

Г.Г. Онищенко¹, И.А. Дятлов², Э.А. Светоч², Н.В. Воложанцев², В.А. Баннов², Н.Н. Карцев²,
В.Н. Борзенков², Н.К. Фурсова², И.Г. Шемякин², А.Г. Богун², А.А. Кисличкина², А.В. Попова²,
В.П. Мякина², М.Г. Теймуразов², О.В. Полосенко², Л.А. Кафтырева³, М.А. Макарова³, З.Н. Матвеева³,
Т.А. Гречанинова⁴, Н.С. Григорьева⁴, Е.В. Кича⁴, Г.В. Забалуева⁴, Т.Б. Кутасова⁴, Ю.Н. Коржаев⁴,
Н.С. Башкетова⁵, О.Н. Бушманова⁵, А.В. Сталевская⁵, И.Г. Чхинджерия⁵, А.Б. Жебрун³

¹ Правительство Российской Федерации, Москва

² ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии, Оболенск, Российская Федерация

³ НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, Санкт-Петербург, Российская Федерация

⁴ Центр гигиены и эпидемиологии в городе Санкт-Петербурге, Российская Федерация

⁵ Управление Роспотребнадзора по городу Санкт-Петербургу, Российская Федерация

Молекулярно-генетическая характеристика шига-токсинпродуцирующих *Escherichia coli*, выделенных при вспышке пищевой инфекции в Санкт-Петербурге в 2013 году

70

Пищевые инфекции, вызываемые шига-токсинпродуцирующими штаммами *Escherichia coli* (STEC), регистрируются во многих странах мира и представляют серьезную проблему для общественного здравоохранения. Сведений об эпидемиологии, этиологической структуре STEC-инфекций и молекулярно-генетических особенностях STEC-патогенов в Российской Федерации крайне недостаточно. **Цель исследования:** изучить вспышку пищевой инфекции в форме геморрагического колита (ГК) с гемолитико-уремическим синдромом (ГУС), энтероколита и острого гастроэнтерита среди детей Санкт-Петербурга в 2013 г. **Методы:** в работе использованы эпидемиологические, микробиологические, молекулярно-генетические и биоинформационные методы анализа. **Результаты:** объектами исследования послужили образцы клинического материала, пробы молока и пищевых продуктов, а также штаммы STEC, выделенные во время вспышки пищевой инфекции. Установлено, что вспышка пищевой инфекции была вызвана потреблением сырого молока, обсемененного STEC, что подтверждено данными эпидемиологического анализа, выявлением в пробах молока ДНК STEC и выделением возбудителей из испражнений больных детей и из проб молока. Данные полногеномного секвенирования показали, что описываемая вспышка была вызвана двумя группами патогенов: *E. coli* O157:H7 и *E. coli* O101:H33. Штаммы первой группы отнесены к ранее известному сиквенс-типу — ST24, второй группы — к ранее не описанному ST145, зарегистрированному нами в базе данных shigatox.net. В геномах штаммов обеих групп присутствуют нуклеотидные последовательности VT2-подобных профагов с интегрированными в них генами *stx*₂ и нуклеотидные последовательности плазмид с генами энтерогемолизина, а также гены синтеза основного фактора адгезии ЕНЕС интимина: в группе *E. coli* O157:H7 — интимина гамма, а в группе *E. coli* O101:H33 — интимина йота 2, до настоящей работы обнаруженного только в группе энтеропатогенных эшерихий (ЕПЕС). **Заключение:** пополнение знаний по эпидемиологии и биологии возбудителей STEC-инфекций позволит усовершенствовать диагностику, лечение и профилактику геморрагического колита.

Ключевые слова: энтерогеморрагические *Escherichia coli*, шига-токсинпродуцирующие *Escherichia coli*, гены шига-токсинов, ген интимина, серотипирование, мультилокусное сиквенс-типирование, полногеномное секвенирование. (Вестник РАМН. 2015; 1: 70–81)

Обоснование

Пищевые инфекции, вызываемые шига-токсинпродуцирующими штаммами *Escherichia coli* (STEC), — актуальная проблема общественного здравоохранения многих стран мира, включая высокоразвитые: США, Канаду, страны Европейского союза, Японию и др. Начиная с 1990-х гг. заболевания, обусловленные STEC-штаммами, регистрируют и в Российской Федерации [1, 2]. STEC-штаммы часто вызывают обычную водянистую диарею, которая, как правило, заканчивается выздоровлением в течение нескольких дней, тяжелые формы болезни провоцируют обуславливают развивают способны вызвать геморрагическую диарею (геморрагический колит, ГК) и ассоциированный с ней гемолитико-уремический синдром (ГУС). Наибольшую опасность, особенно для детей младшего возраста и пожилых людей, представляет ГУС, при котором у больного развиваются острая почечная недостаточность, тромбоцитопения и гемолитическая анемия. Смертность среди пациентов с ГУС может достигать 10%

и более; у 10–50% пациентов, перенесших ГУС, в течение длительного периода имеют место осложнения в виде хронической почечной недостаточности, диабета, неврологических нарушений и других патологий [3, 4]. Эффективных методов лечения STEC-инфекций до настоящего времени не предложено; применение антибиотиков не рекомендуется, поскольку их использование повышает риск возникновения ГУС у детей и пожилых пациентов [5]. Лечение инфекции в основном симптоматическое и предполагает введение больному жидкостей и электролитов, гемодиализ [5]. Лицензированных вакцин против STEC-инфекций на сегодня нет. Неготовность современной медицины эффективно бороться с пищевой инфекцией, вызванной STEC-штаммами, наглядно проявилась во время крупной вспышки, обусловленной *E. coli* O104:H4, в 2011 г. в Германии и других странах, когда инфекцией было поражено более 4000 человек, из которых 54 умерли [6].

Группа STEC-штаммов эшерихий включает в себя энтерогеморрагические *E. coli* (ЕНЕС) и не-ЕНЕС эшерихии. Для группы ЕНЕС характерно наличие в их геномах

G.G. Onishchenko¹, I.A. Dyatlov², E.A. Svetoch², N.V. Volozhantsev², V.A. Bannov², N.N. Kartsev², V.N. Borzenkov², N.K. Fursova², I.G. Shemyakin², A.G. Bogun², A.A. Kislichkina², A.V. Popova², V.P. Myakinina², M.G. Teimurazov², O.V. Polosenko², L.A. Kaftyreva³, M.A. Makarova³, Z.N. Matveeva³, T.A. Grechaninova⁴, N.S. Grigor'eva⁴, E.V. Kicha⁴, G.V. Zabalueva⁴, T.B. Kutasova⁴, Yu.N. Korzhaev⁴, N.S. Bashketova⁵, O.N. Bushmanova⁵, A.V. Stalevskaya⁵, I.G. Tchineria⁵, F.B. Zhebrun³

¹ Government of the Russian Federation, Moscow

² State Research Centre for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Russian Federation

³ Pasteur Research Institute of Epidemiology and Microbiology, St. Petersburg, Russian Federation

⁴ St. Petersburg Centre for Hygiene and Epidemiology, Russian Federation

⁵ St. Petersburg Rospotrebnadzor Department, Russian Federation

Molecular-genetic Characterization of Shiga-Toxin Producing *Escherichia Coli* Isolated During a Food-Borne Outbreak in St. Petersburg in 2013

Shiga toxin-producing Escherichia coli (STEC) food-borne infections are reported worldwide and represent a serious problem for public healthcare. In the Russian Federation there is little information on epidemiology and etiology of STEC-infections as well as on molecular-genetic peculiarities of STEC pathogens. Objective: Our aim was to describe a food-borne outbreak as hemorrhagic colitis (HC) along with hemolytic uremic syndrome (HUS), enterocolitis, and acute gastroenteritis in children in St.-Petersburg in 2013. Methods: Epidemiological, microbiological, molecular-genetic and bioinformatic methods were applied. Results: Objects to study were clinical specimens, milk and food samples, as well as STEC strains isolated during the outbreak. The outbreak of food-borne infection was found to be caused by STEC-contaminated raw milk as confirmed by epidemiological analysis, detection of STEC DNA and isolation of relevant pathogens in milk and sick children fecal specimens. The whole-genome sequencing revealed two groups of pathogens, E. coli O157:H7 and E. coli O101:H33 among collected strains. Group I strains were attributed to the previously known sequence type ST24, while group II strains belonged to the previously non-described sequence type ST145. In strain genomes of both groups there were identified nucleotide sequences of VT2-like prophage carrying stx2c gene, plasmid enterohemolysin gene, and gene of the STEC main adhesion factor intimin. Gene of intimin gamma was identified in E. coli O157:H7 strains and intimin iota 2 in E. coli O101:H33 strains. The latter previously was identified only in enteropathogenic E. coli (EPEC) strains. Conclusion: The additional knowledge of epidemiology and biology of STEC pathogens would assist clinicians and epidemiologists in diagnosing, treating and preventing hemorrhagic colitis.

Key words: enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC), Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* (STEC), Shiga-toxin genes stx2 and stx1, intimin gene eae, serotyping, MultiLocus Sequence Typing (MLST), whole-genome sequencing.

(Vestnik Rossiiskoi Akademii Meditsinskikh Nauk — Annals of the Russian Academy of Medical Sciences. 2015; 1: 70–81)

71

определенного набора 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. В геномах не-ЕНЕС эшерихий отсутствуют гены синтеза интимина и энтерогемолизина, а также гены синтеза белков III типа секреции, отвечающих, наряду с интимином, за адгезию возбудителя на энтероцитах кишечника человека и животных. Классический представитель ЕНЕС-группы — *E. coli* серотипа O157:H7, наиболее опасный патоген, с которым связаны крупные вспышки пищевых инфекций, зарегистрированные в разное время во многих странах мира, включая США, Канаду, Японию, европейские государства. В эти эпидемиологические вспышки были вовлечены сотни и тысячи человек, во всех случаях среди больных ГУС имели место летальные исходы. Кроме серотипа *E. coli* O157:H7 спорадические и вспышечные случаи ГК могут вызывать *E. coli* других серогрупп, среди которых наиболее часто встречаются O26, O55, O103, O111, O121 и O145. *E. coli* этих серогрупп вызывают менее тяжелые формы болезни, нежели *E. coli* O157:H7, однако обусловленные ими ГК и ГУС также могут сопровождаться летальными исходами [7]. В последние годы эпидемиологическая значимость указанных выше серогрупп *E. coli* в возникновении пищевых инфекций постоянно возрастает. Тем не менее серотип *E. coli* O157:H7 остается ведущим возбудителем тяжелых форм ГК и ГУС и основной причиной летальных исходов, причем число тяжелых форм болезни и число госпитализаций больных

при *E. coli* O157:H7 инфекции увеличиваются. Эту тенденцию исследователи связывают с повышением вирулентности возбудителя, причины которого остаются неясными.

Группа не-ЕНЕС шига-токсинпродуцирующих штаммов включает высокопатогенный для человека эпидемический штамм *E. coli* O104:H4 и отдельные штаммы *E. coli* различных O-серогрупп, выделенные у людей при спорадических случаях ГК и ГУС. Биологические и генетические свойства таких штаммов изучены слабо и нуждаются в дальнейших исследованиях. Это же справедливо и в отношении шига-токсинпозитивных не-ЕНЕС штаммов, нередко выделяемых от здоровых животных, иногда от людей и из продуктов питания. Роль этих штаммов в этиологии STEC-инфекции у человека не ясна.

Основной естественный резервуар и источник STEC-штаммов — сельскохозяйственные животные: крупный рогатый скот, овцы, козы, свиньи, птица. В последние годы получены доказательства того, что второй источник *E. coli* O157:H7 для человека — это зеленые растения: укроп, салат, петрушка, редис и др., в тканях которых возбудитель не только сохраняется, но и размножается [8]. Этим в определенной мере и объясняют факт увеличения в последние годы числа вспышек ГК среди людей после употребления зеленых растений или их семян.

Заражение человека STEC-штаммами, включая *E. coli* O157:H7, происходит, в первую очередь, при употреблении контаминированных патогеном сырых или неправильно приготовленных мясных продуктов, сырого молока, растительных салатов, питьевой воды и др. Инфицирование

людей, особенно детей, возможно также при контакте непосредственно с большими ГУС и бактерионосителями, при общении с домашними животными, при посещении животноводческих ферм и т.д. Заражающая доза *E. coli* O157:H7 для человека невысокая и составляет в большинстве случаев менее 100 клеток [9]. Инкубационный период заболевания непродолжительный, в среднем 3–4 сут.

В последние годы для эпидемиологического анализа вспышечных случаев пищевых инфекций широко используют генетический анализ штаммов возбудителей. В частности, у них определяют гены патогенности, изучают типы генетических детерминант синтеза шига-токсинов, определяют сиквенс-типы или проводят полногеномное секвенирование ДНК возбудителя. Подобный генетический анализ STEC-штаммов позволяет судить о биологических особенностях возбудителя, о тяжести и течении вызванного им заболевания, об источнике инфекции и т.д. Сиквенс-типирование, кроме того, позволяет установить доминирующие типы циркулирующих в стране STEC-штаммов и сравнить их с сиквенс-типами, выявляемыми в других странах.

Настоящая работа посвящена анализу произошедшей в Санкт-Петербурге в 2013 г. вспышки пищевой инфекции, в частности некоторым вопросам эпидемиологии болезни, выделению и идентификации возбудителя, выявлению источника заболевания людей, изучению фено- и генотипических свойств STEC-штаммов, в том числе *E. coli* O157:H7, выделенных при вспышке.

72

Методы

Дизайн исследования

В работе проанализирована серия случаев инфекционных заболеваний с применением эпидемиологических, микробиологических, молекулярно-генетических и биоинформационных методов анализа.

Критерии соответствия

В исследование были включены образцы клинического материала (кала) от госпитализированных в Санкт-Петербурге в мае-июле 2013 г. 48 детей и 14 взрослых с острыми кишечными инфекциями (ОКИ). Проведен молекулярно-генетический анализ на наличие STEC образцов клинического материала от 15 больных детей с симптомами ГК и ГУС, а также образцов сырого коровьего молока ($n = 6$), проб пищевых продуктов и воды ($n = 213$), пробы испражнений от здоровых рабочих животноводческого хозяйства ($n = 33$).

Условия проведения

Исследование проведено в ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии (Оболensk, Московская обл., Российская Федерация), НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера (Санкт-Петербург, Российская Федерация) и Центре гигиены и эпидемиологии (Санкт-Петербург, Российская Федерация).

Продолжительность исследования

Исследование проводилось в период с мая 2013 по декабрь 2014 г.

Исходы исследования

В ходе исследования выделены и идентифицированы STEC-штаммы типичного для возбудителя геморрагического колита серотипа O157:H7, а также серотипа O101:H33. Показано, что вспышка ОКИ была вызвана

потреблением сырого коровьего молока, контаминированного бактериями STEC. Исходом большинства случаев заболевания в анализируемой вспышке ОКИ явилось выздоровление, кроме одного, закончившегося смертью 2-летнего ребенка.

Методы регистрации исходов

Клинические, бактериологические, молекулярно-биологические.

Бактериальные изоляты и штаммы. Изоляты STEC выделены во время вспышки ОКИ в сентябре 2013 г. ($n = 6$). В Государственную коллекцию патогенных микроорганизмов и клеточных культур «ГКПМ-Оболensk» депонированы штаммы *E. coli* O157:H7 13177 (Инв. № В-7440); *E. coli* O157:H7 13200 (В-7441); *E. coli* O157:H7 61-58 (В-7613); *E. coli* 13199-2 (В-7616); *E. coli* 85-50 (В-7614); *E. coli* 13573 (В-7615).

Выделение и культивирование микроорганизмов проводили согласно Методическим указаниям МУК 4.2.2963-11 «Методические указания по лабораторной диагностике заболеваний, вызываемых *E. coli*, продуцирующих шига-токсины (STEC-культуры) и обнаружению возбудителей STEC-инфекций в пищевых продуктах». Бактериальные изоляты хранили в 10% глицерине при температуре -70°C .

Видовую идентификацию микроорганизмов проводили с помощью биохимических тест-систем API-20, автоматической системы VITEK-2 Compact (Biomerieux, Франция), а также на масс-спектрометре MALDI-TOF Biotyper (Bruker, Германия).

Выявление STEC в клиническом материале осуществляли с помощью мультиплексной ПЦР тест-системы для детекции *E. coli* O157:H7 «Тест-система ТЭК-O157», регистрационное удостоверение № ФСР 2012/13709 (Оболensk, Россия), ПЦР тест-системы для детекции в реальном времени *E. coli* O157:H7 и *E. coli* O104:H4 STEC MULTI-FL, TY 9398-209-78095326-2013 (Россия), а также тест-систем «АмплиСенс ЕНЕС-FL» и «АмплиСенс Эшерихиозы-FL» («Интерлабсервис», Россия).

Серотипирование. Определение O-серогрупповой принадлежности штаммов STEC осуществляли с помощью реакции агглютинации на стекле с использованием следующих наборов: «Сыворотки диагностические, эшерихиозные ОК сухие для РА-ФСР 42-0010-4610-03», «Сыворотки диагностические, эшерихиозные ОК поливалентные сухие для РА-ФСР 42-0010-4611-03» (ОАО «Биомед» им. И.И. Мечникова, Россия), «Агглютинирующая моновалентная сыворотка O101» (ФКП «Армавирская биофабрика», Россия), «Диагностическая агглютинирующая сыворотка O101» (Statens Serum Institute, Дания), а также латексного антигенового диагностикума (ФБУН «ГНЦ ПМБ», Россия), в соответствии с рекомендациями производителей. Определение H-серогрупповой принадлежности проводили в реакции иммобилизации с сывороткой H7 (ОАО «Биомед» им. И.И. Мечникова, Россия), а также с помощью ПЦР со специфичными праймерами на ген *fliC* и анализа полиморфизма длин рестрикционных фрагментов ПЦР-продуктов [10].

Чувствительность к бактериофагу V32, специфичному к *E. coli* серогруппы O157, определяли методом спот-теста [11].

Чувствительность к антимикробным препаратам определяли диско-диффузионным методом, а также с помощью бактериологического анализатора VITEK-2 Compact (Biomerieux, Франция). Интерпретацию результатов осуществляли согласно критериям EUCAST (http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/).

Иммунохроматографическая детекция шига-токсинов. Определение шига-токсинов и липополисахаридов *E. coli*

серотипа O157:H7 в клиническом материале и в бактериальных культурах проводили с помощью иммунохроматографических тестов (ИХ-тестов) RIDA QUICK Verotoxin/O157 Combi (R-biopharm, Германия), Singlepath E. coli O157 (Merck, Германия), Duopath Verotoxins (Merck, Германия) в соответствии с рекомендациями производителя.

Мультилокусное сиквенс-типирование (MLST) проводили по схеме, представленной на веб-сайте базы данных EcMLST Version 1.2 (<http://www.shigatox.net/ecmlst/cgi-bin/index>), которая основана на анализе комбинаций 15 генов «домашнего хозяйства» (housekeeping genes): *aspC* — аспаратаминотрансферазы; *clpX* — АТФ-зависимой протеазы Clp; *fadD* — сул-СоА синтетазы; *icdA* — изоцитратдегидрогеназы; *lysP* — лизинспецифичной пермеазы; *mdh* — малатдегидрогеназы; *uidA* — β-D-глюкуронидазы; *arcA* — регуляторного белка аэробного дыхания ArcA; *aroE* — дегидрошкимаатредуктазы; *суаА* — аденилатциклазы; *dnaG* — ДНК-праймазы; *grpE* — белка термического шока GrpE; *mltD* — маннитол-1-фосфат дегидрогеназы; *mutS* — белка метилнаправленной репарации MutS; *rpoS* — сигма-фактора RpoS РНК-полимеразы. Последовательности ДНК генов штамма *E. coli* O157:H7 61-58, депонированные в базе данных GenBank: *grpE* (KJ667569); *mutS* (KJ667570); *uidA* (KJ667571); *arcA* (KJ667572); *aroE* (KJ667573); *aspC* (KJ667574); *clpX* (KJ667575); *суаА* (KJ667576); *dnaG* (KJ667577); *mltD* (KJ667578); *pgi* (KJ667579); *rpoS* (KJ667580); *cstA* (KJ667581); *fadD* (KJ667582); *icd* (KJ667583); *lysP* (KJ667584); *mdh* (KJ667585).

Полногеномное секвенирование осуществляли в системе Ion Torrent PGM (Life Technologies, США) согласно инструкциям фирмы-производителя (<http://ioncommunity.lifetechnologies.com>). Для секвенирования использовали наборы реактивов Ion PGM Reagents 200 Kit, Ion 314 Chip Kit и Ion 318 Chip Kit (Life Technologies, США). Индивидуальные прочтения собирали в контиги с помощью программы Newbler 2.9 (Roche, Швейцария).

Биоинформационный анализ выполняли с помощью программ Lasergene 11 (DNASTAR, США), Vector NTI Advance 11.5 (Invitrogen, США), Chromas Version 1.5 (Technelysium Ply Ltd, Австралия), BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Этическая экспертиза

Материалы, использованные в работе, не содержат персональных данных пациентов, т.к. полученные от них клинические изоляты промаркированы без указания фамилии, даты рождения, адреса проживания, номера истории болезни и личных документов и других именных

материалов. В то же время в соответствии с требованиями биоэтического комитета Российской Федерации каждым пациентом (или его представителем) при поступлении в клинику был заключен договор с лечебным учреждением, содержащий согласие на проведение лечения и лабораторного обследования, в т.ч. на углубленное обследование с использованием инструментальных методов.

Статистический анализ

В ходе работы проведена оценка динамики случаев заболеваний ГК по дням в период вспышки ОКИ, возрастного состава больных, зарегистрированных во время вспышки, соотношения дат приобретения молока и развития заболевания. Для обработки результатов использовали ресурсы программы Microsoft Office Excel 2010 (США).

Результаты

Участники исследования

По данным Управления Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по г. Санкт-Петербургу в период с 21.05.2013 по 12.07.2013 г. в городе было зарегистрировано более 5000 случаев ОКИ, 64 из них сопровождалось явлениями ГК, 6 — осложнились ГУС. Из 64 заболевших 62 человека, в т.ч. 48 детей и 14 взрослых, были госпитализированы, 1 ребенок умер. В возрастной структуре больных 65,6% составляли дети до 6 лет, максимальный удельный вес представлен детьми возрастной группы 1–2 года (табл. 1). Пик числа заболевших ГК пришелся на период с 19.06.2013 по 06.07.2013 г. (рис. 1).

Таблица 1. Возрастная характеристика больных, выявленных во время вспышки острой кишечной инфекции в Санкт-Петербурге в 2013 г.

Возраст, лет	Абсолютное число	%
<1	10	15,6
1–2	20	31,3
3–6	12	18,8
7–10	3	4,7
11–14	3	4,7
15–19	2	3,1
20–29	5	7,8
30–39	4	6,3
>40	5	7,8
Всего	64	100

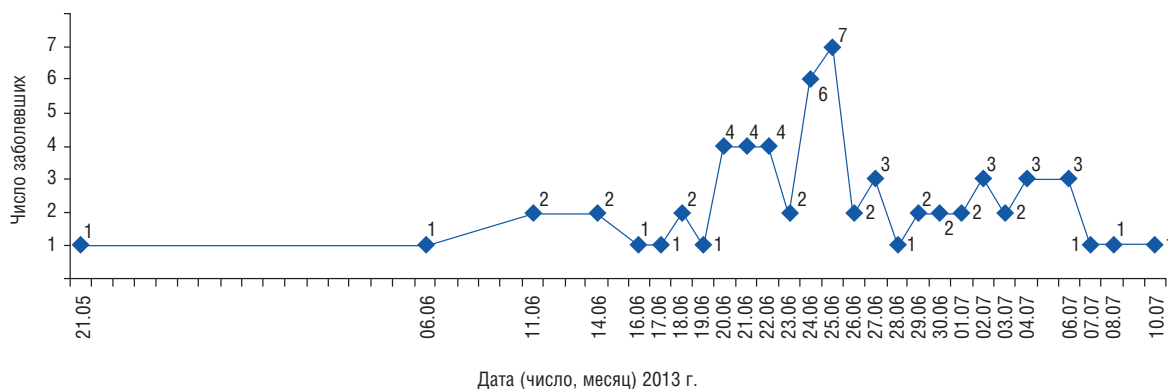


Рис. 1. Динамика случаев заболеваний геморрагическим колитом по дням в период вспышки острой кишечной инфекции в Санкт-Петербурге в 2013 г.

Диагнозы ГК и ГУС были установлены на основании клинических проявлений болезни и в 16 случаях подтверждены результатами лабораторных исследований. ГК у больных начинался с повышения температуры тела, появления слабости, рвоты и в большинстве случаев с водянистой диареей, которая в последующем переходила в геморрагическую. ГУС у больных появлялся на 4–5-е сут от начала болезни и сопровождался субфебрильной температурой тела, анемией и почечной недостаточностью (повышенное содержание креатинина и мочевины в сыворотке крови, стойкая анурия). Все случаи ГК и ГУС протекали в среднетяжелой и тяжелой форме.

Основным фактором передачи людям возбудителей STEC-инфекции, обусловивших вспышку ГК в г. Санкт-Петербурге, с большой вероятностью было сырое молоко, реализованное населению через молокоавтоматы. Эта связь явно прослежена в 10 случаях при сравнении даты приобретения семьей молока и даты манифестации заболевания у детей, употреблявших это молоко (табл. 2). Судя по представленным данным, инкубационный период заболевания составлял 1–4 сут. Доказательством роли сырого молока в возникновении пищевой инфекции было также обнаружение в образцах молока ДНК *E. coli* O157:H7, выделение из них культуры *E. coli* с генами синтеза шига-токсина 2-го типа (см. ниже) и, наконец, тот факт, что прекращение реализации сырого молока из автоматов позволило быстро остановить вспышку пищевой инфекции.

74

Таблица 2. Сведения о датах приобретения молока и развитии заболевания

№ п/п	Больной	Дата приобретения молока, июнь 2013 г.	Дата манифестации заболевания, июнь 2013 г.
1	К.В.	04, 05	06
2	Ш.Д.	07, 10	11
3	П.Д.	15	17
4	Г.К.	19	21
5	Р.В.	19	22
6	Б.А.	21	21
7	Ш.Е.	17	18
8	К.В.	19	20
9	М.Л.	19	20
10	М.В.	20	25

Бактериологическому и молекулярно-генетическому анализу на наличие STEC-штаммов и их специфических ДНК были подвергнуты испражнения 15 больных детей с симптомами ГК и ГУС; 5 образцов сырого коровьего молока, взятого из молокоавтоматов по 5 различным адресам Санкт-Петербурга и г. Красное село; 1 образец, отобранный из молочного танкера завода-производителя; 213 проб пищевых продуктов и воды из детских учреждений; 33 пробы испражнений от здоровых рабочих животноводческого хозяйства, из которого молоко поступало в молокоавтоматы.

Основные результаты исследования

Результаты исследований образцов испражнений и патологического материала от детей с предварительными диагнозами «Энтероколит», «ГК» и «ГУС», представленные в табл. 3, показывают, что STEC были выделены у 4 из 15 обследованных. В 2 случаях — из испражнений ребенка П.Д. с диагнозом «ГК и ГУС» и больного Б.А. с диагнозом «Острый гастроэнтерит» — были выделены

ЕНЕС-культуры серотипа O157:H7, которые имели типичные для этого возбудителя свойства: характерный рост на сорбитол-агаре, хромогенной среде и среде Эндо. Они были чувствительны к специфическому бактериофагу V32, давали выраженную агглютинацию со специфическими латексным и сывороточным диагностикумами и положительную реакцию в ИХ-тесте, что подтверждает принадлежность данных изолятов к серогруппе O157. Клетки обеих культур подвижные, результаты реакции иммобилизации бактерий со специфической H7-сывороткой свидетельствуют о наличии у них жгутикового антигена H7. С помощью ИХ-теста Duopath Verotoxins показано, что оба изолята продуцируют шига-токсин 2. Изолят от больного П.Д. депонирован в Государственную коллекцию патогенных микроорганизмов «ГКПМ-Оболensk» как штамм *E. coli* O157:H7 13177 под номером В-7440, а 2 культуры, выделенные от больного Б.А. независимо двумя группами исследователей, — как штаммы *E. coli* O157:H7 13200 и *E. coli* O157:H7 61-58 под номерами В-7441 и В-7613, соответственно.

Анализ штаммов *E. coli* O157:H7 от обоих пациентов (П.Д. и Б.А.) с помощью ПЦР в режиме реального времени показал, что в составе их геномов присутствуют гены основных факторов патогенности STEC: *rfb*_{O157}, *stx2*, *eae*, *ehx* и *fliC*_{H7}. Следует отметить, что у обоих пациентов возбудители были высеяны из испражнений в низкой концентрации. От больного П.Д. при исследовании более 50 колоний энтеробактерий была изолирована 1 колония патогена. У больного Б.А. только 3 колонии из 77 исследованных принадлежали *E. coli* O157:H7. Столь низкий показатель высева патогена из испражнений больных можно объяснить либо предшествующим взятию проб применением эффективных против данного патогена антимикробных препаратов, либо определенной цикличностью его выделения с каловыми массами.

У больного П.Д., помимо выделения из испражнений культуры *E. coli* O157:H7, в сыворотке крови с помощью ИХ-теста было обнаружено присутствие шига-токсина и специфического O157 антигена; методом ПЦР в режиме реального времени в том же образце сыворотки и испражнениях были детектированы гены *stx2*, *rfb*_{O157} и *eae*. Эти же гены обнаружили в испражнениях больного Б.А. Таким образом, лабораторные исследования свидетельствуют, что пищевая инфекция у П.Д. и Б.А. была обусловлена ЕНЕС-штаммами серотипа O157:H7.

В двух других случаях (больные Ш.Л. и П.А., см. табл. 3) в каловых массах и в выделенных культурах также обнаружен ген *stx2*, однако гены *rfb*_{O157} и *fliC*_{H7}, определяющие серотип O157:H7, не выявлены. Эти 2 культуры имели типичные для *E. coli* свойства, но в отличие от *E. coli* O157:H7 имели фермент глюкуронидазу и были устойчивы к O157-специфическому бактериофагу V32. Следует отметить, что специфичность бактериофага V32 составляет 95% (проверено на 230 штаммах *E. coli* разных серогрупп, выделенных в разных регионах России). По данным ИХ-теста, обе культуры продуцировали шига-токсин. Установлена принадлежность STEC-культур, изолированных от больных Ш.Л. и П.А., к серогруппе O101. STEC-культура в испражнениях Ш.Л. присутствовала в значительной концентрации: из 77 исследованных колоний, типичных для *E. coli*, 48 содержали ген *stx2*. Два STEC-штамма *E. coli* 13199-2 и *E. coli* 85-50, выделенные от Ш.Л. независимо двумя группами исследователей, депонированы в Государственную коллекцию патогенных микроорганизмов «ГКПМ-Оболensk» под номерами В-7616 и В-7614.

Выделенные STEC-штаммы были чувствительны ко всем использованным антимикробным препаратам:

Таблица 3. Результаты бактериологического и молекулярно-генетического анализа образцов фекалий на наличие в них STEC-культур и их специфических ДНК

№ п/п	Пациент (возраст)	Предварительный диагноз	Вид анализируемого материала	ИХ	Детекция генов методом ПЦР в режиме реального времени						Выделенная STEC культура
					<i>stx2</i>	<i>stx1</i>	<i>rfb</i> _{O157}	<i>fliC</i> _{H7}	<i>eae</i>	<i>ehly</i>	
1	П.Д. (5 лет)	ГК, ГУС	Кал	+	+	–	+	+	+	+	–
			Сыворотка	+	+	–	+	+	+	+	–
			Среда обогащения (кал)	н/и	+	–	+	+	+	+	<i>E. coli</i> O157
2	Ш.Д. (1,5 года)	ГК	Кал	+	+	–	+	н/и	+	н/и	–
			Сыворотка	+	+	–	+	н/и	+	н/и	–
			Среда обогащения (кал)	н/и	–	–	+	н/и	–	н/и	–
3	Б.Л. (1 год)	Энтероколит	Кал	н/и	–	–	–	н/и	–	н/и	–
			Сыворотка	+	–	–	–	н/и	–	н/и	–
			Среда обогащения (кал)	н/и	–	–	–	н/и	–	н/и	–
4	К.Л. (3 года)	Энтероколит	Кал	н/и	–	–	–	н/и	–	н/и	–
			Сыворотка	+	–	–	–	н/и	–	н/и	–
			Среда обогащения (кал)	н/и	–	–	–	н/и	–	н/и	–
5	А.М. (15 лет)	Энтерит, ГУС	Кал	н/и	–	–	–	н/и	+	н/и	–
			Сыворотка	+	–	–	–	н/и	–	н/и	–
			Среда обогащения (кал)	н/и	–	–	–	н/и	+	н/и	–
6	П.П. (1 год)	Энтерит	Кал	н/и	–	–	–	н/и	–	н/и	–
			Сыворотка	+	–	–	–	н/и	–	н/и	–
			Среда обогащения (кал)	н/и	+	–	–	н/и	+	н/и	–
7	Ш.Л. (5 лет)	ГК	Кал	–	+	–	–	н/и	+	н/и	<i>E. coli</i> O101
8	Б.А. (1 год)	Острый гастроэнтерит	Среда обогащения (кал)	+	+	–	+	+	+	н/и	<i>E. coli</i> O157
9	П.А. (15 лет)	ГК, ГУС	Среда обогащения (кал)	н/и	+	–	–	–	+	н/и	<i>E. coli</i> O101
10	К.В. (2 года)	ГК?, ГУС? (умер)	Формализированные органы	н/и	–	–	–	–	–	–	–
11	Г.К. (5 лет)	ГК	Кал	н/и	+	–	н/и	н/и	+	н/и	–
12	Р.В. (5 лет)	ГК	Кал	н/и	+	–	н/и	н/и	+	н/и	–
13	К.В. (3 года)	ГК	Кал	н/и	+	–	н/и	н/и	+	н/и	–
14	М.Л. (6 лет)	ГК	Кал	н/и	+	–	н/и	н/и	+	н/и	–
15	М.В. (4 года)	ГК	Кал	н/и	+	–	н/и	н/и	+	н/и	–

Примечание. ГК — геморрагический колит; ГУС — гемолитико-уремический синдром; ИХ — иммунохроматографический тест на STEC O157; «+» — положительный результат ПЦР: наличие специфической ДНК с соответствующим геном; «–» — отрицательный результат; «н/и» — не исследовано.

β-лактамам, включая цефалоспорины и карбапенемы, хинолонам, аминогликозидам, нитрофуранам, тетрациклинам, хлорамфениколу, ко-тримоксазолу, фосфомицину и колистину.

У 11 из 15 обследованных детей STEC-культуры из образцов испражнений выделены не были. Тем не менее у 7 из 11 больных в кале были обнаружены гены шига-токсинов и интимина (см. табл. 3). Обращает на себя внимание факт выявления с помощью ИХ-теста в сыворотках крови 6 больных детей шига-токсинов и специфического O157-антигена, причем ИХ-тест был положителен у 3 больных детей, у которых специфические ДНК *E. coli* O157:H7 в испражнениях обнаружены не были.

При бактериологическом и ПЦР-анализе испражнений от 33 рабочих животноводческого хозяйства, откуда поступало сырое молоко в торговую сеть для реализации через молокоавтоматы, ни в одной из исследованных проб STEC-культуры или их ДНК обнаружены не были. Безуспешными оказались и попытки выделить STEC-

культуры или их ДНК при исследовании 213 образцов пищевых продуктов и воды из детских учреждений, где были зарегистрированы случаи ОКИ.

При исследовании 5 образцов сырого коровьего молока, взятого из разных молокоавтоматов, во всех случаях обнаружены микроорганизмы группы кишечной палочки в концентрации не менее 10³ КОЕ/мл. В среде обогащения после посева молока в 4 из 5 образцов ПЦР в режиме реального времени идентифицирована ДНК ЕНЕС-штаммов. При дополнительном ПЦР-исследовании с праймерами на отдельные гены вирулентности в одном из образцов выявлена ДНК с генами *stx2*, *rfb*_{O157} и *eae*, характерными для *E. coli* O157:H7 (подтверждено в трех независимых экспериментах). Обнаружение одновременно трех основных маркеров ЕНЕС O157:H7 предполагает присутствие этого патогена в образце молока. Однако выделить чистую культуру *E. coli* O157:H7 в этом случае не удалось. Очевидно, это связано с тем, что доля бактериальных клеток с искомыми генами в сме-

Таблица 4. Характеристика STEC-штаммов, выделенных во время вспышки острой кишечной инфекции в 2013 г.

Штамм (№ в коллекции «ГКПМ-Оболенск»)	13177 (В-7440)	13200 (В-7441)	61-58 (В-7613)	13199-2 (В-7616)	85-50 (В-7614)	13573 (В-7615)
Серотип	O157:H7	O157:H7	O157:H7	O101:H33*	O101:H33*	O101:H33*
Источник выделения	Фекалии (П.Д.)	Фекалии (Б.А.)	Фекалии (Б.А.)	Фекалии (Ш.Л.)	Фекалии (Ш.Л.)	Молоко
Биохимическая активность	dSor	–	–	–	–	–
	BGUR	–	–	–	+	+
	SAC	+	+	+	–	–
	ODC	+	+	+	–	–
	LDC	+	+	+	–	–
	O/129R	–	–	–	+	+
	IMLTa	–	–	–	–	–
	ILATa	–	–	–	–	–
Аллельный профиль MLST	arcA	6	6	6	3	3
	aroE	7	7	7	1	1
	aspC	1	1	1	3	3
	clpX	1	1	1	3	3
	суаA	1	1	1	2	2
	dnaG	1	1	1	2	2
	fadD	4	4	4	1	1
	grpE	1	1	1	2	2
	icdA	3	3	3	15	15
	lysP	2	2	2	1	1
	mdh	4	4	4	1	1
	mtlD	11	11	11	2	2
	mutS	11	11	11	1	1
	rpoS	8	8	8	1	1
	uidA	4	4	4	1	1
ST	24	24	24	145	145	145
ST-комплекс	11	11	11	23	23	23
Ген <i>stx</i>	stx2 _c	stx2 _c	stx2 _c	stx2 _c	stx2 _c	stx2 _c
Ген <i>ehx</i>	+	+	+	+	+	+
Ген <i>eae</i>	eae _γ	eae _γ	eae _γ	eae _γ	eae _γ	eae _γ
Ген <i>rfb</i> _{O157}	+	+	+	–	–	–
Ген <i>fliC</i> _{H7}	+	+	+	–	–	–

Примечание. * – H33 определен на основании полногеномного секвенирования; «+» – наличие признака; «-» – отсутствие признака; dSor – ферментация сорбитола; BGUR – β-глюкуронидазная активность; SAC – ферментация сахарозы; ODC – орнитиндекарбоксилазная активность; LDC – лизиндекарбоксилазная активность; O/129R – устойчивость к вибриостатическому агенту 2,4-диамино-6,7-диизопропилптеридину; IMLTa – ферментация L-малата; ILATa – ферментация L-лактата; *aspC* – ген аспартаминотрансферазы; *clpX* – ген АТФ-зависимой протеазы Clp; *fadD* – ген сул-CoA синтетазы; *icdA* – ген изоцитратдегидрогеназы; *lysP* – ген лизинспецифичной пермеазы; *mdh* – ген малатдегидрогеназы; *uidA* – ген β-D-глюкуронидазы; *arcA* – ген регуляторного белка аэробного дыхания ArcA; *aroE* – ген дегидрошхикиматредуктазы; *суаA* – ген аденилатциклазы; *dnaG* – ген ДНК-праймазы; *grpE* – ген белка термического шока GrpE; *mtlD* – ген маннитол-1-фосфат дегидрогеназы; *mutS* – ген белка метилнаправленной репарации MutS; *rpoS* – ген сигма-фактора RpoS РНК-полимеразы.

си с другими энтеробактериями, выросшими в среде обогащения, не превышает значения 1:50 000 (установлено при титровании ДНК-матрицы анализируемых бактерий и референс-бактерий в количественной ПЦР). Следует отметить, что инфицирующая доза *E. coli* O157:H7 очень низка и колеблется в интервале от 4 до 100 клеток [9]. Культура STEC-штамма серогруппы O101 была выделена при бактериологическом исследовании молока, отобранного непосредственно из емкостей завода-производителя (штамм *E. coli* 13573, № В-7615 в коллекции «ГКПМ-Оболенск»). По данным бактериологического и ПЦР-анализа, этот штамм не отличался от штаммов *E. coli* 85-50 и *E. coli* 13199-2, выделенных от больного ребенка Ш.Л. (табл. 4).

Дополнительные результаты исследования

Как показали результаты бактериологического анализа, дополненного данными ПЦР-исследования, все STEC-штаммы, выделенные от больных детей при

вспышке пищевой инфекции, распределились на 2 группы: *E. coli* серотипа O157:H7 и *E. coli* серогруппы O101. Для дальнейшей характеристики и сравнительного анализа выделенных STEC-штаммов были использованы методы полногеномного секвенирования и мультилокусного сиквенса-типирования (MLST).

В результате трех независимых раундов секвенирования в системе Ion Torrent PFG для каждого из 6 штаммов было получено от 1,1 до 2,8 млн коротких нуклеотидных фрагментов (ридов). Обработка и анализ ридов с помощью программы Lasergene 11 с последующей сборкой нуклеотидных последовательностей в контиги (Newbler 2.9) позволили провести сравнительный анализ секвенированных геномов. Для этого среди штаммов ЕНЕС, геномы которых размещены в базе данных GenBank, был выбран наиболее близкий гомолог с наименее выраженным однонуклеотидным полиморфизмом (SNP) – штамм *E. coli* Xuzhou21 (NC_017906.1) серотипа O157:H7. Нуклеотидные последовательности генома это-

го штамма были использованы в качестве референс-последовательностей при сборке и анализе геномов исследуемых нами штаммов (рис. 2).

Проведенный анализ показал практически полную идентичность геномов штаммов *E. coli* O157:H7 61-58, 13177 и 13200, выделенных от больных Б.А. и П.Д. Геномы трех штаммов серогруппы O101, выделенные от ребенка (*E. coli* 85-50 и *E. coli* 13199-2) и из молока (*E. coli* 13573),

отличаются от трех штаммов *E. coli* O157:H7, но идентичны друг другу (см. рис. 2).

В контигах, полученных при секвенировании STEC-штаммов (алгоритм *de novo*), выявлены все 15 участков генома, используемых для мультилокусного типирования высокопатогенных *E. coli* по схеме вебсайта shigatox.net. На основании анализа полученных контигов и исследования MLST-локусов можно заключить, что штаммы

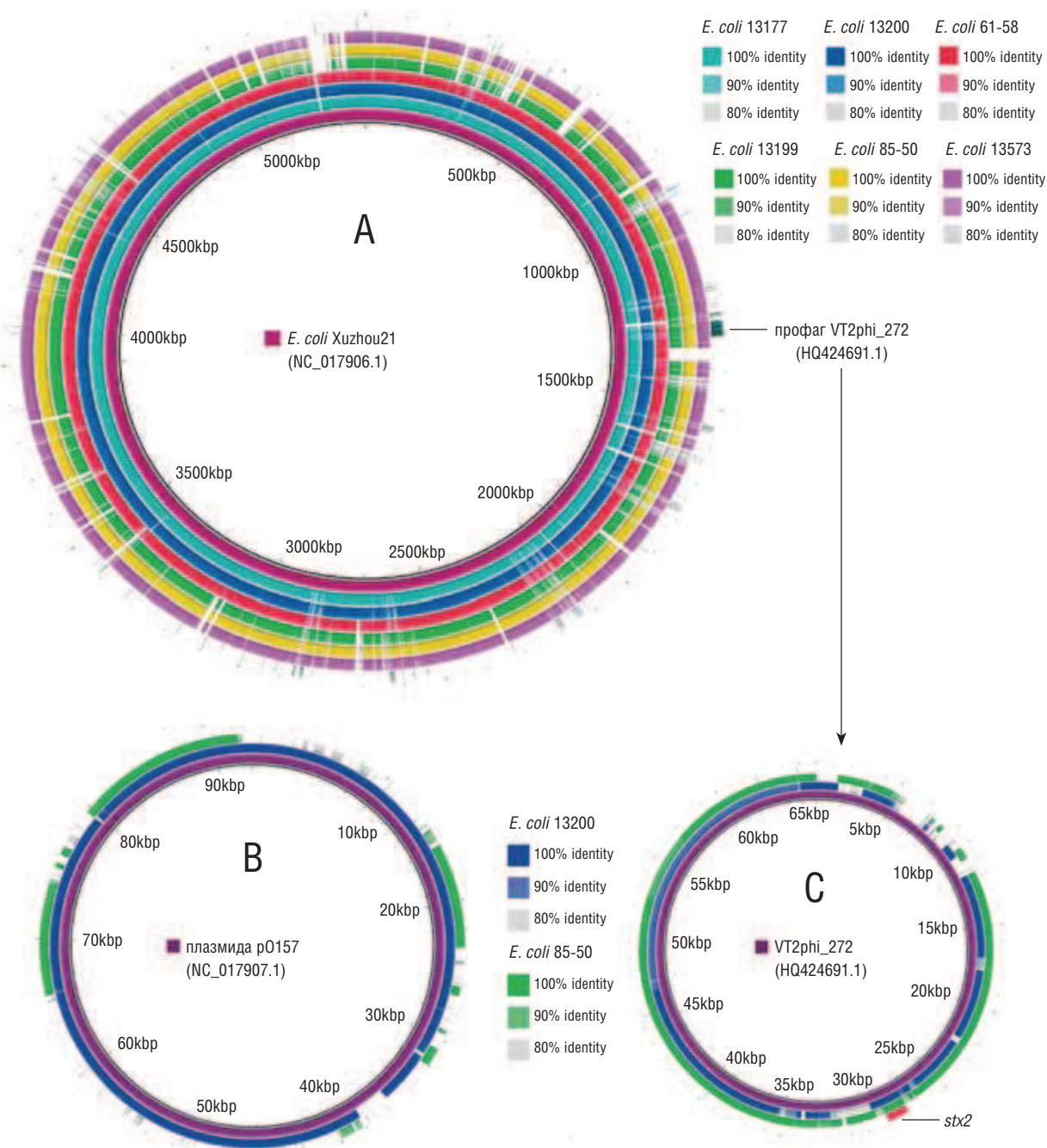


Рис. 2. Сравнительный анализ геномов выделенных ЕНЕС штаммов O157:H7 и O101:H33.

Примечание. А — сборка контигов анализируемых геномов на референс-последовательности хромосомы штамма *E. coli* Xuzhou21 (NC_017906.1). Соответствие окружностей (от внутренней к наружной): *E. coli* Xuzhou21, три штамма *E. coli* O157:H7 (13177, 13200 и 61-58, соответственно), три штамма *E. coli* O101:H33 (13199-2, 85-50 и 13573, соответственно); В — сравнение нуклеотидных последовательностей в составе рO157-подобных плазмид штаммов *E. coli* 13200 (серотип O157:H7) и *E. coli* 85-50 (серогруппа O101); С — сравнение нуклеотидных последовательностей профагов этих же штаммов. Изображения построены с использованием программы Blast Ring Image Generator (<http://sourceforge.net/projects/brig>).

E. coli O157:H7 13177, 13200 и 61-58 принадлежат к сиквенс-типу ST24 (ST комплекс 11) с MLST-профилем, который был обнаружен в базе данных патогенных *E. coli* только у одного штамма — ЕНЕС TW05359 (PF-15, 413) — неизвестного происхождения из коллекции Центра NIAID STEC (<http://www.shigatox.net/ecmlst/cgi-bin/strainquery?strainname=TW05359&scheme=st15>). Штаммы второй группы *E. coli* 85-50 и *E. coli* 13199-2, выделенные от больного ребенка Ш.Л., и *E. coli* 13573, выделенный из молока, также идентичны между собой, но по результатам MLST отличаются от штаммов первой группы. Профиль MLST этих штаммов уникален: на основании нашей заявки в базе данных shigatox.net ему присвоен номер ST145 (ST-комплекс 23) (<http://shigatox.net/ecmlst/cgi-bin/stquery15?st=145&search=15&scheme=st15>; см. табл. 4).

При анализе нуклеотидных последовательностей генов основных факторов патогенности STEC-штаммов установлено следующее. Во всех 6 штаммах обнаружены полные нуклеотидные последовательности гена *stx2_c*, причем нуклеотидные последовательности *stx2_c* генов во всех исследованных штаммах полностью идентичны. Ген *stx2_c*, детерминирующий синтез шига-токсина типа 2С, выявляют в штаммах *E. coli* O157:H7, вызывающих средние и тяжелые формы ГК и ГУС [12]. Следует отметить, что установленные гены шига-токсинов локализируются на VT2-подобных профагах, нуклеотидные последовательности которых полностью идентичны, но только в пределах каждой группы штаммов. То же самое можно сказать о нуклеотидных последовательностях рO157-подобных плазмид, идентичных в пределах каждой группы исследованных штаммов и отличающихся у O157:H7 и O101 штаммов (см. рис. 2). В составе плазмид выявлены кластеры генов, ответственных за синтез энтерогемолизина (*ehxA*) и транспортных Hly-белков.

В штаммах ЕНЕС O157:H7 выявлены последовательности гена *eae_γ*, детерминирующего синтез белка интимина гамма, в штаммах серогруппы O101 — аналогичный ген *eae_γ*, детерминирующий синтез интимина другого типа — йота 2. Первый характерен для штаммов ЕНЕС, тогда как ген интимина йота 2 не ассоциирован со STEC-штаммами и до сих пор был обнаружен только в энтеропатогенных штаммах *E. coli* (ЕРЕС), т.е. штаммах, не продуцирующих шига-токсины [13–15].

В геномах штаммов серогруппы O101 (*E. coli* 13573, *E. coli* 13199-2 и *E. coli* 85-50) обнаружены нуклеотидные последовательности, идентичные последовательностям гена *fliC*, детерминирующего синтез флагеллина H33-серотипа (GenBank: AF345849.1; AY250015.1), а также нуклеотидные последовательности, гомологичные последовательностям гена *wzm* *E. coli* серотипа O101 (полная идентичность по транскрибируемому продукту с последовательностью GenBank: GQ499340.1). Других аналогов по кластеру генов О-антигенов, кроме гена *wzm*, в базах данных не обнаружено. Полученные результаты позволяют предположить принадлежность штаммов серогруппы O101 к серотипу O101:H33.

Обсуждение

Прошло уже более 30 лет с момента, когда впервые в США была зарегистрирована пищевая инфекция (геморрагический колит), вызванная шига-токсинпродуцирующим штаммом *E. coli* O157:H7. В последние годы инфекцию стали диагностировать во многих, в т.ч. высокоразвитых, странах мира. В короткие сроки было установлено, что природным резервуаром *E. coli*

O157:H7 и других ЕНЕС-патогенов служат домашние и сельскохозяйственные животные, в первую очередь крупный рогатый скот. Человек заражается STEC-штаммами чаще всего при употреблении контаминированных этими патогенами пищевых продуктов, в ряду которых важное место занимает сырое молоко. Следует отметить, что во многих странах имеется небольшая часть населения (к примеру, в США это 1–3% [16]), которая предпочитает употреблять сырое молоко, как естественный продукт, не подвергшийся никаким обработкам, приобретаемая ею на молочных фермах или в розничной торговле. К сожалению, сырое молоко, даже полученное на ферме с высоким уровнем санитарно-гигиенической культуры, может содержать STEC — возбудителей геморрагического колита. Например, по сообщению французских исследователей, из 205 образцов сырого молока, исследованных ими, 21% содержал STEC-штаммы, хотя и в небольшой концентрации [17]. STEC-культуры в образцах сырого молока обнаружены и исследователями их других стран, поэтому неудивительно, что употребление сырого молока, особенно детьми, нередко становится причиной спорадических и вспышечных случаев пищевой инфекции, вызванной STEC-патогенами.

В настоящей работе впервые в Российской Федерации описана вспышка пищевой инфекции, связанная с потреблением жителями Санкт-Петербурга сырого молока, контаминированного шига-токсинпродуцирующими *E. coli*, которое приобреталось населением из молочных автоматов, куда оно поступало непосредственно из молочного хозяйства. В нашем исследовании установлено, что этиологической причиной заболевания ГК детей явились 2 энтерогеморрагических штамма *E. coli*, один из которых принадлежал к серотипу *E. coli* O157:H7, второй — к серотипу *E. coli* O101:H33. И если обнаружение у больного ГК возбудителя *E. coli* O157:H7 и его специфических последовательностей ДНК в образцах сырого молока не является чем-то неожиданным, то факт выделения STEC-штамма серотипа *E. coli* O101:H33 у больного ребенка и в образце сырого молока является уникальным случаем для нашей страны. О выделении STEC-штамма серогруппы O101 от больных ГК сообщалось в работе О. Nyholm и соавт. [18]. *E. coli* этой серогруппы, как правило, относятся к группе энтеротоксигенных *E. coli* (ЕТЕС), которые вызывают колидиарею у новорожденных телят. Здесь же мы имеем дело с новым патотипом *E. coli*, опасным для человека.

Проведенные нами молекулярно-генетические исследования 2 типов штаммов, вызвавших вспышку ГК у детей, показали, что штаммы *E. coli* серотипа O157:H7 имеют одинаковые MLST-профили и относятся к сиквенс-типу ST24 (ST комплекс 11), впервые выявленному у штамма *E. coli* TW05359 неизвестного происхождения из коллекции Центра NIAID STEC (<http://www.shigatox.net/ecmlst/cgi-bin/strainquery?strainname=TW05359&scheme=st15>). Штаммы серотипа O101:H33 также имеют одинаковые MLST-профили и образуют новый (ранее отсутствующий в базе данных shigatox.net) сиквенс-тип ST145.

В геномах штаммов обеих групп обнаружены нуклеотидные последовательности VT2-подобных профагов с интегрированными в них генами синтеза шига-токсина 2с (*stx2_c*), причем нуклеотидные последовательности этих генов во всех 6 исследованных штаммах полностью идентичны. Ген *stx2_c* является одной из аллельных форм гена *stx2*. Известно, что STEC-штаммы, содержащие различные типы и аллельные варианты генов *stx*, заметно различаются по инфекционной способности и степени тяжести вызываемых ими заболеваний. Так, в работе Friedrich

и соавт. [12] показано, что из 268 STEC-штаммов, выделенных от больных и содержащих разные аллельные формы гена *stx2* (*stx2*, *stx2_c*, *stx2_d*, *stx2_e* и *stx2_f*), только штаммы с генотипом *stx2* и *stx2_c* вызывали заболевания, сопровождавшиеся ГУС. Как следует из результатов этой же работы, риск развития ГУС после инфекции STEC с генотипом *stx2_c* значительно ниже, чем после инфицирования STEC с генотипом *stx2* (3,7 и 54,9%, соответственно). Вместе с тем среди STEC-штаммов с геном *stx2_c* доля способных вызвать инфекцию с ГУС составила 35,7% [12]. В нашем случае 2 из 4 STEC-штаммов, выделенных от больных детей, привели к развитию инфекции, отягощенной ГУС (больные П.Д. и П.А., см. табл. 3).

Помимо генов синтеза шигаподобных токсинов в исследованных штаммах обнаружены кластеры генов, ответственных за синтез энтерогемолизина (*ehxA*) и транспортных Нгу-белков и локализованных на рO157-подобных плаزمидов. В пределах каждой группы штаммов нуклеотидные последовательности плазмид были полностью идентичны, но отличались у штаммов серотипа O157:H7 и O101:H33. Во всех штаммах выявлены также гены синтеза основного фактора адгезии ЕНЕС — интимина. Однако, если в группе *E. coli* O157:H7 эти гены детерминируют синтез интимина гамма, то во второй (*E. coli* O101:H33) — интимина йота 2. До настоящей работы в доступной литературе отсутствовали сообщения о выделении от больных ГК STEC-штаммов, в которых бы одновременно детектировали гены шига-токсина 2с и интимина йота 2. Ранее гены интимина йота 2 обнаруживали только в группе энтеропатогенных штаммов *E. coli* (ЕРЕС), которые, как известно, не продуцируют шига-токсины [13–15].

Полученные данные свидетельствуют о большом генетическом разнообразии факторов патогенности у STEC-штаммов различных серогрупп и позволяют глубже понять и объяснить связь генотипа патогена с его потенциальной опасностью для человека и его клинической значимостью для инфекционистов.

Обнаружение у больных ГК STEC-штаммов новых серо- и генотипов указывает на необходимость проведения более углубленных исследований этиологической структуры ГК, обращая более пристальное внимание на другие, не-O157 STEC-серогруппы, циркулирующие на территории Российской Федерации. Безусловно, важным звеном в решении этой задачи являются также исследования по изучению бактерионосительства STEC-культур у сельскохозяйственных животных.

Предупреждение пищевой STEC-инфекции, связанной с потреблением сырого молока, представляется весьма сложной задачей для специалистов, поскольку, как мы уже упоминали выше, даже строгое соблюдение санитарно-гигиенических и ветеринарно-санитарных норм и

правил при получении сырого молока не гарантирует защиты от контаминации его STEC-патогенами. Учитывая это обстоятельство, FDA (Food and Drug Administration) еще в 1987 г. запретила продажу в США непастеризованных молочных продуктов [19]. На наш взгляд, до тех пор, пока в России не будет разработана технология, полностью гарантирующая получение производителем безопасного для человека сырого молока, реализовывать его населению через розничную продажу, в т.ч. и через молочные автоматы, весьма опасно для потребителя. Употребление пастеризованного молока во много раз снижает риск заболевания STEC-инфекцией.

Заключение

Вспышка острой кишечной инфекции среди детей, зарегистрированная в Санкт-Петербурге в 2013 г. и протекавшая в форме геморрагического колита с проявлением в некоторых случаях гемолитико-уремического синдрома, энтероколита и острого гастроэнтерита, была вызвана потреблением сырого коровьего молока, контаминированного шига-токсинпродуцирующими эшерихиями. Об этом свидетельствуют эпидемиологический анализ вспышки, клиническая картина болезни, выявление в пробах молока ДНК основных генов патогенности ЕНЕС-культур и выделение из проб молока и испражнений больных детей энтерогеморрагических штаммов и их специфических фрагментов ДНК. Молекулярно-генетические исследования, включая полногеномное секвенирование выделенных STEC-штаммов, наряду с типичным возбудителем геморрагического колита *E. coli* O157:H7, позволили обнаружить бактерии штамма *E. coli* серотипа O101:H33 уникального сиквенс-типа и с новым сочетанием факторов вирулентности (генов шига-токсина 2с, интимина йота 2 и энтерогемолизина).

Полученные в работе результаты расширяют наши знания о биологии возбудителей геморрагического колита у людей и указывают на необходимость совершенствования диагностики этой болезни.

Конфликт интересов

Исследование выполнено в рамках НИР 037 Отраслевой программы «Научные исследования и разработки с целью обеспечения санитарно-эпидемиологического благополучия и снижения инфекционной заболеваемости в Российской Федерации» (на 2011–2015 гг.), утв. руководителем Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека 21 декабря 2010 г.

ЛИТЕРАТУРА

1. Светоч Э.А., Степаншин Ю.Г., Манзенюк И.Н., Степанов А.В., Храмов М.В., Рудницкий С.Ю., Борзенков В.Н., Ерусланов Б.В., Шобухова Т.С., Лобковский А.Г., Безобразова С.В., Попова Т.А. Чувствительность *Escherichia coli* O157:H7, возбудителя геморрагического колита, к антибактериальным препаратам. *Антибиотики и химиотерапия*. 1998; 43 (11): 16–20. Кафтырева Л.А., Макарова М.А., Коновалова Т.А., Матвеева З.Н. Характеристика энтерогеморрагической *Escherichia coli* O145:H28, выделенной от пациента с гемолитико-уремическим синдромом. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии*. 2013; 5: 100–104.
2. Padhye N.V., Doyle M.P. *Escherichia coli* O157:H7 epidemiology, pathogenesis and methods for detection in food. *J. Food Protect.* 1992; 55: 555–565.
3. Garg A.X., Suri R.S., Barrowman N., Rehman F., Matsell D., Rosas-Arellano M.P., Salvadori M., Haynes R.B., Clark W.F. Long-term renal prognosis of diarrhea-associated hemolytic uremic syndrome: a systematic review, meta-analysis, and meta-regression. *JAMA*. 2003; 290 (10): 1360–1370.
4. Karch H., Tarr P.I., Bielaszewska M. Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* in human medicine. *Int. J. Med. Microbiol.* 2005; 295 (6–7): 405–418.

5. Soon J.M., Seaman P., Baines R.N. *Escherichia coli* O104:H4 outbreak from sprouted seeds. *Int. J. Hyg. Environ. Health.* 2012; 216 (3): 346–354.
6. Brooks J.T., Sowers E.G., Wells J.G., Greene K.D., Griffin P.M., Hoekstra R.M., Strockbine N.A. Non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections in the United States, 1983–2002. *J. Infect. Dis.* 2005; 192 (8): 1422–1429.
7. Manning S.D., Motiwala A.S., Springman A.C. Variation in virulence among clades of *Escherichia coli* O157:H7 associated with disease outbreaks. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 2008; 105: 4868–4873.
8. Tilden J., Jr., Young W., McNamara A.M., Custer C., Boesel B., Lambert-Fair M.A., Majkowski J., Vugia D., Werner S.B., Hollingsworth J., Morris J.G., Jr. A new route of transmission for *Escherichia coli*: infection from dry fermented salami. *Am. J. Public Health.* 1996; 86 (8): 1142–1145.
9. Machado J., Grimont F., Grimont P.A. Identification of *Escherichia coli* flagellar types by restriction of the amplified *fljC* gene. *Res Microbiol.* 2000; 151 (7): 535–546.
10. Веревкин В.В., Воложанцев Н.В., Степаншин Ю.Г., Светоч Э.А., Мякинина В.П. Штамм бактериофага *Escherichia coli* V32 для идентификации бактерий *Escherichia coli* серогруппы O157. Патент RU № 2425877. Заявка: 2010106806/10, 26.02.2010, опубл. 10.08.2011. Бюлл. № 22.
11. Friedrich A.W., Bielaszewska M., Zhang W.L., Pulz M., Kuczius T., Ammon A., Karch H. *Escherichia coli* harboring Shiga toxin 2 gene variants: frequency and association with clinical symptoms. *J. Infect. Dis.* 2002; 185 (1): 74–84.
12. Zhang W.L., Kohler B., Oswald E., Beutin L., Karch H., Morabito S., Caprioli A., Suerbaum S., Schmidt H. Genetic diversity of intimin genes of attaching and effacing *Escherichia coli* strains. *J. Clin. Microbiol.* 2002; 40: 4486–4492.
13. Ramachandran V., Brett K., Hornitzky M.A., Dowton M., Bettelheim K.A., Walker M.J., Djordjevic S.P. Distribution of intimin subtypes among *Escherichia coli* isolates from ruminant and human sources. *J. Clin. Microbiol.* 2003; 41: 5022–5032.
14. Cookson A.L., Cao M., Bennett J., Nicol C., Thomson-Carter F., Attwood G.T. Relationship between virulence gene profiles of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* and Shiga toxin-producing *E. coli* isolates from cattle and sheep in New Zealand. *Appl. Environ. Microbiol.* 2010; 76 (11): 3744–3747.
15. Centers for Disease Control and Prevention. 2002–2003 Foodnet population survey. URL: <http://www.cdc.gov/foodnet/surveys/pop/2002/2002Atlas.pdf> Accessed 15 December 2009.
16. Perelle S., Dilasser F., Grout J., Fach P. Screening food raw materials for the presence of the world's most frequent clinical cases of Shiga toxin-encoding *Escherichia coli* O26, O103, O111, O145 and O157. *Int. J. Food Microbiol.* 2007; 113 (3): 284–288.
17. Nyholm O., Heinikainen S., Pelkonen S., Hallanvuo S., Haukka K., Siitonen A. Hybrids of Shigatoxigenic and Enterotoxigenic *Escherichia coli* (STEC/ETEC) Among Human and Animal Isolates in Finland. *Zoonoses Public Health.* 2015. Doi: 10.1111/zph.12177 [Epub ahead of print].
18. Weisbecker A. A legal history of raw milk in the United States. *J. Environ. Health.* 2007; 69 (8): 62–63.

80

КОНТАКТНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Онищенко Геннадий Григорьевич, доктор медицинских наук, профессор, академик РАН, помощник Председателя Правительства Российской Федерации

Адрес: 103274, Москва, Краснопресненская наб., д. 2, стр. 2, тел.: +7 (495) 985-54-86, e-mail: taruntaeva_na@apr.gov.ru

Дятлов Иван Алексеевич, доктор медицинских наук, профессор, член-корреспондент РАН, директор ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии

Адрес: 142279, Московская обл., Серпуховский р-н, п. Оболенск, тел.: +7 (4967) 36-00-03, e-mail: dyatlov@obolensk.org

Светоч Эдуард Арсеньевич, доктор ветеринарных наук, профессор, заведующий отделом молекулярной микробиологии ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии

Адрес: 142279, Московская обл., Серпуховский р-н, п. Оболенск, тел.: +7 (4967) 36-00-79,

e-mail: svetoch@obolensk.org

Воложанцев Николай Валентинович, кандидат биологических наук, заведующий лабораторией молекулярной диагностики и генно-инженерных препаратов отдела молекулярной микробиологии ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии

Адрес: 142279, Московская обл., Серпуховский р-н, п. Оболенск, тел.: +7 (4967) 36-01-47, e-mail: nikvol@obolensk.org

Баннов Василий Александрович, старший научный сотрудник лаборатории молекулярной диагностики и генно-инженерных препаратов отдела молекулярной микробиологии ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии

Адрес: 142279, Московская обл., Серпуховский р-н, п. Оболенск, тел.: +7 (4967) 36-00-79, e-mail: bannov@online.

stack.net

Карцев Николай Николаевич, научный сотрудник лаборатории антимикробных препаратов отдела молекулярной микробиологии ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии

Адрес: 142279, Московская обл., Серпуховский р-н, п. Оболенск, тел.: +7 (4967) 36-00-79,

e-mail: kargev.nikoay@mail.ru

Борзенков Валерий Николаевич, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории антимикробных препаратов отдела молекулярной микробиологии ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии

Адрес: 142279, Московская обл., Серпуховский р-н, п. Оболенск, тел.: +7 (4967) 36-00-79, e-mail: vbn5314@mail.ru

Фурсова Надежда Константиновна, кандидат биологических наук, заведующая лабораторией антимикробных препаратов отдела молекулярной микробиологии ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии

Адрес: 142279, Московская обл., Серпуховский р-н, п. Оболенск, тел.: +7 (4967) 36-00-79, e-mail: fursova@obolensk.org

Шемакин Игорь Георгиевич, доктор биологических наук, профессор, заместитель директора по научной работе ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии

Адрес: 142279, Московская обл., Серпуховский р-н, п. Оболенск, тел.: +7 (4967) 36-00-60,

e-mail: shemyakin@obolensk.org

Богун Александр Геннадиевич, кандидат биологических наук, заведующий отделом коллекционных культур ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии

Адрес: 142279, Московская обл., Серпуховский р-н, п. Оболенск, тел.: +7 (4967) 36-00-00, e-mail: bogun@obolensk.org

Кисличкина Ангелина Александровна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник отдела коллекционных культур ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии

Адрес: 142279, Московская обл., Серпуховский р-н, п. Оболенск, тел.: +7 (4967) 36-00-00,

e-mail: angelinakislichkina@yandex.ru

Попова Анастасия Владимировна, кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории молекулярной диагностики и генно-инженерных препаратов отдела молекулярной микробиологии ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии

Адрес: 142279, Московская обл., Серпуховский р-н, п. Оболенск, тел.: +7 (4967) 36-01-47,

e-mail: popova_nastya86@mail.ru

Мякинина Вера Павловна, научный сотрудник лаборатории молекулярной диагностики и генно-инженерных препаратов отдела молекулярной микробиологии ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии

Адрес: 142279, Московская обл., Серпуховский р-н, п. Оболенск, тел.: +7 (4967) 36-01-47, e-mail: verpalmak@mail.ru

Теймуразов Марат Георгиевич, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории анти-микробных препаратов отдела молекулярной микробиологии ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии

Адрес: 142279, Московская обл., Серпуховский р-н, п. Оболенск, тел.: +7 (4967) 36-00-79,

e-mail: marat_teimurazov@mail.ru

Полосенко Ольга Вадимовна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории физико-химических и микробиологических методов анализа ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии

Адрес: 142279, Московская обл., Серпуховский р-н, п. Оболенск, тел.: +7 (4967) 36-00-20,

e-mail: polosenko.olga@yandex.ru

Кафтырева Лидия Алексеевна, доктор медицинских наук, заведующая лабораторией кишечных инфекций НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера

Адрес: 197101, Санкт-Петербург, ул. Мира, д. 14, тел.: +7 (812) 313-69-88, e-mail: pasteur@lk14290.spb.edu

Макарова Мария Александровна, кандидат медицинских наук, научный сотрудник лаборатории кишечных инфекций НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера

Адрес: 197101, Санкт-Петербург, ул. Мира, д. 14, тел.: +7 (812) 313-69-88, e-mail: makmaria@mail.ru

Матвеева Зоя Николаевна, кандидат медицинских наук, ведущий научный сотрудник лаборатории кишечных инфекций НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера

Адрес: 197101, Санкт-Петербург, ул. Мира, д. 14, тел.: +7 (812) 313-69-88, e-mail: pasteur@lk14290.spb.edu

Гречанинова Татьяна Александровна, врач-бактериолог, заместитель главного врача Центра гигиены и эпидемиологии в городе Санкт-Петербурге по организации лабораторного дела

Адрес: 191023, Санкт-Петербург, ул. Малая Садовая, д. 1, тел.: +7 (812) 570-60-78, e-mail: tatyana_grechani@mail.ru

Григорьева Наталья Сергеевна, врач-бактериолог, заведующая бактериологической лабораторией Центра гигиены и эпидемиологии в городе Санкт-Петербурге

Адрес: 192102, Санкт-Петербург, Волковский проспект, д. 77, тел.: +7 (812) 490-57-76, e-mail: fguz_labback_spb@mail.ru

Кича Елена Вячеславовна, врач-бактериолог бактериологической лаборатории Центра гигиены и эпидемиологии в городе Санкт-Петербурге

Адрес: 192102, Санкт-Петербург, Волковский проспект, д. 77, тел.: +7 (812) 405-75-14, e-mail: fguz_labback_spb@mail.ru

Забалуева Галина Викторовна, врач-бактериолог, заведующая лабораторией особо опасных и вирусологических исследований Центра гигиены и эпидемиологии в городе Санкт-Петербурге

Адрес: 198099, Санкт-Петербург, ул. Оборонная, д. 35, лит. А, тел.: +7 (812) 786-87-00, e-mail: fguzlabovir_spb@mail.ru

Кутасова Татьяна Борисовна, врач-эпидемиолог, заведующая отделом эпидемиологии инфекционных и особо опасных заболеваний Центра гигиены и эпидемиологии в городе Санкт-Петербурге

Адрес: 191023, Санкт-Петербург, ул. Малая Садовая, д. 1, тел.: +7 (812) 570-60-87, e-mail: epid@78cge.ru

Коржаев Юрий Николаевич, главный врач Центра гигиены и эпидемиологии в городе Санкт-Петербурге

Адрес: 191023, Санкт-Петербург, ул. Малая Садовая, д. 1, тел.: +7 (812) 570-38-11, e-mail: centr@78cge.ru

Башкетова Наталия Семеновна, заместитель руководителя Управления Роспотребнадзора по городу Санкт-Петербургу

Адрес: 191025, Санкт-Петербург, ул. Стремянная, д. 19, тел.: +7 (812) 764-54-38, e-mail: uprav@78rospotrebnadzor.ru

Бушманова Ольга Николаевна, главный специалист-эксперт Управления Роспотребнадзора по городу Санкт-Петербургу

Адрес: 191025, Санкт-Петербург, ул. Стремянная, д. 19, тел.: +7 (812) 764-55-87, e-mail: uprav@78rospotrebnadzor.ru

Сталевская Анна Владимировна, кандидат медицинских наук, заместитель руководителя Управления Роспотребнадзора по городу Санкт-Петербургу

Адрес: 191025, Санкт-Петербург, ул. Стремянная, д. 19, тел.: +7 (812) 764-58-77, e-mail: uprav@78rospotrebnadzor.ru

Чхинджерия Ирина Григорьевна, начальник отдела эпидемиологического надзора Управления Роспотребнадзора по городу Санкт-Петербургу

Адрес: 191025, Санкт-Петербург, ул. Стремянная, д. 19, тел.: +7 (812) 575-81-04, e-mail: uprav@78rospotrebnadzor.ru

Жебрун Анатолий Борисович, доктор медицинских наук, профессор, член-корреспондент РАН, директор НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера

Адрес: 197101, Санкт-Петербург, ул. Мира, д. 14, тел.: +7 (812) 313-69-88, e-mail: pasteurdnt@yandex.ru