагностика VT *E. coli* у людей может быть ценным методом, в частности, после болезни, когда становится все сложнее выделять патогенные микроорганизмы в экскрементах. В качестве альтернативного антигена использовался липополисахарид (ЛПС), и в результате исследования было продемонстрировано производство сывороточных антител к ЛПС с широким диапазоном доминантных серотипов VT *E. coli*. Серологические реакции не используются для диагностики заражения VT *E. coli* животных. Тем не менее, исследования показали, что следствием воздействия *E. coli* O157:H7 на крупного рогатого скота становится производство антител против O157-LPS, которое сохраняется на протяжении нескольких месяцев и может быть продемонстрировано с помощью непрямого твердофазного ИФА (Johnson *et al.*, 1996b). Также исследования показали наличие перекрестных реакций между O157-LPS и антигенами к ЛПС других бактерий, включая *E. coli* O55, *Salmonella* spp., *Yersinia enterocolitica*, *Brucella abortus* и не содержащие O1 штаммы *V. cholerae*. Для снижения уровня перекрестной реактивности, в целях обнаружения сывороточных антител к антигену O157 у крупного рогатого скота, был разработан блокирующий твердофазный ИФА с использованием *E. coli* O157-специфичного моноклонального антитела в качестве конкурирующего антитела (Laegreid *et al.*, 1998). Наличие у крупного рогатого скота сывороточных антител к VT1, но не к VT2, было продемонстрировано с помощью тестов на нейтрализацию токсина в ходе проведения анализов с использованием клеток Vero (Johnson *et al.*, 1996b). Другие исследования продемонстрировали преобладание VT1-нейтрализующих антител по сравнению с VT2-нейтрализующими антителами в сыворотке

крупного рогатого скота, что можно объяснить преобладанием VT1-производящих VT *E. coli* у крупного рогатого скота и/или более низкой иммуногенностью VT2.

С. ТРЕБОВАНИЯ К ВАКЦИНАМ И БИОЛОГИЧЕСКИМ ПРЕПАРАТАМ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ

В настоящее время не существует вакцин против зоонозной VT *E. coli*. Используются различные подходы к иммунологическому контролю заражения людей ЭГ *E. coli* (Levine, 1998). Данные подходы направлены на предотвращение колонизации организма, развития кишечных болезней, а также тяжелых последствий гемолитико-уремического синдрома и тромбоцитопенического акроангиотромбоза. Эти подходы включают в себя применение конъюгатных вакцин (например, на основе полисахарида O157, связанного с подгруппой В токсинов VT1 и VT2, использующихся в качестве белков-носителей), живых векторных вакцин, токсидных вакцин или пассивной иммунизации гипериммунным глобулином или моноклональными антителами против VT. В настоящее время, в период, предшествующий появлению эффективной вакцины, продолжаются споры вокруг социальных, политических и экономических последствий широкого распространения вакцинации людей против патогенных микроорганизмов, которыми бывают заражены продукты питания. Поскольку животные, главным образом, крупный рогатый скот, считаются резервуарами инфекции, поражающей человеческую популяцию, новейшей стратегией является вакцинация крупного рогатого скота с целью снижения объемов колонизации патогенными VT *E. coli* и, таким образом, уменьшению объемов заражения продуктов питания и окружающей среды (т. е. необходимо сделать еду более безопасной вместо того, чтобы защищать людей от их еды). Одним из подходов является также использование живого, токсин-отрицательного колонизирующего штамма в качестве оральной вакцины для стимулирования производства антител против поверхностных компонентов, а другим подходом – введение факторов колонизации, таких как интимин, в качестве вакцины для перорального применения в трансгенные растения (Gyles, 1998).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

БЕЕВАКНЕЕ G., LOUIE M., DE AZAVEDO J. & BRUNTON J. (1992). Cloning and nucleotide sequence of the *eae* gene homologue from enterohemorrhagic *Escherichia coli* serotype O157:H7. *FEMS Microbiol. Lett.*, **91**, 63–68.

BEKAL S., BROUSSEAU R., MASSON L., PREFONTAINE G., FAIRBROTHER J. & HAREL J. (2003). Rapid identification of *Escherichia coli* pathotypes by virulence gene detection with DNA microarrays. *J. Clin. Microbiol.*, **40**, 2113–2125.

BETTELHEIM K.A. (2000). Role of non-O157 VT E. COLI. *J. Appl. Microbiol.*, **88**, 38S–50S.

BEUTIN L., GEIER D., STEINRUCK H., ZIMMERMANN S. & SCHEUTZ F. (1993). Prevalence and some properties of verotoxin (Shiga-like toxin)-producing *Escherichia coli* in seven species of healthy domestic animals. *J. Clin. Microbiol.*, **31**, 2483–2488.

BEUTIN L., KRAUSE G., ZIMMERMANN S., KAULFUSS S. & GLEIER K. (2004). Characterization of shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from human patients in Germany over a 3-year period. *J. Clin. Microbiol.*, **42**, 1099–1108.

BEUTIN L., MIKO A., KRAUSE G., PRIES K., HABY S., STEEGE K. & ALBRECHT N. (2007). Identification of human-pathogenic strains of shiga toxin-producing *Escherichia coli* from food by a combination of serotyping and molecular typing of shiga toxin genes. *Appl. Env. Microbiol.*, **73**, 4769–4775.

DE BOER E. & HEUVELINK A.E. (2001). Evaluation of methods for the detection and isolation of *Escherichia coli* O157 from foods and faeces. Proceedings of European Union Concerted Action CT98-3935. Verocytotoxigenic *E. coli* in Europe. 1. Methods for Verocytotoxigenic *E. coli*, Duffy G., Garvey P., Coia J., Wasteson Y. & McDowell D.A., eds. *Int. J. Food Microbiol.*, **66**, 25–35.

BLACKBURN C.W. & MCCARTHY J.D. (2000). Modifications to methods for the enumeration and detection of injured *Escherichia coli* O157:H7 in foods. *Int. J. Food Microbiol.*, **55**, 285–290.

CHAPMAN P.A. & CUDJOE K.S. (2001). Evaluation of Beadretriever™, an automated system for concentration of *Escherichia coli* O157 from enrichment cultures by immunomagnetic separation. *J. Rapid Methods Automation Microbiol.*, **9**, 203–214.

CHAPMAN P.A., WRIGHT D.J. & SIDONS C.A. (1994). A comparison of immunomagnetic separation and direct culture for the isolation of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 from bovine faeces. *J. Med. Microbiol.*, **40**, 424–427.

CLIFTON-HADLEY F.A. (2000). Detection and diagnosis of *Escherichia coli* O157 and other verocytotoxigenic *E. coli* in animal faeces. *Rev. Med. Microbiol.*, **11**, 47–58.

DE BOER E. & HEUVELINK A.E. (2001). Evaluation of methods for the detection and isolation of *Escherichia coli* O157 from foods and faeces. Proceedings of European Union Concerted Action CT98-3935. Verocytotoxigenic *E. coli* in Europe. 1. Methods for Verocytotoxigenic *E. coli*, Duffy G., Garvey P., Coia J., Wasteson Y. & McDowell D.A., eds. *Int. J. Food Microbiol.*, **66**, 25–35.

GYLES C.L. (1998). Vaccines and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in animals. In: *Escherichia coli* O157:H7 and Other Shiga Toxin-Producing *E. coli* Strains, Kaper J.B. & O'Brien A.D. eds. ASM Press, Washington, D.C., USA, 434–444.

HOPKINS K.L. & HILTON A.C. (2000). Methods available for the sub-typing of *Escherichia coli* O157. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, **16**, 741–748.

HULL A.E., ACHESON D.W.K., ECHEVERRIA P., DONOHUE-ROLFE A. & KEUSCH G.T. (1993). Mitomycin immunoblot colony assay for detection of shiga-like toxin-producing *Escherichia coli* in fecal samples: comparison with DNA probes. *J. Clin. Microbiol.*, **31**, 1167–1172.

JACKSON M.P., NEILL R.J., O'BRIEN A.D., HOLMES R.K. & NEWLAND J.W. (1987). Nucleotide sequence analysis and comparison of the structural genes for Shiga-like toxin I and Shiga-like toxin II encoded by bacteriophages from *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.*, **44**, 109–114.

JOHNSON R.P., CLARKE R.C., WILSON J.B., READ S.C., RAHN K., RENWICK S.A., SANDHU K.A., ALVES D., KARMALI M.A., LIOR H., MCEWEN S.A., SPIKA J.S. &

- GYLES C.L. (1996a). Growing concerns and recent outbreaks involving non-O157:H7 serotypes of verotoxigenic *Escherichia coli*. *J. Food Protect.*, **59**, 1112–1122.
- JOHNSON R.P., CRAY W.C. & JOHNSON S.T. (1996b). Serum antibody responses of cattle following experimental infection with *Escherichia coli* O157:H7. *Infect. Immun.*, **64**, 1879–1883.
- KARCH H. & BIELASZEWSKA M. (2001). Sorbitol-fermenting Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H– strains: Epidemiology, phenotypic and molecular characteristics and microbiological diagnosis. *J. Clin. Microbiol.*, **39**, 2043–2049.
- KONOWALCHUK J., SPEIRS J.I. & STAVRIC S. (1977). Vero response to a cytotoxin of *Escherichia coli*. *Infect. Immun.*, **18**, 775–779.
- LAEGREID W., HOFFMAN M., KEEN J., ELDER R. & KWANG J. (1998). Development of a blocking enzyme-linked immunosorbent assay for detection of serum antibodies to O157 antigen of *Escherichia coli*. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, **5**, 242–246.
- LAW D. (2000). Virulence factors of *Escherichia coli* O157 and other Shiga toxin-producing *E. coli*. *J. Appl. Microbiol.*, **88**, 729–745.
- LEE J.H. & CHOI S. (2006). Isolation and characteristics of sorbitol-fermenting *Escherichia coli* O157 strains from cattle. *Microbes and Infection*, **8**, 2021–2026.
- LEVINE M.M. (1998). Immunoprophylaxis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infection and disease: strengths and weaknesses of various strategies. *In: Escherichia coli* O157:H7 and Other Shiga Toxin-Producing *E. coli* Strains, Kaper J.B. & O'Brien A.D., eds. ASM Press, Washington, D.C. USA, 405–408.
- MATTHEWS L., MCKENDRICK I.J., TERNENT H., GUNN G.J., SYNGE B. & WOOLHOUSE M.E.J. (2006). Super-shedding cattle and the transmission dynamics of *Escherichia coli* O157. *Epidem. Infect.*, **134**, 131–142.
- MEYER-BROSETA S., BASTIAN S.N., ARNE P.D., CERF O. & SANAA M. (2001). Review of epidemiological surveys on the prevalence of contamination of healthy cattle with *Escherichia coli* serogroup O157:H7. *Int. J. Hyg. Environ. Health*, **203**, 347–361.
- MUNDELL D.H., ANSELMO C.R. & WISHNOW R.M. (1976). Factors influencing heat-labile *Escherichia coli* enterotoxin activity. *Infect. Immun.*, **14**, 383–388.
- NATARO J.P. & KAPER J.B. (1998). Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol. Rev.*, **11**, 142–201.
- O'BRIEN A.D. & LAVECK G.D. (1983) Purification and characterization of a *Shigella dysenteriae* type 1-like toxin produced by *Escherichia coli*. *Infect. Immun.*, **40**, 675–683.
- PATON J.C. & PATON A.W. (1998). Pathogenesis and diagnosis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. *Clin. Microbiol. Rev.*, **11**, 450–479.
- RICE D.H., SHENG H.Q., WYNIA S.A. & HOVDE C.J. (2003). Rectoanal mucosal swab culture is more sensitive than fecal culture and distinguishes *Escherichia coli* O157:H7-

colonized cattle and those transiently shedding the same organism. *J. Clin. Microbiol.*, **41**, 4924–4929.

RING K. & SCHLECHT S. (1970). Ein neuer laboratoriumsfermenter zur züchtung von mikroorganismen im turbidostatischen, chemostatischen und “batch” verfahren. II. Mitteilung. Arbeitsweise und anwendungsbeispiele. *Zentralblatt für Bakteriologie Parasitenkunde*, **213**, 103–119.

STROCKBINE N.A., JACKSON M.P., SUNG L.M., HOLMES R.K. & O’BRIEN A.D. (1988). Cloning and sequencing of the genes for Shiga toxin from *Shigella dysenteriae* type 1. *J. Bacteriol.*, **170**, 1116–1122.

STROCKBINE N.A., WELLS J.G., BOPP C.A. & BARRETT T.J. (1998). Overview of detection and subtyping methods. In: *Escherichia coli* O157:H7 and Other Shiga Toxin-Producing *E. coli* Strains, Kaper J.B. & O’Brien A.D., eds. ASM Press, Washington, D.C., USA, 331–356.

VERNOZY-ROZAND C. (1997). Detection of *Escherichia coli* O157:H7 and other verocytotoxin-producing *E. coli* (BT *E. coli*) in food. *J. Appl. Microbiol.*, **82**, 537–551.

ZADIK P.M., CHAPMAN P.A. & SIDDON C.A. (1993). Use of tellurite for the selection of verocytotoxigenic *Escherichia coli* O157. *J. Med. Microbiol.*, **39**, 155–158.

ZIEBELL K.A., READ S.C., JOHNSON R.P. & GYLES C.L. (2002). Evaluation of PCR and PCR-RFLP protocols for identifying Shiga toxins. *Res. Microbiol.*, **153**, 289–300.

* * *

NB: Существует Референтная лаборатория МЭБ по диагностике (обнаружению) *E. coli* (см. таблицу, приведенную в части 4 настоящего Руководства по диагностическим тестам и вакцинам для наземных животных или посетите веб-сайт МЭБ для получения актуального списка лабораторий: <http://www.oie.int/en/our-scientific-expertise/reference-laboratories/list-of-laboratories/>).

Для получения более подробной информации, касающейся тестов и реагентов для диагностики *E. coli*, просим Вас обращаться в Референтные лаборатории МЭБ.