

ВИЯВЛЕННЯ ТА ІДЕНТИФІКАЦІЇ ШИГАТОКСИН ПРОДУКУЮЧИХ ШТАМІВ БАКТЕРІЙ *E. COLI* МЕТОДОМ ПОЛІМЕРАЗНОЇ ЛАНЦЮГОВОЇ РЕАКЦІЇ

В.В. Касянчук, д.вет.н., професор, Сумський національний аграрний університет

В. О. Ушкалов, д.вет.н., професор, чл.-кор. НААН, завідувач Національного центру штамів мікроорганізмів (ДНКІБШМ)

О.М. Бергілевич, д.вет.н., професор, Сумський національний аграрний університет

О.М. Дерябін, завідувач відділу молекулярної біології і імунохімії (ДНКІБШМ)

О.М. Єфімова, аспірант, Сумський національний аграрний університет

Р.В. Козій, молодший науковий співробітник (ДНКІБШМ)

Основою даних досліджень було попередньо проведена характеристика оригінальних олігонуклеотидних праймерів до генів stx2 та eae. Переверено специфічність та дана характеристика оригінальних олігонуклеотидних праймерів до генів stx2 та eae, як засобів для молекулярно-генетичного аналізу (виявлення та ідентифікації) шигатоксин продукуючих штамів бактерій E. coli. Для перевірки специфічності та чутливості синтезованих праймерів, як можливе джерело цільових генів, були використані штами E. coli серотипів O157, O145 та O111z Національної колекції штамів мікроорганізмів. Ген stx2 був виявлений у штаму E. coli серотипу O157, а ген eae – у штаму E. coli серотипу O145.

Ключові слова: полімеразна ланцюгова реакція, E. coli, шигатоксин, Stx-токсини, послідовність нуклеотидів, інтімін, хромосомний ген, stx2 ген, eae ген.

Постановка проблеми в загальному вигляді. Важливо відмітити, що більшість видів бактерій E. coli, не викликають захворювання у людей, навпаки, деякі з них корисні, а деякі викликають шлунково-кишкові інфекції та інфекції сечовивідних шляхів. В останні роки особливої уваги набули патогенні види E. coli. Серед них найбільш відомою є E. coli O157:H7. Найбільш часто ці мікроорганізми зустрічаються у сирій яловичині.

Для того щоб контролювати мікробіологічну безпечність м'яса, в багатьох країнах, та, в тому числі, країнах ЄС та США використовується кількісне визначення E. coli. Ці мікроорганізми вважаються хорошим показником гігієни та безпечності харчових продуктів у всьому світі. В США Служба безпеки та інспекції харчових продуктів (FSIS) встановила максимальні критерії для контролю яловичих туш відносно E. coli, біотипу, які становлять 10^2 КУО/см². Перевищення цього критерію може бути сигналом про вірогідність присутності в м'ясі патогенного виду E. coli O157:H7. Оскільки, Україна є потенційним постачальником сирій яловичини на міжнародні ринки, та, в тому числі, в країні ЄС, важливо та актуально дотримуватись міжнародних вимог щодо її безпечності та розробляти для цього ефективні високочутливі методи контролю за патогенними видами E. coli. До таких методів відноситься ПЛР-аналіз.

Аналіз основних досліджень і публікацій, в яких започатковано розв'язання проблеми. Кишкова паличка (лат. Escherichia coli, E. coli, на ім'я Теодора Ешериха) – грамнегативна паличкоподібна бактерія, широко зустрічається в нижній частині кишечника теплокровних організмів. E. coli була описана німецьким педіатром і бактеріологом Теодором Ешерихієм в 1885 році.

В даний час кишково паличку відносять до роду Escherichia, сімейству Enterobacteriaceae, порядку Enterobacteriales [3, 8].

Більшість штамів E. coli є нешкідливими, проте деякі серотип E. coli, що продукують шигатоксин можуть викликати важкі харчові отруєння у людей [5]. Нешкідливі штами є частиною нормальної флори кишечника людини і тварин. Кишкова паличка приносить користь організму хазяїна, наприклад, синтезує вітамін K, а також запобігає розвитку патогенних мікроорганізмів у кишечнику [3]. E. coli не завжди живуть тільки в шлунково-кишковому тракті, здатність деякий час виживати в навколишньому середовищі робить їх важливим індикатором для дослідження зразків на наявність фекальних забруднень [3, 4].

Вірулентні штами E. coli в нормі відсутні в кишечнику, і захворювання настає при зараженні ззовні. Передача патогенних E. coli часто відбувається фекально-оральним шляхом [1, 2]. Шляхи передачі можуть бути викликані: низькою гігієною приготування їжі [2], забрудненням продуктів гноєм, поливом врожаю забрудненою водою або стічними водами, вживанням для пиття води, забрудненої стічними водами [8].

Деякі штами E. coli, наприклад, O157:H7, O121 і O104:H21, синтезують потенційно смертельні токсини. Харчові отруєння, інфекційним агентом при яких є вірулентні E. coli, зазвичай викликані вживанням в їжу немитих овочів або не прожареного м'яса. Первинними резервуарами E. coli O157:H7 є м'ясна і молочна худоба, яка може переносити бактерії безсимптомно і виділяти з фекаліями [1, 2, 7, 8].

Бактерії легко можуть бути вирощені в лабораторних умовах, тому кишкова паличка відіграє важливу роль в генетичних дослідженнях. E. coli є

одним із найважливіших об'єктів біотехнології і мікробіології. Кишкова паличка *E. coli* була одним з перших організмів, чий геном був повністю секвенований. Послідовність нуклеотидів в геномі штаму K12 *E. coli* була опублікована в журналі Science в 1997 році [7]. На даний час виявлено понад 700 різних серотипів кишкової палички. *E. coli* поділяють різні на серотипи відповідно до їх "O" і "H" антигенів та джгутиків (наприклад, *E. coli* O157: H7, *E. coli* O26: H11). Серотипи кишкової палички, які спричиняють харчові отруєння виробляють шигатоксин, який позначається Stx- Shigatoxin). Цей токсин отримав свою назву через ідентичність симптомів ураження людини, до тих, які спричиняють бактерії, відомі як *Shigella* дизентерійного типу 1 (*Shigella* також викликає кривавий пронос і гемолітико-уремічний синдром (HUS).

В США за оцінкою центру «Боротьби з інфекціями» щорічне число постраждалих, від шигатоксину, що продукують *E. coli* (як O157: H7 і не O157: H7) становить: 73 000 хворих; 2200 госпіталізованих; 61 померлих [6, 8].

Кишкові палички, що виробляють шигатоксин мають кілька особливостей, які роблять їх особливо небезпечними. Ці мікроорганізми досить витривалі в довкіллі – вони можуть виживати кілька тижнів на таких поверхнях, як дерев'яні поверхні, і до року в компості. Вони мають дуже низьку інфекційну дозу, що включає відносно невелику кількість бактерій (<50), що може викликати харчове захворювання [3, 5].

Крім *E. coli* O157:H7, що спричиняє більшість захворювань людини, є інші *E. coli*, що продукують STX-токсин (наприклад, *E. coli* O121:H19), які також можуть викликати геморагічний коліт, діареї з гемолітичним уремічним синдромом, що проявляється трьома характерними симптомами: гемолітична анемія, тромбоцитопенія і гостра ниркова недостатність [1, 2].

Для ефективного контролю за *E. coli* O157:H7, що може викликати важкі захворювання вчені розробляють високочутливі та ефективні методи на основі ПЛР. Важливим етапом для розробки методу на основі ПЛР аналізу є виявлення шигапродукуючих ізолятів *E. coli*, що викликають діарею і гемолітико-уремічний синдром в людини за фенотиповими та генетичними ознаками. Такі дослідження були проведені на ізолятах *E. coli* O157:H7, виділених від хворих на гемолі-

тико-уремічний синдром та діарею. Було встановлено, що деякі ізоляти не продукували шигатоксин і не мали stx гену. Всі ізоляти мали хромосомний eae ген, який кодує гамма-інтимін, а також гени плазмиди E-hly та efp. Ці *E. coli* O157:H7 ізоляти були kat Pandesp P позитивними [13, 14].

Метою даної роботи є розробка засобів для молекулярно-генетичного аналізу (виявлення та ідентифікації) шигатоксин продукуючих штамів бактерій *E. coli*.

Матеріали і методи досліджень. Дослідження проводили в Сумському НАУ та Національній колекції штамів мікроорганізмів при Державному науково-контрольному інституті біотехнології і штамів мікроорганізмів, звідки були отримані штами бактерій *E. coli* різних серотипів. Мікробіологічні дослідження проводили загальноприйнятими методиками згідно чинних в Україні нормативно-правових актів на диференційно-діагностичних поживних середовищах.

Виділення ДНК виконували за допомогою комерційного набору «ДНК-сорб-В» (Амплісенс, Росія), а очищення бактеріальної ДНК за допомогою набору «UltraCleanDNAPurificationKit» (Cat.# 12500-100; МОБІО, США). Концентрацію ДНК вимірювали на спектрофотометрі «NanoDrop 2000c» (США), а реакцію ампліфікації проводили на термочиклерах «Терцик» (ДНК-технологія, Росія) та «Т1» (Biometra, Німеччина) в мікропробірках в об'ємі 0,025 см³. З метою мінімізації утворення неспецифічних димерів праймер-матриця і їх ампліфікації, був використаний метод «гарячого старту» і приготування реакційної суміші з фізичним розділенням компонентів ПЛР.

Аналіз продуктів ампліфікації проводився шляхом розділення фрагментів ДНК в 1,5 % гелі агарози (Sigma, США). Розташування смуг ДНК на отриманій електрофореграмі та їх реєстрацію виконували за допомогою «MolecularImageGelDocXR+» (BioRad, США).

Результати власних досліджень. Для виявлення та ідентифікації шигатоксин продукуючих варіантів бактерій *E. coli* були розроблені олігонуклеотидні праймери специфічні до генів токсину stx1 і stx2, та усіх поліморфних варіантів гену eae (інтиміну). В роботі наведені результати попередньої перевірки і характеристики оригінальних олігонуклеотидних праймерів до генів stx2 та eae (табл. 1; рис. 1).

Таблиця 1

Послідовність олігонуклеотидних праймерів, специфічних до генів токсину (stx2) та інтиміну (eae)

№/№	Ген	Праймер	Послідовність(5'→3')	Розмір фрагмента(н.з.)
1	stx2	dF1-stx2	CCATGACAACGGACAGCAGT	466
		dR3-stx2	ATCTGACATTCTGGTTGACTCTCTTC	
2	eae	dF-eae	CGCTCTTGGTATCGCTGGTAAC	327
		dR2-eae	TAGTCTCGCCAGTATTCGCCAC	

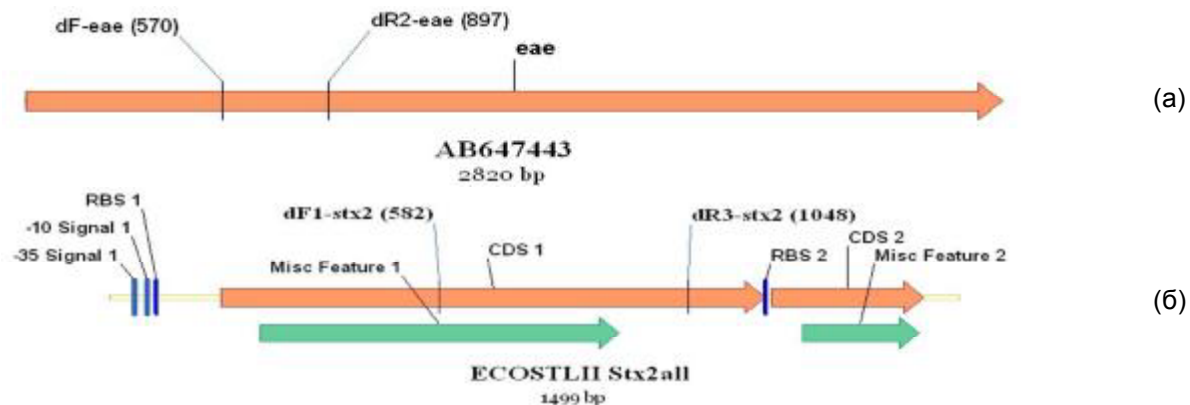


Рис. 1. Позиції олігонуклеотидних праймерів на послідовностях генів *eae* (а) та *stx2* (б) бактерій *E. coli* (серотип O157:H7).

Для перевірки специфічності та чутливості синтезованих праймерів, як можливе джерело цільових генів, були використані штами *E. coli* серотипів O157, O145 та O111 з Національної колекції штамів мікроорганізмів. Ген *stx2* був виявлений у штама *E. coli* серотипу O157, а ген *eae* – у штама *E. coli* серотипу O145. Як негатив-

ний контроль використовували штами *E. coli* серотипів 25 та 20.

Оскільки при розрахунку праймерів враховувалась можливість їх використання в мультиплексному варіанті полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР), оптимізацію температури відпалу праймерів проводили однаково (рис. 2, а, б, с).

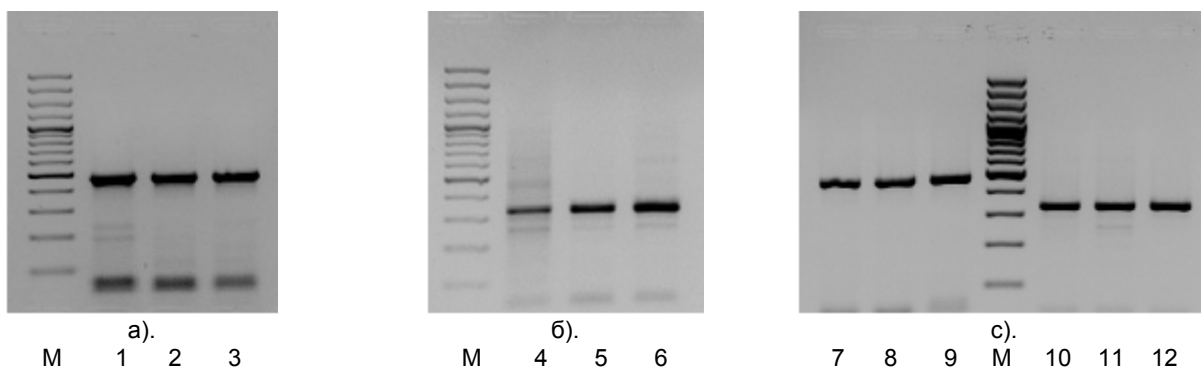


Рис. 2. Результати електрофоретичного аналізу продуктів ампліфікації після оптимізації температури відпалу праймерів.

Примітка. М - маркер "100 bp Plus DNALadder" (Fermentas); ген *stx2*: а1-58°C, а2-60°C, а3-62°C, а7-63°C, а8-64°C, а9-65°C; ген *eae*: б4-58°C, б5-60°C, б6-62°C, б10-63°C, б11-64°C, б12-65°C.

За результатами проведеного аналізу оптимальною температурою відпалу для обох пар праймерів визначено температуру 65° С.

Для визначення чутливості розроблених праймерів, були приготовлені 10 кратні послідовні розведення очищеної бактеріальної ДНК.

Концентрація очищеної ДНК позитивних зразків була визначена спектрофотометрично і складала для штаму O145 – 22,28 нг/0,001 см³ (ген *eae*) та 20,70 нг/0,001 см³ для штаму O157 (ген *stx2*) (рис. 3).

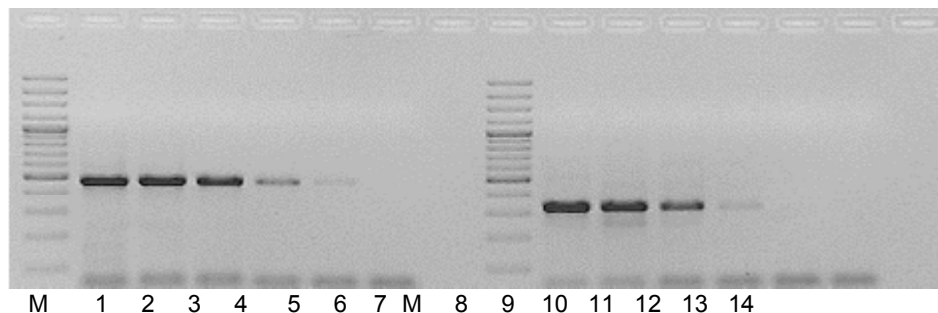


Рис. 3. Визначення чутливості праймерів до генів *stx2* та *eae* з препаратами очищеної ДНК *E. coli*.

Примітка: М - маркер "100 bp Plus DNALadder" (Fermentas). Штам O157: 1- 207 нг; 2- 20,7 нг; 3- 2,1 нг; 4 - 0,21 нг; 5 - 0,021 нг; 7 - негативний контроль. Штам O145: 8 - 222,8 нг; 9 - 22,28 нг; 10 - 2,23 нг; 11 - 0,22 нг; 12 - 0,02 нг; 13 - 0,002 нг; 14 - негативний контроль.

Висновки. 1. Перевірено специфічність та дана характеристика оригінальних олігонуклеотидних праймерів до генів *stx2* та *eae*, як засобів для молекулярно-генетичного аналізу (виявлення та ідентифікації) шигатоксин продукуючих штамів бактерій *E. coli*.

2. Перевірено специфічності та чутливості

синтезованих праймерів, як можливого джерела цільових генів на штаммах *E. coli* серотипів O157, O145 та O111з Національної колекції штамів мікроорганізмів. Ген *stx2* був виявлений у штама *E. coli* серотипу O157, а ген *eae* – у штама *E. coli* серотипу O145.

Список використаної літератури:

1. Arthur T.M. Escherichia coli O157 prevalence and enumeration of aerobic bacteria, Enterobacteriaceae, and Escherichia coli O157 at various steps in commercial beef processing plants / T.M. Arthur, X.N. Bosilevac, S.D. Shackelford, et al // J Food Prot. – № 67. – 2004. – P. 658-665.
2. Bacon R.T. Microbial populations on animal hides and beef carcasses at different stages of slaughter in plants employing multiple-sequential interventions for decontamination / R.T. Bacon, K.E. Belk, J.N. Sofos, et al // J Food Prot. – 2000. – № 63. – P. 1080-1086.
3. Feng Peter “Escherichia coli Serotype O157:H7: Novel Vehicles of Infection and Emergence of Phenotypic Variants,” Emerging Infect. Diseases, 1995. – Vol. 1, № 2. – 47 p.
4. Frenzen P.D. Economic Cost of Illness due to Escherichia coli O157 Infections in the United States / P.D. Frenzen et al // J. of Food Protection, 2005. – Vol. 68. – P. 2623-2630.
5. Heuvelink A.E. Characterization of verocytotoxin-producing Escherichia coli O157 isolates from patients with haemolytic uremic syndrome in Western Europe / A.E. Heuvelink, van de Kar N.C., Meis J.F. et al // Epidemiol Infect, 1995. – № 15. – P. 1-14.
6. Keen J.E. Shiga-toxicogenic Escherichia coli O157 in agricultural fair livestock, United States / J.E. Keen, et al // Emerging Infect. Diseases, 2003. – Vol. 12. – № 5. – P. 780-786.
7. Paula K. Witham. A PCR-Based Assay for the Detection of Escherichia coli Shiga-Like Toxin Genes in Ground Beef / Paula K. Witham, Carl T. Y Amashiro, Kenneth J. Livak, Carl A. Batti // Applied and Environmental Microbiology, 1996. – Vol. 62. – № 4. – P. 1347-1353.
8. Rangel J.M. Epidemiology of Escherichia coli O157:H7 Outbreaks, United States, 1982-2002 / Rangel, Josefa M. et al // Emerging Infect. Diseases, 2005. – Vol. 11. – № 4. – P. 603.
9. Schmidt H. Non-O157:H7 pathogenic Shiga toxin-producing Escherichia coli: phenotypic and genetic profiling of virulence traits and evidence for clonality / H. Schmidt, C. Geitz, P. I. Tarr, M. Frosch, H. Karch // J Infect Dis., 1999. – № 179. – P. 115-123.
10. Schmidt 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 / H. Schmidt, J. Scheef, H. I. Huppertz, M. Frosch, H. Karch // J Clin Microbiol., 1999. – № 37 (11). – P. 3491-3496.

Касянчук В.В., Ушкалов В.А., Бергилевич А.Н., Дерябин О.Н., Ефимова О.Н., Козий Р.В. Определение и идентификация шигатоксин продуцирующих штаммов бактерий *E. coli* методом полимеразной цепной реакция

Целью данной работы является разработка средств для молекулярно-генетического анализа (определение и идентификация) шигатоксин продуцирующих штаммов бактерий *E. coli*. Анализ продуктов амплификации проводили путем разделения фрагментов ДНК в 1,5 % геле агарозы (Sigma, США). Расслоение полос ДНК на полученной электрофореграмме и их регистрацию определяли с помощью “Molecular Image Gel Doc XR+”.

Проверено специфичность оригинальных олигонуклеотидных праймеров к гену *stx2* и гену *eae*. Определена характеристика гена *stx2* и гена *eae*, как средств для молекулярно-генетического анализа шигатоксин продуцирующих штаммов бактерий *E. coli* с целью их выявления и идентификации. Проведенными исследованиями установлено, что оптимальным температурным режимом для обеих пар праймеров является температура 65°C.

Для определения чувствительности разработанных праймеров, были приготовлены 10 кратные последовательные разведения очищенной бактериальной ДНК. Концентрация очищенной ДНК положительных образцов была определена спектрофотометрическим методом и составляла для штамма O145 - 22,28 нг/0,001 см³ (ген *eae*) и 20,70 нг/0,001 см³ для штамма O157 (ген *stx2*)

Проверена специфичность и чувствительность синтезированных праймеров на штаммах *E. coli* серотипов O157, O145 и O111з Национальной коллекции штаммов микроорганизмов. Данные праймеры предполагается использовать как источник целевых генов: гена *stx2* и гена *eae*. Ген *stx2* был выявленный у штамма *E. coli* серотипа O157, а ген *eae* – у штамма *E. coli* серотипа O145.

Ключевые слова: полимеразная цепная реакция, *E. coli*, шигатоксин, Stx-токсины, последовательность нуклеотидов, интимин, хромосомный ген, *stx2* ген, *eae* ген.

Kasyanchuk V., Ushkalov V., Berhilevych O., Deryabin O., Efimova O., Kozii R. Detection and identification of shiga-toxin producing strain of the bacteria E. coli by polymerase chain reaction

The aim of this work is to develop tools for molecular genetic analysis (detection and identification) Shiga-producing strains of bacteria E. coli. Analysis of amplification products was performed by separation of DNA fragments on a 1,5 % agarose gel (Sigma, USA). A bundle of DNA bands on received and Registration elektroforegramme determined using "MolecularImageGelDocXR +".

Original specificity of oligonucleotide primers for the gene and stx2 gene eae were verified. Determine the characteristics of the gene and stx2 gene eae, as tools for molecular genetic analysis of Shiga-toxin-producing strains of E.coli bacteria for the purpose of detection and identification. From research that the optimal temperature conditions for both primer pairs is 65° C.

To determine the sensitivity of the designed primers were prepared by serial 10-fold dilutions of purified bacterial DNA. The concentration of the purified DNA positive samples was determined by spectrophotometry and amounted to strain O145 – 22,28 ng/0,001 cm³ (gene eae) and 20,70 ng/0,001 sm³dlya strain O157 (gene stx2)

Tested the specificity and sensitivity of the synthesized primers E. coli strains of serotypes O157, O145 and O111z National Collection of microbial strains. These primers to be used as a source of target genes: gene and gene stx2 eae. Stx2 gene was detected in strain E.coli serotype O157 and gene eae - strain E.coli O145 serotype.

Keywords: Polymerase chain reaction, E. coli, shyhatoksyn, Stx-toxins, nucleotide sequence, intimin, chromosomal gene, stx2 gene, eae gene.

Дата надходження до редакції: 23.03.2015 р.

Рецензент: д.вет.н., професор Кассіч В.Ю.

УДК 619:616.155.194.8:616-091

**ВПЛИВ НАДЛИШКУ МІДІ, ЗАЛІЗА, КОБАЛЬТУ НА МОРФОЛОГІЮ СЕЛЕЗІНКИ
ЗА КОЛІБАКТЕРІОЗУ У ПОРОСЯТ МОЛОЧНОГО ПЕРІОДУ**

М.В. Скрипка, д.вет.н., професор

І.Є. Запека, аспірантка

Полтавська державна аграрна академія

Довжина селезінки становила $8,2 \pm 0,3$ см; ширина – $1,3 \pm 0,4$ см. Капсула органу (ширина від $24,34 \pm 2,28$ мкм до $88,56 \pm 6,54$ мкм), з ознаками набряку та мукоїдного набухання, ширина трабекул від $13,43 \pm 1,16$ мкм до $54,67 \pm 2,57$ мкм. Відносна площа білої пульпи по відношенню до загальної площі зрізу становила від 9-13 % до 27 %. Кількість (1-3 вузлики в полі зору) і площа лімфатичних вузликів, яка становила від $2104,40 \pm 397,34$ мкм² до $3101,88 \pm 213,87$ мкм², на окремих ділянках площа вузликів складала до $26248,81 \pm 1263,38$ мкм². Ширина периартеріальних піхв коливається від $25,47 \pm 1,53$ мкм до $75,85 \pm 1,34$ мкм.

Ключові слова: колібактеріоз, селезінка, червона та біла пульпа, лімфатичний вузлик, поросята, мікроелементи.

Постановка проблеми у загальному вигляді. Незважаючи на те, що ветеринарна наука і практика накопичили великий арсенал засобів і методів профілактики та лікування інфекційних захворювань, вони продовжують наносити величезні економічні збитки. За статистичними даними, велику частку інфекційних захворювань у свинарстві займають шлунково-кишкові хвороби молодняка. Ними щорічно хворіє від 70 до 100 % поросят. В наслідок перехворювання молодняка на 20-25 % знижується потенціал їх продуктивності в дорослому віці. В свою чергу, значне місце серед них припадає на колібактеріоз – до 20-25 % від усіх інфекційних хвороб свиней. Смертність від цього захворювання досягає 70 %. Така ситуація – наслідок низької резистентності організму, рівень якої визначається станом імунної системи і проявом клітинних і гуморальних факторів захис-

ту. Великий вплив на морфологічні і функціональні показники, які характеризують стан імунної системи здійснює повноцінна годівля тварин, зокрема збалансованість кормів за мікроелементами [7, 8].

Аналіз останніх досліджень і публікацій.

Активізація клітинного і гуморального імунітету є основою профілактики захворювань травного каналу молодняка тварин та збереження генетичного потенціалу, їхньої продуктивності. Вітчизняний і зарубіжний досвід показує, що збереження здоров'я тварин і отримання високої продуктивності неможливо без ретельного балансування раціонів за мікроелементами. Значний вплив мікроелементів на фізіологічні процеси пояснюється тим, що вони входять до складу так званих акцесорних речовин: дихальні пігменти, вітаміни, гормони, ферменти і коферменти, що приймають