

Федеральная служба по ветеринарному и фитосанитарному надзору  
(РОССЕЛЬХОЗНАДЗОР)

Федеральное государственное бюджетное учреждение  
«ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ЦЕНТР ОХРАНЫ ЗДОРОВЬЯ ЖИВОТНЫХ»  
(ФГБУ «ВНИИЗЖ»)

ВЫЯВЛЕНИЕ ДИАРЕЕГЕННЫХ E. COLI (DEC) В КОРМАХ ДЛЯ ЖИВОТНЫХ

н.с. Кремлева А.А., к.в.н. Шарыпова Д.В., м.н.с. Кожевникова М.В., к.б.н. Разумова А.А.

Актуальность

*Escherichia coli* является нормальным обитателем желудочно-кишечного тракта всех теплокровных животных, но варианты этого вида также входят в число важных этиологических агентов энтерита. Из всех существующих сероваров эшерихий, более 170 являются патогенными для людей и животных. К патогенным эшерихиям относятся возбудители парентеральных эшерихиозов или экстраинтестинальные патогенные эшерихии (Extraintestinal pathogenic *E. coli* - возбудители внекишечных заболеваний) и диареогенные (интестинальные) эшерихии (Diarheogenic *E. coli* - возбудители острых кишечных инфекций (DEC)).

Диареогенные эшерихии в зависимости от наличия тех или иных факторов патогенности и патогенетических особенностей заболевания подразделяются на следующие группы:

- энтеротоксигенные *E. coli* (Enterotoxigenic *E. coli* - ETEC, энтеротоксигенные кишечные палочки - ЭТКП);
- энтероинвазивные *E. coli* (Enteroinvasive *E. coli* - EIEC, энтероинвазивные кишечные палочки - ЭИКП);
- энтеропатогенные *E. coli* (Enteropathogenic *E. coli* - EPEC, энтеропатогенные кишечные палочки - ЭПКП);
- энтерогеморрагические *E. coli* (Enterohemorrhagic *E. coli* - EHEC, энтерогеморрагические кишечные палочки - ЭГКП);
- энтероагрегативные (энтероагрегирующие, энтероадгезивные или энтероагрегативные) кишечные палочки (Enteroggregative *E. coli* - EAEC, энтероагрегативные кишечные палочки - ЭАГКП);
- диффузно-адгезивные (диффузно-агрегативные, диффузно-агрегирующие) кишечные палочки (Diffusely Adherent *E. coli* - DAEC, диффузно-адгезивные кишечные палочки - ДАКП)

Среди представителей семейства энтеробактерий, наиболее опасными для человека являются энтерогеморрагические кишечные палочки (*E.coli* O157:H7) и энтероагрегативные кишечные палочки (O104:H4). Группа STEC-штаммов эшерихий включает в себя энтерогеморрагические *E. coli* (EHEC) и не-EHEC *E. coli*. Для группы EHEC характерно наличие генов патогенности: *rfb*, *eae*, *stx1*, *stx2*, *ehx*, контролирующих соответственно, синтез специфических липополисахаридов, основного антигена адгезии — интимина, шига-токсинов 2- и/или 1-го типов, энтерогемолизина.

Распространение EHEC/STEC в желудочно-кишечном тракте животных свидетельствует о зоонозном характере его инфекций. Различные виды животных являются бессимптомными носителями EHEC/STEC. Помимо крупного рогатого скота, который является их наиболее распространенным естественным резервуаром, присутствие этих возбудителей было выявлено в фекалиях буйволов, овец, свиней, птиц и рыб.

Присутствие EHEC/STEC в окружающей среде, является еще одной проблемой, поскольку они попадают в пищевую цепь через загрязненные корма, а также при ненадлежащих гигиенических условиях на уровне фермы.

Следует отметить, что на территории Российской Федерации не осуществляется контроль по обнаружению эпидмиологически значимых шига-токсинообразующих штаммов *Escherichia coli*. Кроме того, для подтверждения патогенности выделенных штаммов *E.coli* специалисты ветеринарных лабораторий РФ используют метод постановки биопробы на белых лабораторных мышах и метод серологической идентификации сыворотками О-коли агглютинирующими, что не позволяет достоверно определить патогенный потенциал штамма возбудителя.

Цель работы

Оценить патогенный потенциал штаммов *Escherichia coli*, выделенных из кормов для животных, с помощью молекулярно-генетических методов. Выявить нуклеотидные последовательности генов, контролирующих продукцию факторов патогенности энтеробактерий, с использованием метода полимеразной цепной реакции.

Методология работы

Проведение бактериологического исследования с последующим изучением морфологических, тинкториальных, культуральных, биологических и серологических свойств выделенных изолятов *Escherichia coli* проводили в отделе бактериологии ФГБУ «ВНИИЗЖ» в г. Москва. Молекулярно-генетические исследования проводили на базе отдела молекулярных исследований ФГБУ ВНИИЗЖ.

Для определения генетических детерминант патогенности были использованы молекулярно-генетические методы (real-Time ПЦР) для видовой идентификации - MALDI-ToF-масс-спектрометрия, для определения биохимических свойств выделенных изолятов микроорганизмов - микробиологические методы.

Для изучения биохимических свойств, выделенных изолятов бактерий были использованы коммерческие тест системы API® 20 E с сопутствующими расходными материалами, реагентами и электронной базой для интерпретации полученного результата.

Определение патогрупп изолятов *E. coli* осуществляли с помощью набора реагентов для выявления и дифференциации ДНК диареогенных *E. coli* «АмплиСенс® Эшерихиозы-FL» (ФБУН ЦНИИЭ, Россия).

Результаты

При исследовании 745 проб кормов real-Time ПЦР на этапе первичного обогащения в 20 случаях (12,9%) выявлена ДНК двух патотипов диареогенных эшерихий: в 7 пробах EPEC (4,5 %), и в 13 –ти пробах (8,4 %) STEC/EHEC.



Рис.1 Внутривидовое разнообразие E.coli

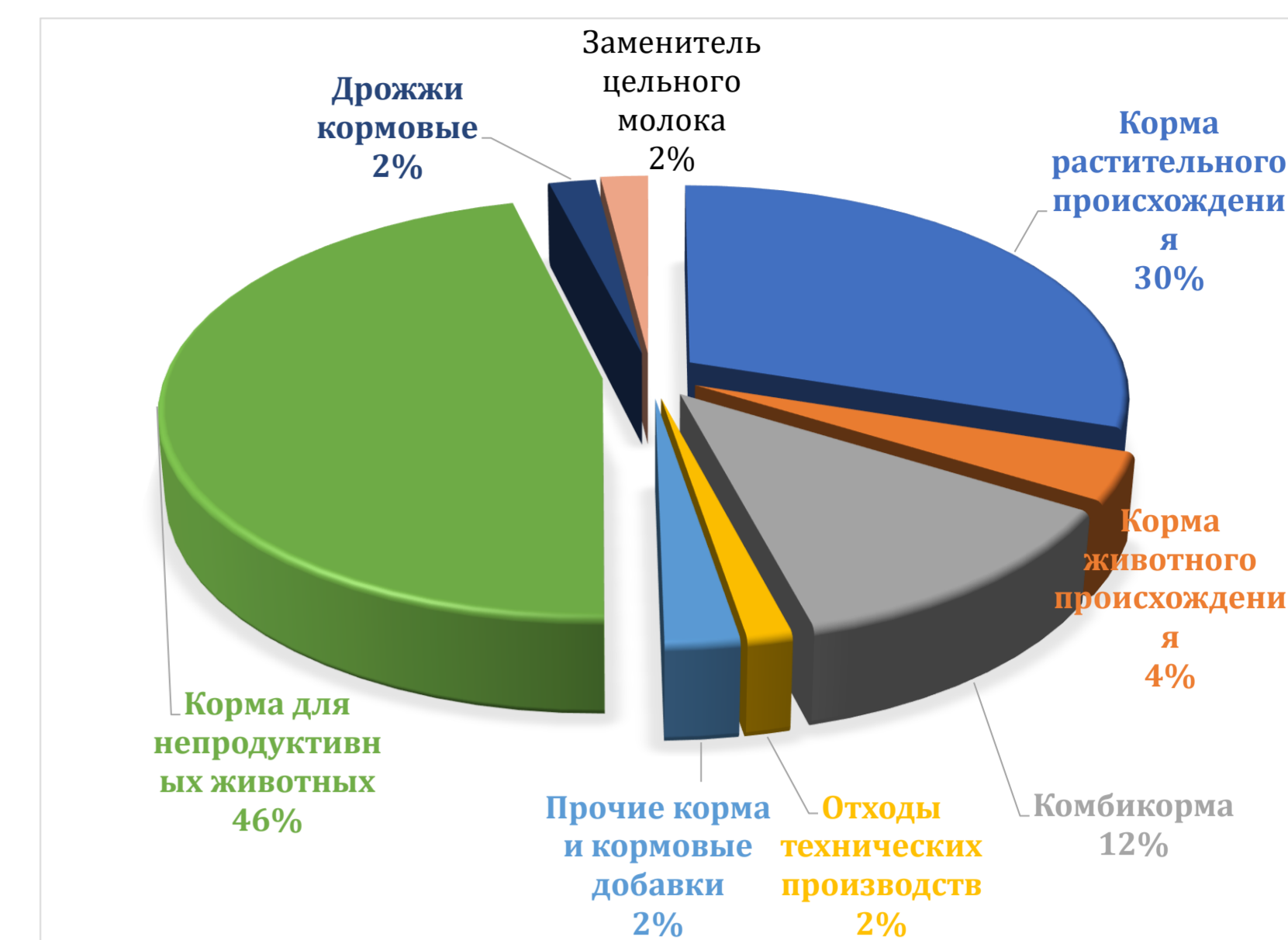


Рис.2 Объем исследований кормов, проведенных на базе ИЦНМВЛ ФГБУ ВНИИЗЖ в 2022 г.

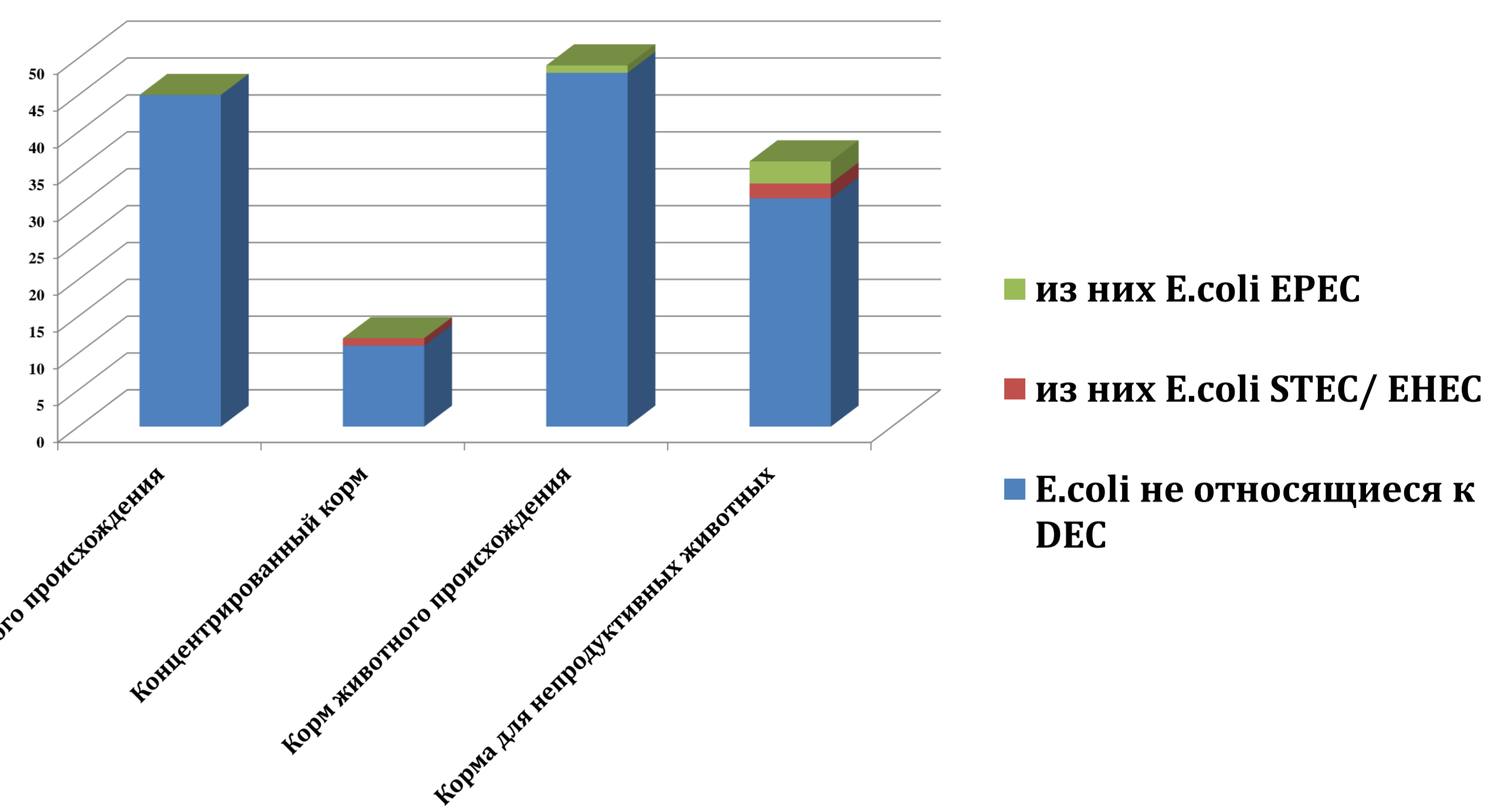


Рис.3. Скрининг принадлежности изолятов к диареогенным E. coli, проведенный молекулярным методом



Рис 4. Видовое разнообразие кормов для животных, контаминированных E. coli, патогруппы STEC/EHEC

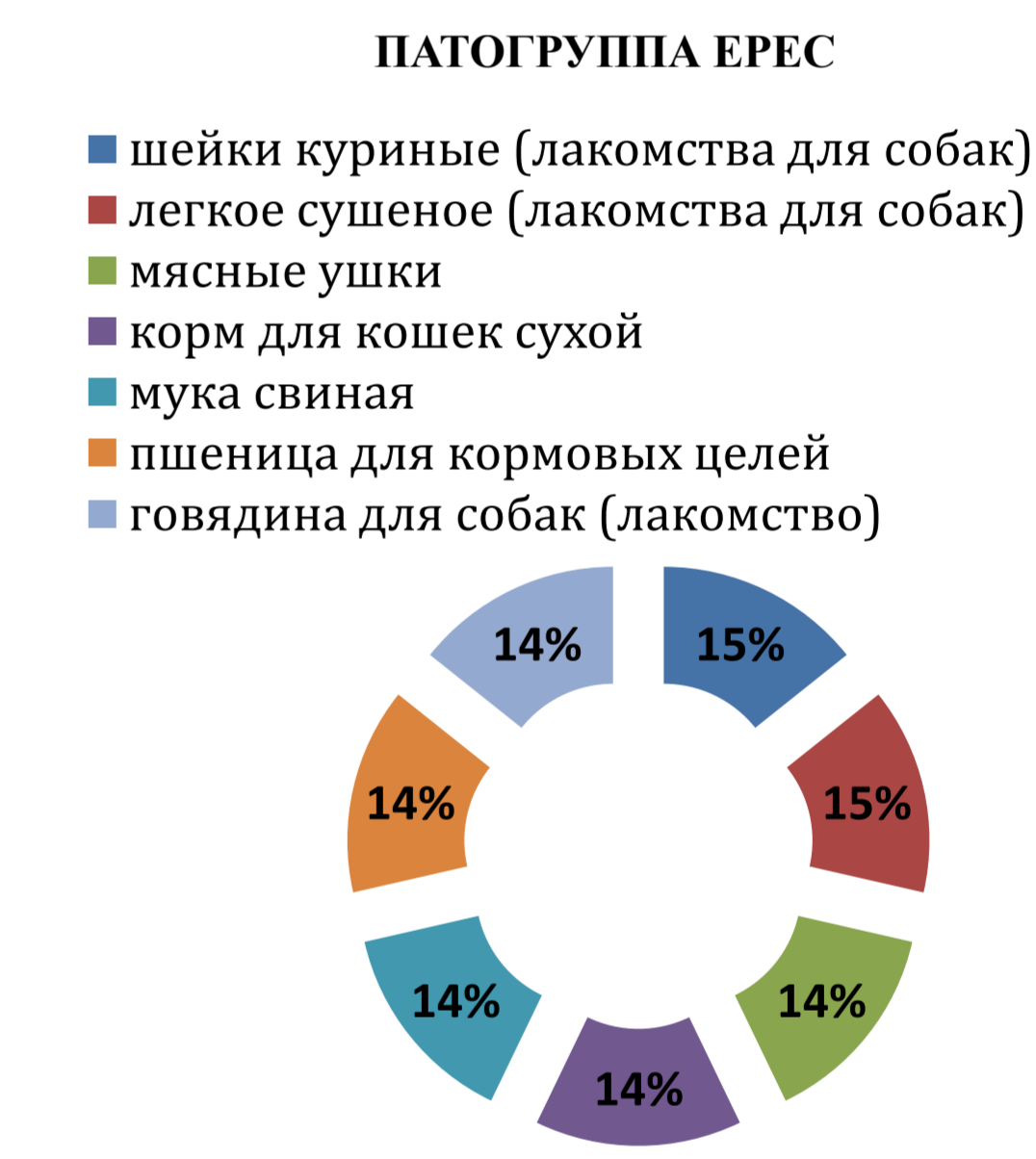


Рис 5. Видовое разнообразие кормов для животных, контаминированных E. coli, патогруппы EPEC

При этом, по результатам скрининга доля контаминированных STEC/EHEC кормов для собак и кошек (лакомства) составила 92 % (от количества положительных проб), комбикормов- 8 %.

Доля контаминированных EPEC кормов для собак и кошек (лакомства) составила 72 % (от количества положительных проб), мясной муки- 14 % и пшеницы - 14% (рис. 4-5).

В ходе проведения исследований образцов кормов классическим бактериологическим методом (рис.2) было выделено 155 изолятов *E. coli*. Скрининг принадлежности изолятов к диареогенным *E. coli*, проведенный молекулярным методом, выявил наличие специфических участков ДНК патотипа STEC/EHEC только у трех изолятов *E. coli* и патотипа EPEC у четырех изолятов.

На рисунке №3 представлены результаты принадлежности штаммов к диареогенным *E. coli*, в кормах методом полимеразной цепной реакции. Как видно из графической информации, во всех видах корма зарегистрировано выявление патогенных *E.coli*, относящихся к патогруппам EPEC и STEC/EHEC.

У 135 (87,1 %) штаммов *E. coli* не были выявлены кривые накопления флуоресцентных сигналов, что указывало на отсутствие в этих штаммах специфических участков ДНК диареогенных эшерихий (EPEC, ETEC, EIEC, EHEC, EAEC).

Выводы

Внутривидовое разнообразие *E. coli*, выделенных из кормов для животных, включает штаммы с генотипами вирулентности EPEC и EHEC, которые не могут быть достоверно идентифицированы при классическом бактериологическом исследовании. Идентификация штаммов *E. coli*, наряду с фенотипическими методами должна включать молекулярно-генетические методы, которые расширяют аналитические и диагностические возможности лабораторных исследований в части детекции генов, ответственных за продукцию шига-токсинов.

Список использованных источников.

- 1.Носова, Е.С. Энтерогеморрагические штаммы *Escherichia coli*: биологические свойства, эпидемиологическая характеристика, методы лабораторной диагностики / Е. С. Носова, Л. П. Титов // Здравоохранение. - 2011. -№: 12. - С. 41-46.
- 2.М.А.Макарова, Л.А.Кафтырева, З.Н.Матвеева. Биологические свойства штаммов *E. coli* серогруппы O144, регистрируемые в Санкт-Петербурге как возбудители острых кишечных инфекций. Бактериология, 2018, том 3, №4, с. 12-1
- 3.Колотова Е.В., Малышева Л.А. Эпизоотология, диагностика, методы лечения и профилактика отечной болезни поросят. Ветеринарная патология. - 2008. -№: 1(24). - С. 163-166.
- 4.Терехов В.И., Малышева Т.В. Тищенко А.С, Мусатова Н.С. Патогенный потенциал энтеробактерий, выделенных от новорожденных телят при острых кишечных заболеваниях