

**ТРАКИЙСКИ УНИВЕРСИТЕТ – СТАРА ЗАГОРА**

**ВЕТЕРИНАРНОМЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ**

**Катедра „Ветеринарна микробиология, инфекциозни и  
паразитни болести,,  
Секция „Епидемиология, инфекциозни болести и превантивна  
медицина“**

**КОЙЧО ПЕТКОВ КОЕВ**

**МИКРОБИОЛОГИЧНИ И ЕПИДЕМИОЛОГИЧНИ ПРОУЧВАНИЯ НА  
ШИГА-ТОКСИНПРОДУЦИРАЩИ *ESCHERICHIA COLI* ПРИ  
МЛЕКОДАЙНИ ГОВЕДА В Р БЪЛГАРИЯ**

**АВТОРЕФЕРАТ**

**на**

**дисертация за присъждане на образователната и научна степен  
„ДОКТОР“**

**по научната специалност „Епизоотология, инфекциозни  
болести и профилактика на заразните заболявания по  
животните“**

**Научен ръководител доц. дн Валентина Урумова  
Научен консултант проф. дн Михни Люцканов**

**СТАРА ЗАГОРА  
2019**

Дисертационния труд е написан на 192 страници и е онагледен с 12 таблици и 24 фигури. Библиографската справка обхваща 298 литературни източника, от които 3 са на кирилица и 295 на латиница.

Дисертационния труд е обсъден на 17.06.2019 г. от Разширен катедрен съвет, определен със заповед № 21/03.06.2019 г. на Декана на ВМФ, Тракийски университет и е насочен за защита пред Научно жури.

Дисертантът е асистент в секция „Епидемиология, инфекциозни болести и превантивна медицина“ към Катедра „Ветеринарна микробиология, инфекциозни и паразитни болести,,.

Публичната защита на дисертационния труд ще се състои на .....от.....часа, в семинарната зала на секция „Епидемиология, инфекциозни болести и превантивна медицина“ (7<sup>-ми</sup> корпус, 4<sup>-ти</sup> етаж), Ветеринарномедицински факултет при Тракийски университет, гр. Стара Загора на заседание на Специализирано жури.

Материалите по защитата на дисертационния труд са на разположение в „Научен отдел“ на ВМФ и на уебсайта на Тракийския университет ([www.unisz.bg](http://www.unisz.bg)).

Изказвам признателност и уважение към моите научен ръководител и научен консултант, доц. Валентина Урумова и проф. Михни Люцканов за напътствията, ценните съвети и безрезервната помощ при изготвянето на дисертационния труд, те дадоха част от себе си за моето лично и професионално развитие, а тяхната подкрепа и увереност направиха тази работа възможна.

Сърдечна благодарност дължа на доц. Владимир Петров за безкрайното търпение и всеотдайност, задълбочения и добронамерен прочит на дисертационния труд, за полезните съвети и препоръки по реализирането му, без които никога нямаше да бъде завършен.

Благодаря на доц. Тодор Стоянчев за приятелското рамо, висок професионализъм и безкористна подкрепа. Благодарности и към екипа на ръководената от него ЦНИЛ при Тракийския университет, гр. Стара Загора.

Изказвам искрена благодарност на биолог Красимира Господинова за неограничената помощ която ми оказа по време на изработването на микробиологичните анализи, включени в дисертационния труд.

Благодарности към настоящия колектив на секция „Епидемиология, инфекциозни болести и превантивна медицина“ които бяха съпричастни на неволите и успехите ми и за това, че отдавна сме се превърнали в едно голямо семейство.

Изказвам благодарности и на всички практикуващи ветеринарни лекари и специалисти за съдействието при получаване на материалите включени в разработването на настоящия труд.

## Съдържание

Въведение	5
Цел и задачи	7
Материал и методи	8
Резултати	23
Обсъждане	34
Изводи	55
Приноси	56
Препоръки за практиката	57
Научни публикации свързани с дисертационния труд	59
Summary	60

## ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ В ТЕКСТА

**HC** – Хеморагичен колит

**HUS** – Хемолитично-уремичен синдром

**STEC** - Шигатоксин продуциращите *E. coli*

**STX** – шига токсин

**TTP** - Тромботичната тромбоцитопенична пурпура

**AE-VTEC** – attaching/effacing Веротоксигенни *E. coli*

**EHEC** – ентерохеморагични *E. coli*

**VTEC** – веротоксин продуциращи *E.coli*

**VT** – веротоксин

**EAggEC** – ентероагрегативни *E. coli*

**PFGE** – пулсова гел електрофореза

**PCR** – полимеразно верижна реакция

**IMS** – имуномагнетична сепарация

**CT-SMAC** – цефиксим телурит Sorbitol Mac Conkey Agar

**MUG** - 4 метиллумбелиферил-  $\beta$ - D- глюкоронид

**A/E lesia** – лезии на прикрепването и изглаждането

**LEE** – локус на ентероцитно изглаждане

**MIC** – минимална инхибираща концентрация

**EUCAST** - The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing

## ВЪВЕДЕНИЕ

Представителите на вида *Escherichia coli* са повсеместно разпространени микроорганизми с поведение на опортюнисти и/или на резиденти в някой нестерилни области на човешкото и животинското тяло. Въпреки че съставляват малка част от фекалната микрофлора, колибактериите са преобладаващите факултативни анаероби в дебелото черво и вероятно съществуват там симбиотично. Интестиналният тракт на деца-кърмачета и новородени домашни животни обикновено се колонизира много скоро след раждането, придобивайки чревната флора на техните майки (Bettelheim 1996; Nataro et. al. 1998).

Съществуват и патогенни щамове или по-скоро биовари на *E. coli* с налични способности да предизвикат широк спектър от инфекциозни болестни процеси и заболявания както при човека, така и при почти всички видове животни (Nataro et. al. 1998; Whittam et. al. 1988; Whittam et. al. 1993).

Това многообразие в клиничен аспект се дължи на високата генетична вариабилност и пластичност на колибактериите. Те лесно обменят генетична информация със сходни бактерии, особено с други ентеробактерии като *Salmonella* spp., *Shigella* spp., като и други сероварианти на *E. coli*, чрез механизмите на хоризонтален генетичен трансфер. Така колищамовете придобиват характеристики и белези на различни биологични източници.

През последните тридесет години, беше очертана клонова група на *E. coli*, която притежава уникални атрибути на вирулентност. В зависимост от механизмите по които реализират своя патогенен потенциал, патогенните колибактерии са разпределени в няколко патологични вариетети (патовари). Един от тях е този на ентерохеморагичните колибактерии (ЕНЕС), които упражняват своето патогенно действие благодарение на токсините, които продуцират и които имат действие подобно на токсините на шигелите, насочено върху съдовия ендотел на малките кръвоносни съдове. Част от серотиповете, принадлежащи към този патовар са установени само при домашните животни, други обаче са със доказана зооантропонозност. От тях най-често установяван и най-подробно проучен е серотип O157:H7, който е доказано отговорен за причиняването на заболяване при хората, съпроводено с кървава диария и

бъбречна недостатъчност, познато е като хемолитично-уремичен синдром (HUS), завършващ често летално (Kaper et al. 2004).

Съществуват поредица от доказателства, че основен резервоар на щамовете от този и други подобни серотипове са някои животински видове в т.ч. и стопански (свине, преживни животни), а също и свободно живеещи видове.

Необходимо е обаче провеждането на допълнителни, целенасочени изследвания в т.ч. и епидемиологични, които да осветлят ареалите на разпространение на такива щамове, механизмите на трансфериране между животните и човека, ролята на храните и суровините от животински произход.

## ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

ЦЕЛ: Целта на настоящото проучване беше чрез епидемиологични обследвания, утвърдени микробиологични техники и генетични анализи да се изолират и характеризират STEC, серогрупа O157 при млекодайни говеда отглеждани в стопанства от промишлен тип, както и да се проучи и анализира значението на някои суровини като носители на STEC по хранителната верига и да се направи опит за анализ на по-нататъшните стратегии по отношение на контрола

### ЗАДАЧИ:

1. Уточняване и апробиране на конкретен, научно обоснован микробиологичен алгоритъм относно изолацията и първичната идентификация на ентерохеморагични *E. coli* от фецес на говеда с млекодайно направление.
2. Определяне принадлежността и генетичен профил на изолатите относно тяхната токсин продукция
3. Определяне на преваленността на STEC O157:H7 сред животинската популация едри преживни животни с млекодайно направление
4. Да се проучат и анализират *in vitro* отнасянията към антиминобни средства на всички изолираните щамове с принадлежност към серогрупа O157
5. Да се направи опити за изолация на STEC O157:H7 от сурово сборно мляко във всички позитивни за каузалния агент стопанства.

## **МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ**

**Период на проучването – 2012-2018 година**

**Епидемиологичен анализ**

***Стопанства:***

В проучванията бяха включени общо **28** говедовъдни ферми от **27** общини, разположени на **16** административни области.

За целия период на проучването бяха изследвани общо 1129 фекални тампонни проби, получени от телета на възраст между 3 и 6 месеца от тези 28 стопанства.

Възрастта на телетата от които се получаваха пробите разбира се не е случайна, а съобразена с множество подобни теренни проучвания. По литературни данни се счита че най-висок риск за излъчване на STEC O157:H7 е при говеда, чиято възрастова категория е 3-18 месеца. Това почти съвпада с началото възрастта, когато телетата излизат от индивидуалните боксове и се обособяват в сборни групи, около 70-тия ден след раждането. От всички от горепосочените стопанства бяха получени по около 30-60 бр. анални тампонни проби от телета на възраст 3-6 месеца в зависимост от големината на популацията. Трябва да се каже, че в така упоменатите цифри се поместват почти, или 100 % от телетата от таргетната възрастова група. Такива животни са склонни да отделят STEC по-често и EFSA препоръча изследване на говеда в рамките на този възрастов спектър (EFSA 2009).

### ***Методи на епидемиологичните проучвания***

В процеса на проучванията бяха използвани методите на епидемиологичното наблюдение и епидемиологичната анкета.

*Епидемиологичното наблюдение* се осъществяваше на място като при него се отчиташе капацитетът на фермата, направлението на производството, режимът и технологиите на отглеждане, начинът на хранене на отделните технологични категории, рецептите на използваните концентратни смески, наличието на отделни технологични сектори, и мерките за биосигурност в тях. Вземаха се предвид още технологията за оборот на стадото, произхода на внасяните ремонтни животни, технологията на развъждане, имунизационния календар. Специално внимание се отделяше на въпросите, касаещи организацията и логистиката на родилния процес, отглеждането на животните



до 3 м. възраст, както и групирането им по технологични направления след това. По време на наблюденията се отчитаха и начинът на доене, съхраняването на сборното мляко, дезинфекционните мероприятия, свързани с доилния процес и като цяло във фермата, а също и общото ниво на хигиена в различните сектори.

Епидемиологичните анализи се основаваха на данни, събрани по метода на анкетното проучване. За целта изготвихме адаптиран, примерен анкетен лист, в който се отразяваха основните данни проучени при посещение във фермите и/или със съдействието на обслужващите конкретните ферми ветеринарни лекари.

## **Бактериологични изследвания**

### ***Хранителни среди***

За първична изолация и идентификация на таргетните микроорганизми при телета се използваха:

- ✓ Tryptone Soya Broth Modified (mTSB) (Oxoid)
- ✓ Novobiocin Supplement (Oxoid)
- ✓ Sorbitol Mac Conkey Agar - SMAC (Oxoid)
- ✓ Cefixime tellurite sel.sup. (Oxoid)
- ✓ 4 метиллумбелиферил-  $\beta$ - D- глюкоронид (MUG supplement - Liofilchem).
- ✓ Kligler Iron Agar (KIA) - (Oxoid – CM0033)
- ✓ Mueller-Hinton agar
- ✓ Месопептонен Агар (МПА) HIMEDIA

### ***Диагностичен алгоритъм за първична идентификация на E. coli O157:H7 от фецес***

Изследванията се провеждаха по стандартни и утвърдени микробиологични техники за изолация и първична идентификация на колибактериите.

Първоначалното, селективно набогатяване на ректалните тампон-проби беше извършено в модифициран триптиказа-соев бульон (Tryptone Soya Broth Modified, Oxoid), суплементиран с 16 mg/L новобиоцин (Novobiocin Supplement, Oxoid). Целта е да се увеличи броя на таргетни микроорганизми, като същевременно се инхибира конкурентната флора (*Bacteroides* spp.,

*Lactobacillus* spp., *Proteus* spp., *Enterococcus* spp., *Clostridium* spp.). Посевките се инкубираха при аеробни условия, в термостат при температура 37°C в продължение на 4-6 часа.

От така култивирани проби извършихме субкултивиране върху селективна среда Sorbitol Mac Conkey Agar (SMAC), на фирмата Oxoid, суплементиран със цефиксим (0.05 mg/L) и телурит (2.5 mg/L), (СТ-SMAC) (Cefixime, Tellurite, Oxoid).

Литературните данни сочат, че SMAC съдържащ цефиксим и калиев телурит е най-често използваната твърда хранителна среда за селективно набогатени проби от говеда с или без имуномагнетична сепарация (IMS) (Charman et. al. 1994).

Инкубирането се извършваше също при аеробни условия и температура 37°C, но в продължение на 18-20 часа. На SMAC агар колонииите на *E. coli*, серотип O157:H7 са добре визуализирани и безцветни поради тяхната неспособност да ферментират сорбитол за разлика от други серотипове *E. coli*. В края на първото денонощие колонииите са безцветни и имат диаметър от около 2-3 мм.

След внимателен оглед подбрахме по няколко (7-10 бр.) единични, сорбитол-негативни колонии, които субкултивирахме на политропната среда на Kligler (Kligler agar, Oxoid). Последната както е известно се разлива в епруветки под наклон с формиране на прав и полегат стълбец. Те се инкубираха при аеробни условия, 37°C за 24 часа. Отчиташе се ферментирането на лактоза, продукция на газ от ферментацията на глюкоза, продуцирането на сероводород, както и наличие на уреазна активност. Определените като *E. coli* изолати отново бяха препосявани на Sorbitol Mac Conkey Agar с добавка на 4-метиллумбелиферил-β-D-глюкоронид (MUG supplement - Liofilchem). в доза 0,1 g/L).

На следващият етап от идентификационният алгоритъм MUG-негативните колонии се култивираха върху обикновен месопептонов агар. След нова 24-часова инкубация при аеробни условия и 37°C, сорбитол неферментативните, бета-глюкоронидаза негативни колонии се тестваха чрез латекс аглутинация. Използван беше кит *E. coli* O157 Latex test (Oxoid), за да се определи дали съспектния изолат принадлежи към серотип O157, което го прави потенциален шига-токсин продуциращ вариетет (stx).

## **Изоляция и първична идентификация на *E. coli* O157:H7 от сурово сборно мляко**

Млечните проби бяха получени от говедовъдни ферми от интензивен тип. Те всички бяха с капацитет над 100 дойни крави. Пробите бяха получени изследвани през периода юли - септември 2017 година, тъй като според литературни данни летният период се асоциира с най-масирано отделителство на *E. coli* серотип O157:H7.

Стопанствата, от които бяха получени млечните проби не бяха случайно подбрани. Това бяха ферми, в които предварително бяхме установили наличие на животни, носители и излъчители на *E. coli* O157:H7 във фецеса на здрави индивиди. Изследвани бяха 22 броя проби от определените четири стопанства, като честотата на получаване беше два пъти месечно в продължение на три месеца.

Пробите от свежо, сурово мляко се получаваха след издояването от охладения млечен танк за съхранение на свежо мляко при 4-6°C. Полученото количество беше 100 мл., при непрекъснат режим на разбъркващия механизъм на танка. След получаване пробите се транспортираха по най-бързия начин до бактериологичната лаборатория при хладилни условия. Всички последващи изследвания бяха извършвани в бактериологичната лаборатория на диагностично-консултативния център по заразни болести към Ветеринарномедицинския факултет на Тракийския университет и централната научно-изследователска университетска лаборатория.

Получените проби мляко се разливаха в центрофужни епруветки по 10 мл и се центрофугираха при 4000 rpm<sup>-1</sup> за 10 минути. След центрофугирането извърши внимателно отсметаняване на пробите, което се последваше от ресуспендиране на утайката с 5 мл. стерилен физиологичен разтвор. Следваше процедура на ново центрофугиране при същия режим, след което надутаечната течност се отстраняваше, а към седимента се добавяше 9 мл. селективен бульон за набогатяване (Tryptone Soya Broth Modified (mTSB)). Последният беше суплементиран с Novobiocin по подобие на откриването на STEC O157 хранителни продукти, съгласно ISO 16654: 2001 (ISO, 2001).

Инкубирането бе извършено в термостат при аеробни условия и температура 37°C в продължение на 10-12 часа. Така инкубираните проби се

центрифугираха отново при  $4000 \text{ rpm}^{-1}$  за 10 минути, като надутаечната течност се отстраняваше, а утайката се ресуспендираше с 1 мл. стерилен физиологичен разтвор. На така подготвените проби беше извършен молекулярно–биологичен (генетичен) анализ.

### **Молекулярно биологичен метод**

#### *Бактериални щамове и екстрахиране на ДНК.*

Молекулярно-биологичната идентификация на *E. coli* O157:H7 беше извършена чрез амплификация на нуклеотидна последователност характерна за наличието на специфичен ген посредством полимеразно-верижна реакция (polymerase chain reaction – PCR).

Бяха изследвани общо 30 бактериални щамове на *E. coli*, изолирани от теренните изследвания във фермите, биохимично и серологично потвърдени като принадлежащи към *E. coli* O157:H7. Всеки от щамовете, в чиста култура беше посят върху Триптиказо соев агар (CASO) и инкубиран при  $37^{\circ}\text{C}$  за 18 часа. От получената бактериална култура приготвихме суспензия за екстрахиране на геномна ДНК. В предварително приготвени стерилни микроепруветки тип „Епендорф“ се поставя по 1 мл стерилен ТЕ буфер. Чрез стерилен памучен тампон се вземат няколко единични колонии от агаровата среда и чрез въртеливи движения се суспендират в микроепруветката. Получената бактериална суспензия е с клетъчна концентрация съответстваща на 0,5 McFarland. Бактериалната суспензия се подлага на разрушаване на клетъчните мембрани чрез т.н. термо-метод, при който суспензията се загрява до температура  $99,5^{\circ}\text{C}$  в продължение на 10 минути. Вследствие на разкъсване на клетъчните мембрани при температурното въздействие свободната ДНК остава разтворена в ТЕ буфера. За утаяване на клетъчните елементи, микроепруветките с кипящия клетъчен лизат се центрофугират в охлаждаща центрофуга при  $10\,000 \text{ rpm}^{-1}$  за 10 минути с понижаване на температурата до  $4^{\circ}\text{C}$ . Разтворената бактериална геномна ДНК остава в супернатантата. По 500  $\mu\text{l}$  от супернатантата от всяка микроепруветка се прехвърлят в нова стерилна микроепруветка, надписват се и се съхраняват във фризер при минус  $20^{\circ}\text{C}$  до извършване на PCR амплификация. Екстрахираната ДНК се подлага на спектрално измерване на концентрацията на ДНК и протеинното замърсяване чрез измерване на абсорбция при 160 и 280 nm и изчисление на коефициента

A260/280 в Nanodrop. Добива на ДНК трябва да е в концентрация 200-400 ng/μl в супернатантата, с чистота 1,8 – 2,0 A260/280.

*Директно екстрахиране на бактериална ДНК от проби сурово мляко.* 10 мл сурово мляко се центрофугира на 4000 rpm<sup>-1</sup> за 15 минути. Повърхностния пласт от сметана (млечна мазнина) се отстранява със стерилен памучен тампон, надутаечната течност (мляко) се отлива и изхвърля, а утайката от клетки се ресуспендира в 5 мл фосфатен буфер. Хомогенизира се добре на вортекс и отново се центрофугира при същите условия. Процедурата на промиване с фосфатен буфер се повтаря 2 пъти. Получената утайка след второто промиване се ресуспендира в 500 μl лизиращ буфер, към който се прибавят 400μl 10% натриев додецил сулфат и 25 μl протеиназа К (10mg/ml). Суспензията инкубирахме на 37°C за 12 часа. След 12 часа към реакционната смес прибавихме 2 мл наситен разтвор на NaCl и хомогенизирахме на вортекс за преципитиране на клетъчните стени и се центрофугира при 3000 rpm<sup>-1</sup> за 15 мин. за тяхното утаяване. Надутаечната течност с разтворената геномна ДНК подложихме на преципитацията на ДНК, като в нова стерилна микроепруветка от 2 мл се смесват 400 μl супернатанта с 800 μl леден абсолютен етанол (96%). Размесват се добре в продължение на 15 минути на стайна температура и се центрофугира при 13000 об/мин за 15 мин. Супернатантата се отлива и изхвърля. За промиване на утаената ДНК към утайката се добавихме стерилен 70% етанол в количество 500 μl суспендира се отново на вортекс за 1-2 минути и отново се центрофугира при 13000 об/мин за 15 мин. Супернатантата отпипетирахме и оставихме да изсъхне на стайна температура. Получения фин пелет (утайка) разтворихме в стерилен TE буфер и така се съхранява в замразено състояние при -20°C до провеждане на PCR.

Екстрахираната ДНК подложихме на спектрално измерване на концентрацията на ДНК и протеинното замърсяване чрез измерване на абсорбция при 160 и 280 nm и изчисление на коефициента A260/280 в Nanodrop. Измерването проведохме в микрокувета, чрез смесване на 7 μl екстрахирана ДНК с 70 μl стерилна ултра чиста вода (GenPure Ultrapure Water System). Добива на ДНК трябва да е в концентрация 400-1200 ng/μl в супернатантата, с чистота 1,3 – 1,8 A260/280.

Така подготвените проби бяха скринирани чрез мултиплекс PCR анализ за наличието на генетични маркери, асоциирани със някои фактори на вирулентност. За целите на анализа обхванахме сегменти от геномната ДНК, отговарящи на гени *eaeA*, *stx1*, *stx2*, H7 ген на *E. coli*.

#### *PCR - последователност на работа*

Приложената полимеразно верижна реакция (PCR-метод) използвахме с цел амплификация на желаните фрагменти от изследвания ген на *E. coli* O157:H7. За целите на анализа обхванахме сегменти от геномната ДНК, отговарящи на гени за *eaeA*, *stx1*, *stx2*, H7 при *E. coli*

Праймерите за таргетните гени на *E. coli* синтезирахме в следната нуклеотидна последователност:

*eae* : < F - 5'-TCAATGCAGTTCCGTTATCAGTT-3';  
R - 5' -GTAAAGTCCGTTACCCCAACCTG-3'>  
*stx1* : < F - 5' -CAGTTAATGTGGTGGCGAAGG-3';  
R - 5' -CACCAGACAATGTAACCGCTG-3'>  
*stx2* : < F - 5' - ATCCTATTCCCGGGAGTTTACG -3';  
R- 5'- GCGTCATCGTATACACAGGAGC -3'>  
*fliCh7* < F - 5' - ATCCTATTCCCGGGAGTTTACG -3';  
R- 5'- GCGTCATCGTATACACAGGAGC -3'>

F – forward праймер

R – reverse праймер

Приготвянето на реакционната PCR смес, както и работата с екстрахираната геномна ДНК извършихме в стерилен PCR-бокс, който преди работа се включва в режим на автостерилизация чрез UV-лампа за 30 минути. По време на работа използвахме стерилни латексови ръкавици. За приготвяне на мастер микса се използват концентрации от праймери, буфер, dNTP и MgCl<sub>2</sub> и Taq-полимераза в количества и концентрации съответно представени в таблици 4 и 5.

**Таблица 4. Реакционна смес за мултиплексна верижна полимеразна реакция (PCR) с праймери за гени *eaeA*, *stx1* и *stx2*.**

Компонент	Изходна концентрация	Крайна концентрация
ДНК		
10x PCR Буфер	10x	1x
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	1.5 mM
dNTP	2 mM mix	0.2 mM
<b>F: <i>eaeA</i></b>	50 μM	0.5 μM
<b>R: <i>eaeA</i></b>	50 μM	0.5 μM
<b>F: <i>stx1</i></b>	50 μM	0.5 μM
<b>R: <i>stx1</i></b>	50 μM	0.5 μM
<b>F: <i>stx2</i></b>	50 μM	0.5 μM
<b>R: <i>stx2</i></b>	50 μM	0.5 μM
Taq polymerase	5 U/μl	1 U/rxn
H <sub>2</sub> O	до краен обем 20 μl	

**Таблица 5. Реакционна смес за верижна полимеразна реакция с праймери за ген *fliCh7*.**

Компонент	Изходна концентрация	Крайна концентрация
ДНК		
10x PCR Буфер With KCL	10x	1x
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	1.5 mM
dNTP	2 mM mix	0.2 mM
<b><u>H-7 F</u></b>	50 μM	0.5 μM
<b><u>H-7 R</u></b>	50 μM	0.5 μM
Taq polymerase	5 U/μl	1 U/rxn
H <sub>2</sub> O	до краен обем 20 μl	

Мастермикса приготвихме в стерилна микропруветка от 2 мл, поставена върху охлаждащ агент. Екстрахираната геномна ДНК се размразява и поставя върху охлаждащ агент при 4°C до момента на нейното включване към индивидуална PCR микропруветка. От приготвения мастер-микс прехвърлихме по 18 μl в стерилна PCR микропруветка (обем 200 μl) и към това количество се добавят 2 μl от геномната ДНК на всеки бактериален щам. На всяко зареждане на проби за PCR приготвихме и една положителна и една отрицателна контролни проби. Положителната контрола е с геномна ДНК на

референтен щам на *E. coli* O157:H7. Отрицателната контрола е със стерилна дестилирана и дейонизирана вода.

Така подготвените PCR микроепруветки поставихме в предварително настроен термосайкълър (PCR апарат). Използван е апарат за PCR анализ с градиент блок QB-96 - Quanta Biotech. Включва се PCR апарата и се изчаква за извършване на авто тест и автокалибровка. В софтуера на термосайкълъра се въвежда програма за амплифициране на единичен ген или мултиплексна амплификация на няколко гена. Секвенцията на използваните праймери, температурата на хибридизация и обработката на амплификационните продукти са специфични за прицелния ген. Използваните програми са представени на таблица 6.

**Таблица 6. Програма за циклично извършване на верижна полимеразна реакция с праймери *eaeA*, *stx1*, *stx2* и *fliCh7*.**

Стъпка	Начална денатурация	Денатурация	Анелинг	Амплификация	Финална екстензия	край
Температура	94 °C	94 °C	60 °C	72 °C	72 °C	4 °C
Време	3 мин	1 мин	1 мин и 30 сек	1 мин и 30 сек	7 мин	∞
		35 цикъла				

Първоначално всички проби се денатурират на 94°C за 3 мин., след което се провеждат по 35 цикъла, като всеки отделен цикъл се състои от следните стъпки: денатурация на двойно верижната ДНК (94°C за 1 min), хибридизация (анелинг) на комплементарните участъци от ДНК матрицата с праймерите (60°C за 1 мин. и 30 сек) и удължаване (амплификация) на новосинтезиращата се верига (72°C за 1 мин. и 30 сек). След приключване на последния 35-ти цикъл апарата преминава във финална екстензия (72°C за 7 min) и показва края на програмата и преминава в режим на охлаждане и съхранение при 4°C до момента на отваряне на капака на термосайкълъра.

*Провеждане на гел-електрофореза и отчитане на резултатите:*

Получените PCR амплификати (новосинтезирани фрагменти на таргентните гени) се разделят чрез хоризонтална гел-електрофореза в 2% агарозен ген. Приготвя се 2% агарозен гел в TBE-буфер, като 1,2 g агароза се



смесват с 60 мл от буфера. Сместа се загрява на термочапла с електромагнитна бъркалка до пълно разтваряне на кристалите на агарозата, след което се охлажда до 60 °C и се добавят 6 µl Ethidiumbromid (концентрация 5.25 mg/ml). Веществото е Ethidiumbromid мутаген и по време на работа с разтвора и формата за отливане на гел се използват винилови ръкавици (сини). Добавянето на Ethidiumbromid се извършва в химическа камина, и след хомогенизиране все още течната агароза се излива във формата за гел-електрофореза. Постава се гребен за 12 ямки и се оставя в покой за 30 минути до пълно втвърдяване на гела. Когато гелът е готов, гребенчето се отстранява внимателно и ямките които остават в гела, стават стартовете, където се поставят по 12 µl от пробите от PCR реакцията. В електрофорезната вана гелът се поставя с ямките към отрицателния полюс и се залива с 400 мл от 1×TBE-буфер. Количеството трябва напълно да покрие гела. TBE-буфера за електрофореза се приготвя в състав 90 mM Tris; 90 mM Борна киселина; 1 mM Na<sub>2</sub> EDTA. От този буфер след разреждане 1:10 се приготвя 1×TBE-буфер.

След приключване на PCR реакцията, термосайкълъра се отваря и всички микроепруветки се поставят в статив. От всяка проба се прехвърлят по 10 µl в нова стерилна микроепруветка и се добавят 2 µl Bromphenol Blau и се смесват добре. Внимава се да не се получат въздушни мехурчета. Bromphenol Blau е оцветяващо вещество с електрофоретични свойства и позволява както придвижване на амплификатите, така и тяхното визуално отчитане при облъчване с UV-светлина. От така приготвените проби се зареждат ямките на гела, като 12 µl от всяка проба се поставят в отделна ямка на гела. Номерацията на ямките е от 1 до 12, като в първата се поставя маркер (ladder 100 bp), от 2-ра до 10-та се поставят пробите, в 11-та се поставя положителна контрола и в 12-та се поставя отрицателна контрола. След зареждане на всички ямки се програмира управляващия модул на електрофорезата и се стартира. Програмата за гел-електрофореза е на 100 V на 55 mA.

След 65 минути модула се изключва и гела внимателно се изважда и се поставя в затворена камера за UV-фотодокументация. Отчитането се извършва под UV трансилюминатор и се прави снимка чрез UV-гел фотодокументационна система. Отчитането на големината на амплифицираните фрагменти от пробите става чрез съпоставяне с големината на амплифицираните фрагменти от положителната контрола (референтна ДНК) и големината на фрагментите на

100 bp маркера. При маркера в първата ямка на гела, всеки светещ фрагмент е с нарастваща големина от 100 към 1100 bp със стъпка 100 bp. (100 bp; 200 bp.; 300 bp. и т.н. до 1100 bp.). Големината на амплифицираните фрагменти чрез праймери *eaeA*, *stx1*, *stx2* и *fliCh7* са представени съответно в таблица 7:

**Таблица 7. Големина на амплифицираните фрагменти**

Амплификон на:	Големина, bp.
<i>eaeA</i>	482 bp.
<i>stx1</i>	348 bp.
<i>stx2</i>	584 bp.
<i>fliCh7</i>	625 bp.

Данните от изследванията са прехвърлени в Microsoft Excel и обработени чрез SPSS 16.0 статистически софтуер (SPSS Inc.), с отчитане на корелационна значимост по Pearson chi-square тест и Fisher's exact two-tailed тест, при което разлика със стойност  $P < 0.05$  се приема за значима.

### **Отнасяния на изолатите *E. coli* O157:H7 към антимикробни средства**

Фенотипния анализ, касаещ отнасянията на получените микробни изолати *E. coli* O157:H7 към антимикробните средства, включваше 12 антибиотици и синтетични химиотерапевтици, отнасящи се към 6 различни класове. Техният избор беше съобразен с терапията и контрола на колиинфекциите в кравефермите, както и с лекуването на хемолитично-уремичния синдром при хората, а именно:

- **Бета-лактамни антибиотици**
- ампицилин,
- амоксицилин/клавуланова киселина
- цефалотин
- цефотаксим
- цефтазидим
- цефтриаксон
- **Тетрациклини**
- тетрациклин
- **Флуорирани хинолони**
- енрофлоксацин

- **Аминогликозид-аминоциклитоли**
- Гентамицин
- стрептомицин
- **Линкозамиди**
- клиндамицин
- **Антифолатни агенти**
- сулфаметоксазол и триметоприм

### **Диск-дифузионен метод**

Диск-дифузионния метод провеждахме съгласно изискванията на EUCAST (Matuschek et al. 2013). За целта приготвихме инокулум от култури на изолираните *E. coli* O157 в стационарна фаза на растеж и нефелометрично го стандартизирахме до 0.5 по McFarland.

Така стандартизирания бактериален инокулум щрихирахме с памучен тампон върху повърността на Мюлер-Хинтон агар, производство на Oxoid, Англия (височина на агаровия стълб  $4.0 \pm 0.5 \text{ mm}$ ). По препоръка на EUCAST щрихирането извършвахме в рамките на 15-60 min след неговото приготвяне, от гледна точка прецизиране коректния брой на инокулираните микробни клетки. След инокулирането на агаровата повърхност подсушавахме петрите за 15 min.

Антибиотичните дискове, натоварени със съответните коректни концентрации поставяхме върху агаровата повърхност, като в една стандартна 90 mm петра поставяхме не повече от 6 диск, респ. не повече от 12 диска за петрите с диаметър 150 mm.

Антибиотичните дискове, които използвахме при определяне отнасянията на колищамовете бяха натоварени със следните концентрации антиминокробни вещества: ампицилин 10 $\mu\text{g}$ , амоксицилин/клавуланова киселина 20/10  $\mu\text{g}$ , цефалотин 30  $\mu\text{g}$ , цефтазидим 30  $\mu\text{g}$ , цефтриаксон, 30  $\mu\text{g}$  цефотаксим 30  $\mu\text{g}$ , гентамицин 10  $\mu\text{g}$ , стрептомицин 10  $\mu\text{g}$ , тетрациклин 30  $\mu\text{g}$ , сулфаметоксазол/триметоприм 25 $\mu\text{g}$ , енрофлоксацин 5  $\mu\text{g}$ . Използваните антибиотични дискове за антибиограмите бяха производство на Oxoid (England), таблица 8.

**Таблица 8. Използвани антибактериални дискове**

	<b>Антибактериален агент</b>	<b>Антимикробен диск с</b>	<b>Код</b>	<b>µg/диск</b>	<b>Производител</b>
1.	<b>Ампицилин</b>	<b>AMPICILIN</b>	<b>AMP</b>	<b>10</b>	<b>OXOID</b>
2.	<b>Цефалотин</b>	<b>CEPHALOTIN</b>	<b>KF</b>	<b>30</b>	<b>OXOID</b>
3.	<b>Амоксицилин/ клавуланова киселина</b>	<b>Amoxicillin/ clavulanic acid</b>	<b>AMC</b>	<b>20/10</b>	<b>OXOID</b>
4.	<b>Цефтазидим</b>	<b>CEFTAZIDIME</b>	<b>CAZ</b>	<b>30</b>	<b>OXOID</b>
5.	<b>Цефтриаксон</b>	<b>CEFTRIAZONE</b>	<b>CRO</b>	<b>30</b>	<b>OXOID</b>
6.	<b>Цефотаксим</b>	<b>CEFOTAXIME</b>	<b>CTX</b>	<b>30</b>	<b>OXOID</b>
7.	<b>Гентамицин</b>	<b>GENTAMICIN</b>	<b>GEN</b>	<b>10</b>	<b>OXOID</b>
8.	<b>Стрептомицин</b>	<b>STREPTOMYCIN</b>	<b>S</b>	<b>10</b>	<b>OXOID</b>
9.	<b>Тетрациклин</b>	<b>TETRACYCLIN</b>	<b>TE</b>	<b>30</b>	<b>OXOID</b>
10.	<b>Енрофлоксацин</b>	<b>ENROFLOXACIN</b>	<b>EX</b>	<b>5</b>	<b>OXOID</b>
11.	<b>Триметроприм/ Сулфаметоксазол</b>	<b>TRIMETHOPRIME/ SULFAMETOXAZOLE</b>	<b>SXT</b>	<b>25</b>	<b>OXOID</b>

Този анализ се предхождаше от предварително категоризиране на изолатите на сензитивни (S), интермедиерни (I) и резистентни (R) съобразно тристепенната система на Bauer-Kirby. Впоследствие данните бяха анализирани сравнително-конфронтационно чрез определяне на съответните процентни изражения и тяхната оценка. На таблица 9 са представени използваните референтни стойности за категоризиране чувствителността към приложените антимикробни средства.

**Таблица 9. Категоризиране на чувствителността на изпитваните щамове.**

Антибактериален агент	Съдържание за диск в µg	S (mm)	I (mm)	R (mm)	Източник
Ампицилин	10	≤ 11	12-14	≥ 15	OXOID
Цефалотин	30	≤ 14	15-17	≥ 18	OXOID
Амоксицилин/ клавуланова киселина	20/10	≤ 14	14-20	≥ 21	OXOID
Цефтазидим	30	≤ 14	15-17	≥ 18	OXOID
Цефтриаксон	30	≤ 13	14-20	≥ 21	OXOID
Цефотаксим	30	≤ 14	15-22	≥ 23	OXOID
Гентамицин	10	≤ 12	13-14	≥ 15	OXOID
Стрептомицин	10	≤ 11	12-14	≥ 15	OXOID
Тетрациклин	30	≤ 14	15-18	≥ 19	OXOID
Енрофлоксацин	5	≤ 17	18-21	≥ 22	OXOID
Триметроприм/ Сулфаметоксазол	25	≤ 10	11-15	≥ 16	OXOID

### **Определяне на минималните инхибиращи концентрации**

За целта на изследването използвахме градиентен тест за детерминиране на минималните инхибиращи концентрации - Liofilchem MIC Test Strips на селектирани бактериални щамове. MIC е минималната инхибираща концентрация на антибиотик, който ще инхибира растежа на бактериите при стандартизирани *in vitro* условия. Метода се основава на количествен анализ за определяне на минималната инхибиторна концентрация (MIC) на антимикробни агенти срещу микроорганизми, с цел назоваване на подходящо лекуване на пациента, както и за идентифициране на модели (механизми) на резистентност. Тестовите ленти Liofilchem® MIC са изработени от специална висококачествена хартия, импрегнирана с предварително определен градиент на концентрация на антибиотик, в 15 двукратни разреждания като тези на конвенционалния MIC метод.

Когато MIC тестовата лента се постави върху инокулирана агарова повърхност, предварително формираният експоненциален градиент на антимикробния агент се прехвърля в агарната матрица и дифундира в агара около час. След 18 часа инкубиране, се образува симетрична елипса на инхибиране, центрирана по протежение на ивицата. MIC се отчита директно от

скалата на концентрация в  $\mu\text{g/mL}$ , в точката, където ръбът на формираната елипса на инхибиране се пресича с MIC Test Strip.

Тестовата процедура изисква първо да се остави неотворената тест лента да достигне стайна температура преди да се отвори, за да се сведе до минимум кондензацията на лентата.

След това вземаме 4 до 5 морфологично сходни колонии от културална среда и ги суспендираме в 5 mL в подходяща суспензионна среда, и определяме мътността по скалата на McFarland. След което потопихме стерилен тампон в бульонната култура като с оглед за елиминиране излишната течност притиснахме тампона към стената на епруветката. Следващата стъпка беше нанасяне по повърхността на средата на петриевата паничка за да се постигне равномерен растеж, като се оставя излишната влага да бъде абсорбирана. След като се уверихме, че повърхността на Мюлер Хинтон агара е напълно суха, нанесохме тестовата лента върху агаровата повърхност с лицевата страна на MIC нагоре и кода на лентата от външната страна на агара. Притиснахме тестовата лента върху средата, така че цялата дължина на антибиотичния градиент да е в пълен контакт с повърхността на агара. Последва 18-часова инкубация на плаките в обърнато положение при термостатни условия. В края на инкубацията отчетохме стойността на MIC, която се намира на ръба на елипсата на инхибиране.

Стойностите MIC за определяне на категориите на чувствителност са предоставени от CLSI или EUCAST и могат да се използват за тълкуване на MIC стойности.

## РЕЗУЛТАТИ

### Резултати от първична изолация и идентификация на таргетните микроорганизми при телета

В периода 2012-2016 година бяха получени и анализирани общо 1129 колко проби са изследвани бр. фекални тампонни проби от подрастващи телета на възраст 3-6 месеца. Те произхождаха от 28 говедовъдни ферми.

Стремежа бе да се обхване голяма част от страната и да се направи една своеобразна снимка на републиката по отношение превалентността на *E. coli* O157.

На таблица 10 са отразени данните от сложния диагностичен алгоритъм от утвърдени микробиологични техники за изолация и първична идентификация на *E. coli* O 157.

**Таблица 10. Сумарни данни от първична идентификация и биохимични отнасяния на получените анални тампонни проби**

Стопанства	Брой взети проби	Брой сорбитол негативни	Брой позитивни <i>E. coli</i> на KIA	Брой MUG негативни	Брой серопозитивни проби
Total	1129	825 (73%)	588 (71.2%)	80 (13.6%)	30 (37.5%)

От таблицата е видно, че над 70% проби съдържат сорбитол негативни колонии. Трябва да се отбележи, че някои от пробите, респ. петрита съдържаха няколко сорбитол негативни колонии, а други бяха изцяло с такива. Подобна тенденция в процентно съотношение (71.2 %), ние наблюдавахме и при следващата стъпка на изпитване, а именно определянето им като *E. coli* на политропната среда на Клиглер – жълт цвят на стълбеца, наличие на газ и отсъствие на сероводород (фигура 3). Само 13.6 % или 80 от доказаните коли щамове показват липса на бета глюкоронидазна активност (фигура 4). Последните бяха прехвърляни на обикновен агар (фигура 5), от тях по-малко от половината (37,5%), показаха принадлежност към серогрупа O157, чрез аглутинационно тестване. Така от изследваните общо 1129 фекални тампонни проби, 30 от сорбитол-негативните коли изолата (2,65 %), показаха положителен аглутинационен тест със антисерум *E. coli* O157.

## Резултати от молекулярно биологичния метод

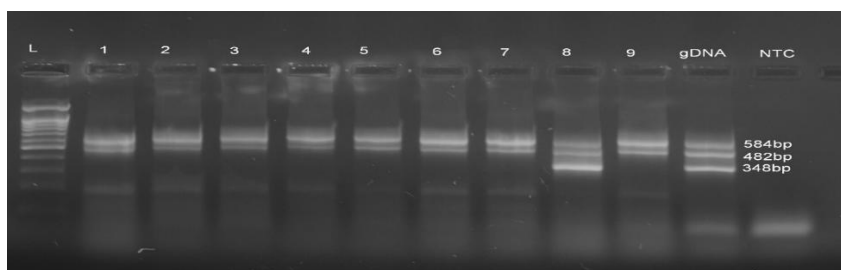
### Генетично изпитване на изолатите от проби фецес

От всички изследвани 1129 проби фецес само в 30 беше установено наличие на сорбитол-негативните коли изолата (2.65%), които показваха положителен аглутинационен тест за *E. coli* O157. Същите бяха подложени на генетично изпитване за наличие на ген кодиращ H7 антиген.

На фиг. 8 е представена генната идентификация при 9 щамове (от 1 до 9) изолирани от три стопанства. При всички щамове се отчита наличие на ампликони с големина 584 bp и 482 bp, които са еквивалентни съответно на гени *stx2* и *eaeA*. Единствено при щам 8, изолиран от едно стопанство се отчита и наличието на ген *stx1*, доказан чрез амплифициран фрагмент с големина 348 bp. Големината на фрагментите е определена чрез ДНК ледер 100 bp и чрез амплификация с положителна контрола ДНК от референтен щам АТСС (геномна DNA) с праймерни двойки специфични за гени *eaeA*, *stx1*, *stx2*.

При отрицателната контрола (NTC) не се отчита наличие на амплификат или друг носител на генетична информация.

**Фигура 8. Молекулярнобиологична идентификация чрез PCR амплификация на гени *eaeA*, *stx1*, *stx2*, при *E. coli* на изолати от 1 до 9.**



**Легенда:** 1-9 - щамове на *E. coli* O157

L - DNA Ladder - 100 bp

gDNA - positive control

NTC - negative control

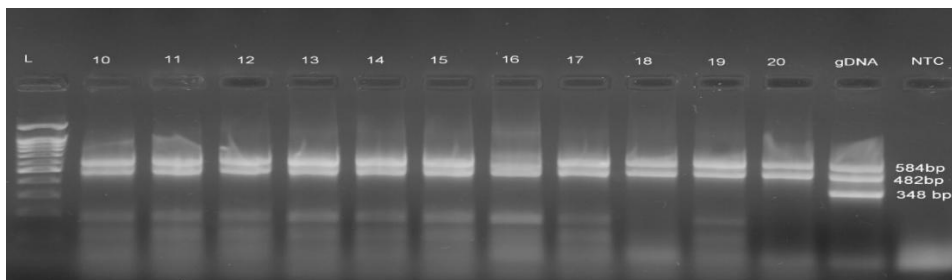
При щамове от 10 до 20, които са изолирани от две стопанства включително генната идентификация е сходна, като при всички се отчита присъствието на амплификони с размери големина 584 bp и 482 bp, които са еквивалентни съответно на гени *stx2* и *eaeA*. Големината на фрагментите е установена чрез ДНК ледер 100 bp и чрез амплификация с положителна



контрола ДНК от референтен щам ATCC (геномна DNA) с праймерни двойки специфични за гени *eaeA*, *stx1*, *stx2*.

При отрицателната контрола (NTC) не се регистрира наличие на амплификат или друг носител на генетична информация. Резултатите са представени на фигура 9.

**Фиг. 9. Молекулярнобиологична идентификация чрез PCR амплификация на гени *eaeA*, *stx1*, *stx2*, при *E. coli* на щамове от 10 до 20.**

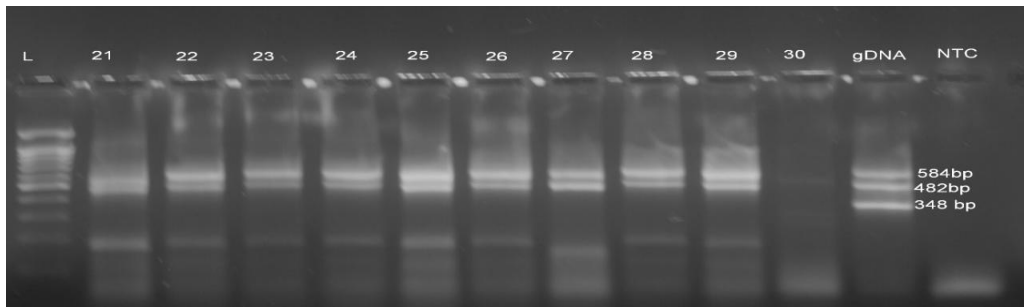


**Легенда:** 10-20 - щамове на *E. coli* O157  
L - DNA Ladder - 100 bp  
gDNA - positive control  
NTC - negative control

Изолираните щамове от 21 до 30 (фигура 10) са от 3 стопанства, съответно 21 и 22 от едно, от 23 до 25 от второ и от 26 до 30 от трето стопанство (фигура 10). Данните от генната идентификация сочат наличието на амплификони с размери големина 584 bp и 482 bp, които са реципрочни съответно на гени *stx2* и *eaeA*. Единствено последния щам, 30-ти прави изключение, при който отсъстват амплификони за кодирането и на трите гена.

При отрицателната контрола (NTC) не се отчита наличие на амплификат или друг носител на генетична информация.

**Фиг. 10. Молекулярнобиологична идентификация чрез PCR амплификация на гени *eaeA*, *stx1*, *stx2*, при *E. coli* на изолати от 21 до 30.**

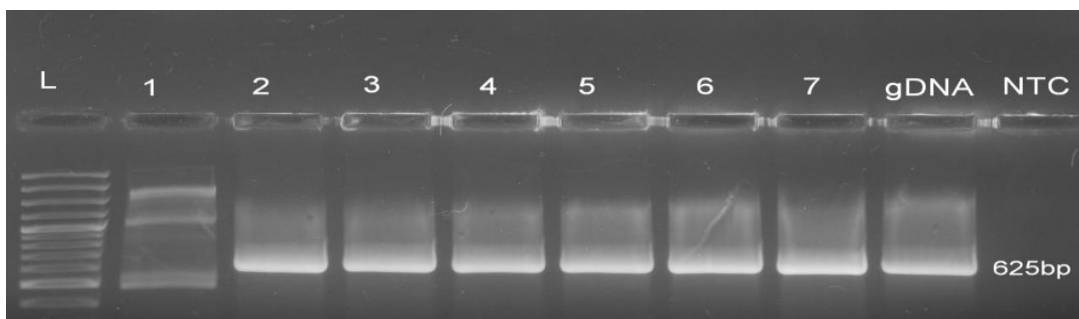


**Легенда:** 21-30 - щамове на *E. coli* O157  
L - DNA Ladder - 100 bp  
gDNA - positive control  
NTC - negative control

На фигура 11 е представена генната идентификация при 7 щамове (от 1 до 7) изолирани от две стопанства. При всички изпитани щамове недвосмислено се отчита присъствие на апликони с големина 625 bp, които са еквивалентни съответно на ген H7. Големината на фрагментите е установена чрез ДНК ледер 100 bp и чрез амплификация с положителна контрола ДНК от референтен щам ATCC (геномна DNA) с праймерни двойки специфични за ген H7.

При отрицателната контрола (NTC) не се отчита наличие на амплификат или друг носител на генетична информация.

**Фиг. 11. Молекулярнобиологична идентификация чрез PCR амплификация на ген H7 при *E. coli* на щамове от 1 до 7.**

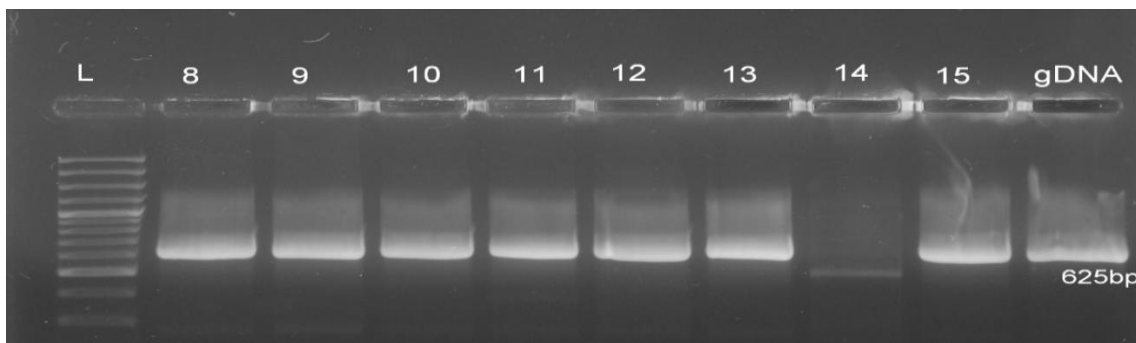


**Легенда:** 1-7 - щамове на *E. coli* O157  
L - DNA Ladder - 100 bp  
gDNA - positive control  
NTC - negative control

На фигура 12 е представена генната идентификация при 8 щамове (от 8 до 15) изолирани от три стопанства. Като първите два са от едно стопанство, от 10 до 14 включително от второ стопанство и последния щам е от трето стопанство. С изключение на щам 14 при който отсъстват амплификони за кодирането и на таргетния ген, при всички останали се отчита наличие на такива с големина 625 bp, които са еквивалентни на ген H7. Големината на фрагментите е установена чрез ДНК ледер 100 bp и чрез амплификация с положителна контрола ДНК от референтен щам ATCC (геномна DNA) с праймерни двойки специфични за ген H7.

При отрицателната контрола (NTC) не се отчита наличие на амплификат или друг носител на генетична информация.

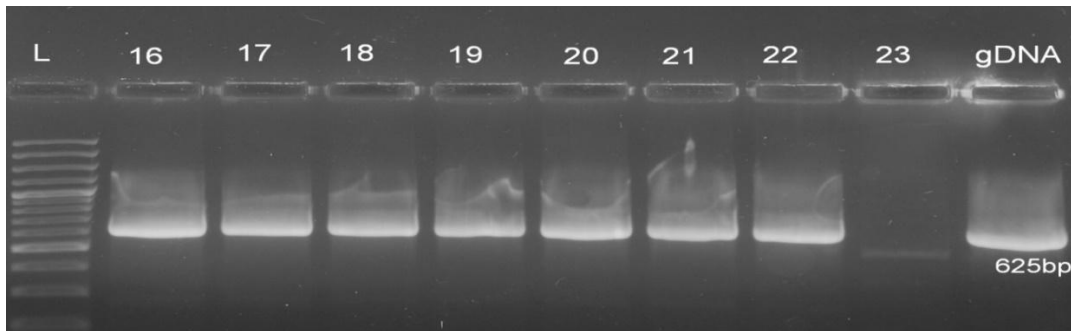
**Фиг. 12 Молекулярнобиологична идентификация чрез PCR амплификация на ген H7 при *E. coli* на щамове от 8 до 15.**



**Легенда:** 8-15 - щамове на *E. coli* O157  
L - DNA Ladder - 100 bp  
gDNA - positive control  
NTC - negative control

На фигура 13 е онагледена генната идентификация на 8 щамове на *E. coli* принадлежащи от две стопанства. При първите 7 щамове (от 16-23 до включително) е видно присъствието на ампликони с големина 625 bp, еквивалентни за кодирането на ген H7. Изключение прави последния изпитан щам, а именно 23, при който отсъстват ампликони за кодиране на въпросния ген

**Фиг. 13. Молекулярнобиологична идентификация чрез PCR амплификация на ген H7 при *E. coli* на щамове от 16 до 23.**

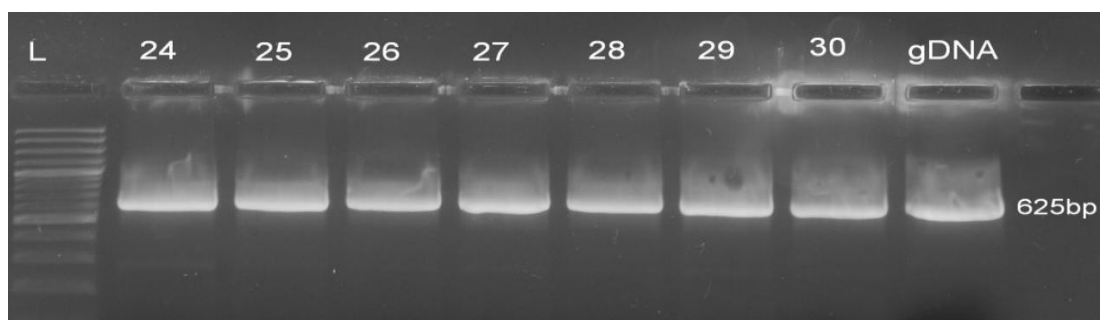


**Легенда:** 16-23 - щамове на *E. coli* O157  
L - DNA Ladder - 100 bp  
gDNA - positive control  
NTC - negative control

На следващата фиг.14 е представена генната идентификация на щамове *E. coli* от 24 до 30. При всички изпитани проби недвосмислено се регистрира наличие на апликони с големина 625 bp, които са еквивалентни съответно на ген H7. Големината на фрагментите е установена чрез ДНК ледер 100 bp и чрез амплификация с положителна контрола ДНК от референтен щам ATCC (геномна DNA) с праймерни двойки специфични за ген H7.

При отрицателната контрола (NTC) не се отчита наличие на амплификат или друг носител на генетична информация

**Фиг. 14 Молекулярнобиологична идентификация чрез PCR амплификация на ген H7 при *E. coli* на щамове от 24 до 30.**



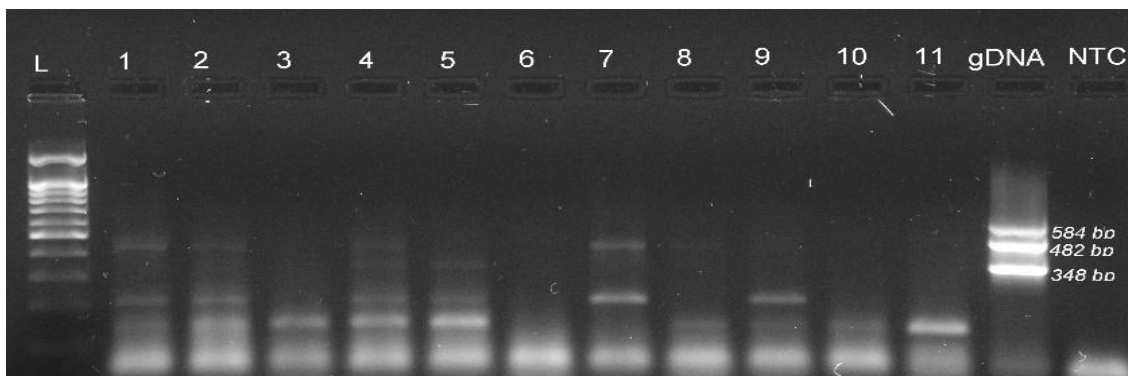
**Легенда:** 24-30 - щамове на *E. coli* O157  
L - DNA Ladder - 100 bp  
gDNA - positive control  
NTC - negative control

### **Резултати от генетичния профил на токсинпродуциращите *E. coli* от проби сурово сборно мляко**

От фигура 15 е видно, че данните от генната идентификация сочат наличието на амплификони с размери големина 348 bp при проби 4 и 5 и 482 bp при 1, 2, 4 и 7, които са реципрочни съответно на гени *stx1* и *eaeA*. Като при останалите проби не се отчита присъствие на амплификони за кодирането и на двата гена.

При отрицателната контрола (NTC) не се отчита наличие на амплификат или друг носител на генетична информация.

**Фиг. 15. Молекулярнобиологична идентификация чрез PCR амплификация на гени *eaeA*, *stx1*, *stx2*, от млечни проби от 1 до 11.**

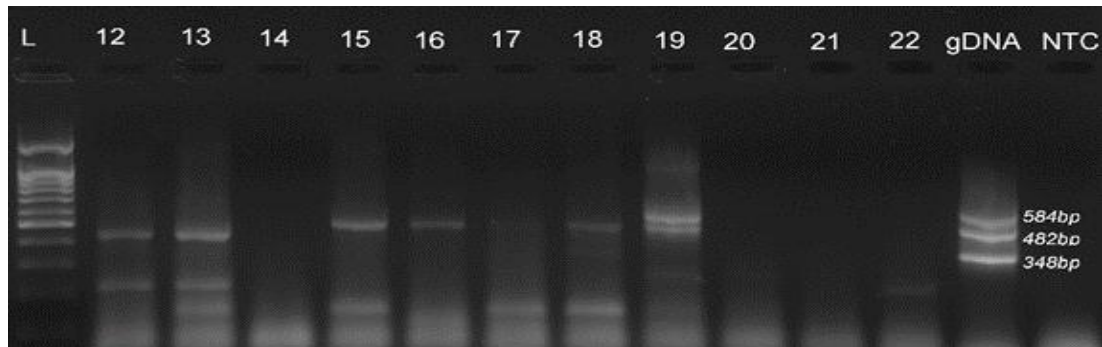


**Легенда:** 1-11 - проби сурово сборно мляко  
L - DNA Ladder - 100 bp  
gDNA - positive control  
NTC - negative control

На данните на фигура 16 данните от генната идентификация сочат наличието на амплификони с размери големина 584 bp при проби 19 и 482 bp при проби 12, 13, 15, 16, 18, 19, които са реципрочни съответно на гени *stx2* и *eaeA*. При всички тествани проби отсъстват амплификати с размер 348 bp съответстващи на ген *stx1*.

При отрицателната контрола (NTC) не се отчита наличие на амплификат или друг носител на генетична информация.

**Фиг. 16** Молекулярнобиологична идентификация чрез PCR амплификация на гени *eaeA*, *stx1*, *stx2*, от млечни проби от 12 до 22.

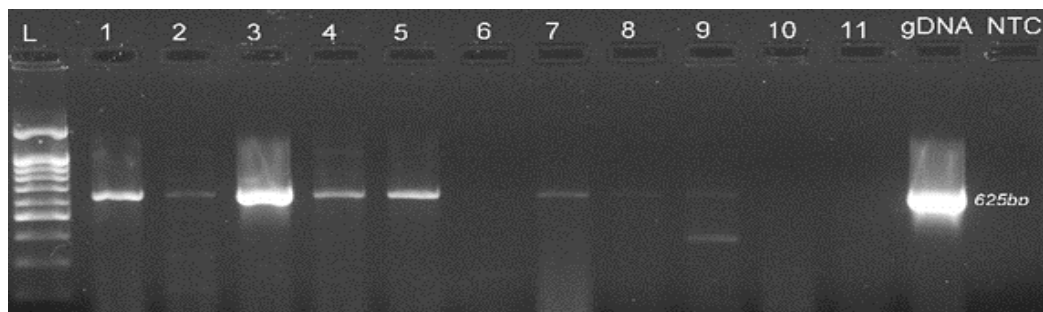


**Легенда:** 12-22 - проби сурово сборно мляко  
L - DNA Ladder - 100 bp  
gDNA - positive control  
NTC - negative control

На фигура 17 е представена генната идентификация при 11 проби (от 1 до 11). С изключение на проби 6, 10 и 11 всички останали изпитани проби недвосмислено отчитат присъствие на апликони с големина 625 bp, които са еквивалентни съответно на ген H7. Големината на фрагментите е установена чрез ДНК ледер 100 bp и чрез амплификация с положителна контрола ДНК от референтен щам ATCC (геномна DNA) с праймерни двойки специфични за ген H7.

При отрицателната контрола (NTC) не се отчита наличие на амплификат или друг носител на генетична информация.

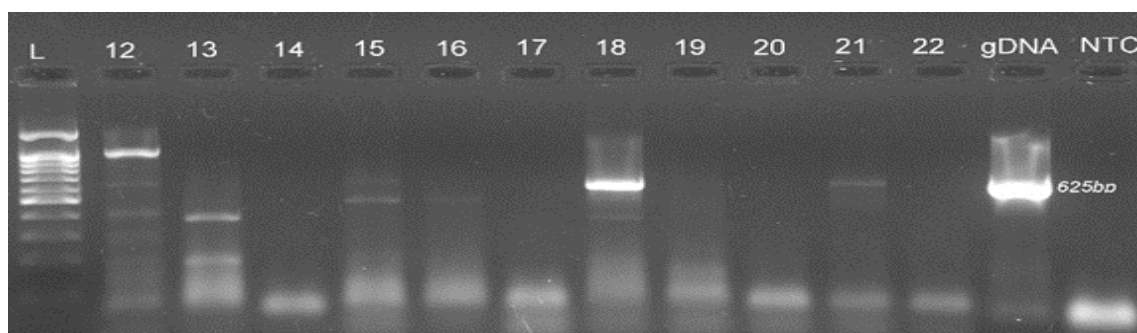
**Фиг. 17** Молекулярнобиологична идентификация чрез PCR амплификация на ген H7, от млечни проби от 1 до 11.



**Легенда:** 1-11 - проби сурово сборно мляко  
L - DNA Ladder - 100 bp  
gDNA - positive control  
NTC - negative control

На фигура 18 е представена генната идентификация при 11 проби (от 12 до 22 ). Видно е присъствие на апликони с големина 625 bp, които са еквивалентни съответно на ген H7 при 4 проби, а именно 12, 15, 18 и 21. Големината на фрагментите е установена чрез ДНК ледер 100 bp и чрез амплификация с положителна контрола ДНК от референтен щам ATCC (геномна DNA) с праймерни двойки специфични за ген H7.

**Фиг. 18 Молекулярнобиологична идентификация чрез PCR амплификация на ген H7 на млечни проби от 12 до 22.**



### **Резултати от фенотипния анализ на резистентността**

По диск-дифузионния метод (фиг. 19) бяха изпитани относянията на всички 30 щама *E. coli* O 157:H7 изолирани от фецес на здрави телета, произхождащи от 6 стопанства през периода 2012-2018 година.

Представените данни дават информация в сравнителен аспект за установената от нас резистентност. Резултатите от категоризирането по изискванията на EUCAST са отразени в таблица 11, а процентното разпределение е фигура 20.

**Табл. 11. Дистрибуция в процентно съотношение на отнасянията на щамове *E. coli* O157:H7 към различни химиотерапевтични средства**

Химиотерапевтици	Сензитивни (S) %	Резистентни и интермедиерни (R+I) %	Доверителни интервали
Ампицилин (AMP)	80	20	7.8÷35.9
Цефалотин (KF)	96.6	3.33	0÷12.7
Амоксицилин/ Клавуланова киселина (АМС)	93.3	6.7	0.5÷17.1
Цефтазидим (CAZ)	100	0	-
Цефтриаксон (CRO)	100	0	-
Цефотаксим СТХ)	96.1	3.9	0.04÷13.6
Гентамицин (GEN)	100	0	-
Стрептомицин (S)	90	10	2.0÷23
Тетрациклин (TE)	96.6	3.33	0÷12.7
Енрофлоксацин (EX)	100	0	-
Триметроприм/ Сулфаметоксазол (STX)	100	0	-

Данните от таблицата 11 недвосмислено сочат, че щамове на *E. coli* са със съхранена сензитивност както към цефалоспорините от трета генерация (цефтриаксон, цефтазидим, цефотаксим), така и към този от първо поколение – цефалотин. Видна е запазената чувствителност и към представителите на аминогликозидната група – стрептомицин и гентамицин. Релативно висока е чувствителността към представителя на широкоспектърните пеницилини – ампицилин, устойчиво запазена е такава към тетрациклина, флуорирания хинолон от втора генерация – енрофлоксацин, както и към комбинацията сулфаметоксазол с триметроприм и към широко използвания амоксицилин, potenziран с клавуланова киселина.

### **Резултати от определянето на минимални инхибиращи концентрации**

На таблица 12 са представени резултатите от определените MIC на ампицилин и амоксицилин/клавуланова киселина. При колищамовете показали резистентност към ампицилин по диск-дифузионния метод бяха намерени високи стойности на MIC (256µg/mL), респективно за комбинацията амоксицилин/клавуланова киселина, при два от резистентните към ампицилин щамове бяха намерени високи MIC (256 µg/mL) на амоксицилин/клавуланова киселина.



**Таблица 12. Минимални инхибиращи концентрации на ампицилин и амоксицилин/клавуланова киселина**

<b>№ на щамове</b>	<b>MIC на ампицилина (<math>\mu\text{g/ml}</math>)</b>	<b>MIC на амоксицилин/ клавуланова к-на (<math>\mu\text{g/ml}</math>)</b>
<b>3</b>	<b>256 <math>\mu\text{g/ml}</math></b>	<b>256 <math>\mu\text{g/ml}</math></b>
<b>5</b>	<b>256 <math>\mu\text{g/ml}</math></b>	<b>8 <math>\mu\text{g/ml}</math></b>
<b>6</b>	<b>256 <math>\mu\text{g/ml}</math></b>	<b>4 <math>\mu\text{g/ml}</math></b>
<b>10</b>	<b>256 <math>\mu\text{g/ml}</math></b>	<b>4 <math>\mu\text{g/ml}</math></b>
<b>29</b>	<b>256 <math>\mu\text{g/ml}</math></b>	<b>4 <math>\mu\text{g/ml}</math></b>
<b>30</b>	<b>256 <math>\mu\text{g/ml}</math></b>	<b>256 <math>\mu\text{g/ml}</math></b>

## ОБСЪЖДАНЕ

Резултатите представени от нашите проучвания доказват, че щамове *E. coli* серотип O157 циркулират сред млечните говеда в нашата страна, но подобно и в останалите страни и региони те имат различен интензитет при различните възрастови и технологични групи говеда. При изолираните от нас щамове беше установено, че те имат няколко вирулентни маркери, които ги правят сериозна заплаха за човешкото здраве. По наше мнение тези резултати налагат и дори задължават провеждането на допълнителни съвместни проучвания за извършване на анализ на ентерохеморагични *E. coli* O157:H7 от клинични изолати при хора с оглед осветляването тежестта на проблема у нас за общественото здраве. Такива мултидисциплинарни и между институционални проучвания са необходими и с оглед изготвянето на един пълен сравнителен, анализ на фенотипно и генотипно ниво касаещ базовите характеристики на тези човешки изолати и изолатите, получени от животни при теренни изследвания.

В известно различие с това са други проучвания, проведени в различни страни като например тези на Chapman et al. (2001) които сравняват профилите на вирулентните фактори на говежди и човешки изолати и заключват, че по-голямата част от говеждите изолати на *E. coli* O157 не се срещат или са недостатъчно представени при хората.

Освен това в друго едно изследване на Besser et al. (2007) се установява по-голямо генетично разнообразие при говеждите изолати в сравнение с човешките щамове. В крайна сметка значението на преживните животни и особено на говедата като резервоар на този серотип е безспорно. Като потвърждение на това идва фактът при 350 епидемични взрива сред хора в САЩ между 1982 г. и 2002 г е доказано че смляното говеждо месо е „носител“ при 75 от 183 огнища, причинени от храни (Rangel et al. 2005),

### **Първична изолация и идентификация на STEC серотип O157:H7 от различни възрастови категории телета**

С времето методологията за култивиране непрекъснато се променя и усъвършенства, като усилията са насочени не само към повишаване на

селективността на средите респ. чувствителността и специфичността на процеса, но и адаптиране на стъпките от началното идентифициране на серотипа. Все повече се работи и в посока за снижаване на обема на работа и разхода на време, което отбелязват и Bettelheim and Beutin през 2003 г. в едно свое обзорно и проучване.

Още след първите съобщения за наличие на епидемични взривове, причинени от щамове STEC O157, бързо се осъзнава, че изолатите, принадлежащи към този серотип, се различават от повечето типични *E. coli* по това, че не могат да ферментират сорбитол. Това е довело до разработването на вариантни агарови среди, съдържащи този поливалетен алкохол. Такива са на сорбитол MacConkey агара (SMAC), на която среда бледожълтите сорбитол-негативни колонии могат лесно да бъдат различени от предимно розово пигментираните колонии на сорбитол-ферментиращата щамове. (March and Ratnam 1986). По-късно се изработват и други селективни среди, с или без добавка на суплемементи, подчинени на микробиологичните и биохимични специфики на този вариантен агент. Така например Hiramatsu et al. (2002) разработват нова селективна среда, използваща рамноза, но за изолиране на STEC от серотип O26. Установяват, че тази особеност или липса на ферментация на този или някой други някой въглехидрати се използва, но за определени серотипове на шига-токсин продуциращите колищамове.

При нашето проучване ние също използвахме комбинация от културално базирани техники базирани на различни течни и твърди селективни хранителни среди. Обикновено те бяха съчетани с добавяне на необходимите суплемементи, а също и използването на серологичен метод за потвърждение. Окончателното потвърждение обаче се основаваше на доказване на специфичните нуклеотидни последователности в ДНК, т.е прилагането на генетичен метод за откриване на гените, кодиращи токсичните продукти, характерни за STEC.

При нашите проучвания, подобно на изследването на (Mir et al. 2016) за първична изолация от аналните тампонни проби успешно използвахме триптиказа-соев бульон (TSB), но без добавка на новобиоцин. След задължителната инкубация при определен температурен режим и аеробни условия се извършваха препосявки върху MacConkey агар, но в контраст с посочените автори при нашето изследване (Koev et al. 2018) това се

осъществяваше без добавяне на селективните суплемементи цефиксим и калиев телурит. Ние считаме, че и при такава процедурна практика резултатът като наличие и добив е удовлетворителен.

Проучванията на разпространението на *E.coli* O157:H7 най-често са свързани с две основни обстоятелства в екологичното им поведение. На първо място те се откриват във фецеса като чревно отделителство, което е по-често инцидентно и краткотрайно, от колкото перманентно. Според някои изследователи именно този факт предопределя ниската превалентност на и този агент в популациите (Shere et al. 1998). На второ място сложното екологично поведение на въпросния серотип както в макроорганизма, така и извън него се определя и от обстоятелството, че той може да бъде открит и екстраинтестинално във външния ушен канал и устната кухина с относително малка корелация с фекалното изхвърляне (Boqvist et al. 2009).

Нашето изследване бе насочено към изследване предимно на здрави говеда с млекодайно направление от интензивния сектор, които се инкриминират като основни резервоари на *E.coli* O157:H7. Това в свои проучвания изказват Gyles през 2007, според който основните носители са здрави домашни преживни животни, предимно говеда и в по-малка степен, овце и вероятно кози (La Ragione et al. 2009).

При нашите проучвания се установи носителство и излъчителство, съпоставимо с резултатите, получени при подобно проучване на Enem et al. Те изследват 718 фекални проби, събрани от кланици и говедовъдни стопанства. Първоначалната изолация е извършена на Eosin Methylene Blue (EMB) агар, докато ние използваме триптиказа соев бульон, суплементиран с новобиоцин. След това и при тяхното и при нашето изследване допълнително културите са анализирани, чрез добавяне в телурит-сорбитол McConkey агара (CT-SMAC) на цефиксим, агар за определяне наличието на сорбитолна ферментация с последващо използване на идентификация чрез латекс-аглутинация. Проучването при посочените автори спира дотук като отчита само общата превалентност на STEC щамове на популациите, без да определя вирулентен профил на изолатите. Авторите регистрират превалентност на STEC O157 при здрави говеда от 1,84% и 2.96% при такива с диаричен синдром, което напълно

съвпада по структура на методологията и резултати с тези от нашето изследване.

Наличието на носителство в дебелочревния тракт на младите говеда и инцидентното излъчителиство все пак предопределят в някаква, макар и невисока степен, контаминиране на средата и запазването на щамовете от този серотип в нея. В този смисъл интерес представляват данните на McWilliams и Torres от 2014 г., които съобщават, че устойчивостта на *E. coli* O157:H7 във околната среда (във и около фермата) се определя от една страна от способността му да колонизира червата на говедата, и от друга да се задържа и съхранява върху биотични или абиотични повърхности извън говеждото черво. Важно е, също така, че априори ЕНЕС щамовете произвеждат адхезини, за да доближат бактериите до чревния епител на реципиента и след това да установят интимна привързаност и предизвикването на А/Е лезии.

Болшинството от лабораториите занимаващи се с изолиране и проучване на щамове, принадлежащи към STEC, изолирани от хора, както и изследвания на щамове, носени и излъчвани от животни, обикновено използват само сорбитол MacConkey агар (SMAC) или по-рядко някои от другите STEC O157 специфични селективни среди (Bettelheim and Beutin 2003). Ние в нашето изследване също разчитаме на тази среда като селективна при изолацията на STEC от серотип O157. Разбира се всички селективни среди, основно SMAC улесняват в значителна степен първичната изолация и предшестват първичната идентификация което ги прави много подходящи за при скринингови проучвания като нашето. Така, в едно свое изследване Charman et. al. още през 1994 г. изказват становището, че за изолация на STEC от човешки, респективно говежди фецес цефиксим-рамноза сорбитол MacConkey агара и цефиксим-телурит сорбитол MacConkey агара също са се доказали като ефективни при това сравнително повече от класическия сорбитол MacConkey агар. Същия авторски колектив прави сравнителен и задълбочен анализ при изолирането на серотип O157 от фецес на млекодайни говеда като използва методика за изолация в директна култура и такава с помощта на имуномагнетичната сепарация (IMS). Пробите са получени за период от четири месеца като мониторингът е извършен върху 1024 броя проби. Принадлежност към серогрупа O 157 са показали 84 от тях (8.2 %).

Като част от диагностичния алгоритъм генетичните изследвания може да се предхождат от някои някои биологични методи като например цитотоксични тестове или серологични подходи, като ELISA, пасивна латекс аглутинация (PLA), отново за идентификация на веротоксини (Bettelheim and Beutin 2003).

Както беше вече споменато по-горе резултатите от нашето проучване относно превалентността на *E.coli* серотип O157:H7 в аналните проби от млади говеда, е относително ниска, въпреки , че те се считат като важен биологичен резервоар на този зооантропонозен агент. Това не е изненадващо тъй като още в ведно от първите просторни изследване в щата Уисконсин (САЩ) от Faith et al. през 1996 г. установяват 7.1% позитивни стопанства (herd prevalence), като в повече от 70 стопанства са установени до 1.8% позитивни анални тампон-проби (animal prevalence) или като цяло число само в 10 от общо 560 индивидуални проби, т.е цифрите, характеризиращи разпространението на този серотип сред изследваните телета до 4 м. възраст, е напълно съпоставимо с резултатите от нашето проучване.

През последните две десетилетия много изследвания затвърдиха мнението, че общото разпространение на този иначе проблемен зооантропонозен патоген е сравнително ниско. Така, в Обединеното кралство според Raiba et al. (2002) този серотип колибактерии са открити в 4.7% от говедата и 1.7% при овцете а 5 години по-късно Milnes et al. (2008), ги установяват съответно в 4.7% при млечните говеда и 0.7% при овцете.

В Холандия сходно проучване, но проведено с животни, постъпващи в кланици показва наличие на STEC *E. coli* серотип O157 при 10.6% от говедата и 4.0% опри овцете (Heuvelink et al. 1998). Няколко години по-късно в Норвегия ЕНЕС от серотип O157:H7 е намерен в 0.19% от говедата (3/1541) и 0/665 овце (Johnsen et al. 2001), а в Швеция изследват ЕНЕС са били открити в 11 (5,5%) от 200 бика (Stromberg et al. 2018).

При сходно изследване във Франция на 1 318 заклани говеда от млекодайното направление е установено разпространение на петте най-доминиращи STEC серотипове (O157:H7, O26:H11, O103:H2, O111:H8, и O145:H28 в порядъка до 1,8% (Bibbal et al. 2015). Настоящите наши изследвания потвърждават тази обща закономерност.

В България, през 2015 г. Урумова и колектив изследват 1094 анални тампонни проби и установява 36 щамове (3,3%) колибактерии показващи принадлежност към серогрупа O157 чрез аглутинационен тест. Следователно може да заключим, че у нас на този етап сред млечните говеда този серотип все още е относително слабо разпространен. Възможното им попадане в млякото обаче, при фекално замърсяване на последното и при една неефективна пастьоризация крие реален епидемиологичен риск.

### **Молекулярно-биологични изследвания на STEC**

Изолирането, идентифицирането и характеризирането на STEC от говеда се оказва от съществено значение както за разработването на диагностични алгоритми, така и за разработването на контролни инструменти, преследващи крайната цел да се избегне предаването на STEC на хората по хранителната верига. Стана ясно, че при последните проучвания за разпространението на STEC при говедата е установена висока степен на корелация между възрастта и интензитета на отделителството (Mir et al. 2014). По подобен начин, присъствието на *stx* и по-специално на *stx2* също е свързано с възрастта, като много по-често то се установява при млади телета (Mir et al. 2016). Последното твърдение доказваме и ние в нашето изследване: именно при по-млади телета, и ние регистрираме присъствието на амплификати, реципрочни на *stx2*, при това при всички изследвани изолати с изключение на един. Това кореспондира и установеното от Mir et al. (2016), които заключват, че при STEC от телета на възраст до 12 месеца с много по-голяма честота се изолира *stx2*, а от двата *stx* гена, кодиращи Шига-токсините *stx1* и *stx2*, се знае че *stx2* е свързан с по-тежки инфекции при човека.

Според Zhao et al. (2013) дори има и разлики в генетичните характеристики на щамове на STEC по отношение на възрастта, които могат да се обяснят със състава и разновидностите на чревната микрофлора, все още ниската концентрация на резидентната микрофлора от сем. *Enterobacteriaceae*, която повлиява на преживяемостта на STEC, както адхезията и колонизацията в червата на говедата.

По-голямата част от съвременните методи за установяване наличието на STEC във фецес и животински храни и продукти от тях се основават на ДНК

базирани техники. В нашето проучване и ние използвахме подходи, базирани на полимеразно-верижната реакция (PCR). Използвахме къси праймерни (олигонуклеотидни) двойки за амплификация на гени, детерминиращи продукцията на шига-токсин, както съответват Bettelheim and Beutin (2003), които цитират Bastian et al. (1998). Тяхното изследване сравнява генетичните протоколи на други 14 лаборатории. Използването на мултиплексния PCR метод, който специално открива STEC във фецес е с висока чувствителност и е разработена от Osek през 2002, (Bettelheim and Beutin 2003). Тази техника, използваме и ние в нашето проучване. За да се получи пълна картина за всички фактори на вирулентност (и техните подтипове, ако е необходимо) тези техники трябва да бъдат прилагани тъй като са със сигурност много по-надеждни от имунологичните (Bettelheim and Beutin 2003). Те обаче, макар и изключително чувствителни, имат и някои негативни страни, като например факта, че от няколко години има само стандартизирани комерсиални PCR китове, които са па-скъпи и поради това се използват само в отделни диагностични лаборатории. Освен това, изследванията на култури директно от фецес чрез PCR могат да бъдат проблем, тъй като в него могат да присъстват и фактори, инхибиращи PCR. Освен това в тези случаи съществува риска, че е възможно във фецеса да има нисък брой целеви организми, което води до получаване на фалшиво-негативни резултати (Bettelheim and Beutin 2003). Това при нашето проучване ние сме избегнали посредством ползването на няколко селективни и набогатителни среди т.е прилагаше се многостепенен подход, предхождащ генетичните анализи.

Установено е, че фалшиво-положителни резултати могат да бъдат получени, ако в пробата присъстват криптирани последователности на целевия ген (такива като свободни фаги на шигатоксини или дефектни *stx* гени в други бактерии) или когато се образуват PCR амплификационни продукти от алтернативни ДНК последователности. За такива съобщават още през далечната 1998г Beutin et al. цитирани от Bettelheim and Beutin 2003 в „зората“ на генетичните бактериологични изследвания. Такива резултати, ние избягваме при нашето изследване, като търсим целевия агент не директно от фецеса, а чрез използване методите на първичната изолация и идентификация, при това и след като сме използвали допълнително слайд аглутинационна техника за



предварително потвърждение. В подкрепа на подобен подход са и проучванията на Abotalp et al. през 2017, които търсят *E. coli* O157 в различни видове животни и източници – вода и мляко. На бактериологичното изследване са подложени 671 проби, събрани от говеда, овце, пилета, патици, мляко и вода. Установява се, че 34,3% (230 от 671) са били положителни *E. coli*. От тези 230 изолата 16 (6.9%) са идентифицирани като *E. coli* O157 с най-висока честота при пробите от едър рогат добитък (20%). Този резултат е твърде доближаващ се до този, получен от нашето проучване. След това щамовете, определени като *E. coli* O157 са подложени на PCR- анализ за наличие на вирулентните гени *sxt1*, *sxt2* и *eaeA*. Същият показва, че от 16 щама, определени като *E. coli* O157 съответно 9, 6 и 16 са положителни съответно за гените *stx1*, *stx2* и *eaeA*. До близък на този резултат се стигна и от нашето проучване при което също се установи доминация на *stx2* и *eaeA* гените. Авторският колектив излиза с заключението, че молекулярната идентификация чрез PCR за откриване на гени на вирулентност *E. coli* O157 е бърз, специфичен и изключително точен подход при изучаването на действителната роля на тези гени, която да даде отговори в участието им в патогенността на заболяването при хора.

В подкрепа на правилно избрания от нас диагностичен подход и конкретна методология са и други много значими факти от близкото и по-недалечното минало. Това е така защото използването само на PCR техники, особено в директни проби сами по себе си са довели до много погрешни изводи в диагностиката при епидемии при хора, консумиращи храни с животински произход. За такива погрешни определяния на етиологичния агент съобщават още Jiang et al. през 2001 в САЩ, както и Marshall et al. през 2001, цитирани от Bettelheim and Beutin 2003, които излизат с твърдението, че самостоятелното ползване на техники, основаващи се на PCR, без предварително културно изследване с идентификация, могат да доведат до подвеждащи резултати.

Изследване на Gonzalez et al. през 2016 г. също се базира на много подобна на нашата постановка и замисъл, търсейки вирулентните маркери на шигатоксин-продуциращи *E. coli*, изолирани от фецеса на здрави млечни говеда в щата Рио де Жанейро, Бразилия. Авторите обаче изолират 105 STEC щама чрез имуномагнетична сепарация (IMS) или плакирани върху MacConkey agar, с

последващо изпитване на изолатите за установяване гените на вирулентност с помощта на полимеразно верижна реакция. От тях преобладаващите серотипове са били принадлежащи O157:H7 (12,4%), като всички щамове от този серотип са установени като носещи гена *stx2*, резултат, напълно отъждествим с тези от нашето проучване.

През 2016 Gupta et al. извършват абсолютно идентично на нашето изследване, но при местни породи кози. Авторите като нас използват също цефиксим и калиев телурит като суплемементи, добавени към сорбитол McConkey агар (CT-SMAC) за ползване като селективна среда за STEC O157, а сорбитол-неферментативните колонии изследват чрез PCR за наличието на гените, за *stx1* и *stx2*, *eae* и *hlyA*. В нашето изследване както и в цитираното неферментативните сорбитол колонии (SNF EC) биваха изпитвани чрез слайд аглутинационен тест за принадлежност към серогрупа O157. Подобно на нас авторите изследват 514 тампонни проби, от които 32 са били идентифицирани като *E. coli*, а от тях 6 (1%) са доказани като позитивни за *stx1*, а в други 6 (1%) е установено присъствието на ген, кодиращ *stx2*, а в още и 2 проби (0,3%) е доказан ген *eae*, като всички те са от различни изолати.

### **Генетичен профил на шига-токсинпродуциращи *E. coli* от проби сурово мляко и антимикробна чувствителност на изолатите**

Счита се отдавна, че суровото мляко има потенциал да бъде високорискова храна, тъй като то е много питателен, богат на протеини и въглехидрати субстрат, осигуряващ благоприятни условия за растеж и размножаване на различни микроорганизми в т.ч и такива с патогенни качества. Стана ясно че бактериите от вида *E. coli*, серотип O157:H7 инфектират хората чрез различни механизми на предаване, но най-често алиментарно по хода на хранителната верига (Tahira et al. 2017). Рискът специално за суровото мляко се умножава, предвид факта че според Ali and Abdelgadir (2011) в някои страни и при това с развити общества има традиция или разбиране, че суровото мляко и неговите продукти са по-здравословни от пастьоризираното. Определена част от хората от селските райони в тези страни все още консумират непастьоризирано мляко директно, или косвено чрез млечни продукти (Rahal et al. 2012).

Тъй като млякото поддържа широк спектър от микробен растеж, както вече бе споменато, пастьоризацията е необходима алтернатива при контрола на патогените, пренасяни от мляко, които застрашават общественото здраве (Holsinger et al. 1997). В този смисъл Vanitha et al. (2018) смятат, че млякото, на очевидно здраво животно, когато се отделя от вимето е стерилен продукт. След това обаче то е предразположено към контаминация с разнообразни микроорганизми в т.ч. и патогенни на различни етапи от производството до консумацията. Авторите също напомнят, че употреблението на сурово мляко все още се практикува от част от населението с аргумента, че хранителните качества и ползите за здравето ще бъдат по-високи отколкото за вареното или преработено мляко, което увеличава риска от заразяване с ЕНЕС.

Установено е специално, че консумацията на сурово мляко или неговите продукти представлява реален риск за заразяване с *E. coli* O157:H7 като това може да доведе до тежко заболяване и дори смърт (Hlavsa et al. 2015). Само в САЩ центровете за контролът и превенция на заразните болести изчисляват, че ЕНЕС O157:H7 причинява годишно приблизително 73 000 заболявания с 2000 хоспитализации и средно около 50-60 смъртни случая (Frenzen et al. 2005).

За разлика от повечето изследвания, които априори търсят *E. coli* O157:H7 в суровото мляко нашата идея и от там методология са структурирани по различен начин, тъй като ние проучваме наличието на шига-токсин продуциращи щамове при млечни проби от ферми с доказано носителство на *E. coli* от серотип O157:H7. В нашето проучване ние извършваме скрининг на факторите на вирулентност на *E. coli* O157:H7 в сурово мляко в онези стопанства където предварително бяхме установили неговото наличие във фецеса на здрави носители и излъчители. При нас представения вирулентния профил на 22 млечни проби показва видима доминация в гените *eae*, кодиращи присъствието на интимин и H7, съответно 10 (45,54 %) и 12 (54,54%) от скринираните млечни проби. Само една проба показва притежание на ген, детерминиращ продуцирането на *stx2* (4,54%) и в други две проби се доказва наличието на ген *stx1* (9.09%)/

Нашите резултати, показващи сравнително ниско разпространение на STEC в млечни проби, са подобни на тези, докладвани от Zhao et al. (2013), които правят подобно изследване със съпоставими резултати. Те скринират

млечни проби като от седем са потвърдени три изолата принадлежащи към серотип *E. coli* O157:H7. На същите е направен генетичен профил, който установява че всички са позитивни за ген *stx2*, а един щам е бил е позитивен за *stx1*. Освен това всички изолати са се характеризирали с присъствието на *eaeA*, кодиращ присъствието на интимин. Трябва да се отбележи че авторите използват като среда за селективно набогатяване при първичната идентификация модифициран триптиказа соев бульон, суплементиран с новобиоцин, което ние също правим при нашето изследване.

Murphy заедно с авторски колектив правят много задълбочено изследване в Ирландия през 2016 г. Те провеждат 12-месечно проучване при две млечни стада, за да се установи статуса на животните по отношение на отделителство на STEC от серотиповете O157 и O26 и тяхното въздействие върху суровото мляко. Авторите споделят, че съществува пропаст в знанията относно т.нар. „животни-суперотделители“ на представители на патовара STEC. Чрез кохортно епидемиологично проучване на 40 лактиращи крави от стада, които преди са били идентифицирани като положителни за STEC, са били взети прицелни проби. По дизайн на постановката това проучване много наподобява нашето. Ние също изследвахме млечни проби, при това само от стада, в които предварително бяхме доказали каузалния агент във фецеса на част от животните. Разликата се състои в това, че посочените автори освен млечни проби са изследвали и ректо-анални тампонни проби, а също проби и от питейната вода и такива от млечните филтри. Резултатите за млечните проби също се доближават много до нашите, а именно при анализираниите от Murphy et al. (2016) 305 животни в първата ферма в 15 (5%) от тях са установени като позитивни за *E. coli* O157, а в 13 чрез количествен PCR са били доказани кодиращите вирулентност гени от типа *stx1* и/или *stx2*. Във втората ферма от анализирани общо 224 животни, при осем (3.5%) те доказват излъчителство на *E. coli* O157. Идентифицирани са били три super-shedders животни, като едното от тях е доказан излъчител на щамове STEC серотип O157, притежаващи гените за *stx2* и две животни са установени като излъчители на подобни щамове, но принадлежащи към серотип O26. Вторите също се установиха като носещи гените, кодиращи продукцията на токсин *stx2*. Три от тях са идентифицирани като притежаващи още ген *eae* кодиращ продукцията на

интиминовия протеин, медиращ етапите на прилепване и изглаждане на микровилите. В един от изолатите допълнително е установен ентерохемолизиновия ген *hlyA*.

Резултатите от това проучване показват, че в популациите с високи или средни нива на носителство е налице относително нисък брой на суперотделители. Това можем да заключим и ние в нашето проучване, но с уточнението, че наличието на тези патогени в стадото дори при ниски количества, може да доведе до предаването им от животно на животно и съответно към околната среда. Авторите не откриват нито вирулентния профил на *E. coli* O157, както и самия агент, което е в контраст с нашето проучване.

При анализирането на получените резултати и установени факти трябва да се има предвид, че механизмите, водещи до състоянието на super-shedders, са до голяма степен са все още неизвестни. Едва в последните няколко години се работи усилено в този аспект. Едно от интересните изследвания в тази посока е това на Zaheer et al. през 2017. Те открива разлики в микробния състав в super-shedders и не-super-shedders на няколко места по протежение на чревния тракт като доказват набогатяване с три рода микроорганизми (*Ruminococcus* spp., *Bacteroidetes* spp. и *Prevotella* spp.) при първата категория. Това според тях по някакъв начин повлиява колонизацията гликокаликса на чревните ентероцити с *E. coli* O157:H7, което зависи и от естеството на микробната общност, обитаваща храносмилателния тракт на super-shedders. Това изследване провокира към нови, допълнителни проучвания и в държави като нашата, в които съществува риск от реални епидемични взривове, въпреки ниското носителство при животните. Имено поради този реален риск в кратковременен аспект е необходим да се създаде Национална мониторингова програма с цел проучване, анализ и оценка на носителството на *E. coli* O157 сред популациите млечни говеда, както и възможностите за замърсяване на околната среда с такива щамове, контролиране нивото на крос-контаминация и в крайна сметка гарантиране сигурността на хранителната верига. Всичко това следва да е компонент на една национална стратегия за предпазване на потребителя от тези сериозни патогени. Това е от есенциално значение тъй като ще предоставят знания за риска относно ролята на говедата от интензивния млекодаен сектор като реален източник на STEC. Това е особено

важно, тъй като понастоящем у нас все още не е изяснена епидемиологичната връзка между продуктивните животни, продукти от животински произход и риска за хората. Премахването или снижаването на екскреция на STEC на ниво ферма ще намали разпространението и циркулацията на тези патогени и от своя страна ще се редуцира риска от инфекция при човека, което е и голямата цел. Не на последно място, акцент трябва да се постави и върху инициативи и кампании за разясняване и повишаване на осведомеността на фермерите, обслужващия персонал и ветеринарните специалисти относно възможните последици върху общественото здраве и инфекцията със STEC.

Световният опит до момента сочи, че този патовар си остава една висока зоонозна заплаха за общественото здраве. В подкрепа на това, при едно епидемиологично проучване Vanitha et al. през 2018г. установяват множество рискови фактори, които са отговорни като регулиращи появата на ЕНЕС в сурово мляко. Към това те добавят и значението на контаминираната вода, използвана като питейна или за нуждите на технологичния процес, а също неправилната и неадекватна подготовка на вимето, ролята на нехигиеничните ръце на доячите, както и използването на недостатъчно хигиенични доилни прибори и обща посуда за измиване на вимето и самото доене. Наред с това заслужава да се отбележи и обстоятелството, че при изолацията и проучването на културална характеристика на ЕНЕС този научен колектив използва еднакви с нашето изследване хранителни среди като Cefixime Tellurite-Sorbitol McConkey агар (СТ-SMAC), допълнен с новобиоцин, цефиксим и калиев телурит. Подобно на тях и ние при нашите изследвания инкубирахме посевките при 37°C за 18h с последващо инокулиране върху агар суплементиран с 4-метилумбелиферил В-глюкуронид (MUG) и последващ молекулярно генетичен анализ на изолатите чрез количествен PCR. Последният също се извършваше с използването на специфични праймери срещу *stx1*, *stx2*, *eaeA* *hlyA*. Авторите също обобщават, че суровото мляко, контаминирано с ЕНЕС представлява сериозна заплаха за общественото здраве, тъй като млекодайнните говеда и заобикалящата ги среда служат като потенциална екологична ниша за ЕНЕС. Това изследване за пореден път налага стремежа който трябва да се следва, а това е да се възприемат добри хигиенни практики за доене и последващо съхранение на суровото мляко с цел силно редуциране появата на ЕНЕС в него.

В по-задълбочен аспект, бъдещето е на страната на молекулярната епидемиология. Това е продиктувано от обстоятелството, че все още е необходимо по-детайлно осветляване на механизмите, свързани с мястото на STEC в микробиалната екосистема в т.ч. и тази в червата на продуктивните животни. Необходимо е да се извършат още изследвания относно циркулацията на отделните серотипове, да се анализират рисковите моменти свързани с формирането на носителство при различните възрасти животни например при телета, да се проучи по-подробно излъчителството и факторите, които го обуславят и в крайна сметка да се инициират действия за да се намали пряката и непряка експозиция на STEC на хората. Именно това е пътят да се обезпечи голямата цел, свързана с гарантиране на общественото здраве. С подобен тип изследвания са се заели страни като Нова Зеландия, където се регистрира сравнително висока инцидентност на случаи на заболяване от Шигатоксин продуциращи *E. coli* при хора (8,9 случая на STEC на 100 000 души, докладвани през 2016 г.). Такова амбициозно проучване осъществява Browne et al. през 2018, при което изследователите се опитват да дадат част от отговорите на горните въпроси. Те например доказват, че “Топ 3” STEC, изолирани от телета принадлежат към серогрупи O157, O26 и O45. При това те доказват, че в рамките на едно стопанство доминира един серотип т.е ако едно теле е положително за даден серотип, то и други в същата среда вероятно ще бъдат положителни за него, но в различните ферми съществуват различни щамове като доминиращи серотипове. Тези резултати бяха допълнително потвърдени с пълно геномно секвениране, което показва, че един клонов щам на *E. coli* O26 може да бъде намерен при телета в едно и също стопанство.

Ние в нашето проучване също откриваме щамове с идентични характеристики по отношение на вирулентния им профил в рамките на отделните стопанства. В подкрепа на целта на последното цитирано проучване е и това от Аржентина на Pianciola и Rivas от 2018г. Същите изказват твърдение, че съществуват големи географски различия в честотата на инфекциите с *E. coli* O157 при хора, които различия корелират със съответното разнообразие на щамове в говедия резервоар на всяка страна. Чрез извършване на целенасочено молекулярно характеризирание на човешките и говежди щамове, принадлежащи към серогрупа *E. coli* O157 циркулиращи в

Аржентина и тези, изолирани в страни се прави заключението, че генотипните характеристики на щамовете, причиняващи заболяване при хората, отразяват в много висока степен преобладаващите генотипове на изолатите от говедата. При това заключението касае всяка от анализирани страни. За нашата страна ние едва ли бихме могли да излезем с подобни изводи, тъй като у нас липсват регистрирани случаи при хора със заболявания, чиято генеза е свързана с серотип O157.

Ниското разпространение на STEC в пробите от сурово мляко, което ние установихме в нашето проучване се потвърждава и в подобно изследване на McKee et al. през 2003 г., които изследват 420 млечни проби от две млекопереработвателни предприятия в Северна Ирландия. Авторите установяват, че девет (2,14%) от тях са били положителни за STEC, четири от които носят само *stx2* гена, други четири притежават и двата - *stx2* и *eae* гена, а един носи едновременно *stx1* и *eae* гена, резултати много близки до генетичния профил при текущото наше проучване.

Аналогично на нашето проучване е извършено и от Brenjchi et al. през 2011 г. в Иран. Авторите изследват 130 млечни проби, като след селективно набогатяване сорбитол-неферментативни се оказват 8, от които чрез биохимични маркери само един изолат се доказва като *E. coli*. Същият чрез PCR е потвърден като принадлежащ към серотип *E. coli* O157:H7. Неговият вирулентен профил показва наличие на ген, кодиращ продукцията на шига-токсин от типа *stx2*. При подобно изследване в Либия пък са били анализирани 108 проби от сурови млека от крави, камили и кози, както и меки сирена. Доказани са 3 изолата *E. coli* O157 от суровото мляко - един от кравето и два от козето, като трябва да се отбележи, че колектива използва за изолиране, както и ние в нашето изследване, селективната среда SMAC, суплементирана с цефиксим и телурит. Шига-токсин продуциращите щамове са потвърдени чрез латекс-аглутинационен тест (Garbaj et al. 2016). Съпоставими на нашите резултати са установени и в Иран от Rahimi, който установява най-висока превалентност на *E. coli* O157 в проби от мляко на водни биволи (5,5%), последвано от това на говеда (3,6%), като всичките 3 изолати от *E. coli* O157:H7 са били положителни за притежание на гени за *stx1*, *stx2*.



През 2016 г. Nobili et al. изследват в Италия 95 проби от храни и от околната среда, получени също като в нашето проучване в периода между юни и септември, за наличието на гени, детерминиращи продукцията на шига токсините *stx1* и *stx2*, Авторите изолират STEC от 2 проби сурово мляко и 1 проба от сирене моцарела (3%). Трябва да се отбележи че щамовете са били подложени и на антимикробно тестване. При това резултатите напълно съответстват на нашите, а именно установена е отсъстваща чувствителност към ампицилин и запазена сензитивност към аминокликозидите и цефалоспорините от трета генерация. Контаминираното сирене моцарела е било произведено мляко, закупено от интензивен тип кравеферма, откъдето са били изолирани двата STEC-щам от суровото мляко. Този факт идва в подкрепа и на нашата теза да обвържем позитивните ферми, в които да търсим причинителя и в суровото краве мляко. Авторите определят, че всички изолати са били положителни за гена, кодиращ *stx2* и с отрицателни за *stx1* и *eae* гените. Подобен вирулентен профил се оказва до известна степен различен от установения при нашето проучване тъй като ние установяваме, че само в една проба се доказва наличие на гени *stx2*, както се съобщава и в други данни от литературата т.е вирулентният ген за *stx2* е най-често установявания сред щамовете от този серотип и клинично най-важният (Farrokhi et al. 2013).

Както се съобщава в литературата и особено в последните години в Италия, замърсеното сурово мляко и суровите млечни продукти и суровини са сред основните рискови фактори, разглеждани като „вектори“ на STEC (Baylis 2009; Trevisani et al. 2014). Както в нашето изследване, така и в други експериментални проучвания се установява обстоятелството, че замърсяването със STEC на суровите млечни продукти, не потвърждава тяхното широко разпространение в популациите от млечни говеда (Conedera et al. 2004).

През 2015 г. авторски колектив от Индия подлага на скрининг 30 щамове *E. coli*, изолирани от сурово говеждо мляко за наличие на вирулентните фактори *stx1*, *stx2* и *eae*. Прилагана е PCR амплификация, като са използвани специфични олигонуклеотидни праймери за таргентните гени както и при нашето изследване. (Neher et al. 2015). Установено е, че три от изолатите носят генната последователност за *stx1*, четири са притежавали *eae* гена а нито един

изолат не показва наличие на ген *stx2*. При нашите резултати се регистрираха два щамове с наличие на амплификони за *stx1*, и един за *stx2*. Десет проби показваха наличието на *eae* гени и дванадесет принадлежащи към, кодиращите флагеларния протеин от типа H7. В нашето проучване ние търсим и откриваме сегменти от геномната ДНК, отговарящи на ген за H7, което в това научно съобщение отсъства.

В едно научно съобщение от Южна Африка, Msolo et al. през 2016 съобщават за проведено от тях сходно проучване в три комерсиални млечни стопанства на проби сурово сборно мляко директно от танка. Изследването е било проведено в периода юни-октомври по опитен дизайн идентичен с нашия. За първична изолация е бил прилаган стандартен културално-базиран метод с използване на сорбитол McConkey agar, суплементиран с цефиксим и калиев телурит. Посевките са култивирани при стандартните условия а изолирането е било последвано от серологично потвърждение на предполагаемите колонии на *E. coli* O157:H7. Била е прилагана също латекс-аглутинация за принадлежност към серогрупа O157. На изолатите е направено генетично изпитване, като ДНК екстракцията на изолатите на *E. coli* O157:H7 е проведено като е бил използван термометода, какъвто използваме и ние. Ползвани са също два различни праймера, отговарящи на гени за O157 и H7, докато ние търсихме сегменти от геномната ДНК за установяване на токсигенен профил. От общо 252 предполагаеми изолати на *E. coli* които са били подложени на серологично тестване 27 или 11%, са се оказали позитивни за серотип O157:H7. Същите допълнително са били потвърдени чрез използване на PCR техника. Като цяло и при това изследване е ползвана постановка и опитен дизайн (микробиологичен и генетичен) които почти изцяло се покриват с нашите за изолация и идентификация на търсения агент от фецес.

Намерените различия в двете проучвания по-скоро касаят резултатите от проучването чувствителността на STEC щамовете към антимикуробни средства, а цитираните по-горе автори регистрират най-висока резистентност към тетрациклина – 22 от изпитаните 27 щамове (81%) и пеницилина – 23 (85%), а ние отчитаме 3,4 % резистентност към тетрациклина и към представителите на аминопеницилините – ампицилин и комбинацията амоксицилин и клавуланова киселина - съответно 20% и 93,3%.

Ролята на суровото мляко като потенциален резервоар на STEC и по-специално на серотип O157:H7 е потвърдена и чрез проучванията на Tahira et al. през 2017 година. Авторите подобно на нас изследват 100 проби от сурово мляко, получени също през летния период от годината от различни ферми в няколко области на Пакистан. Този колектив използва същите селективни хранителни среди и суплементирани по същия начин за първична изолация и идентификация, каквито използваме и ние в нашето изследване, но в процедурата за доказване на причинителя в проби от фецес. Те също използват модифициран триптиказа-соев бульон (mTSB) с прибавен към него 0.5 mg/ml новобиоцин. След инкубация от 24 часа следва препосяване на сорбитол McConkey агар (SMAC), допълнен с 0.05 mg цефиксим и 1.25 mg калиев телурит (CT-SMAC). Минимални разлики могат да се открият в последващата стъпка на идентификационния процес, където при тяхното изследване безцветните колонии се рекултивират върху EMB (eosin methylene blue agar), а ние използвахме Sorbitol Mc Conkey Agar с добавка на 4-метиллумбелиферил- $\beta$ -D-глюкоронид (MUG supplement). В двете изследвания впоследствие се използват различни биохимични тестове, като ние доказваме и серологичната принадлежност на изолатите докато в проучването на пакистанския колектив липсва такава процедура. За амплификация на желаните фрагменти от изследвания ген на *E. coli* O157:H7 при тях е използвана полимеразно верижната реакция, като за целите на анализа са обхванати сегменти от ДНК, отговарящи на гените, кодиращи продукцията на шига-токсините *stx1* и *stx2*, докато ние наред с тях търсим и гените *eaeA* и този, кодиращ флагеларния протеин H7. Авторите от Пакистан също като нас използват праймерни двойки за таргентните гени в съответните нуклеотидни последователности. Всички проби са подложени на 35 цикъла на амплификация на търсените гени и при двете изследвания.

Резултатите от mPCR изследването показват превалентност от 12% на *E. coli* серотип O157:H7 в пробите от сурово мляко, които стойности са значително по-високи от установената от нас но във фецеса, като отчитаме разбира се и обхвата на двете изследвания, който е несравнимо в наша полза. От тях 6 (50%), 3 (25%) и 3 (25%) са положителни за гени съответно *stx1*, *stx2* и за двата респективно. Ние отчитаме притежание на гени *stx2* (4,54%) и *stx1* (9.09%) и

значително преимущество в ген *eae*, кодиращ присъствието на интимин и H7, съответно в 10 (45,54%) и 12 (54,54%) от скринираните от нас млечни проби.

Нашето проучване подчертава важността на суровото мляко като фактор за съхранението и дисеминирането на STEC в животинските и човешката популация и разкрива потенциалния риск от разпространението специално на важния зооантропонозен серотип *E. coli* O157:H7. В този смисъл получените резултати придобиват особено значение от гледна точка на общественото здраве, тъй като те потвърждават реалната възможност чрез кросконтaminaция да се прехвърлят на човека по хранителната верига. Значението на говедата от млекодайния сектор в епидемиологията на STEC при специално ролята им като потенциален резервоар и източник на инфекция е доказана за пореден път. Потвърдено беше че обикновено суровото мляко лесно може да бъде замърсено с говежди фецес особено в стопанства, в които са занижени хигиенните практики и постоянния санитарен контрол. Ако такова контаминирано мляко се консумира без необходима термична обработка или бъде влагано в млечни продукти без или с нисък режим на пастьоризация то става опасно за появата на ендемични взривове от STEC инфекции. В подкрепа на тази теза е изследване на Tahira et al. през 2017, които доказват 5 (19%) изолата на *E. coli* O157:H7 получени от сурово мляко, други 5 (19%) от доилни машини и 2 (7%) от млекопреработватели или ръцете на работниците са сравнени с 15 (55%) изолирани от вимето на говедата чрез шестмесечно вземане на проби. Тези данни показват, че кръстосаното замърсяване (кросконтaminaцията) е възможно по и време на доенето, и след него което налага необходимостта от постоянен надзор върху добива, съхранението и преработката на млякото. Други автори също подчертаха, че съществуват различни фактори, които допринасят значително за контаминацията на млякото във фермата и тези фактори включват освен лошите хигиенни условия на доенето, замърсено оборудване във фермите, в млечни съдове и прибори, както и занижената лична хигиена на персонала (Lye et al. 2013).

Разбира се появата на серотип O157:H7, превалентността му в млякото и млечните продукти не е константна величина или такава, влияеща се само от субективния фактор. Тя се резултат и от многобройни обективни обстоятелства като сезонни различия по отношение на носителството, различия в интензитета

на излъчителството при различните индивиди, размера на стопанството, вида на хранителната диета, несъответствие в извадката на получените проби, различия в сензитета на използваните методи за доказване, а също и възприетите управленски практики (Kuma et al. 2015). Това налага многостранен подход за минимизиране на риска, а именно въвеждане на строги мерки за поддържане на добри хигиенни практики във фермите. Освен това са необходими и мерки, насочени към минимизиране на възможността за трансфер на щамове между отделните стопанства.

Резултатите от нашите проучвания са силно съпоставими и с тези на Turkuilmaz et al. Публикувани през 2017 г., които провеждат сходно изследване но целящо по-скоро изясняване разпространението на *E. coli* O157:H7 обаче в маститно мляко. Аналогично на нас и тези изследователи търсят основните вирулентни гени, детерминиращи продуцирането на шига токсините stx1 и stx2, както и *eae* гена за синтезирането на интимин. Освен това те насочват вниманието си и за гени, детерминиращи антибиотичната резистентност на изолатите. От 484 говежди млека с мастит те изолирани общо 8 (1.65%) *E. coli* O157:H7 от 5 ферми. Сред изследваните вирулентни гени всичките 8 (100.0%) изолата носят *ehlyA* ген за хемолизин, 7 изолати (87.5%) носят *eae* и *stx2* гени. Методологията на първичната изолация на това изследване следва идеята на нашата, която използваме при изолацията от фецес, а именно пробите от мляко са били култивирани на сорбитол MacConkey agar (SMAC) (Oxoid). Следващите стъпки са субкултивиране върху *E. coli* O157:H7 агар и потвърждаване със серологично използване чрез използване на антисерум. На изолатите е извършен тест за антимикробна чувствителност по диск-дифузионния метод на Kirby-Bauer използващ Mueller-Hinton агар, като потвърждават напълно съхранената чувствителност, която и ние установихме в нашето проучване.

През 2018 г. Bedasa и колектив изследват 200 проби от мляко и млечни произведения в Централна Етиопия и изолират 3,5 % *E. coli* от серотип O157:H7 като заключват, че изолатите от този серотип са най-често от сурово мляко (12%). Част от опитния дизайн на това изследване включва субкултивиране в Sorbitol McConkey агар и последваща селекция на безцветните колонии. Онези от тях, които не ферментират сорбитола подобно на нашето проучване, са

подложени на слайд-аглютинация за принадлежност към *E. coli* O157:H7. Трябва да се отбележи че авторите не използват и генетично изследване. Резултатите от изпитването на антимикробната чувствителност в почти пълна степен се покриват с нашите, като потвърждават съхранена чувствителност към цефтриаксон, тетрациклин, енрофлоксацин и гентамицин, като тези автори автори подчертават установената от тях резистентност към ампицилин, за което има индикации и от нашето проучване.

В друго научно съобщение от 2017 г., Myataza проучва профилът на антимикробната чувствителност на изолати *E. coli* O157:H7 и потвърждава, високата чувствителност спрямо цефалоспориновия антибиотик от трета генерация, цефотаксим (91%), подобно на нас, които установихме и 100% сензитивност като резултат от нашите изпитвания. Освен това авторите съобщават, че изпитаните изолати показват висока резистентност към тетрациклина (43%) и комбинацията триметоприм-сулфаметоксазол (45%), които контрастират със съхранена сензитивност, съответно 96,6% и 100% спрямо същите антимикробни средства при нашите изследвания. Освен това PCR анализът използван в това изследване амплифицира два гена *rfbE*O157 и *fliCH7*, докато ние установяваме цялостния вирулентен профил на изолираните щамове.

И други автори съобщават, че *E. coli* O157:H7 е резистентна към тетрациклините (Bekele 2012; Mude et al. 2017), Има обаче и такива като Mohammed et al. 2014, които съобщават, че щамове *E. coli* е от този серотип са податливи на тези антибиотици, което е в съответствие с установеното при нашето проучване.

## ИЗВОДИ

1. Резултатите за ниска общата превалентност на патогена в страната дублира общата снимка по света основана на много изследвания през годините

2. MacConkey агар, съдържащ сорбитол вместо лактоза трябва да се използва като основна диференцираща среда за откриване на *E. coli* O157:H7 в проби от фецес.

3. Детектирането на гени кодиращи *stx1*, *stx2* *eaeA* и H7 чрез полимеразно верижна реакция, основана на използването на къси праймерно двойки е успешен метод за доказване на шигатоксин продукция след предварителна изолация и първична идентификация.

4. Резултатите от настоящото проучване показват, че суровото мляко от говеда с интензивно направление е високо рисков продукт за общественото здраве в България поради потенциално контаминиране с *E. coli* O157:H7, тъй като млекодайните говеда и съпътстващата ги околна среда се оказват обективна ниша за STEC.

5. Телетата се идентифицират като основните екскретори (отделители) на STEC

6. Резултатите представени от нашето проучване, доказват че *E. coli* O157 циркулира сред стопанствата от млечни говеда в нашата страна.

7. Резултати от това проучване задължават провеждането на съвместни проучвания за извършване на анализ на ентерохеморагични *E. coli* O157:H7 от клинични изолати при хора, касаещи общественото здраве и сравнителен, задълбочен анализ на фенотипни и генетични характеристиките на тези човешки изолати и изолатите, получени в наши и други теренни изследвания.

8. Резултатите фенотипния анализ на резистентността сочат за съхранена сензитивност към всички тествани представители на цефалоспорини от първа и трета генерация, запазена е и чувствителността към представителите на аминогликозидната група, а също и към тетрациклин, енрофлоксацин и комбинацията сулфаметоксазол/триметоприм. Релативно висока остава чувствителността към и към групата на аминопеницилините и амоксицилин, потенциран с клавуланова киселина. Относително съхранена е чувствителността към ампицилина, макар и в по-ниска степен.

## ПРИНОСИ

1. За първи път в РБългария е проведено теренно проучване относно комплексния генетичен профил на шигатоксин продуциращи *E. coli* O157:H7 при млекодайна говеда от интензивен тип – **оригинален принос.**

2. Апробиран е диагностичен алгоритъм за първична изолация, идентификация и верификация на *E. coli* O157:H7, чрез използването на селективни и диференциращи хранителни среди - mTSB суплементиран с новобиоцин, SMAC със цефиксим и калиев телурит и 4 метиллумбелиферил-β-D-глюкоронид (MUG) с последващо слайд аглутинационно тестване за серотипна принадлежност – **потвърдителен принос.**

3. Доказано е, че използването на SMAC за детекция и първична идентификация на *E. coli* O157:H7 е проста, евтина, бърза и надеждна среда и се препоръчва за рутинна употреба – **потвърдителен принос.**

4. За първи път е осъществено скринингово изследване при телета в интензивните ферми у нас за носителство на STEC, като е анализиран техния вирулентен потенциал, което позволява научно-аргументиран подход при разработване на моделни програми за превенция и контрол - **принос с научно теоретично и приложно значение.**

5. Доказано е, че при телета, се регистрират преимуществено присъствието на амплификати реципрочни на *stx2*, последния е основен патогенетичен фактор при инфекциите при хора и в пряка корелативна връзка с възрастта животните – **потвърдителен принос.**

6. Потвърдено е, че изолирането и характеризирането на STEC от говеда е от есенциално значение за формирането на диагностични алгоритми и инструменти за контрол, за да се предотврати успешно преноса на STEC на хората чрез консумация на контаминирани храни от говеда по хранителната верига – **потвърдителен принос.**



## ПРЕПОРЪКИ ЗА ПРАКТИКАТА

1. С цел гарантиране на общественото здравеопазване е необходим задълбочен анализ относно циркулацията на отделните серотипове, анализ на предиспониращите моменти свързани с носителството при телета във стопанствата, вследствие на което да се проектират действия за ограничаване на пряката и непряка експозиция на STEC върху човека.

2. Необходимо е да се установи генетичната свързаност и произход на изолатите чрез методите на молекулярната биология с цел по-добро разбиране на тяхната географска дистрибуция, източници и пътища на предаване.

3. Необходимо е осветляване на епидемиологичните механизми, водещи до състояние на суперотделителство (super-shedders) сред говедата, които и до днес са до голяма степен неизвестни.

4. Реална е необходимостта от създаване на Национална мониторингова програма с цел проучване, анализ и оценка на носителството на *E. coli* O157 сред популацията млечни говеда, потенциала за замърсяване на околната среда, нивото на кросконтаминация и безопасността на хранителната верига, като част от стратегия за предпазване на потребителя от тези нововъзникнали патогени.

5. Необходимо е скриниране и по отношение на основните не-O157 серотипове – O26, O45, O103, O104, O111, O121, O145 и O177, за да се подобри и по-пълно да се разкрие разпространението и патогенетичния спектър на тези нововъзникващи агенти.

6. Трябва да се обърне внимание върху инициативи и кампании за разясняване и повишаване на осведомеността на фермерите, обслужващия персонал и ветеринарните специалисти относно възможните последици върху общественото здраве, свързани с инфекция със STEC, тъй като този патовар си остава високо сигнификантна зоонозна заплаха за общественото здраве в световен мащаб.

7. Пастьоризацията на млякото е необходима (задължителна) алтернатива при контрола на патогените, пренасяни чрез мляко, които застрашават общественото здраве

8. Въвеждане на молекулярно-генетичен скрининг на суровото мляко, получавано в говедовъдните стопанства за наличие на гени детерминиращи продукцията на шигатоксини, така че евентуално положителен резултат да послужи като „алармен“ сигнал за корективни действия в процеса на добиване и съхранение, с оглед предотвратяване на неговата контаминация с ЕНЕС.

9. Спазване на добри хигиенни практики при добив и съхранение на сурово мляко в широкия смисъл на думата с цел минимизиране на риска на онези фактори, инкриминиращи появата на ЕНЕС свързани с него - качеството на използваната вода, адекватна подготовка на вимето преди доене, хигиена на ръцете на доячите, използването на дезинфекцирани доилни прибори и избягване употребата на обща посуда за измиване на вимето и самото доене и не на последно място правилно последващото съхранение на суровия продукт.

## Научни публикации, свързани с дисертационния труд

1. **Koev K.**, Zhelev, G., Marutsov, P., Gospodinova, K., & Petrov, V. (2018). Isolation and primary identification of shiga toxin producing *Escherichia coli* O157 in dairy cattle. *Bulgarian Journal of Veterinary Medicine*, 21(4), 445-450. **SJR=0.207/2017**

2. **Koev K.**, Zhelev, G., Marutsov, P., Gospodinova, K., Petrov, V., & Stoyanchev, T. (2019). Molecular Screening and Characterization of Shiga Toxin-producing *Escherichia coli* By Multiplex pCR Assays for *stx1*, *stx2*, *eaeA*, H7 in Raw Milk. *Kafkas Universitesi Veteriner Fakultesi Dergisi*, 25(2), 271-275. **IF= 0.452/2017**

3. **Koev K.**, Stoyanchev, T., Zhelev, G., Marutsov, P., Gospodinova, K., Urumova, V., & Molecular Profiling and Antimicrobial Susceptibilities of *Escherichia coli* O157:H7 Isolated in Bulgaria. *Bulgarian Journal of Veterinary Medicine*. Online First ISSN 1311-1477; DOI: 10.15547/bjvm.2263 **SJR=0.207/2017**

## SUMMARY

The representatives of the *Escherichia coli* species are ubiquitously spread microorganisms with the behavior of opportunists and / or residents in some non-sterile areas of the human and animal body. Although they form a small part of faecal microflora, colibacteria are the predominant facultative anaerobes in the large intestine and probably exist there symbiotically. The intestinal tract of infants and newborn domestic animals is usually colonized very soon after birth, acquiring the intestinal flora of their mothers (Bettelheim 1996; Nataro et al., 1998).

There are also pathogenic strains or rather *E. coli* biovars with the capability to provoke a wide range of infectious disease processes and illnesses in both humans and almost any species of animals (Nataro et al 1998 Whittam et al. 1988; Whittam et al., 1993).

This diversity in clinical aspect is due to the high genetic variability and plasticity of the colibacteria. They easily exchange genetic information with similar bacteria, especially with other enterobacteriaceae such as *Salmonella* spp., *Shigella* spp., as well as other *E. coli* serovars by means of horizontal genetic transfer mechanisms. Thus, the coli strains acquire the characteristics and traits of different biological sources.

Over the last thirty years, an *E. coli* clone possessing unique virulence attributes has been outlined. Depending on the mechanisms in which the pathogenic colibacteria develop their pathogenic potential, they are distributed in several pathological varieties (pathovars). One of them is the one of the enterohemorrhagic *E. coli* bacteria (EHEC) which exert their pathogenic action due to the toxins they produce and which have the effect similar to the one of *Shigella* toxins directed to the vascular endothelium of the small blood vessels. Part of the serotypes belonging to this pathovar are found only in domestic animals, but others have proven zoonanthropogenicity. The most commonly found and most extensively studied of them is serotype O157: H7, which is proven to be responsible for causing a disease in humans accompanied by bloody diarrhea and renal insufficiency known as hemolytic uremic syndrome (HUS), often ending fatally (Kaper et al., 2004).

There is a series of evidence that the major reservoir of the strains of this and other similar serotypes are some animal species, including both farm animals(pigs, ruminants) and wild-living species.

However, it is necessary to carry out further, targeted studies, including epidemiological ones to illustrate the areas of spreading of such strains, the transfer mechanisms between animals and human, the role of foods and animal raw materials.