

Клинично значими
Escherichia coli.
Диагностика и
разпространение
в България

МАРИЯ ПАВЛОВА
ВАЛЕРИ ВЕЛЕВ
ЕКАТЕРИНА АЛЕКСАНДРОВА
ЙОРДАН КАЛЧЕВ
ПЕТЯ СТАНКОВА
ИВАН Н. ИВАНОВ

ИЗДАТЕЛСТВО
БЪЛГАРИ
София • 2022

***С финансовата подкрепа на Фонд Научни
Изследвания по проект „Проучване върху ди-
намиката на безсимптомно заразносите-
лство на патогенни Escherichia coli в България
чрез комплексна диагностика на колиенте-
рити в съвременни условия“ № КП-06-М43/2***

© Гл. ас. Мария Павлова, дм – НЦЗПБ, София, автор

© Екатерина Александрова – НЦЗПБ, София, автор

© Ас. Петя Станкова, дм – Медицински университет,
София

© Гл. Ас. Д-р Йордан Калчев, ДМ – Медицински уни-
верситет, Пловдив

© Доц. Иван Н. Иванов, дм – НЦЗПБ, София, автор

© Гл. Ас. Красимира Иванова, дм – НЦЗПБ, София,
съавтор

© Проф. Д-р Стефана Събчева, ДМ – УСБАЛ по онко-
логия, София, съавтор

© Доц. Д-р Валери Велев, ДМ – СБАЛИПБ „Порф.
Иван Киров“, София; Медицински университет, София

© Издателство „Българи“

ISBN 978–619–7656–25–1

София, 2022 г.

РЕЦЕНЗИЯ

от

проф. д-р Грозданка Лазарова, дм
на монография „Клинично значими *Escherichia coli*. Диагностика
и разпространение в България.“

Escherichia coli е един много особен бактериален патоген, за който продължава да се знае твърде малко. Все още е много популярно мнението, че това е безвреден коменсал в червата на човека и някои клиницисти, работещи извън сферата на заразната патология, дори не смятат за нужно да го причисляват към диарогенните агенти, които трябва да диагностицират. Всички диарични щамове на *E. coli* първоначално са били наречени ентеропатогенни *E. coli* (ЕРЕС), но тъй като микробиологията научи повече относно техните патогенни механизми те вече са групирани в няколко основни класа. От тях ентеропатогенните (ЕРЕС) и ентеротоксигенните (ЕТЕС) са най-важни за човешката патология.

В настоящата монография, написана от колектив микробиолози и инфекционисти, се разглеждат съвременните познания за *E. coli* като диарогенен патоген. Данните за новите класификации, патогенетични механизми на въздействие и епидемиологични особености са особено полезни за широк кръг читатели. Новаторска е частта показваща актуалните методи за диагностициране на ешерихиозите, включително чрез молекулни механизми, серодиагностика и бързи (имунохроматографски) тестове. В помощ на клиницистите – особено инфекционисти и педиатри, са разделите за клинично протичане на чревните ешерихиози и някои тежки извънчревни усложнения до които те могат да доведат.

Освен богат обзорец материал с множество референции, авторите са се постарали да дадат данни и от свои оригинални разработки, както в областта на диагностиката на ешерихиозите, така и в областта на клиничното протичане и начините за терапевтично поведение, особено в ранна детска възраст.

Във връзка с това убедено препоръчвам настоящата монография да бъде издадена като официален научен труд. Той ще бъде незаменимо помагало за редица специалисти в нашата страна

интересуващи се от проблема – микробиолози, инфекционисти, педиатри, лични лекари и всички колеги работещи в областта на медико-биологичните науки.

Проф. д-р Грозданка Лазарова, дм
Катедра по микробиология и паразитология,
Медицински факултет, Тракийски университет,
УМБАЛ „Проф. д-р Ст.Киркович“ , Стара Загора.

ВЪВЕДЕНИЕ

Съвременното научно схващане за чревната *E. coli* претърпя забележителна трансформация през последните десетилетия и несъмнено ще продължи да се развива. Веднъж отхвърлена като безобиден обитател на чревния тракт, *E. coli* сега се разглежда като патогенен вид със забележителна гъвкавост в способността си да причинява болести при хора и животни. Избухванията на заболяване, дължащо се на *E. coli*, могат да засегнат хиляди хора и да предизвикат национални и международни епидемии. Открити са патоген-специфични вирулентни фактори, които влияят неблагоприятно върху широк спектър от еукариотни клетъчни процеси, включително протеинов синтез, клетъчно делене, йонна секреция и транскрипция. Тези фактори са кодирани в различни мобилни генетични елементи като плазмиди, бактериофаги, транспозони и острови на патогенност; тази геномна пластичност предполага продължаващо пренареждане на факторите на вирулентност, което усложнява усилията за категоризиране на различните подгрупи в ясно очертани патотипове. Тази динамика обещава да представи нови предизвикателства в диагностиката, лечението и превенцията на инфекции от *E. coli*.

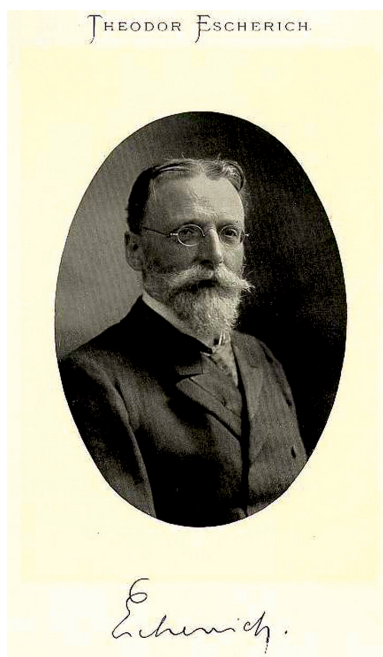
Даваме си сметка, че нито един преглед не може да бъде напълно изчерпателен. Но нека читателят прецени ползите от нашия труд, прилагайки придобитите знанията в микробиологичната диагностична практика, насочена към най-важното бактериално семейство в хуманната медицина *Enterobacteriaceae* със своя лидер в инфекциите *Escherichia coli*.

Гл. ас. Мария Павлова, дм

КРАТКА ИСТОРИЧЕСКА СПРАВКА

Мария Павлова

През 1885 г. един от най-видните педиатри на своето време проф. Теодор Ешерих за първи път идентифицира *E. coli* в проби от из-



пражнения, взети от бебета с ентерит. Тъй като официално професията бактериолог тогава не съществува, нейните инициатори са идвали от други дисциплини и тук областта на медицината далеч преобладава. Откривателите на видни патогени, като Герхард Хансен, Кох, Алберт Найсер, Клебс, Лофлер, Виктор Бабес, Йерсин, всички са били лекари, както, разбира се, и Ешерих. Изтъкнати ранни бактериолози, които не са били лекари, като Пастър, обучен като химик, и Фердинанд Юлиус Кон, който започва кариерата си като ботаник, не са открили човешки патогени.

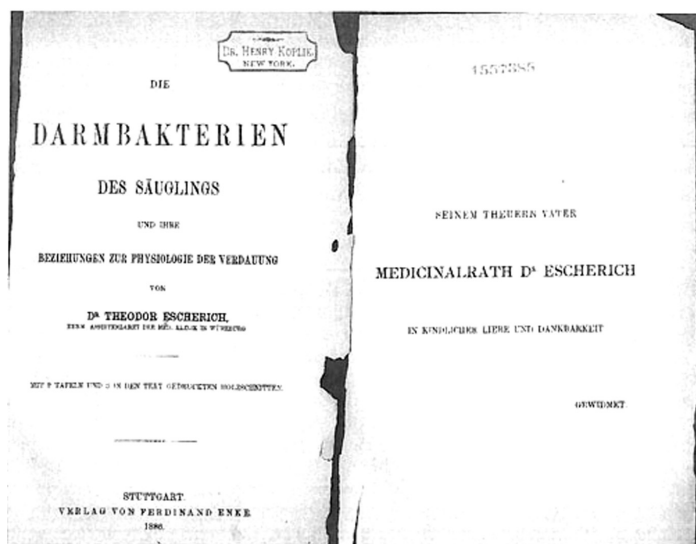
За да открие бактерията, Ешерих вече е научил и прилага новата за времето си техника за култивиране на бактерии върху петриеви панички, съдържащи втвърде-

на, богата на хранителни вещества среда, от Вилхелм Фробениус, лекар, който е изучавал бактериология с Робърт Кох [1]. Кох е бактериолог, известен със създаването Постулатите на Кох, насоките, използвани за определяне на инфекциозния агент или микроорганизма, отговорен за причиняването на дадено заболяване. Тъй като Ешерих е научил за постулатите на Кох, той е сигурен, че агентът, причиняващ диария при бебетата, може да бъде открит в техните проби от изпражнения. Ешерих започва своята работа върху храносмилателните заболявания през 1884 г. Той е заинтригуван от обстоятелството, че *Vibrio cholerae* по това време е единствената от различните патогенни бактерии, за които е известно, че са пряко свързани с храносмилателни заболявания [2]. Изследвайки фекални проби от бебета, за да определи причината за детската диария,

която е причинила смъртта на голям процент от децата, той изолира 19 различни бактерии с различни форми и характеристики и описва нова бактерии, оформени като пръчки, които той нарича *Bacterium coli*. Той демонстрира, че този нормален обитател на чревния тракт (*Bacterium coli*) може да стане патогенен и вирулентен. Името *Bacterium coli* по-късно е променено на *Escherichia coli* в чест на Ешерих. След като характеризира пробите от изпражнения, Ешерих заключава, че бактериите, присъстващи в чревния тракт на бебетата, трябва да са били постъпили от околната среда, чрез директен контакт с други хора, както и чрез млякото, което пият [3]. Това е било много важно откритие по онова време, защото предполагал, че хората носят много видове коменсални бактерии в телата си, които рядко причиняват заболяване и следователно не всички бактерии са патогени.

Едва на 29 години в допълнение към първата си книга Ешерих описва двете бактерии, които той нарича *Bacterium coli commune* и *Bacterium lactis aerogenes* (по-късно наречена *Bacterium aerogenes*, често бъркана с *Enterobacter aerogenes*, и сега наричана *Klebsiella pneumoniae* [4, 5]. Първият щам *E. coli*, за който е известно, че причинява диария, не е идентифициран до 1935 г., въпреки че протоколите за откриване може да са ограничили способността за намиране на бактерията на по-ранни етапи.

Трябва да се отбележи, че работата, която разпространява името на Ешерих, е неговото впечатляващо задълбочено и интензивно



Заглавие и втора страница от класическата книга на Теодор Ешерих, 1886 г., „Чревните бактерии на бебето и техните връзки с физиологията на храносмилането“, към „Неговия скъп баща, старши легиционски служител (Medizinalrath) д-р Ешерих, посветен на детската любов и благодарността“.

Източник: <https://doi.org/10.1128/ecosalplus.ESP-0025-2013>.

изследване на чревните бактерии при новородени и малки деца. *Bacterium coli commune* осигурява важна основа за кариерата му като повече от една четвърт от неговите публикации се отнасят до бактериологията. Ешерих уместно е прехвърлил бактериологичните методи на Робърт Кох в педиатрията [6, 7, 8].

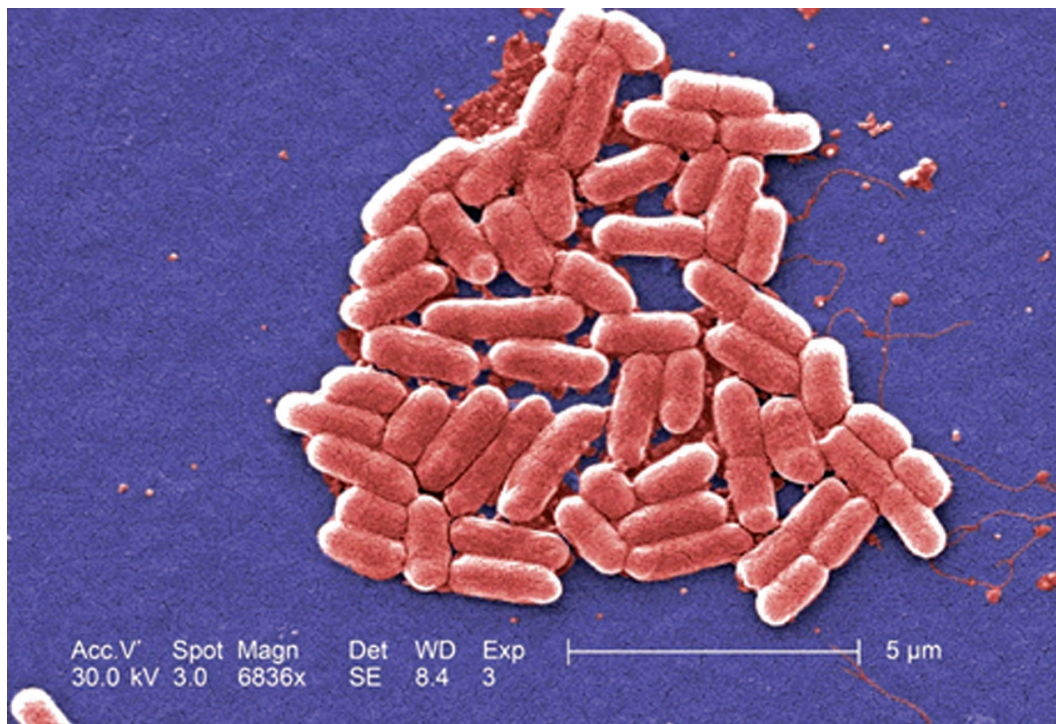
Източници:

1. Eberhart-Philips, *Outbreak Alert*. (Oakland, Calif.: New Harbinger Publications, 2000).
2. Coleman, W. (1987). Koch's comma bacillus: The first year. *Bull. Hist. Med.* 3, 315–342.
3. Escherich, T. (1885b). Die Darmbakterien des Neugeborenen und Sauglings. *Fortschritte der Medicin* 3, 515–522, 547–554.
4. Escherich, T. (1886a). “Die Darmbakterien des Sauglings und ihre Beziehungen zur Physiologie der Verdauung”. Verlag von Ferdinand Enke, Stuttgart.
5. Holmes, B., and Aucken, H. M. (1998). *Citrobacter, Enterobacter, Klebsiella, Serratia and other members of the Enterobacteriaceae*. In “Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections” (L. Collier, A. Balows, and M. Sussman, eds.), 9th edn., Vol. 2, Systematic Bacteriology (A. Balows and B. I. Duerden, volume eds.), p. 1007. Arnold, London; Oxford University Press, Inc., New York.
6. Lesky, E. (1981). “Meilensteine der Wiener Medizin; Große Ärzte Österreichs in drei Jahrhunderten”, pp. 194, 198. Verlag Wilhelm Maudrich, Vienna.
7. Dolman, C. E. (1971). Escherich, Theodor. In “Dictionary of Scientific Biography” (C. C. Gillispie, ed. in chief), Vol. 4, pp. 403–406. Charles Scribner's Sons, New York.
8. L. W. Riley et al., “Hemorrhagic Colitis Associated with a Rare *Escherichia coli* Serotype.” *New England Journal of Medicine* 308 (1983): 681-685.

ОБЩА ХАРАКТЕРИСТИКА НА БАКТЕРИАЛНИЯ ВИД *ESCHERICHIA COLI*

Мария Павлова

Escherichia coli са грам-отрицателни бактерии, факултативни анаероби, неспорогенни, принадлежащи към семейство Enterobacterales. Имат пръчковидна форма с диаметър приблизително 0,4 μm и дължина 2–3 μm . Бактерия може да притежава или не капсула и като цяло са подвижни с помощта на флаголи. Бактерия расте в широк диапазон от температури (15–45 °C) и може да оцелее в околната среда за дълги периоди [7].

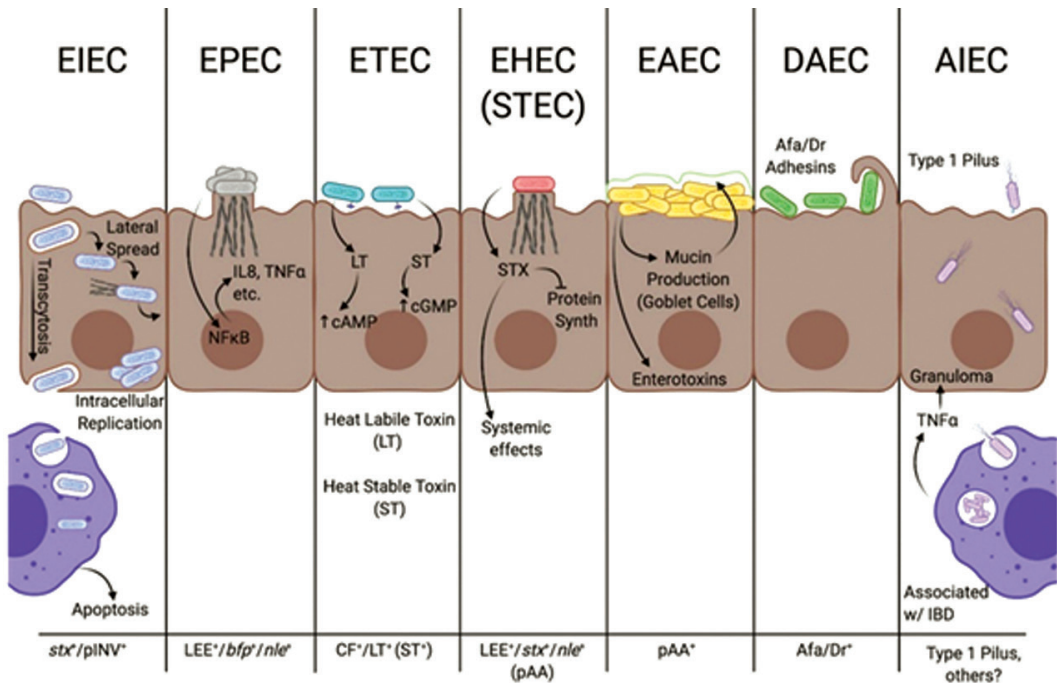


Цветна сканираща електронна микрофотография, изобразяваща редица Грам-отрицателни бактерии *Escherichia coli* от щам O157:H7, увеличение 6,836 Ч. Източник: Janice Haney Carr/CDC.[5].

Escherichia coli е основният факултативен анаероб в чревната флора на хората и топлокръвните животни и като цяло е непатогенен.

Обикновено колонизира стомашно-чревния тракт на бебета в рамките на няколко часа след раждането и съществува в симбиоза със своя гостоприемник до края на живота му [1, 2]. Повечето от щамовете на *E. coli*, изолирани от 1895 г. до днес, са част от коменсалната микробна популация на червата; обикновено присъства в изпражненията в количество от 10^7 – 10^9 . Въпреки че коменсалните *E. coli* рядко причиняват заболяване, освен при имунокомпрометирани гостоприемници или когато нормалните стомашно-чревни бариери са нарушени, някои типове на *E. coli* са адаптирани към патогенни ниши и причиняват широк спектър от заболявания чрез придобиване на специфични вирулентни фактори [3, 4].

Описани са осем патотипа на *E. coli*, причиняващи заболяване при хора, които включват шест широко изследвани чревни патотипа и два патотипа, причиняващи екстраинтестинални инфекции, обикновено наричани екстраинтестинални патогенни *E. coli* (ExPEC). ExPEC включва уропатогенна *E. coli* (UPEC), свързан със сепсис *E. coli* (SEPEC) и свързана с менингит *E. coli* (NMEC), отговорни за многобройни епидемични огнища и спорадични случаи на цистит,



Класификация на патотипи *E. coli*. Източник: <https://www.grepmed.com/images/10784/ecoli-pathophysiology-adherence-escherichia-microbiology>

пиелонефрит, менингит при бебета и т.н.. Шестте чревни патотипа включват ентеропатогенна *E. coli* (ЕПЕС), ентерохеморагична *E. coli* (ЕНЕС), ентеротоксигенна *E. coli* (ЕТЕС), ентероагрегативна *E. coli* (ЕАЕС), ентероинвазивна *E. coli* (ЕИЕС) и дифузно адхерентни *E. coli* (ДАЕС). Всеки патотип се състои от група, различни по своите О-, Н- и К- антигени, серотипа *E. coli* [6].

Източници:

1. Bäckhed F, Roswall J, Peng Y et al. Dynamics and stabilization of the human gut microbiome during the first year of life. *Cell Host Microbe*. 2015;17:690–703.
2. Dicks LMT, Geldenhuys J, Mikkelsen LS et al. Our gut microbiota: a long walk to homeostasis. *Benef Microbes*. 2018;9:3–20.
3. Gomes, T.A.T.; Elias, W.P.; Scaletsky, I.C.A.; Guth, B.E.C.; Rodrigues, J.F.; Piazza, R.M.F.; Ferreira, L.C.S.; Martinez, M.B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Braz. J. Microbiol.* 2016, 47, 3–30.
4. Gyles, C.L.; Prescott, J.F.; Songer, J.G.; Thoen, C.O. *Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals*, 4th ed.; Wiley-Blackwell: Hoboken, NJ, USA, 2010; ISBN 9780813812373. [Google Scholar]
5. <https://www.britannica.com/science/E-coli>.
6. Muniesa M, Hammerl JA, Hertwig S et al. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O104:H4: a new challenge for microbiology. *Appl Environ Microbiol.* 2012;78:4065–73.
7. Nataro JP, Kaper JB. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev.* 1998;11:142–201.
8. www.grepmed.com/images/10784/ecoli-pathophysiology-adherence-escherichia-microbiology

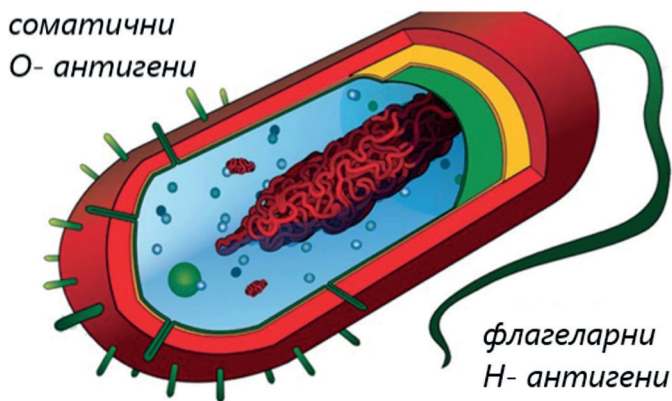
СЕРОЛОГИЧНА КЛАСИФИКАЦИЯ НА ПАТОГЕННИТЕ ЩАМОВЕ *ESCHERICHIA COLI*

Мария Павлова

Щамовете на *E. coli* са серологично класифицирани според антигенните разлики на 181 О (соматични) и 56 Н (флагеларни) антигени, въз основа на схемата за типизиране, въведена през 1947 г. от Фриц Кауфман и все още призната и използвана международно [9]. Наборът от бактериални щамове, характеризиращи се с един и същ О- антиген, съставлява „серогрупа“, докато специфична комбинация от О- антиген и Н- антиген определя „серотипа“ на изолата. Допълнителни антигени, анализирани в класификацията на Кауфман, са К (капсулни) и F (фимбриални) антигени [14].

О- антигенът е полизахарид, съставен от множество олигозахаридни повтарящи се единици и е една от най-променливите клетъчни съставки, поради вариациите в захарите, присъстващи в О- единицата и връзките вътре и между О- единиците. Вариативността в структурата на О- антигените осигурява основата на схемите за серотипиране на много Грам-отрицателни бактерии и е най-широко използваният метод за идентифициране на щамове за епидемиологични цели, което прави О- серотипирането един от най-важните компоненти в типизирането на организми за таксономия и епидемиология и основен инструмент, използван при обследване на епидемии и наблюдение. Разнообразието на О- антигените позволява на всеки от различните клонове във вида да представи повърхност, която предлага селективно предимство в неговата специфична ниша, което вероятно обяснява поддържането на разнообразието им (20). О- антигенът е изложен на клетъчната повърхност и обикновено е силно имуногенен, както и е обект на интензивна селекция от имунната система на гостоприемника и бактериофагите [15]. О- антигенът също е важен вирулентен фактор [1] и загубата на О антиген прави много патогени серумно чувствителни или по друг начин сериозно нарушена вирулентност, което е показано за много видове [4, 12, 17]. Например, О- антигените могат да насърчат имунната супресия, като позволят на УРЕС да намали индукцията на цитокини и хемокини в епителните клетки и да допринесе за за-

щитата срещу фагоцитоза и убиване от неутрофили и моноцити [11, 19]. Също така О- антигенът играе ключова роля във вирулентността на NMЕС. Скоростно проучване показва, че О- антигенът може да повлияе на инхибиторната способност на липополизахаридите върху ензимната и бактерицидна активност на лизозима, ключов елемент от вродения имунитет, характеризиращ се с антибактериална активност срещу ЕхРЕС [2].



Условно изображение на О- и Н-антигени при Escherichia coli.

Източник: <https://about-ecoli.com/>.

Въпреки утвърдената схема на Кауфман за серотипиране на *E. coli*, която сега включва О- антигени, номерирани от 1 до 187 [9], имайте предвид, че О31, О47, О67, О72, О94 и О122 не са вече разпознати, като някои са дублирани за О- антиген, а други принадлежат на организми, които са прекласифицирани в други родове. Това дава 181 О- антигени в *E. coli* в момента. Също така няколко О- антигена съдържат подгрупи, като О9 и О9а в О- антигена О9, О18аb и О18ас в О- антигена О18, О28аb и О28ас в О- антигена О28 и О112аb и О112ас в О- антигена О112. Тъй като всяка подгрупа притежава уникален О- антиген и генен клъстер, те всъщност представляват независими серогрупи [18]. Гените за синтеза на О- антиген обикновено присъстват като генен клъстер в специфичен локус. В по-голямата част от *E. coli* и *Shigellas sp.* клъстерът на О- антигенния ген е разположен между два структурни гена, *galF* и *gnd*. Има три основни класа гени, които обикновено се срещат в клъстерите на О- антигенни гени: гени за синтез на нуклеотидни прекурсори за захари, които са специфични за конкретния полизахарид, гликозилтрансферазни гени, които са специфични за донорните и акцепторните захари и генерират специфична връзка между тях, и гени за транслокация и полимеризация на О- единици. [3, 5, 16].

Повечето структури на *E. coli* и генни клъстери споделят почти идентични или тясно свързани О- антигенни структури и генни групи. Това показва, че членовете във всяка група са еволюционно близки и може да са еволюирали от общ прародител, за да се диверсифицират впоследствие още повече от един към друг. Диверсификацията в рамките на различни групи може да бъде медирана от рекомбинационна замяна на гени (O24/O56, O169/O183, O86/O90/O127), точкова мутация, водеща до инактивиране или функционална промяна на определени гени (O107/O117, O124/O164, O118/O151, O2/O50), вмъкване на инсерционен елемент, водещо до инактивиране на определен ген (O101/O162) и носещи генни профаги (O17/O44/O73/O77/O106). Повечето серогрупи *Shigella* попадат в три клъстера в *E. coli*, като единственото изключение е *Shigella boydii* 13, която сега е призната за серогрупа *Escherichia albertii*. Освен това има 22 двойки О- антигени и свързани генни клъстери, идентични или тясно свързани между *E. coli* и *Shigella* [6, 10].

Групирването на щам *E. coli* към специфична серогрупа или серотип може да бъде свързано с наличието на определени патогенетични фактори и способността да причинява специфични симптоми. Въпреки това, серотипът сам по себе си не може да предскаже нито генотипните характеристики, нито патогенността, тъй като хоризонталният генен трансфер позволява на щамове с идентични фенотипни характеристики (т.е. серотип) да имат няколко генотипни разлики (т.е. различни патогенни фактори). Съвсем наскоро, в допълнение към класификационната схема на Kaufmann, *E. coli* бяха класифицирани в патогенетични типове въз основа на техния патогенетичен профил, който отчита вирулентните фактори и заболяванията, причинени главно при хора [13]. Патогенните *E. coli* могат да бъдат разграничени от техните непатогенни двойници по наличието на вирулентни гени, които кодират прилепването, колонизацията, инвазията, молекулите на клетъчната повърхност, секрецията, транспорта и образуването на сидерофор. Тези вирулентни гени обикновено са организирани като големи блокове в хромозоми, плазмиди или фаги и често се предават между щамове на *E. coli*.

От 1940 г. насам серотипизирането на базата на вариабилността на О- антиген е основен метод за класифициране на щамове на *E. coli* и са разработени стандартизиранни процедури. *E. coli* се разделя на О- и Н- (флагеларен) антиген дефинирани серотипове и някои от тях са доказали, че са тясно свързани с човешки заболявания, с висока заболяемост и смъртност. Например, серотипният щам O157:H7, произвеждащ Shiga токсин *E. coli* (STEC) е добре известен

с причиняването на животозастрашаващи усложнения, като кървава диария (хемолитичен колит) и хемолитично-уремичен синдром (ХУС). От друга страна, най-често срещаните серогрупи на не-O157 STEC като O26, O45, O103, O111, O121 и O145 обикновено причиняват хранителни заболявания, като инфекциите са по-леки от тези, причинени от O157:H7, но се различават между серогрупите. Серотипизирането на O- антиген предоставя важна информация за патотипа и все още е преобладаващият стандарт за откриване на *E. coli* и някои други големи патогени и се счита за съществен метод при обследване на епидемични огнища, управление на риска, епидемиологични проучвания и възможности за лечение от клинични микробиолози, специалисти по инфекциозни заболявания и контрол на инфекциите агенции. Конвенционалното серотипиране е деликатен, трудоемък, отнемащ време и скъп процес. В допълнение, последователното производство на напълно валидирани антисеруми е трудно. През последните няколко десетилетия са разработени голям брой молекулярни и PCR-базирани анализи за насочване към серо-специфични гени на *E. coli*, което води до надеждни и рентабилни процедури за анализ. Продължаващият напредък в разработването на методи за секвениране на ДНК доведоха до подхода за секвениране на целия геном (WGS), базирани на *in silico* серотипиране, които предлагат по-добра резолюция и са по-добри от конвенционалните методи за епидемиологично изследване на патогени и проследяване на *E. coli*, както и други основни патогени като *Salmonella*, *Shigella*, *Campylobacter* и др. [7]. Въпреки това, от решаващо значение за тези подходи е да има база данни, съдържаща съответните подробности за серо-специфични гени, което от своя страна изисква задълбочено разбиране на O- антигенните структури във връзка с генетичната основа за тяхното разнообразие и вариация.

Източници:

1. Achtman M, Pluschke G. Clonal analysis of descent and virulence among selected *Escherichia coli*. *Annu Rev Microbiol.* 1986;40:185–210.
2. Bao Y, Zhang H, Huang X et al. O-specific polysaccharide confers lysozyme resistance to extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. *Virulence.* 2018;9:666–80.
3. Bonofiglio L, Garcia E, Mollerach M. Biochemical characterization of the pneumococcal glucose 1-phosphate uridylyltransferase (GalU) essential for capsule biosynthesis. *Curr Microbiol.* 2005;51:217–21.
4. Caboni M, Pidrón T, Rossi O et al. An O antigen capsule modu-

- lates bacterial pathogenesis in *Shigella sonnei*. PLoS Pathog. 2015;11:e1004749.
5. Daniels C, Vindurampulle C, Morona R. Overexpression and topology of the *Shigella flexneri* O-antigen polymerase (Rfc/Wzy). Mol Microbiol. 1998;28:1211–22.
 6. Hyma KE, Lacher DW, Nelson AM et al. Evolutionary genetics of a new pathogenic *Escherichia* species: *Escherichia albertii* and related *Shigella boydii* strains. J Bacteriol. 2005;187:619–28.
 7. Ibrahim GM, Morin PM, Salmonella Serotyping Using Whole Genome Sequencing. Front Microbiol. 2018;9:2993.
 8. Kauffman F The serology of the coli group. J Immunol. 1947;57:71–100.
 9. Kauffman, F. The Serology of the Coli Group. J. Immunol. 1947, 57, 71–100.
 10. Knirel YA, Qian C, Shashkov AS et al. Erratum to: Structural relationships between genetically closely related O-antigens of *Escherichia coli* and *Shigella* spp. Biochemistry (Moscow). 2018;83:1422–3.
 11. Љьthje P, Brauner A. Virulence factors of uropathogenic *E. coli* and their interaction with the host. Adv Microb Physiol. 2014;65:337–72.
 12. March C, Cano V, Moranta D et al. Role of bacterial surface structures on the interaction of *Klebsiella pneumoniae* with phagocytes. PLoS ONE. 2013;8:e56847.
 13. Nataro JP, Kaper JB. Diarrheagenic *Escherichia coli*. Clin Microbiol Rev. 1998;11:142–201.
 14. Poli, G.; Cocilovo, A.; Dell’Ara, P.E.; Martino, P.A.; Ponti, W. Microbiologia e immunologia veterinaria. In *Microbiologia e Immunologia Veterinaria*; UTET Scienze Mediche: Milan, Italy, 2005; ISBN 8802070342.
 15. Reeves PR, Pacinelli E, Wang L. O antigen gene clusters of *Yersinia pseudotuberculosis*. Adv Experim Med Biol. 2003;529:199–206.
 16. Samuel G, Reeves PR. Biosynthesis of O-antigens: genes and pathways involved in nucleotide sugar precursor synthesis and O-antigen assembly. Carbohydr Res. 2003;338:2503–19.
 17. Sarkar S, Ulett GC, Totsika M et al. Role of capsule and O antigen in the virulence of uropathogenic *Escherichia coli*. PLoS ONE. 2014;9:e94786.
 18. Scheutz F, Cheasty T, Woodward D et al. Designation of O174 and O175 to temporary O groups OX3 and OX7, and six new *E. coli* O groups that include Verocytotoxin-producing *E. coli* (VTEC): O176, O177, O178, O179, O180 and O181. Apmis. 2004;112:569–84.
 19. Vila J, S6ez-Lypez E, Johnson JR et al. *Escherichia coli*: an old friend with new tidings. FEMS Microbiol Rev. 2016;40:437–63.
 20. Yang B, Senchenkova SN, Naumenko OI et al. Structural and genetic relatedness of the O antigens of *Escherichia coli* O50 and O2. Carbohydr Res. 2018;15:8–11.

СЕРОЛОГИЯ НА ГРУПАТА COLI СПОРЕД КАУФМАН, 1947

Мария Павлова

1. Серологичните изследвания на О-, К- и Н- антигените на групата коли доведоха до установяването на диагностична антигенна схема, чрез която щамовете коли могат да бъдат класифицирани в групи и типове.

2. Освен О- и Н- антигените, К- антигените (капсулни антигени) играят много важна роля. К- антигените включват термолабилни антигени (L- и В- антигени), както и термостабилни антигени (А- антигени). Докато L- и В- антигените са предимно антигени на обвивката (съответстващи на Vi- антигена), антигените А- се появяват предимно като видими капсули (съответстващи на капсулата на пневмокока). Така терминът „К- антигени“ е символ за група от различни антигени, включително антигени на обвивката и капсулни антигени.

3. Няколко О групи са особено чести и това се отнася и за определени типове в тези групи. Много висок процент от щамовете, принадлежащи към тези О групи и типове, са О-неаглутиниращи - поради К- антигените. Разпределението на О групата се различава при нормални и патологични материали. Следователно разпределението на типа също трябва да се различава.

4. Щамовете, съдържащи К- антигени, са по-токсични от щамовете без К- антигени – и особено токсични, когато щамовете са изолирани от патологичен материал.

5. Токсичността е постоянно и характерно типово качество, различаващо се в отделните типове от О група.

6. Хемолитичните и некротизиращите щамове са особено чести в О групи 2, 4 и 6. О неаглутинацията на тези групи се дължи на L- антигени, тази на групи 8 и 9 обикновено на А- антигени.

7. Съществува връзка между вида на щама, неговия произход, способност за аглутинация, хемолитична сила, некротизиращ капацитет и токсичност.

8. Щамовете с К- антигени са особено устойчиви на защитните сили на организма и на бактериофагите.

9. Има определени серологични типове коли, които притежават определена патогенност и играят важна роля при апендицит, перитонит, цистит, пиелит и други заболявания.

10. В групата коли културни тестове играят второстепенна роля, така че разделянето на типа трябва да почива на серологична основа. Поради това преобладаващата класификация на щамовете на коли, основана на културелни критерии (особено ферментационни тестове), трябва да бъде изоставена.

В XXI век серологията е крайно недостатъчна в определянето на патотипа, за това са нужни генетични методи от ново поколение.

Източници:

KAUFFMANN F. The serology of the coli group. J Immunol. 1947 Sep;57(1):71-100. PMID: 20264689.

О- и Н- ТИПИЗИРАНЕ НА *ESCHERICHIA COLI*

Мария Павлова

Има няколко налични анализа за идентифициране на различни категории диарийни *Escherichia coli*. Изолирането и идентифицирането на *E. coli* въз основа на биохимичните свойства се използват широко в повечето микробиологични лаборатории, тъй като не изискват сложно оборудване или сложни протоколи. *E. coli* може лесно да се изолира от клинични проби върху диференцираща или селективна среда при 37°C при аеробни условия. *E. coli* обикновено се идентифицират чрез биохимични реакции. Като цяло, различните патотипове не могат да бъдат идентифицирани въз основа само на биохимични критерии, тъй като в повечето случаи те са неразличими от непатогенната *E. coli*.

В допълнение към биохимичните тестове обикновено се използва серология. Тя се основава на схемата на Кауфман за серологична класификация на *E. coli* [1, 2]. Серотипизирането на *E. coli* се извършва на базата на техния О- (соматичен), Н- (флагеларен) и К- (капсулен) повърхностен антигенен профил. Предложени са повече от 180 О, 60 Н и 80 К антигени [3]. Всеки О- антиген определя серогрупа. *E. coli* от специфични серогрупи може да се свърже с определени клинични синдроми. Специфична комбинация от О и Н антигени определя „серотипа“ на даден изолат. Един патотип може да включва няколко серогрупи и една серогрупа може да принадлежи към няколко патотипа и дори към непатогенна *E. coli* [4]. Поради ограничената чувствителност и специфичност и различните комбинации от антигени, серотипирането е комплицирано и скъпо и се извършва надеждно от малък брой референтни лаборатории.

Сред най-полезните методи за диагностициране на различни патотипове на *E. coli* са фенотипните анализи, които се основават на вирулентни характеристики. От тях анализът за придържане на HEp-2 е полезен за идентифициране на моделите на прилепване на диарогенни *E. coli*. Той остава „златният стандарт за диагностика на ЕАЕС и ДАЕС. Идентифицирането на ЕТЕС се основава на откриването на термолабилни и/или термостабилни ентеротоксини. Класическият фенотипен анализ за идентифициране на ЕІЕС е

тестът *Sereny* (кератоконюнктивит на морско свинче), който корелира със способността на щам да нахлува в епителните клетки и да се разпространява от клетка в клетка [5, 6, 7].

Молекулярно-генетичните методи остават най-популярните и най-надеждните техники за диференциране на патогенни щамове от непатогенни изолати. Тестовете се основават на PCR анализи и са широко използвани. Предимствата на PCR включват неговата висока чувствителност при откриване на целеви ДНК елементи и бързи и надеждни резултати поради високата им специфичност.

О Групиране: Стандартна оперативна процедура за типизиране на *E. coli*, Statens Serum Institut, Копенхаген, Дания:

– Една гладка колония от биохимично идентифицирана, чиста култура на щам *E. coli*, от неселективни среди (кръвен агар с овча или конска кръв), се инокулира в **бульон** за обогатяване (напр. ВНІ, говежди бульон) и се инкубира една нощ при 37°C **или** се подготвя бактериална суспензия на *E. coli* в 2 ml дестилирана или дейонизирана вода.

– След инкубиране **бульонът / суспензията** се нагряват при 90°C за 1 час.

– Приготвяне на готова за употреба О- антигенна суспензия за О- групиране в микротитърни плаки: **Бульонът** (=готова за употреба О- антигенна суспензия) след охлаждане до стайна температура (Забележка: ½ от бульона се разрежда с формол физиологичен разтвор, за да се получи готовата за употреба О- антигенна суспензия). или

Преварената суспензия се добавя на капки (около 0,2 ml) към епруветка, съдържаща 5 ml нормален физиологичен разтвор, докато се достигне концентрация, съответстваща на бульонната култура за една нощ, която се оценява на око. Останалата сварена суспензия се съхранява в хладилник и се използва за приготвянето на готова за употреба О- антигенна суспензия в дестилирана или дейонизирана вода, ако щамът е О- груб (дава положителна аглутинация с нормален физиологичен разтвор).

– Минимум 25 µl от готовата за употреба О- антигенна суспензия и равен обем от поливалентни (групови) О- антисеруми или моновалентни О- антисеруми се добавя към микротитърни плаки (или епруветки), които се инкубира във влажна атмосфера при 50-52 °C за една нощ.

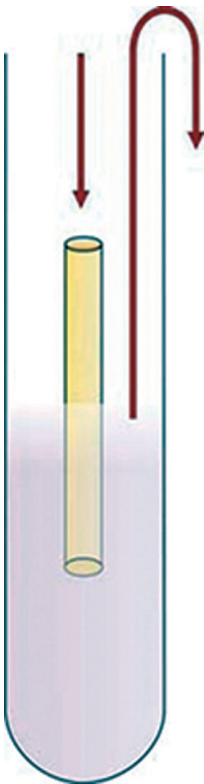
– Разчитане на резултатите: положително аглутиниращия поли О- антисерум, следва да се разгърне с всеки от състава му моно О- антисерум, както следва: Минимум 25 µl от готовата за употреба

O- антигенна суспензия и равен обем от единичен O- антисерум от съответния пул се добавя в нова микротитърна плака или епруветки се инкубира отново при 50-52 °С за една нощ.

– Отчитане на резултатите от моновалентните O- антисеруми от съответния групов поливалентен O- антисерум:

– Минимум 25 µl от готовата за употреба O- антигенна суспензия и равен обем от реагиращия моноспецифичен O- антисерум се титруват с помощта на удвоени разреждания, включително отрицателна контрола в нормален физиологичен разтвор.

Определяне на H-антиген, подвижност на *E. coli*: Стандартна оперативна процедура за типизиране на *E. coli*, Statens Serum Institut, Копенхаген, Дания:



Фиг.1 Епруветки Craigie с полутвърд агар. Инокулира се малката вътрешна тръба. Подвижните бактерии прорастват на повърхността на агара в епруветка

– Същата колония, която се използва за *Escherichia coli* O- антиген групиране се инокулира от неселективен агар към едната страна на U-епруветките с полутвърд агар, или петри със swarm агар, или епруветки с полусолиден агар, или епруветки Craigie с полутвърд агар, представен на фиг. 1 и се инкубират при 30°C или 37°C. Подвижни щамове, които показват миграция през епруветките, трябва да получат още един пасаж във втора епруветка, за да се получи оптимално образуване на H- антиген. Щамове, които не показват миграция през епруветки в продължение на 2 седмици, се определят като неподвижни.

– Малко количество култура от миграционната зона на епруветките или петрите със swarm агар се прехвърля в бульон с плътност на замътването, съответстваща на 24-часова култура от 37°C. Добавя се формалин към бульонната култура до крайна концентрация от 0,5%, което води до готов за употреба H- антиген.

– Минимум 25 µl от готовия за употреба H- антигенен препарат и равен обем от реагиращия H- група моноспецифичен или полиспецифичен H- антисерум се титруват с помощта на удвоени разреждания,

включително отрицателна контрола с нормален физиологичен разтвор.

– Инкубация във влажна атмосфера при 50-52 °C за един и половина до два (максимум!) часа.

ВАЖНО: Някои от O-антигените на *Escherichia coli* са идентични или почти идентични с други бактериални полизахариди и демонстрират съагутинация при тестовете за пробна агутинация на предметно стъкло тип Грубер с поливалентни O-антисеруми на *E. coli*, представени в таблица 1.

Серогрупа на <i>E. coli</i>	Бактериален вид
O8	<i>Klebsiella pneumoniae</i> O5
	<i>Serratia marcescens</i> S3255
O9	<i>Hafnia alvei</i> PCM 1223
	<i>Klebsiella pneumoniae</i> O3
O18	<i>Serratia marcescens</i> O8
O21	<i>Hafnia alvei</i> O39
O35	<i>Salmonella enterica</i> O62
O55	<i>Salmonella enterica</i> O50
O58	<i>Shigella dysenteriae</i> type 5
O97	<i>Yersinia enterocolitica</i> O5,27
O98	<i>Yersinia enterocolitica</i> O11,24
O104	<i>Escherichia coli</i> K9
O105	<i>Shigella boydii</i> type 11
O111	<i>Salmonella enterica</i> O:35
O121	<i>Shigella dysenteriae</i> type 7
O124	<i>Shigella dysenteriae</i> type 3
O143	<i>Shigella boydii</i> type 8
O147	<i>Shigella flexneri</i> type 6
O157	<i>Citrobacter sedlakii</i> NRCC 46070
	<i>Citrobacter freundii</i> F90
	<i>Salmonella enterica</i> O30

Таблица 1. Идентични бактериални полизахариди с тези при *E. coli*.

Диарогенните серотипове на *E. coli* се групират в няколко основни групи. Но както споменахме по-горе, един серотип би могъл да

попадња в неколку патогрупи, зависимост од вирулентните фактори, които притежава. Патогрупите с най-често докладваните серотипа са представени на таблица 2.

ПАТОГРУПА	СЕРОГРУПА	Н-АНТИГЕНИ
<i>ETEC</i>	O6	H16
	O8	H9
	O11	H27
	O15	H11
	O20	NM
	O25	H42, NM
	O27	H7
	O78	H11, H12
	O128	H7
	O148	H28
	O149	H10
	O159	H20
	O173	NM
	O55	H6, NM
O86	H34, NM	
<i>EPEC</i>	O111	H2, H12, NM
	O119	H6, NM
	O125ac	H21
	O126	H27, NM
	O127	H6, NM
	O128	H2, H12
	O142	H6
	O26	H11, H32, NM
	O55	H7
	<i>EHEC</i>	O111ab
O113		H21

<i>EAEC</i>	O117	H14
	O157	H7
	O3	H2
	O15	H18
	O44	H18
	O86	NM
	O77	H18
	O111	H21
	O127	H2
	O28ac	NM
	O29	NM
	O112ac	NM
	O124	H30, NM
	O136	NM
	O143	NM
	O144	NM
	O152	NM
	O159	H2, NM
O164	NM	
O167	H4, H5, NM	

Таблица 2. Характерни за диарогенните категории *E. coli* патогрупи и техните серотипове. Източник: journals.asm.org/doi/full/10.1128/CMR.11.1.142 [9].

Източници:

1. KAUFFMANN F. The serology of the coli group. J Immunol. 1947 Sep;57(1):71-100. PMID: 20264689.
2. Ewing, William H. „Edwards and Ewing’s identification of Enterobacteriaceae.“ Edwards and Ewing’s Identification of Enterobacteriaceae. Edition 4 (1986).
3. Robins-Browne RM & Hartland EL (2002) *Escherichia coli* as a cause of diarrhea. J Gastroenterol Hepatol17: 467–475.

4. Campos LC Franzolin MR & Trabulsi LR (2004) Diarrheagenic *Escherichia coli* categories among the traditional enteropathogenic *E. coli* O serogroups. Mem Inst Oswaldo Cruz99: 545–552.
5. Nataro JP Steiner T & Guerrant RL (1998) Enteroaggregative *Escherichia coli*. Emerg Infect Dis4: 251–261.
6. Donnenberg MS & Nataro JP (1995) Methods for studying adhesion of diarrheagenic *Escherichia coli*. Methods Enzymol253: 324–336.
7. Kopecko DJ (1994) Experimental keratoconjunctivitis (Sereny) assay. Methods Enzymol235: 39–47.
8. O Grouping: Standard Operation Procedure (O SOP) & H Determination: Standard Operation Procedure (H SOP). Department of Bacteria, Parasites & Fungi. Unit of Foodborne Infections. STATENS SERUM INSTITUT. Denmark.
9. journals.asm.org/doi/full/10.1128/CMR.11.1.142.

ИЗОЛИРАНЕ И ИДЕНТИФИЦИРАНЕ НА ДИАРОГЕННИ *E. COLI*

Мария Павлова

Въпреки че са налични тестове за идентифициране на всички патогрупи диарогенни *E. coli*, в много ситуации не е необходимо да се замеси специфичен патоген на *E. coli* при конкретен пациент. Например, пациентите с ентеротоксигенна *E. coli* (ЕТЕС) диария на пътешественика, обикновено симптоматично третират диарията си много преди да потърсят медицинска помощ, при което културелните изследвания на изпражненията са отрицателни. Повечето ентероинвазивни изолати на *E. coli* (ЕИЕС) ще бъдат пропуснати в клиничната лаборатория, но диарията като цяло отшумява и пациентите реагират на емпирични антибиотици, като флуорохинолони, давани за други бактериални диарии. Култивирането на изпражненията за повечето категории диарогенни *E. coli* трябва да се извършва в случаи на персистираща диария, особено при пътуващи, деца и имунокомпрометирани, както и в ситуации на епидемично огнище. *E. coli*, изолирани от изпражненията на суспектни на ентероколит, трябва да се изпратят в квалифицирана референтна лаборатория за окончателна идентификация. Индикациите за култивиране за ЕНЕС се различават от тези за останалите диарогенни патогрупи *E. coli*; индикациите за култивиране на ЕНЕС са обсъдени по-долу в по-големи подробности в следващите две глави за медисинско значение и методи за детекция на STEC.

E. coli е типичният вид от рода *Escherichia*, който съдържа предимно подвижни грам-отрицателни бацили от семейството *Enterobacteriaceae* и род *Escherichia*. *E. coli* може лесно да се изолира от клинични проби върху обикновени или селективни среди при 37°C при аеробни условия. *E. coli* от изпражнения най-често се изолира върху MacConkey или еозин метиленово синьо агар- Levin, който селективно развива членове на *Enterobacteriaceae* и позволява диференциране на чревни организми въз основа на морфология.

Enterobacteriaceae обикновено се идентифицират чрез биохимични реакции. Тези тестове могат да се извършват в отделни

епруветки с култури или чрез използване на тестове API20E, които се предлагат в търговската мрежа. И двата метода дават задоволителни резултати. Трябва да се има предвид, че колкото и полезни да са автоматизираните системи за идентификация, като MALDI TOFF, те нямат възможност за пълно разграничаване на родовете *Shigella* и *Escherichia*, поради общата им генетична родственоост. Преди да се престъпи към епидемиологично серитипизиране и окончателна бактериална диагноза, трябва правилно да се отдиференцира бактериалния вид от близки до него морфологично и серологично други видове, като *Escherichia*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Citrobacter*, и *Proteus*. Едва след лабораторно потвърждаване, може да се заключи диагноза ентероколит.

За епидемиологични или клинични цели щамовете на *E. coli* често се избират от агарови петри след предполагаема визуална идентификация. Въпреки това, този метод трябва да се използва само с повишено внимание, тъй като само около 90% от щамовете на *E. coli* са положителни за лактоза; **някои диарични щамове *E. coli*, включително много от ЕІЕС щамовете, обикновено са лактоза отрицателни.** Индолният тест, положителен при 99% от щамовете на *E. coli*, е единственият най-добър тест за диференциация от други членове на *Enterobacteriaceae*.

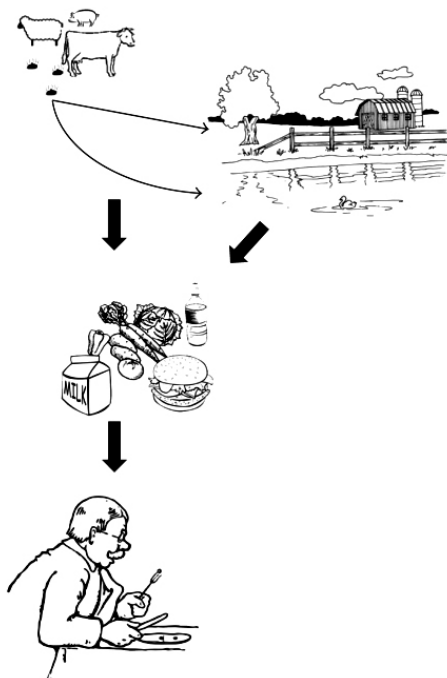
МЕДИЦИНСКОТО ЗНАЧЕНИЕ НА ИНФЕКЦИИ ПРИЧИНЕНИ ОТ ШИГА ТОКСИН ПРОДУЦИРАЩИ *ESCHERICHIA COLI* И КЛИНИКО-ПАТОЛОГИЧНИ ХАРАКТЕРИСТИКИ НА STEC ИНФЕКЦИИТЕ

Мария Павлова

STEC- *Escherichia coli* произвеждащи шига токсин (Stx), наричани още произвеждащи вероцитотоксин *E. coli* (VTEC) са причините за тежки, потенциално фатални, зоонози, предавани с контаминирани храни и/или води, чийто клиничен спектър включва неспецифична диария, хеморагичен колит и хемолитичен уремичен синдром (ХУС) [20, 10, 16, 15, 31]. Появата на епидемични огнища на STEC инфекция, особено в резултат на най-често срещания серотип, O157:H7, и риска от развиването на ХУС, водещата причина за остра бъбречна недостатъчност при деца, придават на STEC инфекцията особена значимост общественото здраве, предизвикваща сериозна загриженост. До 40% от пациентите с ХУС развиват дълготрайна бъб-

речна дисфункция и около 3–5% от тях умират по време на острата фаза на заболяването [6, 23,354]. Няма конкретно лечение на ХУС и ваксини за предотвратяване на заболяването все още не са налични. Първите огнища, причинени от *E. coli* O157, са възникнали в Орегон и Мичиган, САЩ, през 1982 г., когато е изолиран от индивиди, които са развили кървава диария и тежки коремни спазми след ядене на хамбургери във верига ресторанти [41].

STEC инфекция обикновено се придобива чрез поглъщане на заразена храна или вода или чрез предаване от човек на човек. Естественният резервоар на STEC е чревният тракт на домашните



животни, особено говеда и други преживни животни. Източници на човешка инфекция включват храни от животински произход като месо (особено смяно говеждо) и непастеризирано мляко и други храни, които вероятно са били кръстосано замърсени със STEC, като прясно изцедени плодови сокове, кисело мляко и зеленчуци като маруля, кълнове от репички, кълнове от люцерна и домати. Трансмисията от човек на човек е улеснена от ниската инфекциозна доза. Предаването със заразени води и придобиването на инфекция в селските райони чрез контакт със заразени животни стават все по-известни. STEC инфекцията възниква обикновено през лятото и есента и засяга предимно малки деца, въпреки че възрастните хора също имат повишен риск от заболяване [10, 17].

Въпреки че над 200 различни ОН серотипа на STEC са свързани със заболяване при хората, по-голямата част от докладваните огнища и спорадични случаи са свързани със серотип O157:H7 [10, 17]. Други STEC серотипове, които са свързани с огнища, включват O26:H11, O103:H2, O104:H21, O111:H- и O145:H-. Епидемични взривове със случаи на ХУС са възникнали със серотипове, които проявяват характеристиката на прикрепваща и заличаваща цитопатология, която е кодирана от LEE- локус на ентероцитно изтриване в остров на патогенност. Въпреки това, спорадични случаи на ХУС са свързани с над 100 различни LEE-положителни и LEE-отрицателни STEC серотипове. Изглежда, че не-O157 серотипове са по-често свързани с болестта при човека, отколкото серотип O157:H7 [24, 17]. Огнища на STEC инфекция, като някои включват стотици случаи, документирани на 6 континента в различни условия, включително домакинства, дневни центрове, училища, ресторанти, старчески домове, домове със социални функции, затвори и дори при изолирана арктическа общност [1, 4, 26]. Съобщава се за ХУС с честота от около 8% при няколко огнища на STEC O157:H7 инфекция, въпреки че при едно огнище сред лица от домове за стари хора, тя достига до 22%. Честотата на спорадичен хус в Америка и Европа е около 2-3 случая на 100 000 деца под 5-годишна възраст [11, 3], за разлика от приблизително 10 пъти по-висока честота в тази възрастова група в Аржентина. В Южна Африка и в Съединените щати хус изглежда е по-често срещан при бели, отколкото при чернокожи деца. В Англия се среща по-често в селските, отколкото в градските райони, а в Аржентина синдромът се среща по-често в групите с по-високи доходи, отколкото в групите с по-ниски доходи [8, 9, 13, 18]. Причините за тези различия между групите от населението не са известни.

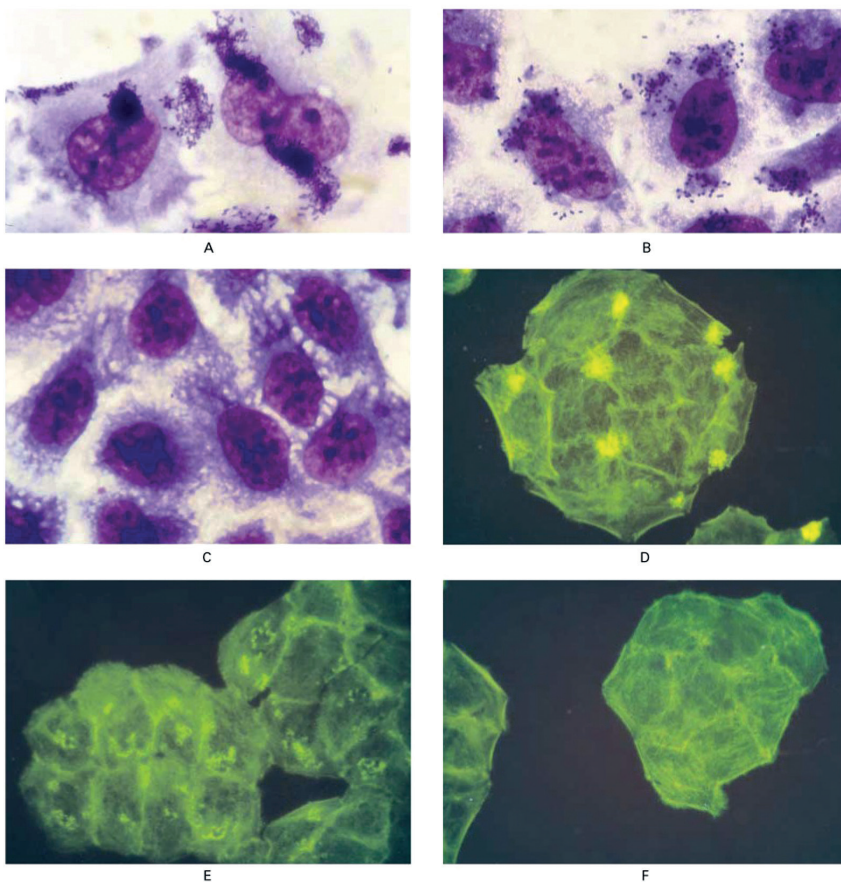
Клинико-патологични характеристики и патофизиология на STEC инфекция

След инкубационен период от обикновено 3-5 дни, характерните симптоми на инфекцията със STEC O157:H7 включват кратък период на коремни спазми и некървава диария, които могат да бъдат последвани в много случаи от хеморагичен колит, състояние, различно от възпалителен колит, който се характеризира с наличието на открит кръвоизлив в изпражненията. Треската и повръщането не са често изяви. ХУС, определен от триадата от характеристики (остра бъбречна недостатъчност, тромбоцитопения и микроангиопатична хемолитична анемия), се развива в около една десета до една четвърт от случаите [10, 17]. ХУС също може да бъде усложнение на инфекция на пикочните пътища, свързана със STEC. Тежестта на ХУС варира от непълна и/или лека клинична картина до тежка и фулминантна, със засягане на множество органи, включително червата, сърцето, белите дробове, панкреаса и централната нервна система [25, 33].

Инфекциозната доза на *E. coli* O157:H7 е много ниска (оценява се на по-малко от 100 до няколкостотин микроорганизми). Смята се, че организъмът колонизира дебелото черво с характерната А/Е цитопатология, медирана от компоненти, кодирани от LEE остров на патогенност. Патологичните промени в дебелото черво включват кръвоизлив и оток в lamina propria, а биопсичните проби от дебело черво могат да показват фокална некроза и левкоцитна инфилтрация. Патогенезата на некървави диарии все още не са напълно изяснени. *E. coli*, произвеждаща шига токсин, създава най-малко четири мощни медирани от бактериофаг цитотоксини: **Stx1** (VT 1), **Stx2** (VT 2), **Stx2c** (VT2c) и **Stx2d**, които могат да присъстват самостоятелно или в комбинация. Stx1 е практически идентичен с Shiga токсина на *Shigella dysenteriae*, но е серологично различен от групата Stx2. Сред най-мощните известни биологични вещества, Stxs са токсични за клетките дори само при пикомоларни концентрации [17, 28].

Токсините споделят структура на полипептидна субединица, състояща се от ензимно активна А- субединица (приблизително 32 kDa), която е свързана с пентамер от В-субединици (приблизително 7,5 kDa). След свързване с гликолипидния рецептор, глоботриаозилцерамид (Gb3), върху еукариотната клетка, токсините се интернализират чрез медирана от рецептора ендоцитоза и се насочват към ендоплазмения ретикулум през апарата на Голджи чрез процес,

наречен „ретрограден транспорт“ [21, 32]. А-субединицата, след като бъде протеолитично прекъсната до ензимно активен А1 фрагмент, разцепва N-гликозидната връзка в позиция А-4324 на 28S rRNA на 60S рибозомната субединица. Това блокира EF 1-зависимото аминопацил tRNA свързване, което води до инхибиране на протеиновия синтез [5, 28].



Прилепване на различни щамове на *E. coli* към HeLa клетки. Непатогенни, ентеропатогенни *E. coli* O111:NM (A) и *E. coli* O103:H2, които са изолирани от пикочните пътища на пациент (B), прилепват към епителните клетки в локализиран модул, докато *E. coli* HB101 (C) не са прилепнали, както се вижда от оцветяването по Giemsa (Ч1005). Актинови агрегати присъстват на мястото на прилепване на бактериални микроколонии към HeLa клетки, инкубирани с *E. coli* O111:NM (D) и *E. coli* O103:H2, който е изолиран от пикочните пътища на пациент (E), както е показано чрез оцветяване с флуоресцеин-фалоидин (Ч635). HeLa клетките, инкубирани с *E. coli* HB101, нямат никакви актинови агрегати (F, Ч635) [19]

Смята се, че развитието на ХУС е свързано с транслокацията на Stx в кръвния поток, въпреки че точният механизъм за това не е известен. Хистологично, ХУС се характеризира с широко разпространена тромботична микроангиопатия в бъбречните гломерули, стомашно-чревния тракт и други органи като мозъка, панкреаса и белите дробове [7, 17, 30, 36]. На ултраструктурно ниво се наблюдава характерно подуване на гломерулни капилярни ендотелни клетки, придружено от разширяване на субендотелното пространство, което предполага, че увреждането на ендотелните клетки е централно за патогенезата на ХУС. Това увреждане вероятно се медира директно от Stx след свързване със специфичен рецептор, глоботриаозилцерамид (Gb3), на повърхността на ендотелната клетка [22, 29, 39]. Токсинът се интернализира от рецептор-медиран ендоцитен процес и се смята, че причинява увреждане на клетките чрез взаимодействие със субклетъчни компоненти, което води до инхибиране на протеиновия синтез. Апоптозата може да бъде друг механизъм, чрез който ендотелните клетки се увреждат. Въпреки че изглежда, че ендотелните клетки са основната мишена за действието на Stx, има доказателства, че токсините могат също така да медираат биологични ефекти чрез взаимодействие с други видове клетки, като бъбречни тубулни клетки, мезангиални клетки и моноцити. Кръвните нива на провъзпалителни цитокини, особено фактор на туморна некроза- α (TNF- α) и интерлевкин-1 β (IL-1 β) са повишени при хус. Доказано е *in vitro*, че тези цитокини потенцират действието на Stx върху ендотелните клетки чрез индуциране на експресия на рецептор Gb3 [12, 27, 37, 38].

Въпреки че увреждащото действие на Stxs върху ендотелните клетки изглежда е от решаващо значение за развитието на ХУС, точните клетъчни събития, които водят до свързаните патофизиологични промени, включително тромботична микроангиопатия, хемолитична анемия и тромбоцитопения, остават да бъдат изяснени.

Приносът на различни гостоприемници (възраст, имунитет, рецепторен тип и разпределение, възпалителна реакция и генетични фактори) и патогенни детерминанти (инфекциозна доза, типове токсини и допълнителни фактори на вирулентност) към тежестта на заболяването остават да бъдат доизяснени.

Източници:

1. Ahmed, S. and Donaghy, M. (1998) An outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 in central Scotland, in *Escherichia coli* O157:H7 and Other Shiga Toxin-Producing *E. coli* Strains (Kaper, J. B. and O'Brien, A. D., eds.), ASM, Washington, DC, pp. 59–65.
2. Burland, V., Shao, Y., Perna, N. T., Plunkett, G., Sofia, H. J., and Blattner, F. R. (1998) The complete DNA sequence and analysis of the large virulence plasmid of *Escherichia coli* O157:H7. *Nucleic Acids Res.* 26, 4196–4204.
3. Carter, A. O., Borczyk, A. A., Carlson, J. A. K., Harvey, B., Hockin, J. C., Karmali, M. A., et al. (1987) A severe outbreak of *Escherichia coli* O157:H7-associated hemorrhagic colitis in a nursing home. *N. Engl. J. Med.* 317, 1496–1500.
4. Centers for Disease Control and Prevention (1993) Update: multistate outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections from Hamburgers—Western United States, 1992–1993. *JAMA* 269, 2194–2196.
5. Endo, Y., Tsurugi, K., Yutsudo, T., Takeda, Y., Ogasawara, T., and Igarashi, K. (1988) Site of action of a Vero toxin (VT2) from *Escherichia coli* O157:H7 and of Shiga toxin on eukaryotic ribosomes; RNA N-glycosidase activity of the toxins. *Eur. J. Biochem.* 171, 45–50.
6. Fitzpatrick, M. M., Shah, V., Trompeter, R. S., Dillon, M. J., and Barratt, T. M. (1991) Long term renal outcome of childhood haemolytic uraemic syndrome. *Br. Med. J.* 303, 489–492.
7. Fong, J. S. C., de Chadarevian, J. P., and Kaplan, B. (1982) Hemolytic uremic syndrome. *Curr. Concepts Manag. Pediatr. Clin. North Am.* 29, 835–856.
8. Gianantonio, C., Vitacco, M., Mendilaharzu, F., Gallo, G. E., and Sojo, E. T. (1973) The hemolytic uremic syndrome. *Nephron* 11, 174–192.
9. Gianantonio, C., Vitacco, M., Mendilaharzu, F., Rutty, A., and Mendilaharzu, J. (1964) The hemolytic-uremic syndrome. *J. Pediatr.* 64, 478–491.
10. Griffin, P. M. (1995) *Escherichia coli* O157:H7 and other enterohemorrhagic *Escherichia coli*, in *Infections of the Gastrointestinal Tract* (Blaser, M. J., Smith, P. D., Ravdin, J. I., Greenberg, H. B., and Guerrant, R. L., eds.), Raven, New York, pp. 739–761.
11. Griffin, P. W. and Tauxe, R. V. (1991) The epidemiology of infections caused by *Escherichia coli* O157:H7, other enterohemorrhagic *E. coli*, and the associated hemolytic uremic syndrome. *Epidemiol. Rev.* 13, 60–98.
12. Inward, C. D., Williams, J., Chant, I., Crocker, J., Milford, D. V., Rose, P. E., et al. (1995) Verocytotoxin-1 induces apoptosis in Vero cells. *J. Infect.* 30, 213–218.

13. Jernigan, S. M. and Waldo, F. B. (1994) Racial incidence of hemolytic uremic syndrome. *Pediatr. Nephrol.* 8, 545–547.
14. Karch, H., Schmidt, H., and Brunder, W. (1998) Plasmid-encoded determinants of *Escherichia coli* O157:H7, in *Escherichia coli* O157:H7 and Other Shiga Toxin-Producing *E. coli* Strains (Kaper, J. B. and O'Brien, A. D., eds.), ASM, Washington, DC, pp. 183–194.
15. Karmali, M. A., Petric, M., Lim, C., Fleming, P. C., Arbus, G. S., and Lior, H. (1985) The association between hemolytic uremic syndrome and infection by Verotoxin-producing *Escherichia coli*. *J. Infect. Dis.* 151, 775–782.
16. Karmali, M. A., Steele, B. T., Petric, M., and Lim, C. (1983) Sporadic cases of hemolytic uremic syndrome associated with fecal cytotoxin and cytotoxin-producing *Escherichia coli*. *Lancet* 1(8325), 619–620.
17. Karmali, M.A. (1989) Infection by Verocytotoxin-producing *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol. Rev.* 2, 15–38.
18. Kibel, M. A. and Barnard, P. J. (1968) The hemolytic uremic syndrome: a survey in Southern Africa. *S. Afr. Med. J.* 42, 692–698.
19. Knutton S, Baldwin T, Williams PH, McNeish AS. Actin accumulation at sites of bacterial adhesion to tissue culture cells: basis of a new diagnostic test for enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Infect Immun* 1989;57:1290-1298.
20. Konowalchuk, J., Speirs, J. I., and Stavric, S. (1977) Vero response to a cytotoxin of *Escherichia coli*. *Infect. Immunol.* 18, 775–779.
21. Lingwood, C. A., Law, H., Richardson, S. E., Petric, M., Brunton, J. L., Grandis, S. D., et al. (1987) Glycolipid binding of natural and recombinant *Escherichia coli* produced Verotoxin in vitro. *J. Biol. Chem.* 262, 8834–8839.
22. Lingwood, C. A., Mylvaganam, M., Arab, S., Khine, A. A., Magnusson, C., Grinstein, S., et al. (1998) Shiga toxin (Verotoxin) binding to its receptor glycolipid, in *Escherichia coli* O157:H7 and Other Shiga Toxin-Producing *E. coli* Strains (Kaper, J. B. and O'Brien, A. D., eds.), ASM, Washington, DC, pp. 129–139.
23. Loirat, C., Sonsino, E., Moreno, A. V., Pillion, G., Mercier, J. C., Beaufils, F., et al. (1984) Hemolytic uremic syndrome: an analysis of the natural history and prognostic features. *Acta Paediatr. Scand.* 73, 505–514.
24. Lopez, E. L., Contrini, M. M., and Rosa, M. F. D. (1998) Epidemiology of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in South America, in *Escherichia coli* O157:H7 and Other Shiga Toxin-Producing *E. coli* Strains (Kaper, J.B. and O'Brien, A.D., eds.), ASM, Washington, DC, pp. 30–37.
25. McLaine, P. N., Orrbine, E., and Rowe, P. C. (1992) Childhood hemolytic uremic syndrome, in *Hemolytic Uremic Syndrome and*

- Thrombotic Thrombocytopenic Purpura (Kaplan, B. S. and Moake, J. L., eds.), Marcel Dekker, New York, pp. 61–69.
26. Michino, H., Araki, K., Minami, S., Nakayama, T., Ejima, Y., Hiroe, K., et al. (1998) Recent outbreaks of infections caused by *Escherichia coli* O157:H7 in Japan, in *Escherichia coli* O157:H7 and Other Shiga Toxin-Producing *E. coli* Strains (Kaper, J. B. and O'Brien, A. D., eds.), ASM, Washington, DC, pp. 73–81.
 27. Monnens, L., Savage, C. O., and Taylor, C. M. (1998) Pathophysiology of hemolytic-uremic syndrome, in *Escherichia coli* O157:H7 and Other Shiga Toxin-Producing *E. coli* Strains (Kaper, J. B. and O'Brien, A. D., eds.), ASM, Washington, DC, pp. 287–292.
 28. O'Brien, A. D., Tesh, V. L., Donohue-Rolfe, A., Jackson, M. P., Olsnes, S., Sandvig, K., et al. (1992) Shiga toxin: biochemistry, genetics, mode of action and role in pathogenesis. *Curr. Topics Microbiol. Immunol.* 180, 65–94.
 29. Obrig, T. (1998) Interactions of Shiga toxins with endothelial cells, in *Escherichia coli* O157:H7 and Other Shiga Toxin-Producing *E. coli* Strains (Kaper, J. B. and O'Brien, A. D., eds.), ASM, Washington, DC, pp. 303–311.
 30. Richardson, S. E., Karmali, M. A., Becker, L. E., and Smith, C. R. (1988) The histopathology of the hemolytic uremic syndrome associated with Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* infections. *Hum. Pathol.* 19, 1102–1108.
 31. Riley, L. W., Remis, R. S., Helgerson, S. D., McGee, H. B., Wells, J. G., Davis, B. R., et al. (1983) Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. *N. Engl. J. Med.* 308, 681–685.
 32. Sandvig, K., Prydz, K., Ryd, M., and Deurs, B. V. (1991) Endocytosis and intracellular Sieglar, R. L., Milligan, M. K., Burningham, T. H., Christofferson, R. D., Chang, S.-Y., and Jorde, L. B. (1991) Long-term outcome and prognostic indicators in the hemolytic uremic syndrome. *J. Pediatr.* 118, 195–200.
 33. Tarr, P. I., Fouser, L. S., Stapleton, A. E., Wilson, R. A., Kim, H. H., Vary, J. C., et al. (1996) Hemolytic-uremic syndrome in a six-year old girl after a urinary tract infection with Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* O103:H2. *N. Engl. J. Med.* 335, 635–660.
 34. transport of the glycolipid-binding ligand Shiga toxin in polarized MDCK cells. *J. Cell. Biol.* 113, 553–562.
 35. Trompeter, R.S., Schwartz, R., Chantler, C., Dillon, M.J., Haycock, G.B., Kay, R., and Barratt, T.M. (1983) Haemolytic uraemic syndrome: an analysis of prognostic features. *Arch. Dis. Child.* 58, 101–105.
 36. Upadhyaya, K., Barwick, K., Fishaut, M., Kashgarian, M., and Segal, N. J. (1980) The importance of nonrenal involvement in hemolytic uremic syndrome. *Pediatrics* 65, 115–120.

37. v.d. Kar, N. C., Kooistra, T., Vermeer, M., Lesslauer, W., Monnens, L. A. H., and v. Hinsbergh, V. W. M. (1995) Tumor necrosis a induces endothelial galactosyl transferase activity and verocytotoxin receptors. Role of specific tumor necrosis factor receptors and protein kinase. *C. Blood* 85, 734–743.
38. v.d. Kar, N. C., Sauerwein, R. W., Demacker, P. N., Grau, G. E., v. Hinsbergh, V. W., and Monnens, L. A. (1995) Plasma cytokine levels in hemolytic uremic syndrome. *Nephron* 71, 309–313.
39. Vitsky, B. H., Suzuki, Y., Strauss, L., and Churg, J. (1969) The hemolytic uremic syndrome: a study of renal pathologic alternations. *Am. J. Pathol.* 57, 627–647.
40. Centers for Disease Control. Isolation of *E. coli* O157:H7 from sporadic cases of hemorrhagic colitis—United States. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 1982; 31: 580–85.
41. Review 1434 www.thelancet.com Vol 376 October 23, 2010 2 Griffi n PM, Tauxe RV. The epidemiology of infections caused by *Escherichia coli* O157:H7, other enterohemorrhagic *E. coli*, and the associated hemolytic syndrome. *Epidemiol Rev* 1991; 13: 60–98.

МЕТОДИ ЗА ОТКРИВАНЕ НА ШИГА ТОКСИН ПРОДУЦИРАЩИ *E. COLI* (STEC) И ТЕХНИТЕ ТОКСИНИ

Мария Павлова

Навременната и точна диагностика на инфекции, причинявани от Shiga toxinogenic *Escherichia coli* (STEC) е изключително важна, както от гледна точка на общественото здраве, така и от гледна точка на клиничното управление на болестта. В условията на епидемия бързата диагностика на случаите и незабавното уведомяване на здравните власти е от съществено значение за ефективна епидемиологична намеса. Ранната диагностика също така създава прозорец от възможности за терапевтична интервенция. Описани са рекомбинантни бактериални агенти, способни да адсорбират и неутрализират свободния Shiga токсин (Stx) в лумена на червата [1, 2], и те вероятно ще бъдат най-ефективни, когато се прилагат в началото на хода на заболяването, преди да се развият сериозни системни последици. Също така, клиничното представяне на болестта STEC понякога може да бъде объркано с други състояния на червата; по този начин ранната окончателна диагноза може да предотврати ненужни инвазивни и скъпи хирургични и изследователски процедури или прилагане на антибиотична терапия, което може да е противопоказано [3]. Откриването на STEC обаче е изпълнено с трудности, особено за щамове, принадлежащи към серогрупи, различни от O157. В ранните етапи на инфекцията може да има много голям брой STEC във фекалиите (STEC може да съставлява >90% от аеробната флора), но с напредването на заболяването микробното число може да спадне драстично. В случаите на хемолитичен уремичен синдром (ХУС), типичните клинични признаци могат да станат очевидни до 2 седмици след началото на стомашно-чревните симптоми, до което време броят на причинителя на STEC може наистина да бъде много нисък. Също така, в някои случаи диарията вече не е налице и трябва да се вземе проба с ректален тампон по време на приемане в болница, което ограничава броя на пробите, налични за анализ. Поради тези причини методите за откриване на STEC трябва да бъдат много чувствителни и да изискват мини-

мални обеми на пробите. Методите за диагностика на шига токсин продуциращи *E. coli* се основават на откриването на наличието на шига токсин или *stx* гени във фекални екстракти или фекални култури и/или изолиране на самия STEC [4 – 7]. Тези процедури се различават по сложност, скорост, чувствителност, специфичност и цена, така че диагностичните стратегии трябва да бъдат съобразени с клиничните обстоятелства и наличните ресурси.

Тестове за цитотоксичност на тъканни култури.

Цитотоксичността за клетките Vero (бъбрек на африканска зелена маймуна) остава „златен стандарт“ за демонстриране на наличието на Stx-свързани токсини във фекална проба. Vero клетките имат висока концентрация на Gb3 рецептори в техните плазмемембрани, както и Gb4 (предпочитаният рецептор за Stx2e) и по този начин са силно чувствителни към всички известни варианти на Stx. При типичен анализ монослоевите Vero клетки се третират със стерилизирани чрез филтър фекални екстракти или филтрати от фекална култура и се изследват за цитопатичен ефект след 48 до 72 часа инкубация. В исторически план този анализ е изиграл важна роля при установяването на диагноза STEC инфекция, особено когато последващото изолиране на причинителя се е оказало трудно [4]. Чувствителността се влияе от изобилието на STEC във фекалната проба, както и от общото количество и силата на Stx, произведени от самия организъм, и степента, до която специфичен Stx се освобождава от бактериалните клетки. Кармали и сътрудници установяват, че третирането на смесени фекални култури с полимиксин В за освобождаване на клетъчно-асоцииран Stx подобрява чувствителността на Vero клетъчния анализ, така че той може надеждно да открие STEC, когато присъства при честота от 1 CFU (формираща колония единица) на 100 [8]. Ясно е, че някои STEC произвеждат много високи нива на токсини и те могат да бъдат открити при дори по-ниски честоти; важи обаче и обратното.

Въпреки че откриването на Stx чрез цитотоксичност на тъканна култура е ценен диагностичен метод, той е трудоемък, отнема време и е тромав. Не всички лаборатории за микробиологична диагностика са подходящо създадени за работа с тъканни култури, като при поискване се предлагат Vero клетъчни монослоеве. Освен това скоростта на диагностициране е важна и резултатите от анализите за цитотоксичност обикновено не са налични за 48–72 часа. Освен това наличието на цитотоксичност в суровия филтрат може

да бъде резултат от въздействието на други бактериални продукти или токсини; по този начин положителните проби винаги трябва да се потвърждават (и типизират) чрез тестване за неутрализиране на цитотоксичността чрез специфични (за предпочитане моноклонални) антитела срещу Stx1 или Stx2.

ELISA анализи за директно откриване на Stx

Разработени са редица ензимно-свързани имуносорбентни анализи (ELISA) за директно откриване на Stx1 и Stx2 във фекални култури и екстракти. Подобно на цитотоксичността на Vero, те имат потенциално важна роля в диагностиката, тъй като са в състояние да открият наличието на STEC независимо от серогрупата. Анализите ELISA обаче са по-бързи и позволяват резултат в рамките на 1 ден. Повечето от публикуваните ELISA методи включват техника, използваща имобилизирани моноклонални или афинитетно пречистени поликлонални антитела към токсините като улавящи лиганди. Пречистен Stx рецептор (Gb3) или течност от хидатидна киста (съдържаща P1 гликопротеин, който също се свързва със Stx) също са използвани за покриване на твърдата фаза. След инкубиране с култури (или директни фекални екстракти), свързаният токсин се открива с помощта на Vero Stx-специфично антитяло, последвано от подходящ анти-имуноглобулин-ензимен конюгат. Някои анализи използват антитяло за откриване на Stx, директно конюгирано с ензима или биотинилирано антитяло за откриване, което се използва с конюгат стрептавидин-ензим [5].

Важно е, че анализите Stx ELISA са налични в търговската мрежа. Докладваните специфики за търговските ELISA анализи, определени чрез тестване на референтни изолати и чрез сравняване на резултатите от ELISA за фекални екстракти с култура и цитотоксичност на Vero клетки, като цяло са много високи. Чувствителността на различните ELISA анализи се влияе от редица променливи, както от афинитета на използваните антитела, така и от вида и количеството Stx, произведено от даден щам. Ранните вътрешни ELISA анализи като цяло са били по-малко чувствителни от анализа за цитотоксичност Vero и чувствителността е била недостатъчна за надеждно откриване на ниски нива на Stx, открити в директни фекални екстракти. Въпреки това, количеството свободен Stx, наличен в първичните фекални култури, обикновено е по-висок, особено когато набогатителните течни среди съдържат полимиксин В и/или митомицин С за подобряване на производството и освобождаването

на Stx. При такива обстоятелства се съобщава, че ELISA са способни да открият наличието на STEC, включващ само 0,1% от общата флора. Освен това, в две големи проучвания е доказано, че ЕНЕС ELISA е поне толкова чувствителен метод, колкото цитотоксичността на Vero клетки за откриване на STEC в екстракти от фекални култури [9 – 12]. Такива анализи ще бъдат от значителна полза за рутинни клинични лаборатории без достъп до по-специализирани диагностични процедури, особено за откриване на не-O157 STEC.

Обратна пасивна латексна аглутинация

Тест за обратна пасивна латекс аглутинация (RPLA) за откриване на продукцията на Stx включва инкубиране на серийно разредени екстракти от полимиксин В на предполагаеми STEC култури или филтрати на култури с Stx1- и Stx2-специфични покрити с антитяло латексови частици и изследване на аглутинацията след 24 часа. Veutín и сътрудници откриват производство на токсин в щамове, съдържащи stx1, stx2 и stx2c, но не откриват токсини, произведени от щамовете, носещи stx2e, което предполага, че чувствителността може да е недостатъчна за тестване на екстракти от първична фекална култура [13]. По-обещаващи резултати са докладвани от Karmali et al., който демонстрира 100% чувствителност и специфичност по отношение на анализа за цитотоксичност на Vero клетки при тестване на филтрати от култура на референтни STEC изолати [14]. Въпреки данните за ефективността на тези анализи, използващи екстракти от смесени фекални култури, могат да позволят широко разпространен скрининг за STEC от клинични лаборатории, тъй като те са прости, бързи и точни.

Откриване на stx гени. Полимеразна верижна реакция.

Достъпът до данни за последователностите за различните stx гени позволи проектирането на различни набори от олигонуклеотидни праймери за амплификация на stx гени с помощта на полимеразна верижна реакция (PCR) [5]. Сурови лизати или ДНК екстракти от единични колонии, смесени бульонни култури, изчистване на колонии или дори директни екстракти от изпражнения или храни могат да се използват като матрици за PCR. Stx-специфични PCR продукти обикновено се откриват чрез оцветяване с етидиев бромид след разделяне на реакционната смес чрез електрофореза в агарозен гел. Някои от stx PCR анализите, описани до момента, комбинират различни двойки праймери за stx1 и stx2, и в някои случаи, stx2

варианти, в една и съща реакция. Те насочват амплификацията на фрагменти, които се различават по размер за всеки тип ген [16 – 19]. Други stx PCR анализи използват единични двойки праймери, базирани на консенсусни последователности, които са способни да амплифицират всички stx гени, с последващо идентифициране на генен тип, изискващ втори кръг на PCR или хибридизация с белязани олигонуклеотиди насочени срещу специфични за типа последователности в амплифицирания фрагмент [20, 21]. Освен добавената чувствителност, стъпките на вторична хибридизация действат като независимо потвърждение на идентичността на амплифицирания продукт. Рестрикционният анализ на амплифицирани части от stx2 гени също е използван за разграничаване между stx2 и stx2 варианти [22 – 24].

Технологията на полимеразна верижна реакция е подходяща за откриване на stx гени в микробиологично сложни проби като изпражнения и хранителни продукти и е потенциално изключително чувствителна. Въпреки това, такива проби могат да съдържат инхибитори на Taq полимераза и чувствителността често е неоптимална, когато се използват директни екстракти като матрици. Както за фекалиите, така и за хранителните проби, чувствителността на PCR анализите се увеличава значително, ако бактериалната ДНК се извлича от бульонни култури [18, 21]. Набогатяването на бульона (което може е само 4 часа инкубация) служи за две цели. Инхибиторите в пробата се разреждат и бактериалният растеж увеличава броя на копията на целевата последователност. Оптимизирането на чувствителността е от първостепенно значение, тъй като броят на STEC във фекалиите на пациенти със сериозни заболявания, свързани със Stx, или в предполагаеми замърсени храни може да бъде наистина много нисък. Друго съображение, което може да повлияе на ефективността на някои stx-специфични PCR анализи, е полиморфизмът на ДНК последователността, за който е известно, че съществува. Това важи особено за stx2-свързани гени, за които се съобщава за значителна вариация [5]. Разминаването на последователността между праймера и неговата мишена (особено в 3' края на праймера) ще намали значително ефективността на *annealing* с потенциално драматични ефекти върху чувствителността на PCR реакцията. Когато избирате или проектирате праймери, трябва да се внимава да се избягват региони, където вече е докладвана хетерогенност на последователността. PCR анализите, които използват една двойка праймери за амплифициране както на stx1, така и на

stx2, може да са по-малко податливи на това потенциално усложнение. Целевите последователности, които са запазени между иначе широко различаващи се гени, кодиращи структурно важни домейни ще бъдат силно избрани на фона на случайните мутации.

Скоростта на диагностициране на STEC инфекцията също е важно съображение в клиничната обстановка. Точното време, необходимо за PCR анализ, варира в зависимост от самия протокол на амплификация (брой цикли и времена на инкубация при всяка температура), използвания метод за екстракция на ДНК и процедурата за откриване на PCR продуктите. Минималното време, необходимо за директен PCR анализ на необогатена фекална проба, анализирана чрез електрофореза в агарозен гел може да бъде около 4 часа. Включването на етап на обогатяване на бульон и използването на по-сложна процедура за пречистване на ДНК би увеличило това време до 8–12 часа, докато хибридизацията на PCR продукти със stx сонди може да добави още един ден. Кумулативното увеличение на чувствителността, произтичащо от всяка допълнителна стъпка, трябва да бъде балансирано спрямо увеличението във времето и това уравнение ще варира в съответствие с конкретния клиничен или епидемиологичен контекст. Често се твърди, че PCR е техника, която трябва да бъде ограничена до определени лаборатории, защото е трудоемка и изисква висококвалифициран персонал. Въпреки това, все по-голям брой клинични лаборатории вече рутинно използват PCR за редица приложения. За разлика от Stx-специфичните антители и други специализирани реагенти, необходими за ELISA анализи, направените по поръчка олигонуклеотидни праймери са евтини и универсално достъпни и имат много дълъг срок на годност. Съвременните многофункционални PCR апарати не са по-скъпи от четците за плаки ELISA и могат да се справят с анализи в 96-ямков формат за лаборатории, които имат висока производителност на проби [25, 26].

PCR за откриване на други STEC маркери

Полимеразната верижна реакция също се използва за откриване на гени, кодиращи допълнителни фактори на вирулентност на STEC, като *eae*, компонент на острова на патогенност на локуса на ентероцитно заличаване (LEE), който кодира способността за образуване на прикрепващи/заличавачи лезии върху ентероцитите и ЕНЕС- *hlyA*, който кодира ентерохемолизин и е разположен върху голям (приблизително 60 MDa) плазмид, присъстващ в много STEC

щамове [27, 28]. Тази информация може да е от клинично значение, тъй като изглежда, че има връзка между наличието на тези гени и способността на STEC изолата да причинява сериозно заболяване при хора [29, 30]. PCR анализи, използващи вариация на последователността в 3' частта на гена *eae*, са използвани като основа за разграничаване на O157 STEC щамове от някои други серогрупи [27, 31]. Въпреки това, наличието на данни за последователности за генетичните локуси (*rfb* региони), кодиращи биосинтезата на O-антиген в *E. coli* серогрупи като O157, O111 и O113 [32, 33], позволи разработването на по-надеждни PCR анализи, специфични за серогрупи. Два други генетични маркера, свързани с O157:H7 STEC щамове, също са използвани като основа на PCR анализи. Това са генът *fliCh7*, който кодира H7 антигена (34) и единична базова мутация в гена *uidA* (открит чрез анализ на мутация на амплификация на несъответствие), която е отговорна за β -глюкуронидаза – отрицателния фенотип на O157:H7 щамове [35].

Праимерите за полимеразна верижна реакция, специфични за различните STEC маркери, обикновено се използват като компоненти на мултиплексни PCR анализи, които също откриват *stx* гени, позволявайки едновременно откриване и частично генетично характеризиране на STEC в проба. Повишената сложност на тези анализи обаче ги прави по-малко подходящи за рутинен скрининг на голям обем на фекални проби или храни.

В НРЛ по Чревни патогени, коки и дифтерия сле възприели двустепенен подход, при който екстрактите от фекални култури първоначално се изследват с помощта на stx PCR анализ, давайки PCR продукти за stx гените, eae и hlyA. Всички положителни проби след това се подлагат на мултиплексен PCR анализ за суптипиране на гените за Stx. Тези два мултиплексни анализа предоставят независимо потвърждение на първоначалния stx скрининг анализ, както и характеристиките на вирулентност на STEC щам или щамове, присъстващи в проба.

Източници:

1. Armstrong, G. D., Rowe, P. C., Goodyer, P., Orrbine, E., Klassen, T. P., Wells, G., et al. (1995) A phase I study of chemically synthesized verotoxin (Shiga-like toxin) Pk-trisaccharide receptors attached to

- chromosorb for preventing hemolytic-uremic syndrome. *J. Infect. Dis.* 171, 1042–1045.
2. Paton, A. W., Morona, R., and Paton, J. C. (2000) A new biological agent for treatment of Shiga toxigenic *Escherichia coli* infections and dysentery in humans. *Nat. Med.* 6, 265–270.
 3. Tarr, P. I. (1995) *Escherichia coli* O157:H7: clinical, diagnostic, and epidemiological aspects of human infection. *Clin. Infect. Dis.* 20, 1–8.
 4. Karmali, M. A. (1989) Infection by verocytotoxin-producing *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol. Rev.* 2, 15–38.
 5. Paton, J. C. and Paton, A. W. (1998) Pathogenesis and diagnosis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. *Clin. Microbiol. Rev.* 11, 450–479.
 6. Strockbine, N. A., Wells, J. G., Bopp, C. A., and Barrett, T.J. (1998) Overview of detection and subtyping methods, in *Escherichia coli* O157:H7 and Other Shiga Toxin-Producing *E. coli* Strains (Kaper, J. B. and O'Brien, A. D. eds.), American Society for Microbiology, Washington, DC, pp. 331–356.
 7. Karch, H., Bielaszewska, M., Bitzan, M., and Schmidt, H. (1999) Epidemiology and diagnosis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 34, 229–243.
 8. Karmali, M. A., Petric, M., Lim, C., Cheung, R., and Arbus, G. S. (1985) Sensitive method for detecting low numbers of verotoxin-producing *Escherichia coli* in mixed cultures by use of colony sweeps and polymyxin extraction of verotoxin. *J. Clin. Microbiol.* 22, 614–619.
 9. Ashkenazi, S. and Cleary, T. G. (1990) A method for detecting Shiga toxin and Shiga-like toxin-I in pure and mixed culture. *J. Med. Microbiol.* 32, 255–261.
 10. Law, D., Ganguli, L. A., Donohue-Rolfe, A., and Acheson, D. W. (1992) Detection by ELISA of low numbers of Shiga-like toxin-producing *Escherichia coli* in mixed cultures after growth in the presence of mitomycin C. *J. Med. Microbiol.* 36, 198–202.
 11. Kehl, K. S., Havens, P., Behnke, C. E., and Acheson, D. W. K. (1997) Evaluation of the Premier EHEC assay for detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *J. Clin. Microbiol.* 35, 2051–2054.
 12. Mackenzie, A. M. R., Lebel, P., Orrbine, E., Rowe, P. C., Hyde, L., Chan, F., et al., and the Synsorb PK Study Investigators (1998) Sensitivities and specificities of Premier *E. coli* O157 and Premier EHEC enzyme immunoassays for diagnosis of infection with verotoxin (Shiga-like toxin)-producing *Escherichia coli*. *J. Clin. Microbiol.* 36, 1608–1611.
 13. Beutin, L., Zimmermann, S., and Gleier, K. (1996) Rapid detection and isolation of Shiga-like toxin (Verocytotoxin)-producing *Escherichia coli* by direct testing of individual enterohemolytic colonies from washed sheep blood agar plates in the VTEC-RPLA assay. *J. Clin. Microbiol.*

- 34, 2812–2814.
14. Karmali, M. A., Petric, M., and Bielaszewska, M. (1999) Evaluation of a microplate latex agglutination method (Verotox-F assay) for detecting and characterizing verotoxins (Shiga toxins) in *Escherichia coli*. *J. Clin. Microbiol.* 37, 396–399.
 15. Thomas, A., Smith, H. R., Willshaw, G. A., and Rowe, B. (1991) Non-radioactively labelled polynucleotide and oligonucleotide DNA probes, for selectively detecting *Escherichia coli* strains producing Vero cytotoxins VT1, VT2 and VT2 variant. *Mol. Cell. Probes* 5, 129–135.
 16. Begum, D., Strockbine, N. A., Sowers, E. G., and Jackson, M. P. (1993) Evaluation of a technique for identification of Shiga-like toxin-producing *Escherichia coli* by using polymerase chain reaction and digoxigenin-labeled probes. *J. Clin. Microbiol.* 31, 3153–3156.
 17. Brian, M. J., Frosolono, M., Murray, B. E., Miranda, A., Lopez, E. L., Gomez, H. F., and Cleary, T. G. (1992) Polymerase chain reaction for diagnosis of enterohemorrhagic *Escherichia coli* infection and hemolytic-uremic syndrome. *J. Clin. Microbiol.* 30, 1801–1806.
 18. Gannon, V. P. J., King, R. K., Kim, J. Y., and Thomas, E. J. (1992) Rapid and sensitive method for detection of Shiga-like toxin-producing *Escherichia coli* in ground beef using the polymerase chain reaction. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 3809–3815.
 19. Pollard, D. R., Johnson, W. M., Lior, H., Tyler, S. D., and Rozee, K. R. (1990) Rapid and specific detection of verotoxin genes in *Escherichia coli* by the polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* 28, 540–545.
 20. Karch, H. and Meyer, T. (1989) Single primer pair for amplifying segments of distinct Shiga-like toxin genes by polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* 27, 2751–2757.
 21. Paton, A. W., Paton, J. C., Goldwater, P. N., and Manning, P. A. (1993) Direct detection of *Escherichia coli* Shiga-like toxin genes in primary fecal cultures by polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* 31, 3063–3067.
 22. Lin, Z., Kurazono, H., Yamasaki, S., and Takeda, Y. (1993) Detection of various variant verotoxin genes in *Escherichia coli* by polymerase chain reaction. *Microbiol. Immunol.* 37, 543–548.
 23. Russmann, H., Schmidt, H., Heesemann, J., Caprioli, A., and Karch, H. (1994) Variants of Shiga-like toxin II constitute a major toxin component in *Escherichia coli* O157 strains from patients with haemolytic uraemic syndrome. *J. Med. Microbiol.* 40, 338–343.
 24. Tyler, S. D., Johnson, W. M., Lior, H., Wang, G., and Rozee, the K. R. (1991) Identification of verotoxin type 2 variant B subunit genes in *Escherichia coli* by the polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism analysis. *J. Clin. Microbiol.* 29, 1339–1343.

25. Chen, S., Xu, R., Yee, A., Wu, K. Y., Wang, C. N., Read, S., et al. (1998) An automated fluorescent PCR method for detection of shiga toxin-producing *Escherichia coli* in foods. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 4210–4216.
26. Sharma, V. K., Dean-Nystrom E. A., and Casey, T. A. (1999) Semi-automated fluorogenic PCR assays (TaqMan) for rapid detection of *Escherichia coli* O157:H7 and other Shiga toxigenic *E. coli*. *Mol. Cell. Probes* 13, 291–302.
27. Gannon, V.P.J., Rashed, M., King, R.K., and Thomas, E.J.G. (1993) Detection and characterization of the *eae* gene of Shiga-like toxin-producing *Escherichia coli* using polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* 31, 1268–1274.
28. Schmidt, H., Beutin, L., and Karch, H. (1995) Molecular analysis of the plasmidencoded hemolysin of *Escherichia coli* O157:H7 strain EDL 933. *Infect. Immun.* 63, 1055–1061.
29. Barrett, T. J., Kaper, J. B., Jerse, A. E., and Wachsmuth, I. K. (1992) Virulence factors in Shiga-like toxin-producing *Escherichia coli* isolated from humans and cattle. *J. Infect. Dis.* 165, 979–980.
30. Schmidt, H. and Karch, H. (1996) Enterohemolytic phenotypes and genotypes of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O111 strains from patients with diarrhea and hemolytic-uremic syndrome. *J. Clin. Microbiol.* 34, 2364–2367.
31. Louie, M., De-Azavedo, J., Clarke, R., Borczyk, A., Lior, H., Richter, M., et al. (1994) Sequence heterogeneity of the *eae* gene and detection of verotoxin-producing *Escherichia coli* using serotype-specific primers. *Epidemiol. Infect.* 112, 449–461.
32. Paton, A. W. and Paton, J. C. (1998) Detection and characterization of Shiga toxigenic *Escherichia coli* using multiplex PCR assays for *stx1*, *stx2*, *eaeA*, Enterohemorrhagic *E. coli* *hlyA*, *rfbO111* and *rfbO157*. *J. Clin. Microbiol.* 36, 598–602.
33. Paton, A. W. and Paton, J. C. (1999) Direct detection of Shiga toxigenic *Escherichia coli* strains belonging to serogroups O111, O157, and O113 by multiplex PCR. *J. Clin. Microbiol.* 37, 3362–3365.
34. Gannon, V. P. J., D'Souza, S., Graham, T., King, R. K., Rahn, K., and Read, S. (1997) Use of the flagellar H7 gene as a target in multiplex PCR assays and improved specificity and identification of enterohemorrhagic *Escherichia coli* strains. *J. Clin. Microbiol.* 35, 656–662.
35. Cebula, T. A., Payne, W. L., and Feng, P. (1995) Simultaneous identification of strains of *Escherichia coli* serotype O157:H7 and their Shiga-like toxin type by mismatch amplification mutation assay-multiplex PCR. *J. Clin. Microbiol.* 33, 248–250. [Published erratum appears in *J. Clin. Microbiol.* 33, 1048.]

ИЗОЛИРАНЕ НА STEC

Мария Павлова

Въпреки че значително количество информация за причинителя на STEC може да бъде получена чрез молекулярен анализ на смесени култури, **изолирането на самия STEC трябва да се счита за окончателна диагностична процедура**. Освен потвърждаване на молекулярните данни, изолирането позволява допълнително характеризирание на STEC чрез различни методи, включително O:H серотипиране, фагово типизиране, полиморфизъм на дължината на рестрикционни фрагменти (RFLP), пулсова гел електрофореза (PFGE), базирано на ДНК амплификация типизиране и така нататък. Въпреки че такова характеризирание може да има ограничено клинично приложение, то е от голямо значение от епидемиологична гледна точка, особено в условията на огнища.

Култивиране за O157 STEC

Култивирането на проби фецес върху сорбитол-MacConkey агар (SMAC) е най-често използваният метод за изолиране на O157 STEC. Това е така, защото за разлика от повечето фекални щамове *E. coli*, повечето O157:H7 и O157:H-STECS, които са най-честите причини за STEC заболяване при хора в много части в света, не ферментират сорбитол [36]. Петрите SMAC се инокулират с фекална проба и се изследват след 18–24 часа инкубация за наличие на безцветни, отрицателни за сорбитол колонии. След това отделните колонии могат да бъдат тествани чрез аглутинация на предметно стъкло с O157- и H7-специфични антисеруми или латексни реагенти. Трябва, разбира се, да се помни, че не всички O157 *E. coli* произвеждат Stx, поради което токсигенността трябва да бъде потвърдена чрез тъканна култура, ELISA или RPLA, както беше обсъдено по-рано и имунохроматографски тестове.

Чувствителността на SMAC е ограничена от способността за различаване на неферментиращи сорбитол O157 колонии на фона на други сорбитол отрицателни микроорганизми, а това е трудно, когато O157 щамът е по-малко от 1% от флората. Степента на изолиране може да се подобри чрез включване на цефиксим за инхибиране на

Proteus sp. и рамноза, която се ферментира от повечето сорбитол-отрицателни не-O157 *E. coli* (щамове O157 обикновено не ферментират рамноза), или цефиксим и калиев телурит (СТ-SMAC) [37, 38]. Въпреки че скринингът на фекални култури на SMAC и неговите варианти не е скъп и включва минимален труд и оборудване, той основно ще открие STEC, принадлежащ към серогрупа O157.

Инфекцията, причинена от STEC, е свързана с много други серогрупи и въпреки че някои от тях също могат да бъдат отрицателни за сорбитол, повечето са положителни [4]. Освен това, Stx2 продуциращи, сорбитол-положителни *E. coli* O157:H- изолати са свързани със случаи на ХУС в някои европейски страни [39,40]. Тези щамове също са много чувствителни към телурит, което смекчава използването на СТ-SMAC за изолиране на STEC.

E. coli O157:H7 би могъл също да се разграничи от други щамове на *E. coli* по отрицателната реакция за продукцията на β -D-глюкуронидаза, ензим, който може лесно да бъде открит флуорогенно с помощта на субстрата 4-метилумбелиферил- β -D-глюкуронид или колориметрично, допълнени с 5-бromo-6-хлоро-3-индолил- β -D-глюкуронид. И този критерий не е надежден за откриване на не-O157 STEC или сорбитол-положителни O157 STEC изолати, които обикновено са глюкуронидаза-положителни [41, 42] Налични са различни селективни търговски агарови среди за изолиране на O157 STEC. Rainbow Agar O157 например, съдържа селективни агенти за *E. coli* и хромогенни субстрати за β -D-глюкуронидаза и β -галактозидаза. Глюкуронидаза-отрицателни, галактозидаза-позитивни щамове O157 се появяват като черни или сиви колонии върху тази среда, докато комменсалните щамове на *E. coli* са розови. Твърди се също, че някои не-O157 STEC щамове свръхпродуцират β -галактозидаза спрямо β -D-глюкуронидаза в тази среда, придават на coloniите отличителен междинен цвят. Към днешна дата анализите на ефикасността на тази среда за откриване на O157 или не-O157 STEC във фекални проби са ограничени, но поне едно проучване показва, че Rainbow Agar O157 очевидно превъзхожда SMAC [43]. CHROM агар O157 (Becton Dickinson Microbiology Systems) също разграничава O157 въз основа на цвета. Колониите O157 са лилави, а други бактерии са или сини, или безцветни. И за двете среди производителите предлагат включването на допълнителни селективни агенти (съответно новобиоцин и телурид) за подобряване на степента на изолиране. Отново трябва да се подчертае, че изолирането на предполагаем щам O157 от някоя от тези хромогенни селективни среди

не е окончателна диагноза сама по себе си, а що се отнася до SMAC, изолата трябва да се тества, за да се потвърди производството на Stx.

Директно откриване на антиген O157 във фекални проби

Директното имунофлуоресцентно оцветяване на фекални проби с използване на поликлонално анти-O157-FITC е потенциална алтернатива на SMAC за откриване на *E. coli* O157, което включва само около 2 часа време за реверсия. Предлагат се и търговски ELISA за бързо (по-малко от 1 час) откриване на наличието на антиген O157 във фекални проби. Както имунофлуоресцентният, така и ELISA тестът имат подобна или по-висока чувствителност към SMAC и, което е важно, са в състояние да открият O157 STEC, ферментиращи сорбитол, ако присъстват [12, 44, 45]. Редица други тестове за имуноанализ откриване на O157 са налични в търговската мрежа, за които са докладвани надеждни данни за тяхната полезност при откриване на *E. coli* O157 в човешки фекални култури или директно в проби фецес. Отново, всички тези анализи също изискват потвърждение чрез култура или чрез доказване на Stx в пробата.

Култивиране за не-O157 STEC

Голямата зависимост на повечето клинични лаборатории от SMAC култура за скрининг на фекални проби от пациенти със съмнение за STEC инфекция несъмнено доведе до надценяване на относителното значение на O157 STEC като причина за заболяване при хора. От много години обаче е известно, че щамовете на *E. coli*, принадлежащи към голям набор от серотипове, както и някои щамове на други бактериални видове са способни да произвеждат Stx и да причиняват сериозни заболявания при хората [4]. За съжаление, няма окончателна биохимична характеристика, която да отличава STEC, принадлежащ към серогрупи, различни от O157, от коменсалните фекални щамове на *E. coli*, факт, който значително усложнява изолирането на такива организми. Въпреки това, почти всички O157 STEC, както и значителна част от не-O157 STEC щамове, произвеждат плазмидно-кодирания ентерохемолизин ЕНЕС-Нлу. Такива щамове не са хемолитични върху стандартен кръвен агар, но произвеждат малки, мътни хемолитични зони върху агар с овнешка кръв (допълнен с Ca²⁺) след 18–24 часа инкубиране при 37°C. Производството на ЕНЕС-Нлу е силно показателно, че даден изолат е STEC, но прогнозната стойност на отрицателен резултат е ниска [30, 46]. Като следствие, хемолитичният фенотип върху кръвен агар

с овнешка кръв е полезно средство за идентифициране на колонии за по-нататъшен анализ, но нехемолитичните колонии също трябва да бъдат тествани. Единственият всеобхватен начин за изолиране на STEC или други организми, произвеждащи Stx, включва директен анализ на колонии върху неселективни агарови среди, като се използват или stx-специфични сонди за нуклеинова киселина, или антители срещу Stx, и са описани различни протоколи за тази цел [5]. Това е трудоемък процес и може да бъде оправдан само за проби, които са дали положителен резултат при скрининг за Stx (чрез цитотоксичност или ELISA) или за stx (чрез PCR). Колониите от агара могат да бъдат директно прехвърлени върху подходяща мембрана за имуноблотове или тестване с ДНК сонди. Сравненията на чувствителността и специфичността на имуноблотинга и ДНК сондите за откриване на STEC колонии показват, че последният вероятно е по-надежден метод. Имуноблот техниките имат допълнителен недостатък, че трябва да инкубирате coloniите върху специална среда, за да се оптимизира производството и освобождаването на Stx [47].

Имуномагнитно разделяне за изолиране на STEC

Имуномагнитното разделяне (IMS) е потенциално мощна техника на обогатяване за изолиране на STEC от проби с ниско съдържание. Процедурата включва покриване на магнитни перли с анти-LPS (липополизахарид) и смесването им с бульонни култури или суспензии от изпражнения или съмнителни хранителни хомогенати. След това перлите със свързаните бактерии се улавят в магнитно поле, несвързаната суспензия се декантира и перлите се измиват. След допълнителни цикли на свързване/промиване, перлите се посяват и получените колонии се тестват за реактивност с подходящ O-антисерум и което е по-важно за производство на Stx. Основният недостатък на IMS е, разбира се, неговата специфичност на серогрупата и понастоящем в търговската мрежа се предлагат само специфични за O157 магнитни перли. Независимо от това, това е изключително ценна техника за обогатяване при обстоятелства, при които умишленото и изключително насочване на тази серогрупа е оправдано (напр. анализ на проби, епидемиологично свързани с доказани случаи на заболяване O157 STEC). Няколко проучвания показват, че IMS обогатяването с помощта на търговски O157-специфични перли преди посяване върху CT-SMAC значително повишава скоростта на изолиране на *E. coli* O157 от фекални проби [48, 49]. Също така, по време на разследването на огнище на ХУС,

причинено от O111:H– STEC щам, обогатяването с помощта на вътрешен O111-специфичен IMS реагент позволява изолирането на O111 STEC от предполагаем хранителен източник след директното посяване и хибридизацията на ДНК сондите са дали отрицателни резултати [50].

Източници:

1. March, S. B. and Ratnam, S. (1986) Sorbitol-MacConkey medium for detection of *Escherichia coli* O157:H7 associated with hemorrhagic colitis. *J. Clin. Microbiol.* 23, 869–872.
2. Chapman, P. A., Siddons, C. A., Zadik, P. M., and Jewes, L. (1991) An improved selective medium for the isolation of *Escherichia coli* O157. *J. Med. Microbiol.* 35, 107–110.
3. Zadik, P. M., Chapman, P. A., and Siddons, C. A. (1993) Use of tellurite for the selection of verocytotoxigenic *Escherichia coli* O157. *J. Med. Microbiol.* 39, 155–158.
4. Gunzer, F., Bohm, H., Russmann, H., Bitzan, M., Aleksic, S., and Karch, H. (1992) Molecular detection of sorbitol-fermenting *Escherichia coli* O157 in patients with hemolytic-uremic syndrome. *J. Clin. Microbiol.* 30, 1807–1810.
5. Bielaszewska, M., Janda, J., Blahova, K., Karch, H., Karmali, M. A., Preston, M. A., et al. (1997) Isolation of sorbitol-fermenting (SF) verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157:H- in the Czech Republic. 13rd International Symposium and Workshop on Shiga Toxin (Verotoxin)-producing *Escherichia coli* Infections, Baltimore, MD.
6. Ratnam, S., March, S. B., Ahmed, R., Bezanson, G. S., and Kasatiya, S. (1988) Characterization of *Escherichia coli* serotype O157:H7. *J. Clin. Microbiol.* 26, 2006–2012.
7. Thompson, J. S., Hodge, D. S., and Borczyk, A. A. (1990) Rapid biochemical test to identify verocytotoxin-positive strains of *Escherichia coli* serotype O157. *J. Clin. Microbiol.* 28, 2165–2168.
8. Novicki, T.J., Daly, J.A., Mottice, S.L., and Carroll, K.C. (2000) Comparison of sorbitol MacConkey agar and a two-step method which utilizes enzyme-linked immunosorbent assay toxin testing and a chromogenic agar to detect and isolate enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *J. Clin. Microbiol.* 38, 547–551.
9. Park, C.H., Hixon, D.L., Morrison, W.L., and Cook, C.B. (1994) Rapid diagnosis of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 directly from fecal specimens using immunofluorescence stain. *Am. J. Clin. Pathol.* 101, 91–94.

10. Park, C. H., Vandel, N. M., and Hixon, D. L. (1996) Rapid immunoassay for detection of *Escherichia coli* O157 directly from stool specimens. *J. Clin. Microbiol.* 34, 988–990.
11. Beutin, L., Montenegro, M. A., Orskov, I., Orskov, F., Prada, J., Zimmermann, S., et al. (1989) Close association of verotoxin (Shiga-like toxin) production with enterohemolysin production in strains of *Escherichia coli*. *J. Clin. Microbiol.* 27, 2559–2564.
12. Hull, A. E., Acheson, D. W., Echeverria, P., Donohue-Rolfe, A., and Keusch, G. T. (1993) Mitomycin immunoblot colony assay for detection of Shiga-like toxin-producing *Escherichia coli* in fecal samples: comparison with DNA probes. *J. Clin. Microbiol.* 31, 1167–1172.
13. Chapman, P. A. and Siddons, C. A. (1996) A comparison of immunomagnetic separation and direct culture for the isolation of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 from cases of bloody diarrhoea, non-bloody diarrhoea and asymptomatic contacts. *J. Med. Microbiol.* 44, 267–271.
14. Karch, H., Janetzki-Mittmann, C., Aleksic, S., and Datz, M. (1996) Isolation of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 strains from patients with hemolytic– uremic syndrome by using immunomagnetic separation, DNA-based methods and direct culture. *J. Clin. Microbiol.* 34, 516–519.
15. Paton, A. W., Ratcliff, R., Doyle, R. M., Seymour-Murray, J., Davos, D., Lanser, J. A., et al. (1996) Molecular microbiological investigation of an outbreak of hemolytic uremic syndrome caused by dry fermented sausage contaminated with Shiga-like toxin-producing *Escherichia coli*. *J. Clin. Microbiol.* 34, 1622–1627.

СЕРОЛОГИЧНА ДИАГНОСТИКА НА STEC ИНФЕКЦИЯ

Мария Павлова

Диагностицирането на заболяване, свързано със STEC, може да бъде особено проблематично, когато пациентите се появят в късния ход на заболяването, тъй като броят на STEC е неоткриваем дори чрез PCR анализ от бульони за набогатяване. Въпреки това, STEC инфекцията често предизвиква реакции на хуморални антитела към набор от бактериални продукти, което може да позволи изясняване на етиологията на инфекцията чрез серологични средства. В предишни проучвания са изследвали имунните отговори на пациенти със STEC заболяване към Stx1, Stx2 и LPS и, по-скоро, към LEE локуса като интимин, Tir, EspA и EspB [5, 51]. Теоретично, Stx трябва да бъдат предпочитаната цел, тъй като всички STEC, по дефиниция, произвеждат Stx1 и/или Stx2-свързан токсин. Въпреки това, предишни проучвания показват, че само малка част от пациентите с доказано STEC заболяване развиват откриваеми отговори на серумни антитела към съответния тип токсин, което се определя чрез ELISA, цитотоксична неутрализация или Western blotting [52–55]. Освен това, при значителна част от здравите индивиди може да се откриват серумни антитела срещу Stx1, особено в селските популации [54]. Това би усложнило тълкуването на резултатите, получени при използване на единични серумни проби, освен ако не са налични географски и възрастови изходни данни за здравата популация. В идеалния случай, остри и реконвалесцентни серуми трябва да бъдат тествани за повишаващи се или спадащи титри на антитела.

По-окуражаващи резултати са получени чрез тестване за антитела срещу LPS, въпреки че този диагностичен подход има недостатъка, че може да се насочи само към определени серогрупи. Не е изненадващо, че по-голямата част от тези проучвания са фокусирани върху серодиагностиката на O157 STEC инфекции. Голяма част от пациентите, инфектирани с тази STEC серогрупа, имат повишени нива на серумни антитела в острата фаза до O157 LPS, измерени чрез ELISA или тест за пасивна хемаглутинация, а нивото на фоновата серопозитивност при здрави контроли обикновено е ниско

[52, 56–60]. В няколко от тези проучвания анти-LPS титрите спадат бързо по време на непосредствената пост-остра фаза, така че повишените титри в единична проба могат наистина да бъдат надежден индикатор за текуща или съвсем скорошна инфекция. Клиничните лабораторни изследвания, поне за антитела O157, също се улесняват от наличие на търговски китове за тест за латексна аглутинация, за който е доказано, че е едновременно чувствителен и специфичен [61]. Въпреки че данните за серологичните отговори на инфекции, причинени от други STEC-асоциирани серогрупи, са по-ограничени, такива анализи са показали, че са полезни при определяне на етиологията в редица спорадични случаи огнища на ХУС, причинени от не-O157 STEC щамове [50, 62 - 65].

Препоръчва се също диагностика на STEC инфекция въз основа на серологични отговори към LEE-кодирани протеини. Това има предимството да се насочва към по-широк спектър от типове STEC, въпреки че не всички щамове, свързани със сериозно заболяване при хора, са LEE-положителни. Отговорите с антитела към интимин (генният продукт на *eae*) са по-чести сред пациентите с HUS, отколкото отговорите към други LEE протеини, но честотата на интимин сероконверсия е по-ниска, отколкото за O157 LPS [51]. Трябва също така да се помни, че други ентеробактериални патогени, включително ентеропатогенна *E. coli*, са LEE-позитивни и затова се очаква да предизвикат анти-интиминни отговори при хора. Проблеми с интерпретацията могат да възникнат и при анти-LPS отговори, като дори за O157, връзката между производството на Stx и серогрупата не е абсолютна и за всички серогрупи са необходими високо пречистени LPS антигени, за да се минимизират кръстосаните реакции. Поради това трябва да се внимава при интерпретирането на серологични данни, особено при липса на потвърждаващи доказателства (напр. производство на Stx или наличие на stx гени във фекални култури).

Стратегии за откриване на STEC

Изборът на най-подходящата методология за откриване на STEC ще включва постигане на баланс между скорост, специфичност, чувствителност и цена на алтернативите. **В идеалния случай клиничните микробиологични лаборатории трябва да изследват всички фекални проби от пациенти с остра диария (не само тези, които са кървави) за наличие на STEC, като използват методи, които не са ограничени за серогрупи. PCR анализът на първичните фекални култури е може би**

най-чувствителният и специфичен средства за скрининг за наличие на STEC. Въпреки това, за тези лаборатории, които нямат възможност за PCR, се препоръчва директен скрининг на фекални култури за наличие на Stx с помощта на един от наличните в търговската мрежа комплекти ELISA или бързи имунохроматографски тестове. Вероцитотоксичността, макар и по-бавна, е много задоволителна алтернатива. Методите, насочени конкретно към O157 STEC (напр. CT-SMAC култура, откриване на антиген O157 и т.н.), са неоптимални самостоятелни първични скринингове, но ако цялостният скрининг не е възможен, е по-добре да се използват тези методи, отколкото да не се скринира изобщо. Би било разумно обаче такива лаборатории да изпращат отрицателни проби от случаи на тежка кървава диария или съмнение за ХУС в референтната лаборатория по Чревни инфекции, патогенни коки и дифтерия.

Всички проби и култури, които дават положителен резултат след скрининга, трябва да бъдат изпратени в референтна лаборатория за потвърждение и опит за изолиране на STEC, ако на място няма подходящи ресурси. Като се има предвид широко разпространената нестабилност на stx гените по време на субкултура, важно е първоначалните проби и първичните култури да съпровождат в допълнение предполагаемите STEC изолати. Именно на етапа на изолиране специализираната среда, може да спести време, като насочи вниманието към суспектни колонии, особено когато те са в ниско микробно число. Въпреки това, ако използвате такава среда, а не неселективни, от съществено значение е да тествате набор от типове колонии, а не само тези със STEC-асоцииран фенотип. Като се има предвид чувствителността на PCR методите, част от истинските STEC-позитивни проби може да не дадат изолат дори след геропосочените опити. Все още може да е възможно да се получи значима допълнителна информация за причинителя при такива обстоятелства. PCR анализът ще покаже тип токсин и дали в пробата присъстват и гени, свързани с вирулентността, или гени, свързани с важни серогрупи. Тълкуването на тази информация обаче се усложнява от възможността съставният генотипен профил да представлява сумата от генотипове на повече от един STEC организъм. Поне в случаите на ХУС информацията за вероятна инфектираща серогрупа може също да бъде получена чрез серологични тестове за анти-LPS.

Источници:

1. Jenkins, C., Chart, H., Smith, H.R., Hartland, E.L., Batchelor, M., Delahay, R.M., et al. (2000) Antibody response of patients infected with verocytotoxin-producing *Escherichia coli* to protein antigens encoded on the LEE locus. *J. Med. Microbiol.* 49, 97–101.
2. Barrett, T. J., Green, J. H., Griffin, P. M., Pavia, A. T., Ostroff, S. M., and Wachsmuth, I. K. (1991) Enzyme-linked immunosorbent assays for detecting antibodies to Shiga-like toxin I, Shiga-like toxin II, and *Escherichia coli* O157:H7 lipopolysaccharide in human serum. *Curr. Microbiol.* 23, 189–195.
3. Chart, H., Law, D., Rowe, B., and Acheson, D. W. (1993) Patients with haemolytic uraemic syndrome caused by *Escherichia coli* O157: absence of antibodies to Vero cytotoxin 1 (VT1) or VT2. *J. Clin. Pathol.* 46, 1053,1054.
4. Karmali, M. A., Petric, M., Winkler, M., Bielaszewska, M., Brunton, J., van-de-Kar, N., et al. (1994) Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of immunoglobulin G antibodies to *Escherichia coli* Vero cytotoxin 1. *J. Clin. Microbiol.* 32, 1457–1463.
5. Reymond, D., Karmali, M. A., Clarke, I., Winkler, M., and Petric, M. (1997) Comparison of the western blot assay with the neutralizing-antibody and enzymelinked immunosorbent assays for measuring antibody to verocytotoxin 1. *J. Clin. Microbiol.* 35, 609–613.
7. Bitzan, M. and Karch, H. (1992) Indirect hemagglutination assay for diagnosis of *Escherichia coli* O157 infection in patients with hemolytic-uremic syndrome. *J. Clin. Microbiol.* 30, 1174–1178.
8. Bitzan, M., Moebius, E., Ludwig, K., Muller-Wiefel, D. E., Heesemann, J., and Karch, H. (1991) High incidence of serum antibodies to *Escherichia coli* O157 lipopolysaccharide in children with hemolytic-uremic syndrome. *J. Pediatr.* 119, 380–385.
9. Chart, H., Smith, H. R., Scotland, S. M., Rowe, B., Milford, D. V., and Taylor, C. M. (1991) Serological identification of *Escherichia coli* infection in haemolytic uraemic syndrome. *Lancet* 337, 138–140.
10. Greatorex, J. S. and Thorne, G.M. (1994) Humoral immune responses to Shigalike toxins and *Escherichia coli* O157 lipopolysaccharide in hemolytic-uremic syndrome patients and healthy subjects. *J. Clin. Microbiol.* 32, 1172–1178.
11. Yamada, S., Kai, A., and Kudoh, Y. (1994) Serodiagnosis by passive hemagglutination test and verotoxin enzyme-linked immunosorbent assay of toxin-producing *Escherichia coli* infections in patients with hemolytic-uremic syndrome. *J. Clin. Microbiol.* 32, 955–959.
12. Chart, H. (1999) Evaluation of a latex agglutination kit for the detection of human antibodies to the lipopolysaccharide of *Escherichia coli* O157, following infection with verocytotoxin-producing E.

-
- coli* O157. Lett. Appl. Microbiol. 29, 434–436.
13. Bielaszewska, M., Janda, J., Blahova, K., Feber, J., Potuznik, V., and Souckova, A. (1996) Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* in children with hemolytic uremic syndrome in the Czech Republic. Clin. Nephrol. 46, 42–44.
 14. Chart, H. and Rowe, B. (1990) Serological identification of infection by Vero cytotoxin producing *Escherichia coli* in patients with haemolytic uraemic syndrome. Serodiagn. Immunother. Infect. Dis. 4, 413–418.
 15. Caprioli, A., Luzzi, I., Rosmini, F., Resti, C., Edefonti, A., Perfumo, F., et al. (1994) Community-wide outbreak of hemolytic-uremic syndrome associated with non-O157 verocytotoxin-producing *Escherichia coli*. J. Infect. Dis. 169, 208–211.
 16. Paton, A. W., Woodrow, M. C., Doyle, R. M., Lanser, J. A. and Paton, J. C. (1999) Molecular characterization of a Shiga-toxigenic *Escherichia coli* O113:H21 strain lacking *eae* responsible for a cluster of cases of hemolytic-uremic syndrome. J. Clin. Microbiol. 37, 3357–3361.

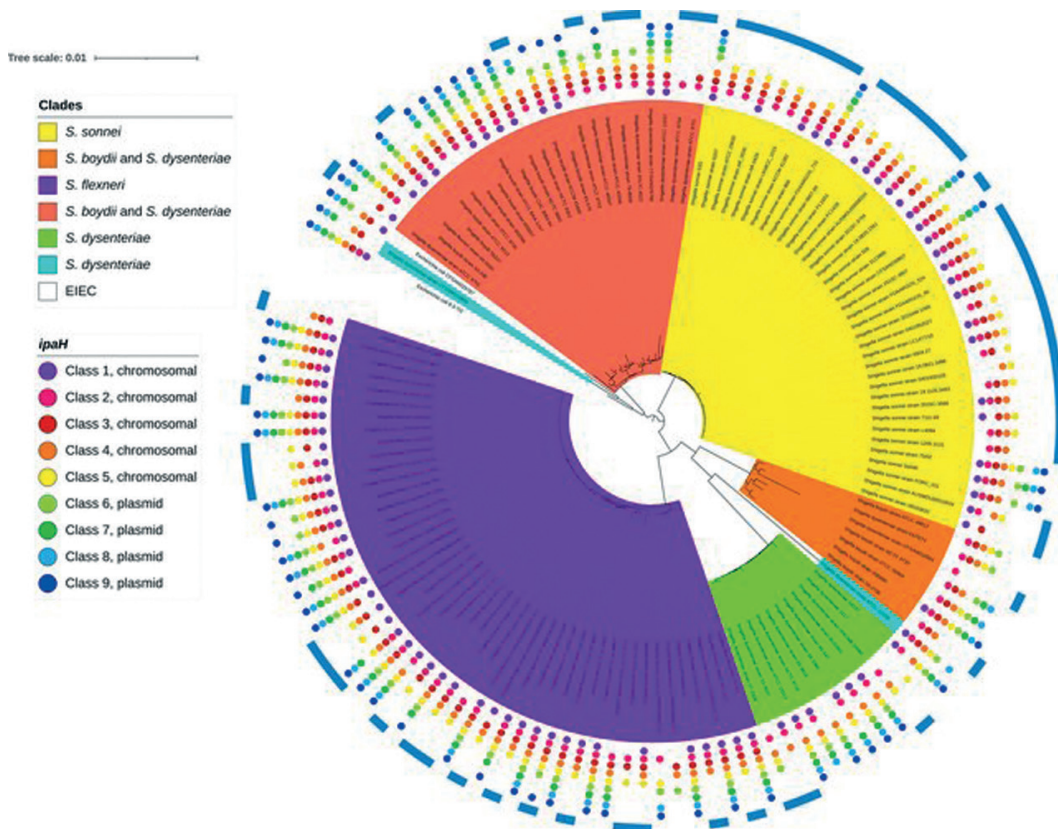
ЕНТЕРОИНВАЗИВНИ *E. COLI* / *SHIGELLA*

Мария Павлова

Ентероинвазивните *E. coli* (EIEC) и *Shigella spp.* са факултативни вътреклетъчни патогени и етиологични агенти на бактериална дизентерия или шигелоза. Дизентерия е терминът, използван от Хипократ, за да опише болест характеризираща се с чести изпражнения, съдържащи кръв и слуз придружени от болезнени коремни спазми. Това заболяване е имало огромни влияние върху човешкото общество през вековете с може би едно от най-големите ефекти са силното му влияние във военните операции. Дълго, продължително военните кампании и обсадите почти винаги пораждаха епидемии от дизентерия и причини голям брой военни и цивилни жертви [1]. Първоначално известна като *Bacillus dysenteriae*, *Shigella* е описана за първи път от Kiyoshi Shiga през 1897 г. по време на епидемия в Япония, където са заразени повече от 91 000 души и смъртността е над 20% [2]. Около 50 години по-късно са открити EIEC, които споделят биохимични, генетични и патогенетични свойства с *Shigella* [3]. Като цяло, род *Shigella* са неподвижни, лизин декарбоксилаза отрицателни и неспособни да ферментират лактозата (с изключение на *S. sonnei*, които бавно ферментират лактоза). Тези и други характеристики се отнасят и за повечето EIEC [4]. Поради голямото си сходство, EIEC и *Shigella* се обсъждат паралелно. Уместността на глава за *Shigella* в книга, посветена на патогенните *E. coli* произлиза от факта, че EIEC причинява дизентерия, която е клинично неразличима от тази, причинена от членовете на рода *Shigella*. В допълнение, изобилие от изследвания с целогеномно секвениране от ново поколение недвусмислено установяват, че *Shigella spp.* са клонове на *E. coli* [5, 6]. В тази глава, ще разгледаме тези патогени заедно. Тъй като по-голямата част от изследвания върху патогенезата на бактериалната дизентерия са направени върху *Shigella*, ще се съсредоточим върху тези организми.

Въпреки развитието на модерния свят дизентерията продължава да отнема живота на стотици хиляди хора живеещи в нехигиеничните условия, породени от война и/или бедност. Ниската инфекциозна доза, необходима за причиняване на заболяване, съчетано с орално предаване на бактериите чрез фекално замърсена храна и вода са

причина за разпространението на заболяването в ендемични райони. Дори отделно от тези специални обстоятелства, шигелозата остава важно заболяване както в развитите страни, така и в слабо развитите страни.



Филетични модели на *ipaH* гените в *Shigella* и EIEC. Оцветяването отразява основните клонове на *Shigella*, които предполагат се са развили от различни непатогенни *E. coli*; два отдалечени щамна *Shigella* са показани в синьо, EIEC щамове са показани в бяло. Наличието на *ipaH* гените е показано чрез точки, чийто цвят отразява *ipaH* класа (вижте легендата). Гените в класове № 1-5 са разположени в хромозомите; гените в класове № 6-9, в плазмиди. Геномите, маркирани с външните сини дъги, не съдържат T3SS гените. DOI: 10.1038/s41598-022-10827-3

Класификация на EIEC

EIEC се състои от 21 основни серотипа, които обикновено се определят от техния O-антигенен модел, с няколко изключения които също представят H антигени, както следва:

О- СЕРПГРУПА *	Н- АНТИГЕНИ
O28AC	–
O29	–
O112AC (D2, B15)	–
O115	–
O121	–
O124 (D3)	– , H7, H30, H32
O135 (F2A)	–
O136	–
O143 (B8)	–
O144	– , H25
O152 (D12)	–
O159	H2
O164	–
O167 (B3)	– , H4, H5
O173	–

*Серотипове на *Shigella*, които споделят един и същ или тясно свързан О- антиген, са посочени в скоби: (B)- *S. boydii*; (D)- *S. dysenteriae*; (F)- *S. flexneri*.

При някои от ЕИЕС О- антигените са идентични или тясно свързани със *Shigella* О- антигените и по този начин усложняват дискриминацията между ЕИЕС и *Shigella* при конвенционално серотипиране [7]. Традиционно, *Shigella* се класифицира въз основа на биохимични, серологични, и клинични фенотипове, а не върху филогенетична корелация [8]. *Shigella* включва 49 серо- и субсеротипа, които по-нататък са групирани в четирите вида *S. dysenteriae* (серогрупа А, 15 серотипа), *S. flexneri* (серогрупа В, 14 серо- и субсеротипа), *S. boydii* (серогрупа С, 19 серотипа) и *S. sonnei* (серогрупа D, 1 серотип):

<i>Shigella</i> sp. групи	серотипа
<i>S. dysenteriae</i> (A)	1–15
<i>S. flexneri</i> (B)	1a, 1b, 2a, 2b, 3a, 3b, 4a, 4b, 4c, 5a, 5b, 6, X, Y
<i>S. boydii</i> (C ^a)	1–20
<i>S. sonnei</i> (D)	–

^a *S. boydii* тип 13 наскоро беше прекласифициран като *Escherichia albertii*.

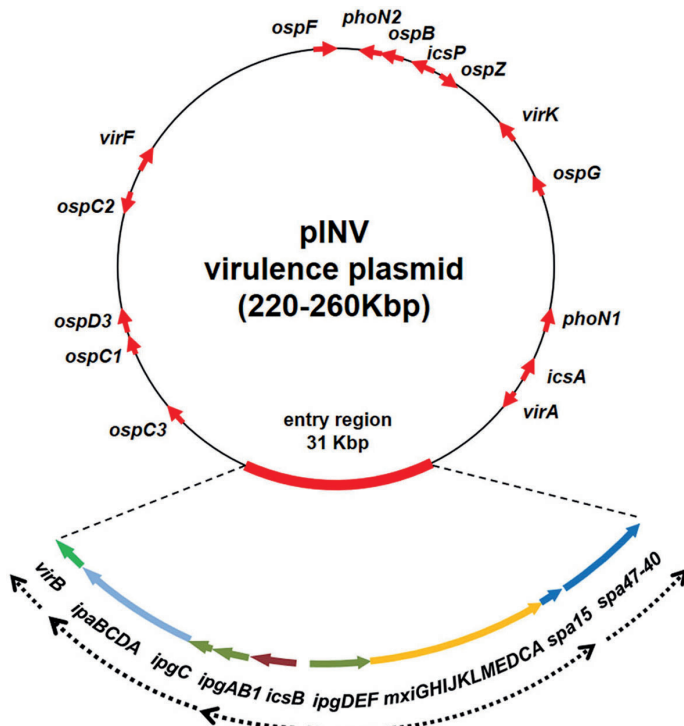
Доскоро *S. boydii* се подразделяше на 20 серотипа; обаче филогенетичният анализ разкрива, че *S. Boydii* 13 принадлежи към линията *E. albertii*, която е различна от типична шигела [9]. Класификацията на серотип осигурява основата за настоящата *Shigella* и ЕИЕС номенклатура. Името на рода *Shigella* все още се използва, главно поради исторически причини и връзката ѝ с болестта шигелоза. Въпреки това, различни филогенетични проучвания показват, че *Shigella* очевидно принадлежи към вида *E. coli*. Както се вижда от анализ на 36 консервативни гени от *E. coli* K-12, STEC O157:H7 и *S. flexneri* 2a, *Shigella* sp и коменсалният щам K-12 показва средна дивергенция на последователността от само 1,12%. В същото изследване *Shigella* демонстрира по-голямо сходство с *E. coli* K-12 от това с STEC O157:H7. Мултилокусния анализ и анализите на целия геном разкриват, че ЕИЕС и *Shigella* формират единен патотип в *E. coli* [10, 11]. В проучване за филогенетично сравнение на ЕИЕС и *Shigella* и референтни щамове *E. coli* Три от четири ЕИЕС клъстера съдържат щамове с различни O- антигени и щамове, споделящи един и същ O- антиген се наблюдаванит в повече от един клъстер. За Шигела, всички клъстери включват щамове от различни традиционно дефинирани серогрупи. Следователно генетичните връзки между щамовете не са цялостно отразени от често използваната традиционна класификационна схема, базирана на повърхностен антигенен профил. ЕИЕС показва по-малко разминаване от коменсалната *E. coli* отколкото *Shigella*, което предполага, че ЕИЕС възникват по-късно от *Shigella* и представляват или предшественик на напълно еволюирала *Shigella* или форма, различна от *Shigella*. Това е в съответствие с намалената дивергенция, наблюдавана в рамките на филогенетиката ЕИЕС клъстери в сравнение с клъстери на *Shigella*. Не съществува обща номенклатура за *Shigella* и ЕИЕС, която да включва филогенетичната връзка между различни родове. Следователно, ще се използва традиционната серотипова номенклатура [10].

Патоадаптация.

Както придобиването, така и загубата на гени са били необходими на *Shigella* и ЕИЕС, за да се развият от коменсална *E. coli*, с извънклетъчен начин на живот до вътреклетъчен патоген, който е напълно адаптиран към разнообразните екологични предизвикателства в своя гостоприемник. Необходим е преход от коменсална *E. coli* към патогенна чрез придобиване на нови фактори, стимулиращи

вирулентността и изчерпване или потискане на ненужни и противоположни на вирулентността генетични елементи. При тези *E. coli* способността им да причиняват заболяване е от съществено значение за непрекъснатата циркулация в природата, като патотипове *Shigella* и ентероинвазивна *E. coli* (EIEC) са чудесни примери. Докато те могат да колонизират хора безсимптомно, асимптомните носители са предимно индивиди, които са се възстановили от симптоматична инфекция от същия щам [12]. Патогени също могат ефективно да се предават по време на активната инфекция, за да образуват нови инфекции, т.е. от пациент на пациент [13]. По този начин има вероятност факторите на вирулентност на *Shigella* и EIEC да се поддържат специално, за да причинят инфекция или да бъдат предадени като патоген, т.е. да бъдат от адаптирана природа. Това се отнася до двата механизма на еволюция на вирулентност, хоризонтален генен трансфер и патоадаптивни мутации. Сред първата категория е голям вирулентен плазмид, който кодира гени за експресията на характерна вирулентност на *Shigella* като инвазия, вътреклетъчна репликация, междуклетъчно разпространение и индуциране на възпалителен отговор [14]. Сред патоадаптивните мутации водеща роля играят мутациите със загуба на функция, с класическия пример за делеция на *cadA* и *ompT* антивирулентни гени, които пречат на функцията или секрецията на ентеротоксина [15]. Също така, сред различните патотипове на *E. coli*, *Shigella*/EIEC носят най-голямото количество точкови мутационни промени (вариации) в основните гени, голяма част от които могат да бъдат патоадаптивни по природа [16].

Еволюцията на *E. coli* към патогенни фенотипове се определя, както при много други бактериални патогени, главно от два механизма: придобиване на вирулентни гени като части от плаزمиди, фаги, транспозони или загуба и/или модификация на гени на основния геном. Докато първият механизъм играе решаваща роля в колонизацията на нова среда на гостоприемник, последният, известен като патоадаптация, силно допринася за стимулиране на еволюцията на бактериите към по-патогенен фенотип [17, 18]. Широко признато е, че както при *Shigella*, така и при EIEC критичното събитие при прехода към патогенен начин на живот е придобиването на голям F-тип плазмид (pINV), който кодира молекулярния механизъм, необходим за инвазия, оцеляване и разпространение на бактерията в гостоприемника, фигура 2 [19, 20]. Плазмидът pINV е открит само в патотипа *Shigella*/EIEC и неговата загуба е рядко събитие, което определя авирулентен фенотип.



Генетична карта на pINV на щамове *Shigella* и EIEC. Червените стрелки показват основните детерминанти на вирулентността. Поради променливостта в позицията и броя, *iraN* гените не са показани. Генетичната организация на входния регион е показана подробно, с прекъснати линии със стрелки, показващи известни транскрипционни единици. Организацията на входния регион се основава на последователността на плазмид pWR100, докато целият плазмид е свободно начертан, за да осигури оформлението на типичен pINV плазмид. Източник: DOI: <https://doi.org/10.1128/IAI.69.5.3271-3285.2001>.

Генетичната организация на pINV е много сложна. Тези плазмиди са изградени от мозайка от гени с различен произход и съдържат следи от четири различни плазмиди. pINV, изолирани от EIEC, споделят широки области на висока структурна и функционална хомология и са взаимозаменяеми с тези, изолирани от щамове *Shigella* [21, 22]. pINV споделя с плазмидите IncFIIA висока хомология в регионите, участващи в репликацията (*rep*) и конюгацията (*tra*) и стабилното наследяване на pINV се осигурява от наличието на няколко плазмидни сегрегации и поддържащи системи [23]. Поради големи делеции в *tra* региона, pINV не са способни на самопрехвърляне чрез конюгация,

но други конюгативни плазмиди могат да ги мобилизират. В целия плазмиден геном присъства удивителен брой инсерции, като смес от пълни и непълни инсерционни елементи, повтарящи се няколко пъти, потвърждавайки съответната роля, изиграна от инсерциите в сглобяването и еволюцията на рINV. Повечето IS са свързани с известни елементи, докато други представляват нови IS. Сред последните, ISEc11, IS, принадлежащ към семейството IS1111, е широко разпространен и функционален в рINV от EIEC, докато само дефектни копия присъстват в плазмидите на *Shigella* рINV [24, 25].

Секреторна система тип III, кодирана от входната област, играе критична роля в бактериалния инвазивен процес, тъй като тя доставя голям брой ефектори, участващи в реорганизацията на актиновия цитоскелет на клетката гостоприемник и в модулирането на клетъчните сигнални пътища за избягване на имунния отговор на гостоприемника. С изключение на няколко протеина от семейството на IpaH, които са хромозомно кодирани, всички ефектори на Секреторна система тип III са кодирани от рINV гени, разположени в рамките на или извън областта на влизане. Тъй като входният регион е силно запазен, филогенетичният анализ на три от неговите гени (*ipgD*, *mxiC* и *mxiA*) позволи диференцирането на рINV от *Shigella* spp. и EIEC в две форми, А и В, като първата е предимно свързана с EIEC щамове [26, 27].

Както при други патогенни *E. coli*, така и при EIEC, вирулентните гени се поддържат стабилно върху екстрахромозомен елемент. Въпреки това се съобщава, че рINV на EIEC е в състояние да се интегрира в хромозомата на гостоприемника и че интегрирането води до заглушаване на всички рINV-кодирани гени на вирулентност, също зависи от температурните условия на гостоприемника. Заглушаването зависи от силно намаляване на транскрипцията на *virB*, вероятно зависимо от неспособността на *VirF* да противодейства на отрицателния контрол на H-NS при *virB* промотора, когато той е хромозомно разположен. Това е довело до хипотезата, че наличието на вирулентни гени върху рINV е резултат от еволюционен път към оптимизиране на генната експресия [29, 30, 31].

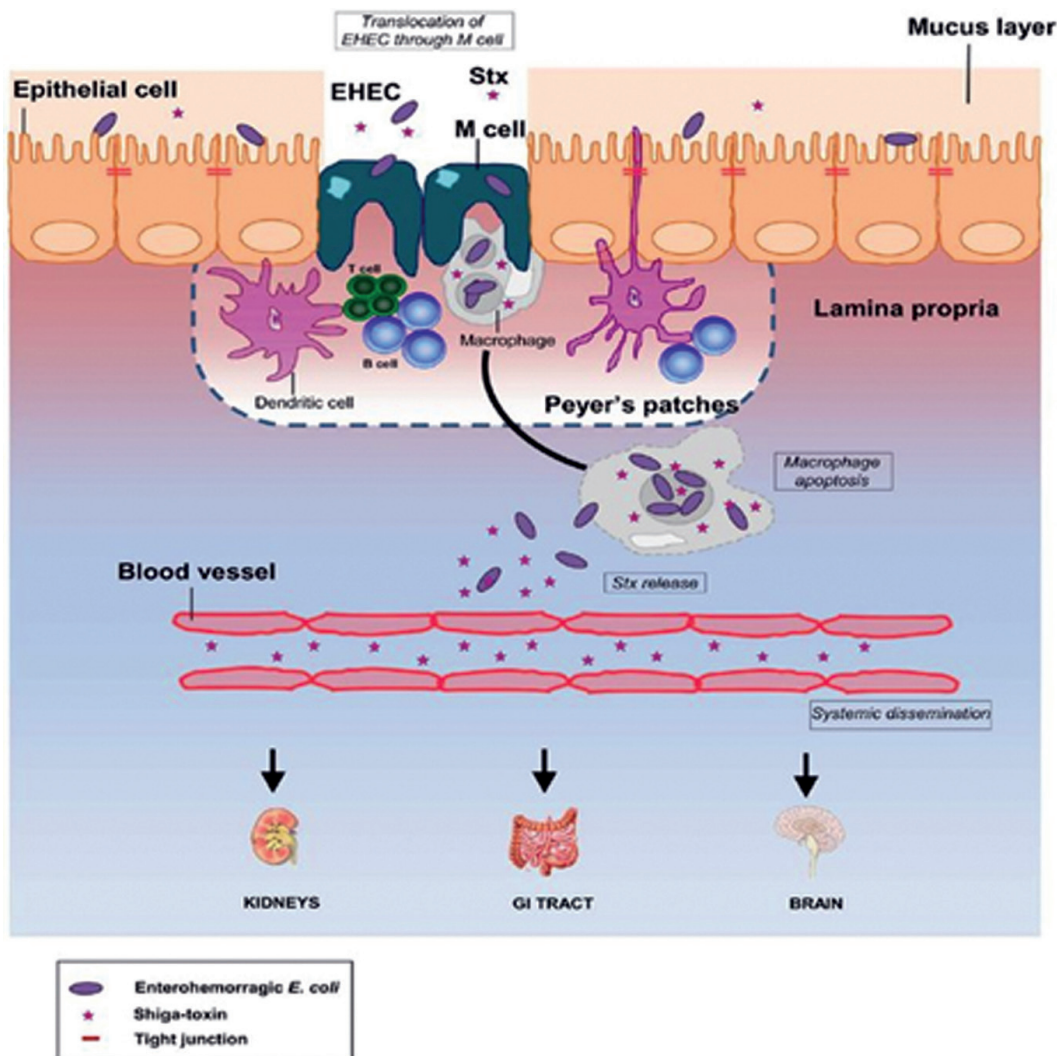
Патогенеза

EIEC и *Shigella* са силно инвазивни патогени, които използват вътреклетъчната среда на чревни епителни клетки (ЧЕК) в дебелото черво, като тяхна репликативна ниша. Тези патогени са лесно адаптивни към различните екологични предизвикателства, пред които са изправени хода на инфекцията, включително ниско рН на

стомаха, температурни промени, наличност на кислород и оксидативен стрес, както и осмоларитет. Напредъкът в изследването на *S. flexneri* осигурява основа за сегашното ни разбиране за патогенезата на ЕИЕС и *Shigella* на клетъчно и молекулярно ниво [31]. Успешната инфекция зависи от основните вирулентни детерминанти, които са кодирани както от хромозомни, така и от плазмидни локуси. Ключовите плазмидно кодирани вирулентни фактори включват компоненти на секреторни системи тип III, шаперони (*IpgA*, *IpgC*, *IpgE* и *Spa15*), транскрипционни регулатори (*VirF*, *VirB* и *MxiE*), транслокатори (*IpaB*, *IpaC* и *IpaD*) и приблизително 25 ефекторни протеини. Инфекцията със *Shigella* е многоетапен процес, включващ проникване през епителната бариера, индуциране на клетъчна смърт на макрофаги, инвазия на ЧЕК, потискане на имунния отговор, вътрешно и междуклетъчно движение и модулиране на епителната цялост.

- 1) *Проникване през епителната бариера и клетъчна смърт на макрофаги.* За да получат достъп до базолатералната повърхност на ЧЕК, бактериите първо проникват през епителната бариера, през М-клетки, чрез трансцитоза. В подлежащата субмукоза се фагоцитират от резидентните макрофаги и избягват собственото си разграждане чрез зависимо от ефекта бягство от фагозома и индукция на каспаза I-зависима клетъчна смърт на макрофаги [32].
- 2) *Нашествие.* Последващото базолатерално нахлуване на ЕИЕС в ЧЕК, тяхното вътреклетъчното оцеляване и репликация и разпространението от клетка в клетка, са управлявани от способността им да подкопават сигналните пътища на клетката гостоприемник. Бактериалната адхезия към клетката гостоприемник се медира от IpaB и IpaBCD комплекс, които се свързват с хиалуронов рецептор CD44 на гостоприемника. Гените *IpgC*, *IpgB1*, *IpgD*, *IpaA* и *VirA* участват в екстензивна реорганизация на цитоскелета на гостоприемника и раздробяване на мембраната за насърчаване на усвояването на патогена във фагозомата. Впоследствие патогенът избягва фагозомата, като използва ефекторите IpaB, IpaC, IpaD и IpaH7.8 [33, 32].
- 3) *Потискане на имунния отговор на гостоприемника.* Множество ефектори противодействат на имунната защита на гостоприемника. Възпалителните реакции на гостоприемника, като митоген-активирана протеин киназа и NF-κB пътища, както и производството на цитокини, са насочени

- и потискани от множество ефектори. Освен това микробът използва стратегии за манипулиране и избягване на имунния отговор на гостоприемника, като потискане на анти-микробната пептидна експресия, индуциране на апоптоза в дендритни клетки и увреждане на Т-клетъчната функция. Освен това ефекторите на секреторни системи тип III VirA и IcsB помагат на патогена да заобиколи своята медирана от автофагия деградация [35, 36].
- 4) *Вътре- и междуклетъчно движение.* Секреторните системи тип III са отговорни за вътре- и междуклетъчното движение. Предполага, че VirA, със своята способност да стимулира дестабилизацията на микротубулите, е друг основен ефектор, който позволява на микроорганизма да се разпространява ефективно през гъстата вътреклетъчна цитоскелетна мрежа и да се разпространи в съседни клетки [37].
 - 5) *Епителна цялост.* Целостта на епитела играе основна роля по време на инфекция с ЕИЕС. В началото на инфекцията патогенът насърчава оцеляването и целостта на клетката гостоприемник. Инхибираното блокиране на смъртта на клетката гостоприемник са известни механизми, използвани от патогена за запазване на неговата репликативна ниша и насърчаване на колонизацията. Въпреки това, *Shigella*/ЕИЕС са развили стратегии за нарушаване на епитела, за да улеснят достъпа до базолатералната повърхност на ЧЕ. Това включва процеси като манипулиране на клетъчната повърхност чрез IpaB-медирано разрушаване на секрецията, управлявана от апарата на Голджи, дестабилизиране на епителната плътна връзка и индуциране на смърт на ЧЕК. Масивният възпалителен отговор, свързан с апоптотични макрофаги и инвазия на чревния епителни клетки, включително инфилтриращи полиморфонуклеарни левкоцити, допълнително перфорира епителната бариера и в крайна сметка води до тъканни лезии, които са характерни за патологията на шигелозата [38, 39, 40].
 - 6) *Токсини.* Като допълнителни вирулентни фактори е известно, че допринасят за клиничните прояви на ЕИЕС/*Shigella* инфекции. Общото наблюдението на водниста диария се приписва на *Shigella* ентеротоксини 1 и 2 (ShET1 и ShET2). Хромозомно кодиран ShET1 е ограничен до *S. flexneri*, докато pINV-кодиращ ShET2, е открит в щамове на различни



Фигурата изобразява монослой от чревни епителни клетки с ЕНЕС инфекция в лумена. Производството на Stx става в червата. Бактериите прелинават през чревната бариера през М клетки. В *lamina propria* бактериите навлизат, оцеляват и произвеждат Stx в резидентните макрофаги. След репликация на бактерии в макрофагите, екстензивното производство на Stx предизвиква смърт на клетката гостоприемник. Впоследствие освободеният Stx може да прелине през кръвоносните съдове надолу по веригата, за да достигне до бъбреците, червата и мозъка. Увреждането на тези органи води до сериозни животозастрашаващи усложнения при хората. Източник; doi:10.1371/journal.pone.0023594.g007.

серотипове EIEC [41, 42]. В допълнение към своя принос към секреторната чревна активност, ShET2 също участва при възпаление в ЧЕК, индуцираното от *Shigella*. Освен това ShET1 и ShET2, двата допълнителни ентеротоксигени, хромозомно кодирани фактора Pic и SigA, допринасят за натрупването на чревна течност в илеума при заешки модел. И накрая, често тежките и смъртоносни усложнения на *S. Dysenteriae* 1 инфекциите са свързани главно със Stx. Stx най-вече присъства в *S. dysenteriae* 1 и е почти идентичен на Stx1, произведени от други STEC щамове. Освен инхибиращото си въздействие върху синтез на протеин на гостоприемника чрез каталитично инактивиране на еукариотни рибозоми, описано е, че Stx индуцира апоптоза в различни видове клетки. Установено е, че това въздействие е отговорно за развитието на съдови лезии в дебелото черво, бъбреците и централната нервна система. Изолат на *S. sonnei*, който носи кодиран с фаг *S. dysenteriae* 1-подобен Stx, доказва че други серотипове на *Shigella* могат да имат потенциала да придобият Stx чрез хоризонтален генен трансфер и по този начин повишават тяхната вирулентност [43-45].

Като цяло EIEC и *Shigella* използват едни и същи стратегии за нахлуване в клетките гостоприемници. Въпреки това, представителите на EIEC са с намалена вирулентност в сравнение с тази на *Shigella*, включително намалена експресия на вирулентни гени, по-малко ефективно убиване на макрофаги, намалено разпространение от клетка към клетка и намалена индукция на провъзпалителни отговори на гостоприемника, което корелира с по-леко заболяване, предизвикано от EIEC.

Клинични показатели

Клиничната картина, прогресията и усложненията на бактериална дизентерия или шигелоза, варират в зависимост от инфекциозен агент, имунологичният фон на гостоприемника и наличната медицинска инфраструктура. Клиничните симптоми варират: лека водниста диария, умора, неразположение, треска и анорексията се развива в ранните стадии на заболяването. Това е типично придружено от коремни спазми, тенезми, оскъдни изпражнения с кръв и слуз и дехидратация. В повечето случаи шигелозата е самоограничаваща се. Въпреки това, може да възникнат тежки и животозастрашаващи

усложнения, особено в райони на развиващия се свят, където заболяването е епидемично или ендемично, при което се заразяват предимно млади, често недохранени и силно имуносупресирани деца и нямат достъп до адекватно лечение. Тежките усложнения на шигелозата често се свързват със серотипа *S. dysenteriae* 1, произвеждащ Shiga токсин, и могат да варират от локални чревни нарушения до системни прояви. Усложненията на шигелозата включват токсичен мегаколон, чревна перфорация, перитонит, хипонатриемия, хипогликемия, пневмония и ХУС. Изчислено е, че ХУС се среща при до 13% от инфектираните със *S. dysenteriae* 1 и процент на смъртност от около 36%. ХУС, причинен от *S. dysenteriae* 1, е много подобен на ХУС, причинен от STEC. Въпреки това, дисеминирана интраваскуларна коагулация с консумацията на коагулационни фактори може да присъства в *S. dysenteriae* 1-асоциирани случаи на ХУС, но са редки при STEC. По-нататък усложненията на шигелозата включват септицемия и неврологични разстройства, като енцефалопатия и гърчове. Инциденти на постинфекциозен синдром на раздразнените черва след *Shigella* инфекции също са докладвани. Инфекция с EIEC често води само до самоограничаваща се, лека водниста диария. В редки случаи обаче може да причини подобна на шигелоза симптоми [46 - 50].

Източници:

1. Kim, M., Ogawa, M., Fujita, Y., et al., 2009. Bacteria hijack integrin-linked kinase to stabilize focal adhesions and block cell detachment. *Nature* 459, 578–582.
2. Shiga K. 1898. Ueber den erreger der dysenterie in Japan (vorläufige mitteilung). *Zentralbl. Bakteriol. Mikrobiol. Hyg.* 599–600.
3. Nataro JP, Kaper JB. 1998. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol. Rev.* 11:142–201.
4. Scheutz F, Strockbine NA. 2005. Genus I. *Escherichia*, p 607–624. In Garrity GM, et al (ed), *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Springer Publishing Company, New York, NY.
5. Sims, G.E., Kim, S.H., 2011. Whole-genome phylogeny of *Escherichia coli*/*Shigella* group by feature frequency profiles (FFPs). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 108, 8329–8334.
6. Touchon, M., Hoede, C., Tenaillon, O., et al., 2009. Organised genome dynamics in the *Escherichia coli* species results in highly diverse adaptive paths. *PLoS Genet.* 5, e1000344.

7. Li Y, Cao B, Liu B, Liu D, Gao Q, Peng X, Wu J, Bastin DA, Feng L, Wang L. 2009. Molecular detection of all 34 distinct O-antigen forms of Shigella. *J. Med. Microbiol.* 58:69–81.
8. Ewing WH. 1949. Shigella nomenclature. *J. Bacteriol.* 57:633–638.
9. Hyma KE, Lacher DW, Nelson AM, Bumbaugh AC, Janda JM, Strockbine NA, Young VB, Whittam TS. 2005. Evolutionary genetics of a new pathogenic *Escherichia* species: *Escherichia albertii* and related *Shigella boydii* strains. *J. Bacteriol.* 187:619–628.
10. Pupo GM, Lan R, Reeves PR. 2000. Multiple independent origins of Shigella clones of *Escherichia coli* and convergent evolution of many of their characteristics. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97:10567–10572.
11. Peng J, Yang J, Jin Q. 2009. The molecular evolutionary history of *Shigella* spp. and enteroinvasive *Escherichia coli*. *Infect. Genet. Evol.* 9:147–152.
12. Zdziarski, J., Brzuszkiewicz, E., Wullt, B., et al., 2010. Host imprints on bacterial genomes – rapid, divergent evolution in individual patients. *PLoS Pathog.* 6 (8), e1001078.
13. Stewart, G.R., Robertson, B.D., Young, D.B., 2003. Tuberculosis: a problem with persistence. *Nat. Rev. Microbiol.* 1 (2), 97–105.
14. Pupo, G.M., Lan, R., Reeves, P.R., 2000. Multiple independent origins of Shigella clones of *Escherichia coli* and convergent evolution of many of their characteristics. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97 (19), 10567–10572.
15. Day Jr., W.A., Fernandez, R.E., Maurelli, A.T., 2001. Pathoadaptive mutations that enhance virulence: genetic organization of the *cadA* regions of *Shigella* spp. *Infect. Immun.* 69 (12), 7471–7480.
16. Chattopadhyay, S., Weissman, S.J., Minin, V.N., Russo, T.A., Dykhuizen, D.E., Sokurenko, E.V., 2009. High frequency of hotspot mutations in core genes of *Escherichia coli* due to short-term positive selection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106 (30), 12412–12417.
17. Kaper, J. B., Nataro, J. P., and Mobley, H. L. T. (2004). Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat. Rev. Microbiol.* 2, 123–140. doi: 10.1038/nrmicro818.
18. Dobrindt, U., Chowdary, M. G., Krumbholz, G., and Hacker, J. (2010). Genome dynamics and its impact on evolution of *Escherichia coli*. *Med. Microbiol. Immunol.* 199, 145–154. doi: 10.1007/s00430-010-0161-2.
19. Small, P. L., and Falkow, S. (1988). Identification of regions on a 230-kilobase plasmid from enteroinvasive *Escherichia coli* that are required for entry into HEp-2 cells. *Infect. Immun.* 56, 225–229.
20. Venkatesan, Malabi M., et al. „Complete DNA sequence and analysis of the large virulence plasmid of *Shigella flexneri*.“ *Infection and immunity* 69.5 (2001): 3271-3285.
21. Escobar-Póramo, P., Giudicelli, C., Parsot, C., and Denamur, E. (2003). The evolutionary history of *Shigella* and enteroinvasive *Escherichia coli* revised. *J. Mol. Evol.* 57, 140–148. doi: 10.1007/s00239-003-2460-3.

22. Johnson, T. J., and Nolan, L. K. (2009). Pathogenomics of the virulence plasmids of *Escherichia coli*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 73, 750–774. doi: 10.1128/MMBR.00015-09.
23. Lan, R., Lumb, B., Ryan, D., and Reeves, P. R. (2001). Molecular evolution of large virulence plasmid in *Shigella* clones and enteroinvasive *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 69, 6303–6309. doi: 10.1128/IAI.69.10.6303-6309.2001.
24. Venkatesan, M. M., Goldberg, M. B., Rose, D. J., Grotbeck, E. J., Burland, V., and Blattner, F. R. (2001). Complete DNA sequence and analysis of the large virulence plasmid of *Shigella flexneri*. *Infect. Immun.* 69, 3271–3285. doi: 10.1128/IAI.69.5.3271-3285.2001.
25. Prosseda, G., Latella, M. C., Casalino, M., Nicoletti, M., Michienzi, S., and Colonna, B. (2006). Plasticity of the P *junc* promoter of ISEc11, a new insertion sequence of the IS1111 family. *J. Bacteriol.* 188, 4681–4689. doi: 10.1128/JB.00332-06.
26. Mattock, E., and Blocker, A. J. (2017). How do the virulence factors of *Shigella* work together to cause disease? *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 7:64. doi: 10.3389/fcimb.2017.00064.
27. Lan, R., Alles, M. C., Donohoe, K., Martinez, M. B., and Reeves, P. R. (2004). Molecular evolutionary relationships of enteroinvasive *Escherichia coli* and *Shigella* spp. *Infect. Immun.* 72, 5080–5088. doi: 10.1128/IAI.72.9.5080-5088.2004.
28. Johnson, T. J., and Nolan, L. K. (2009). Pathogenomics of the virulence plasmids of *Escherichia coli*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 73, 750–774. doi: 10.1128/MMBR.00015-09.
29. Zagaglia, C., Casalino, M., Colonna, B., Conti, C., Calconi, A., and Nicoletti, M. (1991). Virulence plasmids of enteroinvasive *Escherichia coli* and *Shigella flexneri* integrate into a specific site on the host chromosome: integration greatly reduces expression of plasmid-carried virulence genes. *Infect. Immun.* 59, 792–799.
30. Colonna, B., Casalino, M., Fradiani, P. A., Zagaglia, C., Naitza, S., Leoni, L., et al. (1995). H-NS regulation of virulence gene expression in enteroinvasive *Escherichia coli* harboring the virulence plasmid integrated into the host chromosome. *J. Bacteriol.* 177, 4703–4712. doi: 10.1128/jb.177.16.4703-4712.1995.
31. Carayol N, Tran Van Nhieu G. 2013. Tips and tricks about *Shigella* invasion of epithelial cells. *Curr. Opin. Microbiol* 16:32–37.
32. Senerovic L, Tsunoda SP, Goosmann C, Brinkmann V, Zychlinsky A, Meissner F, Kolbe M. 2012. Spontaneous formation of IpaB ion channels in host cell membranes reveals how *Shigella* induces pyroptosis in macrophages. *Cell Death Dis.* 3:e384. doi:10.1038/cddis.2012.124.
33. Picking WL, Nishioka H, Hearn PD, Baxter MA, Harrington AT, Blocker A, Picking WD. 2005. IpaD of *Shigella flexneri* is independently

- required for regulation of Ipa protein secretion and efficient insertion of IpaB and IpaC into host membranes. *Infect. Immun.* 73:1432–1440.
34. Yoshida S, Katayama E, Kuwae A, Mimuro H, Suzuki T, Sasakawa C. 2002. Shigella deliver an effector protein to trigger host microtubule destabilization, which promotes Rac1 activity and efficient bacterial internalization. *EMBO J.* 21:2923–2935.
 35. Ashida H, Ogawa M, Kim M, Suzuki S, Sanada T, Punginelli C, Mimuro H, Sasakawa C. 2011. Shigella deploy multiple countermeasures against host innate immune responses. *Curr. Opin. Microbiol.* 14:16–23.
 36. Konradt C, Frigimelica E, Nothelfer K, Puhar A, Salgado-Pabon W, di Bartolo V, Scott-Algara D, Rodrigues CD, Sansonetti PJ, Phalipon A. 2011. The Shigella flexneri type three secretion system effector IpgD inhibits T cell migration by manipulating host phosphoinositide metabolism. *Cell Host Microbe* 9:263–272.
 37. Fukumatsu M, Ogawa M, Arakawa S, Suzuki M, Nakayama K, Shimizu S, Kim M, Mimuro H, Sasakawa C. 2012. Shigella targets epithelial tricellular junctions and uses a noncanonical clathrin-dependent endocytic pathway to spread between cells. *Cell Host Microbe* 11:325–336.
 38. Bergounioux J, Elisee R, Prunier A-L, Donnadieu F, Sperandio B, Sansonetti P, Arbibe L. 2012. Calpain activation by the Shigella flexneri effector VirA regulates key steps in the formation and life of the bacterium's epithelial niche. *Cell Host Microbe* 11:240–252.
 39. Mounier J, Boncompain G, Senerovic L, Lagache T, Chrétien F, Perez F, Kolbe M, Olivo-Marin J-C, Sansonetti PJ, Sauvonnnet N. 2012. Shigella effector IpaB-induced cholesterol relocation disrupts the Golgi complex and recycling network to inhibit host cell secretion. *Cell Host Microbe* 12:381–389.
 40. Schroeder GN, Hilbi H. 2008. Molecular pathogenesis of Shigella spp.: controlling host cell signaling, invasion, and death by type III secretion. *Clin. Microbiol. Rev.* 21:134–156.
 41. Fasano A, Noriega FR, Maneval DR, Jr, Chanasongcram S, Russell R, Guandalini S, Levine MM. 1995. Shigella enterotoxin 1: an enterotoxin of Shigella flexneri 2a active in rabbit small intestine in vivo and in vitro. *J. Clin. Invest.* 95:2853–2861.
 42. Farfón MJ, Toro CS, Barry EM, Nataro JP. 2011. Shigella enterotoxin-2 is a type III effector that participates in Shigella-induced interleukin 8 secretion by epithelial cells. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 61:332–339.
 43. Behrens M, Sheikh J, Nataro JP. 2002. Regulation of the overlapping pic/set locus in Shigella flexneri and enteroaggregative Escherichia coli. *Infect. Immun.* 70:2915–2925.

-
44. Tesh VL. 2010. Induction of apoptosis by Shiga toxins. *Future Microbiol.* 5:431–453.
 45. Beutin L, Strauch E, Fischer I. 1999. Isolation of *Shigella sonnei* lysogenic for a bacteriophage encoding gene for production of Shiga toxin. *Lancet* 353:1498.
 46. Butler T. 2012. Haemolytic uraemic syndrome during shigellosis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 106:395–399.
 47. Mark Taylor C. 2008. Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* and *Shigella dysenteriae* type 1-induced haemolytic uraemic syndrome. *Pediatr. Nephrol.* 23:1425–1431.
 48. Khan WA, Dhar U, Salam MA, Griffiths JK, Rand W, Bennish ML. 1999. Central nervous system manifestations of childhood shigellosis: prevalence, risk factors, and outcome. *Pediatrics* 103:E18.
 49. Ji S, Park H, Lee D, Song YK, Choi JP, Lee S-I. 2005. Post-infectious irritable bowel syndrome in patients with *Shigella* infection. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 20:381–386.
 50. Ephros M, Cohen D, Yavzori M, Rotman N, Novic B, Ashkenazi S. 1996. Encephalopathy associated with enteroinvasive *Escherichia coli* 0144:NM infection. *J. Clin. Microbiol.* 34:2432–2434.

ДИАГНОСТИКА, ТЕРАПИЯ И ПРЕВЕНЦИЯ НА ИНФЕКЦИИ ОТ ЕИЕС

Мария Павлова

Класически подход за идентифициране на ЕИЕС и *Shigella* в проба от изпражнения, съдържащи кръв, започва с микроскопското откриване на множество полиморфонуклеарни левкоцити, определящи инвазивността на етиологичния причинител на инфекциозната диария [2, 3, 4]. Обаче микроскопският анализ води до двусмислена идентификация на ЕИЕС или *Shigella*. Следователно, необходими са алтернативни диагностични инструменти, които и често се основават на биохимичното разграничаване на ЕИЕС и *Shigella* от други бактерии. За ефективна диагностика, бактериалните изолати трябва да бъдат получени от пресни проби от изпражнения или проби от изпражнения, които са били съхранявани при подходяща транспортна среда, като например буфериран глицеринов физиологичен разтвор или транспортна среда Cary-Blair. Биохимична идентификация на *Shigella*, която може често се използва за ЕИЕС, използва диференциална/селективна среда и се фокусира най-вече върху следните характеристики на почти всички *Shigella* щамове: неспособност за ферментация на лактоза и използване на цитрат; отсъствие на подвижността, лизин декарбоксилазата и уреазната неактивни; без производство на газ и H₂S при ферментация на захар [17, 1, 5]. След фенотипната идентификация, базирана на биохимичен анализ, е добре да се прилагат PCR методи за едновременно идентифициране на ЕИЕС/*Shigella*, чрез откриване на специфични за патотипа генетични маркери, като инвазионния плазмиден антиген Н ген (*ipaH*) или инвазионния локусен ген (*ial*), които са общ диагностичен инструмент за както ЕИЕС, така и откриване на *Shigella* [6]. След като бактериалният изолат се идентифицира като ЕИЕС или *Shigella*, серогрупата и серотипът, съответно, могат да бъдат потвърдени чрез тестове за аглутинация на предметни стъкла използвайки налични в търговската мрежа антисеруми. За разлика от ЕИЕС, *Shigella* изолатите биха могли да бъдат типирани молекулярно чрез мултиплексен PCR анализ, насочен към няколко гени за синтез на специфични О-антигени [7,8].

Нарастващата наличност на данни за геномно секвениране улеснява търсенето на нови генетични маркери, които могат да се използват за недвусмислено серотипиране на *Shigella* и EIEC. На места, където е налична подходяща технологична инфраструктура, се използват допълнителни методи за типизиране, базирани на генома, за прецизна оценка на клиничните изолати, като този начин осигурява голям принос за идентифицирането, наблюдението и оценката на риска от EIEC и *Shigella*. MLST представлява ценен инструмент за идентифициране на клинични изолати и характеризиране на тяхната степен на геномна връзка. Сравнителната геномика представлява ефективна мярка за правилната оценка на патогенните изолати. Например, високата дискриминационна сила на ретроспективен анализ на целия геном на огнище на *S. sonnei* позволи определянето на различни филогенетични линии и се оказа превъзходна спрямо конвенционалните техники за типизиране при дефиниране на огнището [9]. Въпреки това, подходите за типизиране, базирани на ДНК последователности, често са трудни за прилагане в областта, където се прилагат технологични ограничения. Въвеждането на имунохроматографски тестове се оказа приложим подход за бърза диагностика. Този формат открива специфичен за серотипа липополизахарид (LPS) за по-малко от 15 минути чрез използване на специфични за серотипа моноклонални антитела, които са свързани със златни частици и показани на едноетапна имунохроматографска тестове.

Поради тяхната фенотипна, биохимична и генетична връзка е трудно да се направи разлика между EIEC и *Shigella*. Като цяло тестовете на *Shigella* са отрицателни за подвижност, както и за лактоза и мукатна ферментация и използване на L-серин, D-ксилоза и/или натриев ацетат. Някои щамове EIEC са положителни в една или повече от тези категории и по този начин могат да бъдат разграничени от *Shigella* [22]. Това обаче не са много надеждни методи, тъй като повечето EIEC щамове биха показали и отрицателен фенотип, подобен на *Shigella*. Наскоро van den Beld и Reubsat предложиха схема за идентифициране на EIEC и *Shigella* чрез комбиниране на IpaH ген PCR с няколко биохимични анализа [10]. В тази стратегия за откриване авторите предполагат, че използване на тестове за аглутинация с използване на EIEC- или *Shigella*-специфични антисеруми често е неизбежно, за да се направи ясно разграничение между EIEC и шигела. Някои антисеруми реагират кръстосано с O антигени както на EIEC, така и на *Shigella* [18, 19]. В тези случаи

PCR-базираното откриване на лизин декарбоксилазния *cadA* ген, който в повечето случаи липсва в *Shigella*, но често присъства в ЕИЕС, може да осигури по-добро разграничение.

Терапия

Основните стъпки за ефективното лечение на шигелозата са обстойно прегледани и леко адаптирани в последното десетилетие [20, 1, 2, 11]. Обикновено леката до умерена шигелоза се счита за самоограничаваща се, при условие че е гарантирана подходяща рехидратация. Тази важна първа стъпка в терапията на диарията се проявява във формула за ефективна орална рехидратираща терапия, която е разработена от СЗО [1]. Като втора стъпка е доказано, че антимикробното лечение ефективно съкращава продължителността на симптомите и намалява риска от сериозни усложнения и смърт [1, 12]. За разлика от случая за STEC, ранното антимикробното лечение също се съобщава, че е ефективно за намаляване риска от ХУС, свързан с *S. dysenteriae* 1 [13]. Като цяло, тежестта на заболяването, възрастта на пациента и местният модел на чувствителност към антибиотици трябва да се вземат предвид за адекватно, особено в бедните райони на ендемична диария, е важна стъпка към намаляване на медираното от *Shigella* и ЕИЕС заболяване.

Ваксини

Една ефективна ваксина би представлявала друга превантивна мярка и устойчив подход за премахване на тежестта на болестта на бактериална дизентерия. В момента обаче няма налична ваксина за ЕИЕС или *Shigella*. Разработването на ефективна срещу *Shigella* ваксина е в центъра на вниманието на много лаборатории през последното десетилетие. Направеният напредък и срещнатите препятствия в разработването на ваксина срещу *Shigella* са добре документирани в последните прегледи [21, 14, 15]. Накратко обобщено, последните изследвания преследват дизайна на многовалентна ваксина, защитаваща срещу най-разпространените серотипове и субсеротипове, включително *S. dysenteriae* 1, *S. sonnei* и всички 14 вида *S. flexneri*. Внедрени са множество стратегии за проектиране на парентерални и мукозни кандидат ваксини, които са показали различни нива на ефикасност в клинични изпитвания. Най-обещаващите кандидати включват живи атенюирани щамове на *S. flexneri* 2a, *S. sonnei* и *S. Dysenteriae* 1, както и инактивирани цялоклетъчни ваксини, получени от инактивирани щамове *S. sonnei* и *S. flexneri* 2a. Базиран на

субединица подходите включват ковалентен и нековалентен O-полизахарид–протеинови конюгати, насочени към *S. flexneri*, *S. sonnei* и *S. dysenteriae*, LPS-Ipa-протеинови комплекси, защитаващи срещу *S. flexneri* 2a и *S. sonnei*, и *S. flexneri* 2a-насочени външно мембранни везикули. Тези кандидати, заедно с големи усилия за повишаване на имуногенността на мукозните ваксини, както и подбора и дизайна на мощни адюванти и антигенни носители, обещаваат бърз напредък към дългоочаквана безопасна и мощна ваксина срещу *Shigella* [14,16]. За съжаление различни фактори са възпрепятствали бързото решение досега. Разнообразието от епидемиологично значими серотипове на *Shigella*, крехката природа на нейната педиатрична целева група в развиващите се страни и географската дивергенция на заболяемостта от шигелоза, включително различни диети, санитарни стандарти и целеви групи с различни имунологичните среди са само част от препятствията които усложняват процеса на разработване на ваксината.

Източници:

1. Niyogi SK. 2005. Shigellosis. *J. Microbiol.* 43:133–143.
2. World Health Organization. 2005. Guidelines for the control of shigellosis, including epidemics due to *Shigella dysenteriae* type 1. WHO Press, Geneva, Switzerland.
3. Kopecko DJ. 1994. Experimental keratoconjunctivitis (Sereny) assay. *Methods Enzymol.* 235:39–47.
4. Wood PK, Morris JG, Jr, Small PL, Sethabutr O, Toledo MR, Trabulsi L, Kaper JB. 1986. Comparison of DNA probes and the Sereny test for identification of invasive *Shigella* and *Escherichia coli* strains. *J. Clin. Microbiol.* 24:498–500.
5. Panchalingam S, et. al.,. 2012. Diagnostic microbiologic methods in the GEMS-1 case/control study. *Clin. Infect. Dis.* 55(Suppl 4):S294–S302.
6. Venkatesan MM, Buysse JM, Kopecko DJ. 1989. Use of *Shigella flexneri* ipaC and ipaH gene sequences for the general identification of *Shigella* spp. and enteroinvasive *Escherichia coli*. *J. Clin. Microbiol.* 27:2687–2691.
7. Sun Q, Lan R, Wang Y, Zhao A, Zhang S, Wang J, Wang Y, Xia S, Jin D, Cui Z, Zhao H, Li Z, Ye C, Zhang S, Jing H, Xu J. 2011. Development of a multiplex PCR assay targeting O-antigen modification genes for molecular serotyping of *Shigella flexneri*. *J. Clin. Microbiol.* 49:3763770.
8. Hayford AE, Mammel MK, Lacher DW, Brown EW. 2011. Single nucleotide polymorphism (SNP)-based differentiation of *Shigella*

- isolates by pyrosequencing. *Infect. Genet. Evol.* 11:1761–1768.
9. McDonnell J, Dallman T, Atkin S, Turbitt DA, Connor TR, Grant KA, Thomson NR, Jenkins C. 2013. Retrospective analysis of whole genome sequencing compared to prospective typing data in further informing the epidemiological investigation of an outbreak of *Shigella sonnei* in the UK. 544. *Epidemiol. Infect.* 21:1–8.
 10. Van den Beld MJC, Reubsaet FAG. 2012. Differentiation between *Shigella*, enteroinvasive *Escherichia coli* (EIEC) and noninvasive *Escherichia coli*. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 31:899–904.
 11. DuPont HL. 2009. Clinical practice. Bacterial diarrhea. *N. Engl. J. Med.* 361:1560–1569.
 12. Salam MA, Bennish ML. 1991. Antimicrobial therapy for shigellosis. *Rev. Infect. Dis.* 13(Suppl 4):S332–S341.
 13. Bennish ML, Khan WA, Begum M, Bridges EA, Ahmed S, Saha D, Salam MA, Acheson D, Ryan ET. 2006. Low risk of hemolytic uremic syndrome after early effective antimicrobial therapy for *Shigella dysenteriae* type 1 infection in Bangladesh. *Clin. Infect. Dis.* 42:356–362.
 14. Camacho AI, Irache JM, Gamazo C. 2013. Recent progress towards development of a *Shigella* vaccine. *Expert Rev. Vaccines* 12:43–55.
 15. Kweon M-N. 2008. Shigellosis: the current status of vaccine development. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 21:313–318.
 16. Pavot V, Rochereau N, Genin C, Verrier B, Paul S. 2012. New insights in mucosal vaccine development. *Vaccine* 30:142–154.
 17. Von Seidlein L, Kim DR, Ali M, Lee H, Wang X, Thiem VD, Canh DG, Chaicumpa W, Agtini MD, Hossain A, Bhutta ZA, Mason C, Sethabutr O, Talukder K, Nair GB, Deen JL, Kotloff K, Clemens J. 2006. A multicentre study of *Shigella* diarrhoea in six Asian countries: disease burden, clinical manifestations, and microbiology. *PLoS Med.* 3:e353. doi:10.1371/journal.pmed.0030353.
 18. Cheasty T, Rowe B. 1983. Antigenic relationships between the enteroinvasive *Escherichia coli* O antigens O28ac, O112ac, O124, O136, O143, O144, O152, and O164 and *Shigella* O antigens. *J. Clin. Microbiol.* 17: 681–684.
 19. Li Y, Cao B, Liu B, Liu D, Gao Q, Peng X, Wu J, Bastin DA, Feng L, Wang L. 2009. Molecular detection of all 34 distinct O-antigen forms of *Shigella*. *J. Med. Microbiol.* 58:69–81.
 20. Pfeiffer ML, DuPont HL, Ochoa TJ. 2012. The patient presenting with acute dysentery—a systematic review. *J. Infect.* 64:374–386.
 21. Levine MM, Kotloff KL, Barry EM, Pasetti MF, Sztein MB. 2007. Clinical trials of *Shigella* vaccines: two steps forward and one step back on a long, hard road. *Nat. Rev. Microbiol.* 5:540–553.
 22. Lan R, Reeves PR. 2002. *Escherichia coli* in disguise: molecular origins of *Shigella*. *Microbes Infect.* 4:1125–1132.

ЕНТЕРОТОКСИГЕННИ *ESCHERICHIA COLI*

Мария Павлова

Диарийните заболявания продължават да причиняват значителна заболяемост и остават една от водещите причини за смърт при малки деца на възраст под 5 години, най-вече в слабо развитите страни. Повече от една пета от световното население живее в крайна бедност, където липсата на безопасна вода и адекватни санитарни условия позволяват високите нива на чревни инфекции и диария да повишават тенденциозно. Сред бактериалните причини на диария, ентеротоксигенните щамове *Escherichia coli* (ЕТЕС) обикновено се свързват с по-тежки форми на заболяване при малките деца. Представителите на този патотип са най-честата причина за диария при пътуващи до ендемични райони със занижени санитарни условия; въпреки това, те са многократно идентифицирани като етиологични причинители на огнища на диария и спорадични случаи на заболявания в развитите страни [1-3]. Най-често докладваните серотипа на *E. coli*, като етиологичен причинител на диарийни заболявания в България са от групата на ЕТЕС- O6, O25, O78, O15, O128, сред тях водещ причинител на диарии при малки деца е *E. coli* O6.

Клинични особености и възприемчивост на гостоприемника

Диарейното заболяване, причинено от ЕТЕС, варира от лека водниста диария до тежко животозастрашаващо холераподобно заболяване както при деца, така и при възрастни [36]. Диарията, причинена от ЕТЕС, не може да бъде разграничена от тази, причинена от *Vibrio cholerae* само по клинични показатели. Други симптоми, включително коремни спазми, са чести, докато треска и повръщане се срещат средно в около 10% или по-малко от случаите [37]. Диарията, причинена от ЕТЕС, може да бъде кратка или да е продължителна от 1 до 2 седмици. Диарийно заболяване, продължаващо повече от 4 дни, при което повръщането не е преобладаващ симптом, трябва да насочи клинициста и микробиолога към ЕТЕС инфекция [38]. Диарията, причинена от ЕТЕС, се описва класически като водниста без поява на кръв или слуз в изпражненията. Макар

че класически инфекциите с ЕТЕС първоначално са свързвани с причиняване на „невъзпалителна“ диария, тази гледна точка може да не е напълно точна. Всъщност, симптоматичните ЕТЕС инфекции предизвикват значителни фекални реакции на лактоферин, както и интерлевкин-8, които са сравними с тези, наблюдавани при инфекции със *Salmonella*. При проучвания на ЕТЕС при пътници с диария, приблизително една четвърт са имали фекални левкоцити, а близо при една трета са открита окултни изпражнения [39-41].

В допълнение, ЕТЕС и други патогени на диария са свързани с вредни последици, включително недохранване, забавяне на растежа и нарушено когнитивно развитие. Въпреки че оралната рехидратираща терапия е намалила значително смъртността, свързана с диария, чревните инфекции все още персистират, нарушавайки чревната абсорбция и бариерните функции и води до до 43% от забавянето на растежа, засягайки една пета от децата в света и една трета от децата в развиващите се страни. Диарията при деца от бедни райони през първите им 2 години може да причини средно 8 см недостиг в растежа до навършване на 7-9 години. [4, 5].

Децата с антигени на кръвна група А или АВ изглежда са малко по-податливи на развитие на симптоматични ЕТЕС инфекции, отколкото тези на кръвна група О, което предполага генетична предразположеност към развитие на симптоматични ЕТЕС инфекции [42]. По същия начин децата, експресиращи кръвна група а на Люис (Lea+b-), за която се смята, че е рецептор за СФА/І антиген на колонизиращия фактор (СФА – Colonization Factor Antigen), са по-податливи на диария, причинена от ЕТЕС, експресираща СФА/І [43]. Като се има предвид геномното разнообразие на ЕТЕС и сложните взаимодействия между тези организми и гостоприемника е вероятно да има много такива човешки полиморфизми, които биха могли да предразположат към развитие (или превенция) на симптоматични ЕТЕС инфекции. Те включват мутации във вродени имунни ефекторни молекули, които контролират ЕТЕС, както е илюстрирано от идентифицирането на еднонуклеотидни полиморфизми (SNPs) в човешкия лактоферинов ген сред пътници със симптоматична ЕТЕС инфекция, както и SNPs в CD14, липополизахариден рецептор, който се индуцира при диария на пътниците [44]. Интересно е, че полиморфизмите, свързани с по-високи нива на интерлевкин (IL-10), противовъзпалителен цитокин, са свързани с повишен риск от симптоматична ЕТЕС инфекция.

Усложнения

Най-честото сериозно усложнение на диарията от ЕТЕС е дълбоката дехидратация. Особено сред малките деца, ЕТЕС и ротавирусът допринасят непропорционално за епизоди на животозастрашаваща дехидратация в развиващите се страни. По същия начин, сред по-големите деца и възрастни в развиващите се и развити страни, две групи патогени, ЕТЕС и *Vibrio cholerae*, най-често се свързват с тежко заболяване, изискващо хоспитализация. Друг по-опасен, но важен ефект от диария, причинена от ЕТЕС, е забавеното развитие в детството. Връзката между инфекциозни диарийни заболявания и недोхранването е сложна, с множество проучвания, предполагащи диария, причинена от ЕТЕС и други патогени като причина и следствие от недохранване [45, 46]. Повтарящите се пристъпи на диария в детството са свързани със значително забавяне на развитието или забавяне на растежа. Освен това изглежда, че недохранването поставя децата в значително повишен риск за развитието на диария, причинена от ЕТЕС. В допълнение, децата с диария, дължаща се на ЕТЕС, са склонни да имат по-тежка диария, когато са недохранени [45].

Малък процент от пациентите с диария след пътуване ще изпитат хронични симптоми, продължаващи месеци до години. Патогенезата на тези вероятно постинфекциозни последици, наричани постинфекциозен синдром на раздразненото черво, е несигурна. Независимо от това, характерните нискостепенни възпалителни промени в лигавицата могат да предполагат продължаващ неблагоприятен отговор на предходната инфекция [47]. Едно проучване на повече от 500 пътници в Израел документира 5-кратно увеличение на риска от IBS при тези, които са развили диария в сравнение с тези, които са останали безсимптомни [28]. Като се има предвид преобладаването на ентеротоксигенната *E. coli* като причина за диария при пътешествениците, не е напълно изненадващо, че поне едно проучване свързва ЕТЕС с развитието на IBS. Интригуващо обаче е, че асоциацията е само с ЕТЕС, произвеждащ LT, но не и с други ЕТЕС.

Постинфекциозни синдроми на малабсорбция, забавяне на растежа и когнитивно увреждане

Първите описания на индивиди със синдроми на малабсорбция в тропиците датират отпреди повече от 250 години, по-късно наречени подобни заболявания като „тропическа спру“ [29]. Тропическата спру от тогава е синоним на постинфекциозни синдроми

на малабсорбция, потенциално причинени от различни патогени, и се характеризира с притъпяване на тънките чревни въси, персистираща диария, стеаторея и дефицит на фолиева киселина и В12. Тропическата спру е ясно описана като последица от диария при пътуващи. И все пак, въпреки преобладаването на ЕТЕС като основна причина за диарията на пътниците и многократното изолиране на *E. coli*, произвеждаща токсини от аспириати на тънките черва на пациенти с тропическа спру, повечето от тези проучвания са направени преди появата на молекулярни техники, използвани днес. Въпреки че клиничният отговор към антибиотиците при пациенти с тропическа спру също подкрепя възможна бактериална етиология, които ясно установяват пряка връзка между ЕТЕС и развитието на тропическа спру [30-33].

Патогенеза

ЕТЕС колонизира повърхността на лигавицата на тънките черва и изработват ентеротоксини, които водят до чревна секреция. Колонизацията се подпомага от един или повече фимбриални протеина или фимбриларни колонизиращи фактори (*CFs – Fibrillar Colonization Factors*), които са обозначени с антиген на колонизиращия фактор (*CFA – Colonization Factor Antigen*), coli повърхностен антиген (*CS-coli surface antigen*) или предполагаем фактор на колонизация (*PCF – Putative olonization Factor*). Има повече от 20 антигенно разнообразни CF характеризирани, но епидемиологични проучвания показват, че приблизително 75% от човешкия ЕТЕС експресират или CFA/I, CFA/II или CFA/IV51. Антителата срещу CFAs могат да подобрят колонизацията и заболяването на ЕТЕС. ЕТЕС също са важна причина за диарийно заболяване при животните и тези животински щамове изразяват фактори на фимбриална чревна колонизация, като K88 и K99, които не се срещат в човешки щамове ЕТЕС.

Клетъчно действие на ентеротоксини

Гените, кодиращи топлинно лабилни и термостабилни токсини, са кодирани върху вирулентни плазмиди и са сред първите бактериални фактори на вирулентност, които са клонирани, секвенирани и характеризирани на молекулярно ниво. Всъщност тези ранни открития формират основата на използваните в момента анализи за молекулярно откриване. LT споделя значителна хомология с холерния токсин (СТ) и подобно на СТ, LT е хетеродимер, съставен от една А субединица и пентамерна В субединица. LT се свързва чрез

пентамера с GM-1 ганглиозид на повърхността на чревните епителни клетки, последвано от поглъщане на токсина и освобождаване на биологично активната А субединица. LT и СТ принадлежат към голямо семейство бактериални АДФ-рибозилиращи токсини, които действат чрез прехвърляне на ADP-рибоза към целевите субстратни молекули. LT-A катализира ADP-рибозилирането на GS α , което води до образуването на ADP-рибоза-GS α -GTP комплекс, който активира аденилат циклаза, което води до образуването на сАМФ [7-12].

СТ се намира в две различни форми: STh и STp. И двете ST молекули са малки, богати на цистеин пептиди от 18-19 аминокиселини, които споделят хомология с естествени ендогенни пептиди, гуанилин и урогуанилин, и всичките четири от тези молекули се свързват с гуанилат циклаза на повърхността на чревния епител, което води до производството на цГМФ. И двата циклични нуклеотида цАМФ и цГМФ активират вътреклетъчните протеин кинази, които водят до фосфорилиране и промяна на йонните канали, включително хлоридния канал на трансмембрания регулатор на кистозна фиброза (CFTR), и инхибиране на Na⁺/H⁺ обмяна NHE3, чийто чист ефект е натрупването на сол и вода в чревния лумен, което води до водниста диария.

ЕТЕС, секретиращ някой от известните токсини, разчита на хромозомно кодирани секреторни системи. LT се секретира от система за секреция тип 2, подобна на тази, отговорна за екскреция на СТ от *V. cholerae*, докато STh и STp се секретират чрез транспортен протеин на външната мембрана на TolC [13-17].

Колонизационни фактори

ЕТЕС експресират широк спектър от кодирани с плазмид молекули или структури, общо известни като колонизационни фактори (CFs), които улесняват чревната колонизация. Първият от тях, CFA/I, е открит малко след откриването на ЕТЕС като причина за диария. Оттогава са охарактеризирани повече от 20 антигенно различни CFs и нови CFs продължават да се появяват, тъй като секвенирането на целия геном (WGS) се прилага към щамове без предварително характеризирани антигени. Въпреки че някъде от изолатите нямат идентифицируем CF, използвайки CF-специфични моноклонални антитела за откриване на антиген, WGS анализът на щамове, характеризирал по-рано като липса на известен CF, предполага, че повечето от съответните геноми кодират нови или нехарактеризирани преди това CF [18-20].

Фактори на вирулентност

Въпреки че повечето проучвания на патогенезата на ЕТЕС досега са съсредоточени около класическите плазмид-кодирани антигени, които са открити преди почти пет десетилетия, по-новите проучвания показват, че молекулярната патогенеза на тези организми е значително по-сложна. Интересно е, че ентусиазмът за насочване към CFs във ваксините е породен от изследване на щам ЕТЕС, който е загубил CFA/I вирулентен плазмид, тъй като този изолат, H10407-P, не причинява диария в клинични проучвания сред доброволци, докато родителският щам изолиран от случай на заболяване, подобно на холера, предсказуемо предизвиква профузна диария [21].

По-новите проучвания обаче показват, че в допълнение към CFA/I, този голям плазмид носи поне два допълнителни локуса на вирулентност, първоначално открити чрез транспозонова мутагенеза при търсене на нови секретирани антигени. Генът *eatA* кодира **EatA**, член на автотранспортера на серинова протеаза от семейството на *Enterobacteriaceae*, докато локусът *etpBAC* кодира екстрацелуларния адхезин EtpA, транспортния протеин на външната мембрана на EtpB и EtpC гликозилната трансфераза [22]. Секретираният домен EatA (~ 110 kD) съдържа последователност на серинова протеаза и е силно имуногенен. Последните данни предполагат, че EatA може да подобри достъпа на ЕТЕС до чревните епителни клетки чрез разграждане на MUC2, основният муцин, секретирани от чревните бокаловидни клетки. В допълнение към разграждането на MUC2, EatA също разгражда EtpA, потенциално предотвратявайки натрупването на адхезин [23].

EtpA е голям (~ 170 kD) гликопротеин, който се секретира от ЕТЕС. Веднъж секретирани, EtpA изглежда функционира като молекулен мост, свързващ краищата на ЕТЕС флагела с N-ацетилгалактозамин (GalNAc), съдържащ гликани, експресирани върху повърхностите на чревната лигавица. Въпреки че GalNAc е в изобилие в чревния муцин, лектинът EtpA има най-висок афинитет към GalNAc, представен като крайна захар на гликани от кръвна група А. Тъй като тези гликани се експресират върху чревни епителни клетки, EtpA-медираните взаимодействия насърчават бактериалната адхезия към гликаните и следователно доставянето на токсини в тънките чревни ентероцити при индивиди от кръвна група А. Тези взаимодействия, зависими от кръвната група, могат да се превърнат в по-тежко заболяване сред експерименти с хора от кръвна група А и естествено заразени деца в ендемични региони [24-26].

Докато всички патовар-специфични вирулентни молекули за ЕТЕС, описани до момента, са кодирани върху плазмиди, очевидно е, че те действат съвместно с високо запазени хромозомно кодирани характеристики, които са част от консервативни геноми на *E. coli*. Те включват фимбрии тип 1, EaeH адхезин, повърхностно експресирани автотранспортни протеини и YghJ металопротеаза. Координираното взаимодействие на тези основни и специфични за патовар характеристики в крайна сметка води до ефективни взаимодействия патоген-гостоприемник, необходими за оптимално доставяне на ЕТЕС токсини. ЕТЕС обикновено се идентифицират чрез молекулярно тестване за техните токсини. Въпреки това е ясно, че признаците на вирулентност на патогена и характеристиките на гостоприемника, свързани с по-тежко заболяване, подобно на холера, все още се дефинират. Наличните понастоящем молекулярни методи, включително секвениране на патогени в целия геном, също служат за илюстриране, че ЕТЕС не е статичен патоген и че тези патогени вероятно са част от динамична и продължаваща смес от потенциални гени за вирулентност [5, 27].

Диагностика

Идентифицирането на ЕТЕС в клинични проби разчита на откриването на термолабилни и/или термостабилни токсини във фекални изолати на *E. coli*. Докато редица функционални или физиологични анализи са били използвани в миналото за идентифициране на бактерии, произвеждащи токсини, те до голяма степен са изместени от имунологични или молекулярно-базирани методи. PCR, ДНК сонди за гени, кодиращи ST и LT, ELISA анализи както за LT, така и за ST се използват за откриване на токсини в условия на клинични изследвания, с мултиплекс PCR за LT, STa, STb се очертава като предпочитан анализ за идентифициране на ЕТЕС.

За съжаление, нито един от настоящите анализи не се извършва рутинно в клинични лаборатории, нито самостоятелни микробиологични диагностични лаборатории в България. Разчита се само на културелни методи и ограничените възможности на серотипирането на изолата с различен набор от анти-Е. коли серуми, които са удачни за диагностика и типизиране в епидемични случаи, но недостатъчни за рутинната диагностика. Бързите имунохроматографски тестове за доказване на токсините на ЕТЕС в проба фецес и/или в изолат, могат лесно да се прилагат за диагностициране на инфекциите, като са лесни за изпълнение и същевременно сравнително евтини.

Терапия

Не се препоръчва използването на антимикробни препарати за лечение на ЕТЕС диарии с изключение на тежките случаи на продължителна диария, при имунокомпроментирани и възрастни лица (>65 г.), лица със съпроводителни тежки инфекции и рядко при деца. Диарията на пътуващите, причинена от ЕТЕС, се лекува с антибиотици със или без допълнително симптоматично лечение със лоперамиди [48]. Антибиотиците, които в момента се използват при възрастни с диарията на пътуващите, включват флуорохинолони, азитромицин и напоследък рифаксимин. Азитромицинът е единственият антимикробен препарат, който в момента се препоръчва за употреба при деца. Като цяло, когато са активни срещу щамове-причинители на инфекцията, всички тези антимикробни препарати изглежда съкращават продължителността на диарията с приблизително 48 часа. Рифаксимин, неабсорбируем рифамицин антибиотик, изглежда еквивалентен на флуорохинолони и азитромицин за лечение на чувствителни ЕТЕС щамове, без системни странични ефекти. Появяващата се резистентност към трите антибиотика с течение на времето ще остане проблем [49]. Повечето проучвания показват умерена или никаква полза от добавянето на лоперамид към антимикробната терапия при възрастни с диария на пътуващите, докато употребата на лоперамид не е препоръчителна при малки деца поради опасения за потенциална депресия на ЦНС [50, 51]. При тежко заболяване, подобно на холера, особено при малки деца в развиващите се страни, лечението на ЕТЕС инфекции трябва да се съсредоточи първо върху рехидратация. Тези с данни за тежка дехидратация изискват първоначално лечение с интравенозни течности, последвано от орална рехидратираща терапия (ОРТ), докато по-леките форми на заболяване могат да бъдат лекувани само с ОРТ. За разлика от възрастните пътници, антимикробното приложение при ЕТЕС диария при деца не е добре проучено.

Имунен отговор. Вроден и придобит имунитет към ЕТЕС

Вроден имунен отговор. ЕТЕС инфекции стимулират производството на провъзпалителни цитокини, включително интерлевкин-8, мощен хемоатрактант за полиморфонуклеарни левкоцити. Интересно е, че повишените фекални нива на IL-8 са свързани с по-бързото справяне с инфекциите с ЕТЕС, което предполага, че този елемент на вродения имунитет е от значение за изчистването на патогените от тънките черва. Последните проучвания показват, че LT играе роля

в насърчаването на чревната колонизация от ЕТЕС [52, 53]. Един възможен начин, чрез който LT може да повлияе на колонизацията, е чрез намеса във вродените имунни ефектори на повърхността на лигавицата. Интересно е, че повишаването на цАМФ инхибира активирането на редица цитокини, включително TNF α и IL-8, както и на чревни антимикробни пептиди, включително бета-дефензин-1 и кателицидин чрез намеса в NF- κ B-медирана модулация на свързани с патогена модели на молекулярни отговори [54, 55].

Придобит имунни отговори към ЕТЕС. Множество проучвания са документирали свързано с възрастта намаляне на честотата на симптоматични ЕТЕС инфекции, което силно предполага, че естествените инфекции осигуряват значителна защита срещу последващи епизоди на заболяване. Повечето проучвания на имунните отговори към ЕТЕС са съсредоточени върху отговорите на CFs (фимбриларни колонизиращи фактори) и LT. Въпреки това, точната природа на защитните антигени след ЕТЕС инфекции не е изяснена. Докато някои проучвания предполагат, че инфекцията със щамове, експресиращи определен CF, е защитна срещу последваща инфекция със щамове, експресиращи хомоложни CFs, други проучвания не успяха да демонстрират ясна връзка с CF антигените и защитата и са включили други все още неопределени антигени като възможни източник на защита [56, 57]. По същия начин, няма стабилена серологичен корелация на имунен отговор от проведените до момента проучвания. Очевидно, имунният отговор към ЕТЕС е изключително сложен и включва разпознаване на множество антигени в допълнение към LT и CFs, включително по-скоро открити антигени като EtpA adhesin и EatA autotransporter [58].

Епидемиология на ЕТЕС

Както в развиващите се, така и в индустриализираните страни, ЕТЕС инфекции се предават чрез замърсена храна или вода. Както епидемиологичните, така и лабораторно-клинични проучвания с доброволци показват, че инокулумът на ЕТЕС, необходим за установяване на заболяване при здрави индивиди, е относително висок и че предаването от човек на човек е рядко [59, 60]. Докато само 108 CFU от използвания в повечето клинични проучвания с доброволци щам ЕТЕС H10407, води до умерена или тежка диария при повечето изпитвани лица, то действителната инфекциозната доза, необходима за установено заболяване в развиващите се страни може да бъде с пъти по-ниска поради общият занижен здравен и имунен статус на това население [61, 62].

ЕТЕС често се откриват в изпражненията на малки деца в развиващия се свят без диария, явление, което значително обърка скоростните оценки за заболяемостта и смъртността, дължащи се на тези патогени. Въпреки това, някои проучвания предполагат, че носителството на ЕТЕС и други патогени може да е достатъчно, за да предизвика промени, свързани с ентеропатия и недохранване. По същия начин, последните проучвания предполагат, че когнитивното увреждане, свързано с патогени на диария, е свързано с носителство на ентеропатоген дори при липса на диария, което отново предполага, че субклиничните инфекции могат да допринесат за ентеропатия. Ясно е, че връзката между недохранването и забавянето на растежа с инфекция от редица ентеропатогени е сложна и неотдавнашната демонстрация на свръхрастеж на тънките черва. Забележително е обаче, че тези проучвания също демонстрират увеличение на възможните ентеропатогенни родове, дефинирани като *E. coli/Shigella* чрез секвениране на 16S rRNA, което предполага, че представлява краен резултат от редица увреждания на епитела на тънките черва [34-35].

Контрол и превенция

Разработване на ваксини ЕТЕС. Въпреки десетилетия усилия за разработване на ваксини ЕТЕС, понастоящем няма ваксина срещу тези патогени, която да демонстрира трайна, широкообхватна защита в която и да е от рисковите целеви групи, най-вече деца в развиващите се страни. Усилията на ваксинологията досега са се фокусирали върху ограничен брой антигени, предимно CFs, LT и напоследък ST анатоксини. Тази стратегия се опитва да постигне широко покритие чрез включване на най-широко разпространените CF и предизвикване на токсин-неутрализиращ имунитет. За съжаление, антигенна хетерогенност и пластичността, присъщи на геномите на *E. coli*, комбинирани в рамките на пълната защита, осигурена от LT и лошата присъща имуногенност на ST пептидите, възпрепятстват напредъка към широко защитна ваксина [63]. Тази стратегия е допълнително объркана от липсата на идентифицируеми антигени на CF в значителна част от щамовете и както географски, така и времеви вариации в преобладаващите CF антигени [64]. В допълнение, епидемиологични проучвания, които потвърждават значителен защитен ефект след естествени ЕТЕС инфекции, предполагат, че LT и други неизследвани антигени, а не CFs [57] могат да стимулират защитните имунни отговори. Перорална ваксина,

състояща се от рекомбинантна субединица на холерен токсин В, комбинирана със смес от убити ЕТЕС, експресиращи различни СF антигени, индуцирани имунни отговори към СFs, осигури защита срещу тежко диарийно заболяване от ЕТЕС при пътници [65], но не успя за защита на децата в ендемични райони, въпреки имуногенността [66, 67]. По същия начин, компилация от три живи атенюирани щамове, експресиращи шест различни СF антигена и ЛТВ предизвика значителни имунни отговори към целеви антигени при доброволци, но предлага само скромна защита при клинични предизвикателства (NCT01060748) [68, 69]. Забележително е, че транскутаната имунизация (TCI) с термолабилен токсин е доказано, че предизвиква значителни имунни отговори към ЛТ в проучвания на доброволци и към коимуногени в експериментални проучвания върху животни [70, 71]. Тази стратегия може да се окаже полезна при следващите итерации на ЕТЕС ваксини, които включват допълнителни антигени. Взети заедно, тези проучвания показват, че анти-СF и/или анти-ЛТ имунитетът може да не предлага достатъчно стабилна защита и че може да се наложи да бъдат включени допълнителни антигени, съчетани с технология за генериране на безопасни и ефективни ST токсиди в бъдеща стратегии за разработка на ваксини ЕТЕС.

Геномен анализ и разнообразие на ЕТЕС

ЕТЕС щамовете са генетично и серотипно разнообразен патоген на *E. coli*, дефиниран от производството на топлинно лабилни (LT) и/или термостабилни (ST) ентеротоксини, които активират производството на циклични нуклеотиди на гостоприемника за промяна на чревния транспорт на сол и вода, който кулминира в нетни загуби на течности и секреторна диария [13, 14].

Първите два ЕТЕС генома, E24377A и B7A, са секвенирани през 2008 г. като част от анализ на пангенома на *E. coli* [72]. Сравнителен геномен анализ на завършения геном на *E. coli* E24377A демонстрира че изолатът съдържа шест плаزمиди, няколко от които кодират известните ЕТЕС фактори на вирулентност. Анализът също така идентифицира ограничен брой характеристики, които изглеждат са уникални за ЕТЕС. И двата ЕТЕС генома са групирани във филогрупата B1, но е известно, че ЕТЕС изолати заемат по-голямо място филогенетичното пространство, отколкото само групата B1. През 2010 г. авторите секвенирали прототипният ЕТЕС изолат е H10407, стигнали до заключението, че H10407, който попада в *E. coli*

филогрупа А, е коменсален изолат, придобил вирулентни плазмиди и се превърща в човешки патоген. [73]. Много от гените за вирулентност (*cexE*, *tibA*, *tia*) широко свързани с ЕТЕС са идентифицирани в Н10407. Въпреки това, сравнителни проучвания показват, че някои от тези гени за вирулентност не са широко разпространени в различни ЕТЕС изолати и по този причина не е удачно разработването на ваксина [74]. Транскрипционен анализ на ЕТЕС изолати Е24377А и Н10407 демонстрира, че транскрипционният отговор се различават значително в присъствието на химически сигнали, като например глюкоза и жлъчни соли. Този резултат доказва, че използването на единичен прототипен изолат е недостатъчно за описване на геномното разнообразие или патогенезата на ЕТЕС. Като част от голямо проучване, профилите за типирание на мултилокусна последователност (MLST) са идентифицирани от 1019 ЕТЕС изолата [75]. От този анализ са секвенирани и анализирани пет изолата от най-доминиращите типове последователности. Анализът на целия геном показва, че тези геноми попадат във филогрупи В1 и А. Сравнителният геномен анализ показва, че ЕТЕС геномите споделят повече хромозомни последователности един с друг, отколкото с не-ЕТЕС геноми на *E. coli* [76]. В едно изследване на голям брой клинични ЕТЕС изолати са секвенирани 71 ЕТЕС изолата; 38 изолата са от пациенти с остро диарийно заболяване и 33 изолата са от пациенти без симптоми на диария [77]. Филогенезата на целия геном показва, че ЕТЕС се разпределят във филогенезата на *E. coli*. Този резултат не е неочакван, тъй като придобиването на **вирулентния плазмид**, който съдържа LT и/или ST гените, е всичко, което се изисква, за да бъде въведен като ЕТЕС. Сравнителен анализ на свързани с диария и асимптоматични изолати показва, че няколко гена са диференциално запазени във всяка група, независимо от принадлежността им към филогрупата. Освен това е извършен анализ, чрез който геномното съдържание на ЕТЕС и не-ЕТЕС геноми във филогрупи А и В1 са сравнени. Неплазмидни гени са диференциално запазени в ЕТЕС изолати. Следователно, геномен фон в ЕТЕС изглежда съществува отвъд простото придобиване и експресия на ЕТЕС вирулентен плазмид. Допълнителни мащабни проекти са в ход със секвениране на стотици изолати, което ще промени разбирането на еволюцията на ЕТЕС, състава на гени и патогенезата. Геномните сравнителни анализи идентифицират предполагаеми фактори на вирулентност, които ще помогнат да се фокусират проучванията за функционална характеристика. Глобалното разбиране на геномното разнообразие

на цял патовар ще помогне да се премине отвъд ограниченията на единични изолирани, прототипни анализи. С тези видове изследвания в ход може да се прилагат епидемиологични принципи за идентифициране на геномни региони, които са свързани с изолати от здрави, колонизирани и заболели лица от ЕТЕС инфекции, така наречена геномна епидемиология.

Въпреки че ЕТЕС са открити преди повече от 40 години, нашето сегашно разбиране за патогенезата на тези важни патогени остава недостатъчно и идеалните подходи за разработване на ваксини все още не са напълно дефинирани. Въпреки присъщата пластичност на тези патогени, последните открития на относително запазени нови фактори на вирулентност трябва да предоставят допълнителни възможности за изследване и подходи за разработване на ефективна ваксина.

Източници:

1. Liu L, Johnson HL, Cousens S, et al., for the Child Health Epidemiology Reference Group of WHO UNICEF Global, regional, and national causes of child mortality: an updated systematic analysis for 2010 with time trends since 2000. *Lancet*. 2012; 379: 2151-2161.
2. Shah N, DuPont HL, Ramsey DJ. 2009. Global etiology of travelers' diarrhea: systematic review from 1973 to the present. *Am J Trop Med Hyg* 80:609–614.
3. Beatty ME, Adcock PM, Smith SW, Quinlan K, Kamimoto LA, Rowe SY, Scott K, Conover C, Varchmin T, Bopp CA, Greene KD, Bibb B, Slutsker L, Mintz ED. 2006. Epidemic diarrhea due to enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Clin Infect Dis* 42:329 –334.
4. Guerrant RL, DeBoer MD, Moore SR, Scharf RJ, Lima AA. 2013. The impoverished gut – a triple burden of diarrhoea, stunting and chronic disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 10:220 –229.
5. Fleckenstein, J.M., Kuhlmann, F.M. Enterotoxigenic *Escherichia coli* Infections. *Curr Infect Dis Rep* 21, 9 (2019).
6. Carpenter CC, Barua D, Wallace CK, Sack RB, Mitra PP, Werner AS, Duffy TP, Oleinick A, Khanra SR, Lewis GW. 1965. Clinical and physiological observations during an epidemic outbreak of non-vibrio cholera-like disease in Calcutta. *Bull World Health Organ* 33:665–671.
7. So M, Boyer HW, Betlach M, Falkow S. Molecular cloning of an *Escherichia coli* plasmid determinant that encodes for the production of heat-stable enterotoxin. *J Bacteriol*. 1976;128(1):463–72.

8. So M, Dallas WS, Falkow S. Characterization of an *Escherichia coli* plasmid encoding for synthesis of heat-labile toxin: molecular cloning of the toxin determinant. *Infect Immun*. 1978;21(2):405–11.
9. Moseley SL, Samadpour-Motalebi M, Falkow S. Plasmid association and nucleotide sequence relationships of two genes encoding heat-stable enterotoxin production in *Escherichia coli* H-10407. *J Bacteriol*. 1983;156(1):441–3.
10. Gyles C, So M, Falkow S. The enterotoxin plasmids of *Escherichia coli*. *J Infect Dis*. 1974;130(1):40–9.
11. Dallas WS, Falkow S. Amino acid sequence homology between cholera toxin and *Escherichia coli* heat-labile toxin. *Nature*. 1980;288(5790):499–501.
12. Simon NC, Aktories K, Barbieri JT. Novel bacterial ADP-ribosylating toxins: structure and function. *Nat Rev Microbiol*. 2014;12(9):599–611.
13. Taxt AM, Diaz Y, Aasland R, Clements JD, Nataro JP, Sommerfelt H, et al. Towards Rational Design of a Toxoid Vaccine against the Heat-Stable Toxin of *Escherichia coli*. *Infect Immun*. 2016;84(4):1239–49.
14. Chen T, Kocinsky HS, Cha B, Murtazina R, Yang J, Tse CM, et al. Cyclic GMP kinase II (cGKII) inhibits NHE3 by altering its trafficking and phosphorylating NHE3 at three required sites: identification of a multifunctional phosphorylation site. *J Biol Chem*. 2015;290(4):1952–65.
15. Tauschek M, Gorrell RJ, Strugnell RA, Robins-Browne RM. Identification of a protein secretory pathway for the secretion of heat-labile enterotoxin by an enterotoxigenic strain of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(10):7066–71.
16. Yamanaka H, Nomura T, Fujii Y, Okamoto K. Need for TolC, an *Escherichia coli* outer membrane protein, in the secretion of heat-stable enterotoxin I across the outer membrane. *Microb Pathog*. 1998;25(3):111–20.
17. Zhu Y, Luo Q, Davis SM, Westra C, Vickers TJ, Fleckenstein JM. Molecular Determinants of Enterotoxigenic *Escherichia coli* Heat-Stable Toxin Secretion and Delivery. *Infect Immun*. 2018;86(11).
18. Isidean SD, Riddle MS, Savarino SJ, Porter CK. A systematic review of ETEC epidemiology focusing on colonization factor and toxin expression. *Vaccine*. 2011;29(37):6167–78
19. Qadri F, Das SK, Faruque ASG, Fuchs GJ, Albert MJ, Sack RB, et al. Prevalence of toxin types and colonization factors in Enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated during a 2-year period from diarrheal patients in Bangladesh. *J Clin Microbiol*. 2000;38(1):27–31.
20. Sahl JW, Sistrunk JR, Baby NI, Begum Y, Luo Q, Sheikh A, et al. Insights into enterotoxigenic *Escherichia coli* diversity in Bangladesh utilizing genomic epidemiology. *Sci Rep*. 2017;7(1):3402.

21. Satterwhite TK, Evans DG, DuPont HL, Evans DJ Jr. Role of *Escherichia coli* colonisation factor antigen in acute diarrhoea. *Lancet*. 1978;2(8082):181–4.
22. Fleckenstein JM, Roy K, Fischer JF, Burkitt M. Identification of a two-partner secretion locus of enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Infect Immun*. 2006;74(4):2245–58.
23. Kumar P, Luo Q, Vickers TJ, Sheikh A, Lewis WG, Fleckenstein JM. EatA, an immunogenic protective antigen of Enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Degrades Intestinal Mucin Infect Immun*. 2014; 82(2):500–8
24. Arike L, Holmen-Larsson J, Hansson GC. Intestinal Muc2 mucin O-glycosylation is affected by microbiota and regulated by differential expression of glycosyltransferases. *Glycobiology*. 2017;27(4):318–28.
25. Kumar P, Kuhlmann FM, Chakroborty S, Bourgeois AL, Foulke-Abel J, Tumala B, et al. Enterotoxigenic *Escherichia coli* blood group a interactions intensify diarrheal severity. *J Clin Invest*. 2018;128:3298–311.
26. Kumar P, Kuhlmann FM, Bhullar K, Yang H, Vallance BA, Xia L, et al. Dynamic interactions of a conserved Enterotoxigenic *Escherichia coli* Adhesin with intestinal mucins govern epithelium engagement and toxin delivery. *Infect Immun*. 2016;84(12):3608–17.
27. Dorsey FC, Fischer JF, Fleckenstein JM. Directed delivery of heat-labile enterotoxin by enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Cell Microbiol*. 2006;8(9):1516–27.
28. Stermer E, Lubezky A, Potasman I, Paster E, Lavy A. Is traveler’s diarrhea a significant risk factor for the development of irritable bowel syndrome? A prospective study. *Clin Infect Dis*. 2006;43(7):898–901.
29. Manson P. Imperial Maritime Customs II-special series 2. Medical reports for the first half year ended 31st March 188–0. 19th issue. Shanghai: Statistical department of the Inspectorate General 1880. 1880.
30. Klipstein FA, Falaiye JM. Tropical sprue in expatriates from the tropics living in the continental United States. *Medicine (Baltimore)*. 1969;48(6):475–91.
31. Lindenbaum J, Gerson CD, Kent TH. Recovery of small-intestinal structure and function after residence in the tropics. I. Studies in peace corps volunteers. *Ann Intern Med*. 1971;74(2):218–22.
32. Klipstein FA. Tropical sprue in travelers and expatriates living abroad. *Gastroenterology*. 1981;80(3):590–600.
33. Falkow S. Molecular Koch’s postulates applied to bacterial pathogenicity—a personal recollection 15 years later. *Nat Rev Microbiol*. 2004;2(1):67–72.
34. Rogawski ET, Liu J, Platts-Mills JA, Kabir F, Lertsethtakarn P, Sigua M, et al. Use of quantitative molecular diagnostic methods to investigate the effect of enteropathogen infections on linear growth in

- children in low-resource settings: longitudinal analysis of results from the MAL-ED cohort study. *Lancet Glob Health*. 2018;6(12):e1319–e28.
35. Vonaesch P, Morien E, Andrianonimiadana L, Sanke H, Mbecko JR, Huus KE, et al. Stunted childhood growth is associated with decompartmentalization of the gastrointestinal tract and overgrowth of oropharyngeal taxa. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2018;115:E8489–98.
 36. Vicente, A.C., Teixeira, L.F., Iniguez-Rojas, L., et al., 2005. Outbreaks of cholera-like diarrhoea caused by enterotoxigenic *Escherichia coli* in the Brazilian Amazon Rainforest. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 99 (9), 669–674.
 37. Porter, C.K., Riddle, M.S., Tribble, D.R., et al., 2011. A systematic review of experimental infections with enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC). *Vaccine* 29 (35), 5869–5885.
 38. Bolin, I., Wiklund, G., Qadri, F., et al., 2006. Enterotoxigenic *Escherichia coli* with STh and STp genotypes is associated with diarrhea both in children in areas of endemicity and in travelers. *J. Clin. Microbiol.* 44 (11), 3872–3877.
 39. Mercado, E.H., Ochoa, T.J., Ecker, L., et al., 2011. Fecal leukocytes in children infected with diarrheagenic *Escherichia coli*. *J. Clin. Microbiol.* 49 (4), 1376–1381.
 40. Greenberg, D.E., Jiang, Z.D., Steffen, R., Verenker, M.P., DuPont, H.L., 2002. Markers of inflammation in bacterial diarrhea among travelers, with a focus on enteroaggregative *Escherichia coli* pathogenicity. *J. Infect. Dis.* 185 (7), 944–949.
 41. Bouckennooghe, A.R., Dupont, H.L., Jiang, Z.D., et al., 2000. Markers of enteric inflammation in enteroaggregative *Escherichia coli* diarrhea in travelers. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 62 (6), 711–713.
 42. Qadri, F., Saha, A., Ahmed, T., Al Tarique, A., Begum, Y.A., Svennerholm, A.M., 2007. Disease burden due to enterotoxigenic *Escherichia coli* in the first 2 years of life in an urban community in Bangladesh. *Infect. Immun.* 75 (8), 3961–3968.
 43. Ahmed, T., Lundgren, A., Arifuzzaman, M., Qadri, F., Teneberg, S., Svennerholm, A.M., 2009. Children with the Le(a+b-) blood group have increased susceptibility to diarrhea caused by enterotoxigenic *Escherichia coli* expressing colonization factor I group fimbriae. *Infect. Immun.* 77 (5), 2059–2064.
 44. Mohamed, J.A., DuPont, H.L., Flores, J., et al., 2011. Single nucleotide polymorphisms in the promoter of the gene encoding the lipopolysaccharide receptor CD14 are associated with bacterial diarrhea in US and Canadian travelers to Mexico. *Clin. Infect. Dis.* 52 (11), 1332–1341.
 45. Mondal, D., Minak, J., Alam, M., et al., 2012. Contribution of enteric infection, altered intestinal barrier function, and maternal

- malnutrition to infant malnutrition in Bangladesh. *Clin. Infect. Dis.* 54 (2), 185–192.
46. Ricci, K.A., Girosi, F., Tarr, et al., 2006. Reducing stunting among children: the potential contribution of diagnostics. *Nature* 444 (Suppl. 1), 29–38.
 47. Connor, B.A., 2005. Sequelae of traveler's diarrhea: focus on postinfectious irritable bowel syndrome. *Clin. Infect. Dis.* 41 (Suppl. 8), S577–586.
 48. DuPont, H.L., 2007. Therapy for and prevention of traveler's diarrhea. *Clin. Infect. Dis.* 45 (Suppl. 1), S78–S84.
 49. Ouyang-Latimer, J., Jafri, S., VanTassel, A., et al., 2011. In vitro antimicrobial susceptibility of bacterial enteropathogens isolated from international travelers to Mexico, Guatemala, and India from 2006 to 2008. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 55 (2), 874–878.
 50. Butler, T., 2008. Loperamide for the treatment of traveler's diarrhea: broad or narrow usefulness? *Clin. Infect. Dis.* 47 (8), 1015–1016.
 51. Taylor, D.N., Sanchez, J.L., Candler, W., Thornton, S., McQueen, C., Echeverria, P., 1991. Treatment of travelers' diarrhea: ciprofloxacin plus loperamide compared with ciprofloxacin alone. A placebo-controlled, randomized trial. *Ann. Intern. Med.* 114 (9), 731–734.
 52. Long, K.Z., Rosado, J.L., Santos, J.I., et al., 2010. Associations between mucosal innate and adaptive immune responses and resolution of diarrheal pathogen infections. *Infect. Immun.* 78 (3), 1221–1228.
 53. Allen, K.P., Randolph, M.M., Fleckenstein, J.M., 2006. Importance of heat-labile enterotoxin in colonization of the adult mouse small intestine by human enterotoxigenic *Escherichia coli* strains. *Infect. Immun.* 74 (2), 869–875.
 54. Huang, D.B., DuPont, H.L., Jiang, Z.D., Carlin, L., Okhuysen, P.C., 2004. Interleukin-8 response in an intestinal HCT-8 cell line infected with enteroaggregative and enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 11 (3), 548–551.
 55. Chakraborty, K., Ghosh, S., Koley, H., et al., 2008. Bacterial exotoxins downregulate cathelicidin (hCAP-18/LL-37) and human beta-defensin 1 (HBD-1) expression in the intestinal epithelial cells. *Cell Microbiol.* 10 (12), 2520–2537.
 56. Qadri, F., Saha, A., Ahmed, T., Al Tarique, A., Begum, Y.A., Svennerholm, A.M., 2007. Disease burden due to enterotoxigenic *Escherichia coli* in the first 2 years of life in an urban community in Bangladesh. *Infect. Immun.* 75 (8), 3961–3968.
 57. Steinsland, H., Valentiner-Branth, P., Gjessing, H.K., Aaby, P., Molbak, K., Sommerfelt, H., 2003. Protection from natural infections with enterotoxigenic *Escherichia coli*: longitudinal study. *Lancet* 362 (9380), 286–291.

58. Roy, K., Bartels, S., Qadri, F., Fleckenstein, J.M., 2010. Enterotoxigenic *Escherichia coli* elicits immune responses to multiple surface proteins. *Infect. Immun.* 78 (7), 3027–3035.
59. Roels, T.H., Proctor, M.E., Robinson, L.C., Hulbert, K., Bopp, C.A., Davis, J.P., 1998. Clinical features of infections due to *Escherichia coli* producing heat-stable toxin during an outbreak in Wisconsin: a rarely suspected cause of diarrhea in the United States. *Clin. Infect. Dis.* 26 (4), 898–902.
60. Levine, M.M., Rennels, M.B., Cisneros, L., Hughes, T.P., Nalin, D.R., Young, C.R., 1980. Lack of person-to-person transmission of enterotoxigenic *Escherichia coli* despite close contact. *Am. J. Epidemiol.* 111 (3), 347–355.
61. Harro, C., Chakraborty, S., Feller, A., et al., 2011a. Refinement of a human challenge model for evaluation of enterotoxigenic *Escherichia coli* vaccines. *Clin. Vaccine Immunol. CVI* 18 (10), 1719–1727.
62. Potter, L.R., 2011. Guanylyl cyclase structure, function and regulation. *Cell Signal* 23 (12), 1921–1926.
63. Rasko, D.A., Rosovitz, M.J., Myers, G.S., et al., 2008. The pangenome structure of *Escherichia coli*: comparative genomic analysis of *E. coli* commensal and pathogenic isolates. *J. Bacteriol.* 190 (20), 6881–6893.
64. Isidean, S.D., Riddle, M.S., Savarino, S.J., Porter, C.K., 2011. A systematic review of ETEC epidemiology focusing on colonization factor and toxin expression. *Vaccine* 29 (37), 6167–6178.
65. Sack, D.A., Shimko, J., Torres, O., et al., 2007. Randomised, double-blind, safety and efficacy of a killed oral vaccine for enterotoxigenic *E. coli* diarrhoea of travellers to Guatemala and Mexico. *Vaccine* 25 (22), 4392–4400.
66. Walker, R.I., Steele, D., Aguado, T., 2007. Analysis of strategies to successfully vaccinate infants in developing countries against enterotoxigenic *E. coli* (ETEC) disease. *Vaccine* 25 (14), 2545–2566.
67. Savarino, S.J., Hall, E.R., Bassily, S., et al., 2002. Introductory evaluation of an oral, killed whole cell enterotoxigenic *Escherichia coli* plus cholera toxin B subunit vaccine in Egyptian infants. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 21 (4), 322–330.
68. Turner, A.K., Stephens, J.C., Beavis, J.C., et al., 2011. Generation and characterization of a live attenuated enterotoxigenic *Escherichia coli* combination vaccine expressing six colonization factors and heat-labile toxin subunit B. *Clin. Vaccine Immunol. CVI* 18 (12), 2128–2135.
69. Harro, C., Sack, D., Bourgeois, A.L., et al., 2011b. A combination vaccine consisting of three live attenuated enterotoxigenic *Escherichia coli* strains expressing a range of colonization factors and LTb is well tolerated and immunogenic in a placebo-controlled double-blind Phase I trial in healthy adults. *Clin. Vaccine Immunol. CVI* 18 (12), 2118–2127.

70. Frech, S.A., Dupont, H.L., Bourgeois, A.L., et al., 2008. Use of a patch containing heat-labile toxin from *Escherichia coli* against travellers' diarrhoea: a phase II, randomised, double-blind, placebo- controlled field trial. *Lancet* 371 (9629), 2019–2025.
71. Svennerholm, A.M., Lundgren, A., 2012. Recent progress toward an enterotoxigenic *Escherichia coli* vaccine. *Expert Rev. Vaccines* 11 (4), 495–507.
72. Rasko, D.A., Rosovitz, M.J., Myers, G.S., et al., 2008. The pangenome structure of *Escherichia coli*: comparative genomic analysis of *E. coli* commensal and pathogenic isolates. *J. Bacteriol.* 190 (20), 6881–6893.
73. Crossman, L.C., Chaudhuri, R.R., Beatson, S.A., et al., 2010. A commensal gone bad: complete genome sequence of the prototypical enterotoxigenic *Escherichia coli* strain H10407. *J. Bacteriol.* 192 (21), 5822–5831.
74. Turner, S.M., Chaudhuri, R.R., Jiang, Z.D., et al., 2006. Phylogenetic comparisons reveal multiple acquisitions of the toxin genes by enterotoxigenic *Escherichia coli* strains of different evolutionary lineages. *J. Clin. Microbiol.* 44 (12), 4528–4536.
75. Steinsland, H., Lacher, D.W., Sommerfelt, H., Whittam, T.S., 2010. Ancestral lineages of human enterotoxigenic *Escherichia coli*. *J. Clin. Microbiol.* 48 (8), 2916–2924.
76. Sahl, J.W., Steinsland, H., Redman, J.C., et al., 2011. A comparative genomic analysis of diverse clonal types of enterotoxigenic *Escherichia coli* reveals pathovar-specific conservation. *Infect. Immun.* 79 (2), 950–960.
77. Sahl, J.W., Rasko, D.A., 2012. Analysis of global transcriptional profiles of enterotoxigenic *Escherichia coli* isolate E24377A. *Infect. Immun.* 80 (3), 1232–1242.

ЕНТЕРОАГРЕГАТИВНИ *E. COLI* (ЕАЕС)

Мария Павлова

Ентероагрегативните *E. coli* (ЕАЕС) се характеризират с фенотипно прикрепване като „подредени тухли“ към клетките гостоприемници. Те са описани за първи път по време на изследвания на адхезия на *E. coli* към Нер-2 клетки, като са наблюдавани три различни модела на адхезия, които могат да бъдат описани като дифузни, локализирани и агрегирани модели. Така първата асоциация на ЕАЕС с диарийно заболяване е публикувана през 1987 г. като част от проспективно проучване на педиатрична диария [1]. Малко след това ЕАЕС се свързва с персистираща диария сред децата в отделни проучвания [2, 3]. ЕАЕС е патотип на DEC, дефиниран като *E. coli*, който не секретира термостабилните (ST) или топлолабилните (LT) токсини на ентеротоксигенната *Escherichia coli* (ЕТЕС) и които проявяват характерен агрегативен или модел на „натрупани тухли“ (AA) на прилепване към Нер2-клетки в култура. Бързото развитие на молекулярната микробиология води до нови дефиниции за ЕАЕС, но златният стандарт е моделът на адхезия върху клетъчните монослое. Типичният ЕАЕС се прилага за ЕАЕС щамове, притежаващи AggR регулон. Типичните ЕАЕС щамове са свързани с остра диария [4, 5]. Въпреки това, атипичните ЕАЕС нямат AggR регулон и не са надеждно свързани с диария. След първоначалното описание на ЕАЕС, те се очертават като важен патоген в няколко клинични сценария, включително диария на пътниците, ендемична педиатрична диария сред деца в развитите страни и развиващите се страни, както и персистираща диария сред HIV-инфектирани пациенти [6–9]. Мета-анализ показват, че ЕАЕС са причина за остра диария сред различни субпопулации както в развиващите се, така и в индустриализираните региони [10].

Епидемиологията на ЕАЕС е слабо разбрана. Няма доказателства за животински резервоар на бактерията. Описани са епидемии, причинени от храна [11]. Рисковите фактори за инфекция от ЕАЕС включват пътуване до развиващи се страни, поглъщане на замърсена храна и вода, лоша хигиена, податливост на гостоприемника и вероятно имunosупресия [12, 13]. Окончателните данни, демонстриращи

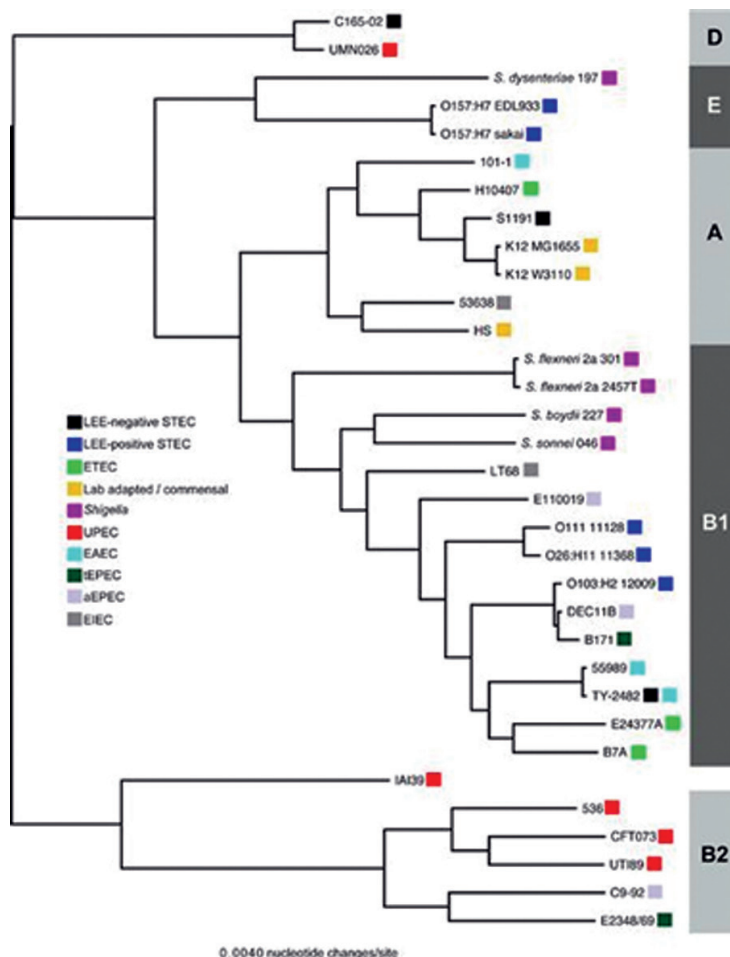
патогенността на отделните ЕАЕС щамове, са оскъдни. При проучвания с доброволци, архетипен щам 042 предизвиква клинична диария при трима от пет субекта и чревни симптоми при друг. Интересно е обаче, че някои други щамове на ЕАЕС не успяха да причинят диария при доброволци. Тези резултати предполагат хетерогенност на вирулентността на ЕАЕС, въпреки че молекулярната основа на тази вариация остава неуловима. Някои проучвания показват, че децата са по-склонни да бъдат засегнати през първия месец от живота, докато други подчертават, че повечето случаи възникват при по-възрастни деца [13,14,15]. Тези различни епидемиологични наблюдения могат да бъдат съгласувани с различни характеристики на вирулентност на щамовете, циркулиращи в съответните места, в комбинация с разнообразие от имунитет и резистентност на гостоприемника.

Изолатите на ЕАЕС не могат да бъдат дефинирани само с един единствен молекулярен маркер, който да разграничава всички изолати на неговия патоген, което представлява предизвикателство за обследване на потенциални епидемични огнище [16]. Обаче фенотипът на агрегирана адхезия (АА) изглежда е кодиран от гени, съдържащи се в плазмидите на вирулентност рАА [17]. Анализът на целия геном показва, че генетичният състав на рАА плазмидите може да се различава драматично между различните ЕАЕС изолати. Първоначалната дефиниция на ЕАЕС е основана на липсата на ST или LT на ЕТЕС, но свързани с диария, причинена от *E. coli*. Идентифицирането на група патогени въз основа на характеристиките, които „не присъстват“, често води до включване на изолати, които наистина не принадлежат един към друг. Филогенезата на фигура 1 показва, че включените ЕАЕС изолати са разнообразни. Най-добре характеризираният регулатор, свързан с вирулентността в ЕАЕС е AggR. Този регулатор контролира експресията на гена *aap*, кодиращ дисперсия, фимбриите на агрегираната адхезия (AAF) и секреторната система на *aai* тип VI (Dudley et al., 2006) [18–21]. В допълнение към тези фактори се смята, че серин протеазните автотранспортери на *Enterobacteriaceae* (SPATEs) са важни в патогенезата на ЕАЕС. Едно проучване изследва профилите на вирулентност на ЕАЕС от деца, за да се свърже геномното съдържание с клиничните резултати. Класификация и регресионен анализ заключават, че SepA SPATE, свързан с чревно възпаление, корелира положително с диарията. Тези проучвания изследват профилите на вирулентност на патогена с предубеждение за вирулентност [22].

Първият секвениран геном на ЕАЕС е изолатът 101-1. ЕАЕС 101-1 не притежава типични ЕАЕС вирулентни фактори, включително рАА плазмид. Оттогава геномите на 55, 989, изолирани от HIV-позитивен пациент в Африка, и прототипният изолат 042, са секвенирани. Глобалната филогенеза показва, че ЕАЕС е филогенетично разнообразен, отразявайки факта, че фенотипът на АА е кодиран от характеристики, съдържащи се в мобилните елементи. Наблюдението на инфекция от ЕАЕС е трудно, тъй като точната диагноза се основава на фенотипа на АА, а не на молекулярен маркер [23–25].

На преден план ЕАЕС са изведени в обществения интерес поради епидемично огнище в Германия през 2011 г., което е причинило приблизително 3 500 хоспитализации, 850 случая на ХУС и 50 смъртни случаи. Въпреки че световно епидемични огнища на *E. coli* с ХУС до голяма степен са свързани с ентерохеморагични O157:H7, в немското огнище изолатът е серотипизиран като O104:H4. Това е същият серотип като този на изолата 55989 ЕАЕС, който преди това е секвениран. Анализи на РСR показват, че този щам съдържа гени на Shiga-токсин, но също така съдържа няколко фактора на вирулентност, включително рАА, aggR и aaiC, свързани с ЕАЕС. Бързото секвениране и публичното оповестяване на данни за последователности инициира глобален анализ на изолата на огнището от множество източници. Въпреки че случаи на придобиване на бактериофага Stx са докладвани преди това от ЕАЕС, не са публикувани случаи на широко разпространено заболяване и смъртност. Изчерпателен сравнителен анализ на геномите от множество изолати O104:H4 разкрива, че очевидната хипервирулентност на изолатът на епидемичното огнище, най-вероятно се дължи на независимото придобиване на плазмид, кодиращ гени за резистентност към антибиотици и stx фага [26 - 30]. Като цяло, тази епидемия демонстрира както скоростта, с която геномните данни могат да бъдат генерирани и анализирани, така и как сега могат да бъдат проведени сравнителни анализи, за да се разбере патогенният потенциал на изолатите от епидемията. Въпреки това, трябва да се има предвид, че нова група от вирулентни фактори във всяка бактерия е само една част от инфекциозния процес, като факторите на гостоприемника, включително имунния статус и съществуващата микробиота, са други части от инфекциозния процес.

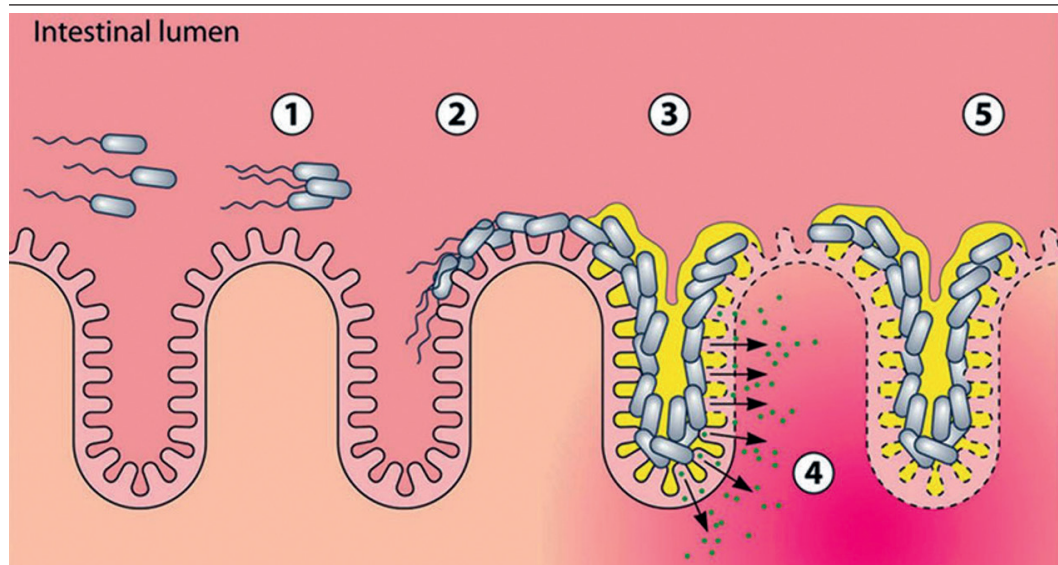
Фигура 1. Филогенетично дърво изведено от 2,5 Mb геномна последователност, запазена във всички изолати. Подравняването на целия геном на всички геноми е анализирано с Mugsy (Angiuoli and Salzberg, 2011) подравняване. Филологенезата е изведена от това свързано подравняване с FastTree2. Източник: <https://basicmedicalkey.com/comparative-genomics-of-pathogenic-escherichia-coli/>Jason



Патогенеза

ЕАЕС, както е определено понастоящем, най-вероятно включва както патогенни, така и непатогенни щамове *E. coli*. Съществените разлики между патогенните и непатогенните щамове са до голяма степен неизвестни, но проучванията на патогенезата предполагат няколко етапа на инфекция (Фигура 2):

- (1) прилепване към чревната лигавица по силата на агрегатно прилепване с фимбрии (AAF) или други фактори на прилепване ;
- (2) стимулиране на производството на слюз, образувайки биофилм на повърхността на лигавицата;
- (3) проявена токсичност за лигавицата чрез освобождаване на цитокини, клетъчна ексфолиация, чревна секреция и индуциране възпаление на лигавицата [16, 31, 32].



Фигура 2. Етапи на патогенезата на ЕАЕС. Числата в кръгове показват прогресията на патогенезата на ЕАЕС. (1) Аглоутинация на планктонни ЕАЕС бактерии. (2) Прилепване към чревния епител и колонизация на червата. (3) Образуване на биофилм. (4) Освобождаване на бактериални токсини, предизвикващи увреждане на епитела и повишена секреция. (5) Създаване на допълнителен биофилм. Източник: DOI: 10.1128/CMR.00112-13

Първият вирулентен фактор от ЕАЕС, който е описан, като потенциална причина за диарията е ентероагрегативният термостабилен токсин EAST1. Епидемиологични проучванията са показали, че EAST1 не само е свързан с ЕАЕС, но също така присъства в широк спектър от патогенни *E. coli* като ЕТЕС, ДАЕС, ЕРЕС и ЕНЕС. Освен това щамове *E. coli*, които не съдържат известни вирулентни фактори, различни от EAST1, са открити в изпражненията на хора с диария [33]. EAST1 е кодиран от гена *astA*, който обхваща 117 bp. Това е 38-аминокиселинен пептид с хомология с термостабилния (ST) ентеротоксин на ЕТЕС. Генът *astA* може да бъде открит и на плазмиди или върху хромозомата, а понякога и двете, в едно или няколко копия [34]. EAST1 е имунологично различен от STa, тъй като не е наблюдавана кръстосана неутрализация с поликлонални анти-STa антитела. Възможно е EAST1 да допринесе за водниста диария при EAST1-положителни ЕАЕС щамове (41% от ЕАЕС щамове съдържат *astA* ген). Генът *astA* обаче присъства и в до 38% от коменсалните щамове *E. coli*. EAST1 може да съществува като поредица от алелни варианти, някои от които може да бъде по-вирулентен от други [34,35, 36].

ЕАЕС е възпалителен патоген, както е докладвано в клинични и лабораторни проучвания. Клинични изследвания са показали, че лактоферин, IL-8 и IL- β могат да бъдат открити в по-високо ниво в изпражненията от случаи на ЕАЕС диария, отколкото в изпражненията на пациенти с диария, заразени с различни от извън ЕАЕС [37, 38]. Вирулентните фактори на типичните ЕАЕС (включително *aggA*, *aggR*, *aafA* и *aap*) са свързани с повишени нива на фекални цитокини и възпалителни маркери и могат да се наблюдават независимо дали пациентът проявява диария. Възпалителният ефект е свързан с експресията на нов ЕАЕС флагелинов протеин, който е хомоложен на флагелин, кодиран от *S. dysenteriae*. Флагелинът на ЕАЕС индуциран IL-8 от чревни епителни клетки (IECs) в култура. Показано е, че флагелинът е основният провъзпалителен фактор на ЕАЕС върху чревни епителни клетки в култура. *In vitro* потвърдено е, че фимбриите медираат освобождаването на IL-8. Освен това ААF/II фимбриите са достатъчни за индуциране на трансмиграцията на неутрофили през епителя. Агрегативните фимбрии са важни в развитието на възпаление в червата на човека. Тези данни предполагат, че ААF адхезините могат да бъдат не само фактори за колонизация, но могат да бъдат и двете необходимо и достатъчно за предизвикване на възпаление на лигавицата [39–41].

Хетерогенност на щамовете

Щамовете ЕАЕС принадлежат към разнообразна гама и комбинация от O:H серотипове. Освен това висока честота на ЕАЕС щамовете експресират O антигени и H антигени, невъзможни за типирание или са неподвижни [42]. Въпреки това, съществуват често изолирани ЕАЕС серотипове: O44:H18, O111:H12, O125 и O126. Проучванията показват, че някои серотипове на типичните ентеропатогенна *E. coli* като O55, O111, O86, O126 и O128 могат да бъдат открити в ЕАЕС, въпреки че най-често срещаните серогрупи, съобщавани в ЕАЕС, са O86, O126 и O125 [43, 44]. Предполага се, че появата на ЕРЕС O-серогрупи (O126, O128 и O158) заедно с ЕАЕС маркери повлиява положителната връзка на щам *E. coli* с диария. Серотипизирането често е полезно при характеризирането на други патогенни *E. coli*, но е с малка стойност в диагностиката на ЕАЕС. Въпреки това, в подробно проучване на геномната характеристика на 121 ЕАЕС щамове, изолирани от деца със или без умерена до тежка диария, е установено, че щамове, експресиращи H:33 флагеларен антиген, се откриват значително по-често в симптоматичните деца, отколкото

в контролите. Тази връзка може да означава съществуването на специфичен набор от вирулентни гени в щамове от този H- тип [22]. Представена е филогенетична рамка, идентифицираща три основни групи от DEC, съдържащи EAEC. Членовете на всяка група показват запазени плазмиди и хромозомни локуси, което показва, че повечето EAEC, като EPEC, имат запазена връзка на вирулентни гени. EAEC щамове, които не попадат в гореспоменатите клъстери, могат да бъдат по-леки патогени, предизвикващи възпаление без диария [39]. Трябва да се отбележи, че rAA плазмидът на EAEC обаче е хетерогенен по отношение на фимбриите и експресията на токсини. При проучвания с доброволци, три щамове, експресиращи AAF/I варианта, не предизвикват диария, докато единият щам, експресиращ AAF/II, причинява диария при повечето инфектирани лица [14].

Идентификация на EAEC

Златният стандарт за идентифициране на EAEC е тестът за прилепване на HEp2-клетки, доколкото патогенът първоначално е бил дефиниран чрез наличието на характерен подреден тухлен модел, обозначен като агрегатен [45]. Тестът за прилепване на HEp2 клетки за съжаление не е предназначен за скрининг на голям брой колонии от проби изпражнения, тъй като отнема много време и е допълнително ограничено от риска от замърсяване на клетъчните култури. Съобщава се, че ДНК проба, CVD432 от rAA плазмид на EAEC, е специфична за EAEC, но варира в чувствителността [8, 13]. Доказано е, че сондата CVD432 съответства на гена *aatA*, който кодира транспортер за диспергиращия протеин (*Aap*), също регулиран от *AggR*. *Aap* на EAEC се секретира от много щамове на EAEC и е предложен като възможна цел за диагностика. Въпреки това, *Aap* се произвежда и от щамове извън патогрупата на EAEC. Разработени са мултиплек PCR анализи, които откриват трите гена, пренасяни от AA плазмид (*aatA*, *aggR* и *aap*) и проучванията показват, че тези локуси са често, но не неизменно свързани [46]. Авторите на това проучване установяват, че 82% от щамовете EAEC, изолирани от пациенти с диария, са положителни за трите локуса и че използването на мултиплексен анализ повишава, както чувствителността, така и специфичността на откриването на EAEC [47]. Няколко проучвания са приложили PCR при откриване на EAEC чрез насочване към гени *aggR* и/или *aatA* [46]. Променливите резултати, получени с помощта на молекулярна диагностика, може да се дължат на хетерогенността в патогенните механизми на EAEC. PCR, насочен към факторите

на вирулентност върху *рАА* плазмидните и хромозомните ЕАЕС локуси, като *aaiC*, може да се окаже най-благоприятният подход за откриване на ЕАЕС.

Източници:

1. Nataro, J.P., Kapur, J.B., Robins-Browne, R., Prado, V., Vial, P., Levine, M.M., 1987. Patterns of adherence of diarrheagenic *Escherichia coli* to HEp-2 cells. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 6 (9), 829–831.
2. Bhan, M.K., Raj, P., Levine, M.M., et al., 1989b. Enteroaggregative *Escherichia coli* associated with persistent diarrhea in a cohort of rural children in India. *J. Infect. Dis.* 159 (6), 1061–1064.
3. Cravioto, A., Tello, A., Navarro, A., et al., 1991. Association of *Escherichia coli* HEp-2 adherence patterns with type and duration of diarrhoea. *Lancet* 337 (8736), 262–264.
4. Sarantuya, J., Nishi, J., Wakimoto, N., et al., 2004. Typical enteroaggregative *Escherichia coli* is the most prevalent pathotype among *E. coli* strains causing diarrhea in Mongolian children. *J. Clin. Microbiol.* 42 (1), 133–139.
5. Huang, D.B., Nataro, J.P., DuPont, H.L., et al., 2006. Enteroaggregative *Escherichia coli* is a cause of acute diarrheal illness: a meta-analysis. *Clin. Infect. Dis.* 43 (5), 556–563.
6. Adachi, J.A., Jiang, Z.D., Mathewson, J.J., et al., 2001. Enteroaggregative *Escherichia coli* as a major etiologic agent in traveler's diarrhea in 3 regions of the world. *Clin. Infect. Dis.* 32 (12), 1706–1709
7. Tompkins, D.S., Hudson, M.J., Smith, H.R., et al., 1999. A study of infectious intestinal disease in England: microbiological findings in cases and controls. *Commun. Dis. Public Health* 2 (2), 108–113.
8. Okeke, I.N., et al., 2000a. Heterogeneous virulence of enteroaggregative *Escherichia coli* strains isolated from children in Southwest Nigeria. *J. Infect. Dis.* 181 (1), 252–260
9. Gassama-Sow, A., Sow, P.S., Gueye, M., et al., 2004. Characterization of pathogenic *Escherichia coli* in human immunodeficiency virus-related diarrhea in Senegal. *J. Infect. Dis.* 189 (1), 75–78.
10. Huang, D.B., Nataro, J.P., DuPont, H.L., et al., 2006. Enteroaggregative *Escherichia coli* is a cause of acute diarrheal illness: a meta-analysis. *Clin. Infect. Dis.* 43 (5), 556–563.
11. Itoh, Y., Nagano, I., Kunishima, M., Ezaki, T., 1997. Laboratory investigation of enteroaggregative *Escherichia coli* O untypeable:H10 associated with a massive outbreak of gastrointestinal illness. *J. Clin. Microbiol.* 35 (10), 2546–2550.

12. Huang, D.B., Mohanty, A., DuPont, H.L., Okhuysen, P.C., Chiang, T., 2006. A review of an emerging enteric pathogen: enteroaggregative *Escherichia coli*. *J. Med. Microbiol.* 55 (Pt 10), 1303–1311.
13. Okeke, I.N., Nataro, J.P., 2001. Enteroaggregative *Escherichia coli*. *Lancet Infect. Dis.* 1 (5), 304–313.
14. Nataro, J.P., Deng, Y., Cookson, S., et al., 1995. Heterogeneity of enteroaggregative *Escherichia coli* virulence demonstrated in volunteers. *J. Infect. Dis.* 171 (2), 465–468.
15. Gonzalez, R., Diaz, C., Marino, M., Cloralt, R., Pequenez, M., Perez-Schael, I., 1997. Age-specific prevalence of *Escherichia coli* with localized and aggregative adherence in Venezuelan infants with acute diarrhea. *J. Clin. Microbiol.* 35 (5), 1103–1107.
16. Kaper, J.B., Nataro, J.P., Mobley, H.L., 2004. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat. Rev. Microbiol.* 2, 123–140.
17. Vial, P.A., Robins-Browne, R., Lior, H., et al., 1988. Characterization of enteroadherent-aggregative *Escherichia coli*, a putative agent of diarrheal disease. *J. Infect. Dis.* 158, 70–79.
18. Rasko, D.A., Webster, D.R., Sahl, J.W., et al., 2011. Origins of the *E. coli* strain causing an outbreak of hemolytic-uremic syndrome in Germany. *N. Engl. J. Med.* 365, 725–729.
19. Sheikh, J., Czczulin, J.R., Harrington, S., et al., 2002. A novel dispersin protein in enteroaggregative *Escherichia coli*. *J. Clin. Invest.* 110, 1329–1337.
20. Bernier, C., Gounon, P., Le Bouguenec, C., 2002. Identification of an aggregative adhesion fimbria (AAF) type III-encoding operon in enteroaggregative *Escherichia coli* as a sensitive probe for detecting the AAF-encoding operon family. *Infect. Immun.* 70, 4302–4311.
21. Dudley, E.G., Thomson, N.R., Parkhill, J., Morin, N.P., Nataro, J.P., 2006. Proteomic and microarray characterization of the AggR regulon identifies a pheU pathogenicity island in enteroaggregative *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 61, 1267–1282.
22. Boisen, N., Scheutz, F., Rasko, D.A., et al., 2012. Genomic characterization of enteroaggregative *Escherichia coli* from children in Mali. *J. Infect. Dis.* 205, 431–444.
23. Touchon, M., Hoede, C., Tenailon, O., et al., 2009. Organised genome dynamics in the *Escherichia coli* species results in highly diverse adaptive paths. *PLoS Genet* 5, e1000344.
24. Rasko, D.A., Webster, D.R., Sahl, J.W., et al., 2011. Origins of the *E. coli* strain causing an outbreak of hemolytic-uremic syndrome in Germany. *N. Engl. J. Med.* 365, 725–729.
25. Chaudhuri, R.R., Sebaihia, M., Hobman, J.L., et al., 2010. Complete genome sequence and comparative metabolic profiling of the prototypical enteroaggregative *Escherichia coli* strain 042. *PLoS One* 5, e8801.

26. Grad, Y.H., Lipsitch, M., Feldgarden, M., et al., 2012. Genomic epidemiology of the *Escherichia coli* O104:H4 outbreaks in Europe, 2011. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 109, 3065–3070.
27. Frank, C., Werber, D., Cramer, J.P., et al., 2011. Epidemic profile of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* O104:H4 outbreak in Germany. *NEJM* 365, 1771–1780.
28. Morabito, S., Karch, H., Mariani-Kurkdjian, P., et al., 1998. Enteroaggregative, Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O111:H2 associated with an outbreak of hemolytic-uremic syndrome. *J. Clin. Microbiol.* 36, 840–842.
29. Parker, C.T., Kyle, J.L., Huynh, S., Carter, M.Q., Brandl, M.T., Mandrell, R.E., 2012. Distinct transcriptional profiles and phenotypes exhibited by *Escherichia coli* O157:H7 isolates related to the 2006 spinach-associated outbreak. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 455–463.
30. Rasko, D.A., Webster, D.R., Sahl, J.W., et al., 2011. Origins of the *E. coli* strain causing an outbreak of hemolytic-uremic syndrome in Germany. *N. Engl. J. Med.* 365, 725–729.
31. Hicks, S., Candy, D.C., Phillips, A.D., 1996. Adhesion of enteroaggregative *Escherichia coli* to pediatric intestinal mucosa in vitro. *Infect. Immun.* 64 (11), 4751–4760.
32. Harrington, S.M., Strauman, M.C., Abe, C.M., Nataro, J.P., 2005. Aggregative adherence fimbriae contribute to the inflammatory response of epithelial cells infected with enteroaggregative *Escherichia coli*. *Cell Microbiol.* 7 (11), 1565–1578.
33. Paiva de Sousa, C., Dubreuil, J.D., 2001. Distribution and expression of the *astA* gene (EAST1 toxin) in *Escherichia coli* and *Salmonella*. *Int. J. Med. Microbiol.* 291 (1), 15–20.
34. Menard, L.P., Dubreuil, J.D., 2002. Enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1 (EAST1): a new toxin with an old twist. *Crit. Rev. Microbiol.* 28 (1), 43–60.
35. Savarino, S.J., McVeigh, A., Watson, J., et al., 1996. Enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin is not restricted to enteroaggregative *E. coli*. *J. Infect. Dis.* 173 (4), 1019–1022.
36. Zhou, Z., Ogasawara, J., Nishikawa, Y., et al., 2002. An outbreak of gastroenteritis in Osaka, Japan due to *Escherichia coli* serogroup O166:H15 that had a coding gene for enteroaggregative *E. coli* heat-stable enterotoxin 1 (EAST1). *Epidemiol. Infect.* 128 (3), 363–371.
37. Greenberg, D.E., Jiang, Z.D., Steffen, R., Verenker, M.P., DuPont, H.L., 2002. Markers of inflammation in bacterial diarrhea among travelers, with a focus on enteroaggregative *Escherichia coli* pathogenicity. *J. Infect. Dis.* 185 (7), 944–949.
38. Jiang, Z.D., Greenberg, D., Nataro, J.P., Steffen, R., DuPont, H.L., 2002. Rate of occurrence and pathogenic effect of enteroaggregative

- Escherichia coli* virulence factors in international travelers. *J. Clin. Microbiol.* 40 (11), 4185–4190.
39. Donnelly, M.A., Steiner, T.S., 2002. Two nonadjacent regions in enteroaggregative *Escherichia coli* flagellin are required for activation of toll-like receptor 5. *J. Biol. Chem.* 277 (43), 40456–40461.
 40. Okhuysen, P.C., Dupont, H.L., 2010. Enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC): A cause of acute and persistent diarrhea of worldwide importance. *J. Infect. Dis.* 202 (4), 503–505.
 41. Boll, E.J., Struve, C., Sander, A., Demma, Z., Krogfelt, K.A., McCormick, B.A., 2012. Enteroaggregative *Escherichia coli* promotes transepithelial migration of neutrophils through a conserved 12-lipoxygenase pathway. *Cell Microbiol.* 14 (1), 120–132.
 42. Regua-Mangia, A.H., Gomes, T.A., Vieira, M.A., Irino, K., Teixeira, L.M., 2009. Molecular typing and virulence of enteroaggregative *Escherichia coli* strains isolated from children with and without diarrhoea in Rio de Janeiro city, Brazil. *J. Med. Microbiol.* 58 (Pt 4), 414–422.
 43. Elias, W.P., Barros, S.F., Moreira, C.G., Trabulsi, L.R., Gomes, T.A., 2002. Enteroaggregative *Escherichia coli* strains among classical enteropathogenic *Escherichia coli* O serogroups. *J. Clin. Microbiol.* 40 (9), 3540–3541.
 44. Uber, A.P., Trabulsi, L.R., Irino, K., et al., 2006. Enteroaggregative *Escherichia coli* from humans and animals differ in major phenotypical traits and virulence genes. *FEMS Microbiol. Lett.* 256 (2), 251–257.
 45. Nataro, J.P., Steiner, T., Guerrant, R.L., 1998. Enteroaggregative *Escherichia coli*. *Emerg. Infect. Dis.* 4 (2), 251–261.
 46. Opintan, J.A., Bishar, R.A., Newman, M.J., Okeke, I.N., 2010. Carriage of diarrhoeagenic *Escherichia coli* by older children and adults in Accra, Ghana. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 104 (7), 504–506.
 47. Cerna, J.F., Nataro, J.P., Estrada-Garcia, T., 2003. Multiplex PCR for detection of three plasmidborne genes of enteroaggregative *Escherichia coli* strains. *J. Clin. Microbiol.* 41 (5), 2138–2140.

ДИФУЗНО АДХЕРЕНТНИ *E. COLI* (DAEC)

Мария Павлова

Тези два сравнително нови патовара са описани основно въз основа на последователността на генома и са публикувани ограничени данни. Дифузно прилепналите *E. coli* (DAEC), като причина за диарийни заболявания при деца, се характеризират с дифузното си прилепване към HEp-2 клетъчни монослоеви [1, 2]. Дифузно прилепналите *E. coli* (DAEC) е един от шестте класически патотипа на диарийни *E. coli* (DEC), със способността да се залепва върху цялата повърхност на HEp-2/HeLa клетки в дифузен адхезивен (DA) модел [1]. Анализ на вирулентните детерминанти на DAEC щамове показват, че те са разнообразна група от щамове с вирулентни гени, хомоложни на тези, открити в DEC щамове (EAEC, ETEC или EPEC) или в извънчревни щамове *E. coli*, свързани с инфекции на пикочните пътища [3, 4].

За разпознаване на DAEC щамове от проби от диарични изпражнения на пациенти е използвана способността на бактериите да се прилепват към HEp-2/HeLa клетки [5]. Този анализ диференцира три фенотипа на прилепване: локализирано, дифузно или агрегирано прилепване (съответно LA, DA, AA; Фигура 1). Анализът на факторите, включени в модела на DA, доведе до откриването на два адхезина, фимбриите F1845 и автотранспортера AIDA-I [6]. Оттогава ДНК сонди и PCR, специфични за тези фактори на вирулентност, са използвани за идентифициране на DAEC щамове и за епидемиологични проучвания, свързващи DAEC със случаи на диария [7]. През последните години фокусът на изследването е върху щамове, произвеждащи F1845 фимбрии, тъй като тези фимбрии са свързани с Afa/Dr адхезини, които се експресират в различни патогени и са свързани с чревни инфекции и инфекции на пикочните пътища.

Епидемиология

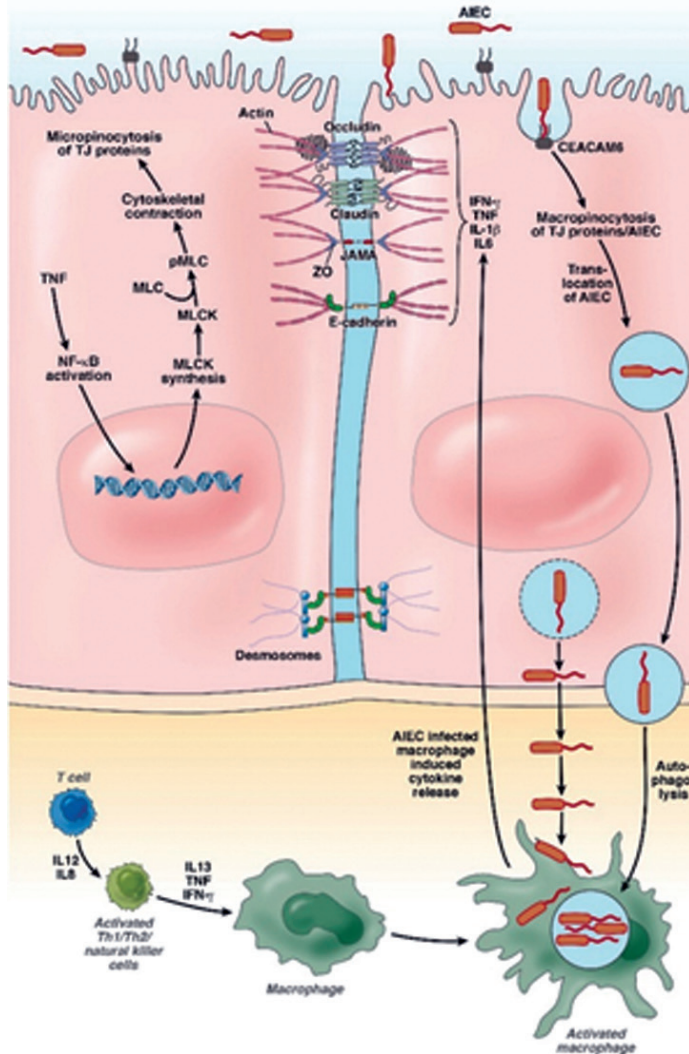
Има няколко проучвания, които изследват участието на DAEC в диарийните заболявания и като цяло те показват, че тази връзка все още не е добре проучена. Разпространението на DAEC изолати в проби от изпражнения на деца с диария е ниско в сравнение с други DEC патотипове [9, 10]. Някои проучвания свързват DAEC

щамове с диарийно заболяване при бебета, деца и възрастни [10]. Освен това, описана е свързана с възрастта честота на DAEC щамове, експресиращи Afa/Dr адhezини, което предполага, че DAEC е причина за диария, особено при деца на възраст >12 месеца [11]. От друга страна, не са открити разлики в честотата на DAEC щамове в проучванията за контрол на случаите и няма връзка с вида или продължителността на диарията при деца, приписана на DAEC. По-удивителното е, че проучванията на доброволци показват, че DAEC щамове, прилагани перорално, не са успели да предизвикат диария при възрастни [12, 13].

Напълно различна ситуация се наблюдава при DAEC щамове, свързани с инфекции на пикочните пътища. Щамове Afa/Dr DAEC участват в 25-50% от случаите на цистит при деца, 30% от случаите на пиелонефрит при бременни жени, и една трета от рецидивиращите инфекции на пикочните пътища при възрастни. Освен това, характеризирани на уринарни изолати на *E. coli* от 174 жени с първи епизод на уринарна инфекция и оценка на риска от втора уринарна инфекция показва, че Afa/Dr адhezини са свързани с двойно повишен риск. Тези наблюдения са довели до изследвания за функцията на Afa/Dr адhezини в патогенността на DAEC, за да се разбере механизмът на взаимодействията на DAEC с епитела [14-16].

Патогенеза

Придържането към епителните клетки е може би най-важната стъпка в DAEC инфекцията. Този процес включва силно специфично взаимодействие с епитела за: (1) разпознаване на мястото на инфекцията; (2) конкурират се и получават достъп до областите на стомашно-чревния тракт и пикочните пътища, които са заети от резидентната микрофлора; и (3) активиране на каскади на сигнална трансдукция, които са необходими за предизвикване на диария и/или възпаление. Много фактори могат да допринесат за адhezията на DAEC към клетките гостоприемници и някои адhezини са характеризирани. Два основни адhezина са идентифицирани в DA щамове, адhezинът, участващ в дифузното прилепване (AIDA-1) и фимбриите F1845. AIDA-1 е плазмидно кодиран 100 kDa автотранспортен протеин, който първоначално е идентифициран в EPEC щам, медиращ прилепването към HeLa клетки и показващ DA фенотипа. Нуклеотидната последователност на фимбриите F1845 има значителна хомология с Afa/Dr фамилията адhezини, които са детерминанти на вирулентността в уропатогенните щамове на *E. coli* [17-20].



Фигура 1. Ефект на АИЕС върху основните съединителни протеини и регулаторни пътища при чревни епителни клетки. Непряка интернализация на протеини с плътна връзка чрез процес на микропиноцитоза може да възникне в резултат на АИЕС директно или непряко $TNF-\alpha$ -зависило активиране на $NF-\kappa B$, което води до повишена експресия на киназа на леката верига на миозина и цитоскелетна контракция. Взаимодействието на АИЕС с чревните епителни клетки води до директна интернализация на TJ протеини и индиректно чрез активиране на провъзпалителни цитокини. Пропускливостта на чревната бариера е компрометирана, което позволява интернализиране, оцеляване и репликация на АИЕС, инвазия на макрофаги и допълнително изостряне на пропускливостта на бариерата.

Като се има предвид, че приблизително 75% от щамовете DAEC произвеждат F1845 или сроден адхезин, ролята на Afa/Dr адхезини върху патогенезата на DAEC е в центъра на няколко проучвания. Семейството на адхезини Afa/Dr съдържа представители на фимбриални и нефимбриални структури, организирани в оперони, състоящи се от най-малко пет гена и принадлежащи към семейството на адхезини на шаперон-ушер. Тези оперони присъстват както в диарийните, така и в уропатогенните щамове на *E. coli* и кодират адхезин Afa/Dr, инвазин и протеини, необходими за секрецията и сглобяването на адхезина на повърхността на бактериалната клетка. Адхезините Afa/Dr също се класифицират въз основа на рецепторите на клетката гостоприемник, които те свързват, като антигена на кръвната група Dr(a), присъстващ на фактора за ускоряване на разпада (DAF, CD55), извънклетъчния матричен протеин колаген IV и/или свързаните с карциноембрионален антиген клетъчни адхезионни молекули (CEACAMs). Всички тези рецептори играят основна роля в прилепването на DEAC към стомашно-чревния и пикочния тракт [17, 21–23].

АДХЕЗИЯ

С помощта на култивиране на поляризирани епителни клетки беше установено, че Afa/Dr адхезини взаимодействат с DAF или CEACAM рецептори (CEACAM6 за F1845) и в резултат на това рецепторите се натрупват под . Това взаимодействие също задейства каскади на сигнална трансдукция, които контролират растежа на дълги подобни на пръсти клетъчни издатини (ламелиподии), които се увиват около бактериите, насърчавайки плътното прикрепване на бактериите към клетъчната повърхност. В допълнение, адхезията на DAEC е придружена от лезия на ръба на четката, пренареждане на F-актин и разрушаване на тясно съединение. В резултат на процеса на адхезия, бактериите стават здраво прикрепени към клетъчната повърхност, иницирайки стъпките на колонизация и активиране на пътищата на сигнална трансдукция, което води до интернализация на бактериите и/или възпалителни реакции [16, 24–28].

ИНТЕРНАЛИЗАЦИЯ

Малка част от прилепналите Afa/Dr DAEC щамове са в състояние да нахлуят в култивирани епителни клетки, процес, който също е свързан с Afa/Dr адхезини. По време на *in vitro* култивиране, Afa/Dr DAEC нахлува в епителните клетки чрез механизъм, подобен на

цип, с участието на микротубули, липидни салове и $\alpha\beta 1$ интегрини. Веднъж попаднали в цитоплазмата, интернализираните бактерии се намират в голяма вакуола, образувана от сливането на единични съдържачи бактерии вакуоли, възникнали рано по време на началния етап на инвазия [4, 29-31].

ВЪЗПАЛЕНИЕ

DAEC инфекцията се характеризира с индуциране на възпалителен отговор върху епителните клетки. Инфекцията с Afa/Dr DAEC на чревни култивирани клетки индуцира освобождаването на провъзпалителни фактори, като IL-8, в резултат на активирането на митоген-активирания протеин киназен път. Възпалението, предизвикано от Afa/Dr DAEC, насърчава полиморфонуклеарната миграция през епителната бариера, предизвиквайки производството на TNF- α и IL-1 β , които стимулират производството на DAEC рецептор DAF. Освен това Afa/Dr DAEC увеличава клетъчната повърхностна експресия на главния комплекс на хистосъвместимост клас I верижен ген A, ключов фактор във вродения имунен отговор на гостоприемника. Като цяло, тези данни осигуряват механизъм, чрез който Afa/Dr DAEC може да участва в развитието на възпалителна диария при хора [18, 32, 33].

Клинични прояви и диагностика

DAEC се свързват с водниста диария, която може да стане персистираща при малки деца, с увеличаване на тежестта на заболяването от възраст 18 месеца до 5 години [34, 35]. Смята се, че възрастните стават асимптоматични носители и се спекулира, че носителството на DAEC може да доведе до хронични възпалителни чревни заболявания като болест на Крон. Разработени са PCR базирани методи за откриване на DAEC щамове, чрез детекция на *daaC*, *daaE* и *afaB* гени, които са обичайни гени в опероните, които кодират Afa/Dr адхезини [36-38]. Обаче в проучване на 40 бебета с диария под 1-годишна възраст, 10% от откритите прилепнали щамове на *E. coli* са били дифузно прилепнали в тъканна култура, но не са били открити с *daaC* сонда, което показва, че отсъствието или присъствието на тези гени не може да се счита за убедително при идентифицирането на всички DAEC в микробиологичните изследвания. Освен това, *daaC* сондата реагира кръстосано с подгрупа от EAEC щамове, които причиняват диария, обръквайки допълнително идентификация на DAEC. Други проучвания докладват, че при 61

пациенти с диария, само 9,8% от изолатите DAEC са хибридизирали с *daaE*, докато 17,6% от здравите контроли също съдържат DAEC щамове, хибридизирали с *daaE*. Очевидно нито един цялостен модел, съответстващ на вирулентността, за универсално откриване на патогенни DAEC изолатите от пациенти, е надежден [39–41].

Лечение, антибиотична резистентност и ваксини

Рехидратацията понастоящем е единственото лечение, препоръчвано за водниста диария, причинена от DAEC. Сред 112 DAEC щамове, изолирани от деца, 70% от щамовете са резистентни към множество антибиотици, а над 50% са резистентни към ампицилин, цефалотин, ко-тримоксазол, стрептомицин, сулфонамид или тетрациклин. Само 20% от щамовете са резистентни към хлорамфеникол. Към днешна дата няма ваксини за който и да е щам на DAEC [41].

Източници:

1. Scaletsky, I.C., Fabbriotti, S.H., Carvalho, R.L., et al., 2002. Diffusely adherent *Escherichia coli* as a cause of acute diarrhea in young children in Northeast Brazil: a case-control study. *J. Clin. Microbiol.* 40, 645–648.
2. Kaper, J.B., Nataro, J.P., Mobley, H.L., 2004. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat. Rev. Microbiol.* 2, 123–140.
3. Czeuczulin, J.R., Whittam, T.S., Henderson, I.R., Navarro-Garcia, F., Nataro, J.P., 1999. Phylogenetic analysis of enteroaggregative and diffusely adherent *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 67 (6), 2692–2699.
4. Servin, A.L., 2005. Pathogenesis of Afa/Dr diffusely adhering *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol. Rev.* 18 (2), 264–292.
5. Mathewson, J.J., Cravioto, A., 1989. HEp-2 cell adherence as an assay for virulence among diarrheagenic *Escherichia coli*. *J. Infect. Dis.* 159, 1057–1060.
6. Bilge, S.S., Clausen, C.R., Lau, W., Moseley, S.L., 1989. Molecular characterization of a fimbrial adhesin, F1845, mediating diffuse adherence of diarrhea-associated *Escherichia coli* to HEp-2 cells. *J. Bacteriol.* 171, 4281–4289.
7. Vidal, M., Kruger, E., Duran, C., et al., 2005. Single multiplex PCR assay to identify simultaneously the six categories of diarrheagenic *Escherichia coli* associated with enteric infections. *J. Clin. Microbiol.* 43, 5362–5365.
8. Gymez-Duarte, Oscar G., et al. „Detection of *Escherichia coli* enteropathogens by multiplex polymerase chain reaction from

- children's diarrheal stools in two Caribbean-Colombian cities." *Foodborne Pathogens and Disease* 7.2 (2010): 199-206.
9. Rajendran, P., Ajjampur, S.S., Chidambaram, D., et al., 2010. Pathotypes of diarrheagenic *Escherichia coli* in children attending a tertiary care hospital in South India. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 68, 117–122.
 10. Giron, J.A., Jones, T., Millan-Velasco, F., et al., 1991. Diffuse-adhering *Escherichia coli* (DAEC) as a putative cause of diarrhea in Mayan children in Mexico. *J. Infect. Dis.* 163, 507–513.
 11. Levine, M.M., Ferreccio, C., Prado, V., et al., 1993. Epidemiologic studies of *Escherichia coli* diarrheal infections in a low socioeconomic level peri-urban community in Santiago, Chile. *Am. J. Epidemiol.* 138, 849–869.
 12. Cravioto, A., Tello, A., Navarro, A., et al., 1991. Association of *Escherichia coli* HEP-2 adherence patterns with type and duration of diarrhoea. *Lancet* 337, 262–264.
 13. Tacket, C.O., Moseley, S.L., Kay, B., Losonsky, G., Levine, M.M., 1990. Challenge studies in volunteers using *Escherichia coli* strains with diffuse adherence to HEP-2 cells. *J. Infect. Dis.* 162, 550–552.
 14. Daigle, F., Harel, J., Fairbrother, J.M., Lebel, P., 1994. Expression and detection of pap-, sfa-, and afa-encoded fimbrial adhesin systems among uropathogenic *Escherichia coli*. *Can. J. Microbiol.* 40, 286–291.
 15. Servin, A.L., 2005. Pathogenesis of Afa/Dr diffusely adhering *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol. Rev.* 18, 264–292.
 16. Le Bouguenec, C., Servin, A.L., 2006. Diffusely adherent *Escherichia coli* strains expressing Afa/Dr adhesins (Afa/Dr DAEC): hitherto unrecognized pathogens. *FEMS Microbiol. Lett.* 256, 185–194.
 17. Nowicki, B., Selvarangan, R., Nowicki, S., 2001. Family of *Escherichia coli* Dr adhesins: decayaccelerating factor receptor recognition and invasiveness. *J. Infect. Dis.* 183 (Suppl. 1), S24–27.
 18. Betis, F., Brest, P., Hofman, V., et al., 2003. The Afa/Dr adhesins of diffusely adhering *Escherichia coli* stimulate interleukin-8 secretion, activate mitogen-activated protein kinases, and promote polymorphonuclear transepithelial migration in T84 polarized epithelial cells. *Infect. Immun.* 71, 1068–1074.
 19. Benz, I., Schmidt, M.A., 1989. Cloning and expression of an adhesin (AIDA-I) involved in diffuse adherence of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 57, 1506–1511.
 20. Maurer, J., Jose, J., Meyer, T.F., 1997. Autodisplay: one-component system for efficient surface display and release of soluble recombinant proteins from *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 179, 794–804.
 21. Bilge, S.S., Clausen, C.R., Lau, W., Moseley, S.L., 1989. Molecular characterization of a fimbrial adhesin, F1845, mediating diffuse

- adherence of diarrhea-associated *Escherichia coli* to HEp-2 cells. *J. Bacteriol.* 171, 4281–4289.
22. Servin, A.L., 2005. Pathogenesis of Afa/Dr diffusely adhering *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol. Rev.* 18, 264–292.
 23. Berger, C.N., Billker, O., Meyer, T.F., Servin, A.L., Kansau, I., 2004. Differential recognition of members of the carcinoembryonic antigen family by Afa/Dr adhesins of diffusely adhering *Escherichia coli* (Afa/Dr DAEC). *Mol. Microbiol.* 52, 963–983.
 24. Goluszko, P., Selvarangan, R., Popov, V., Pham, T., Wen, J.W., Singhal, J., 1999. Decay-accelerating factor and cytoskeleton redistribution pattern in HeLa cells infected with recombinant *Escherichia coli* strains expressing Dr family of adhesins. *Infect. Immun.* 67, 3989–3997.
 25. Cookson, S.T., Nataro, J.P., 1996. Characterization of HEp-2 cell projection formation induced by diffusely adherent *Escherichia coli*. *Microb. Pathog.* 21, 421–434.
 26. Bernet-Camard, M.F., Coconnier, M.H., Hudault, S., Servin, A.L., 1996. Pathogenicity of the diffusely
 27. adhering strain *Escherichia coli* C1845: F1845 adhesin-decay accelerating factor interaction, brush border microvillus injury, and actin disassembly in cultured human intestinal epithelial cells. *Infect. Immun.* 64, 1918–1928.
 28. Peiffer, I., Blanc-Potard, A.B., Bernet-Camard, M.F., Guignot, J., Barbat, A., Servin, A.L., 2000. Afa/Dr diffusely adhering *Escherichia coli* C1845 infection promotes selective injuries in the junctional domain of polarized human intestinal Caco-2/TC7 cells. *Infect. Immun.* 68, 3431–3442.
 29. Guignot, J., Hudault, S., Kansau, I., Chau, I., Servin, A.L., 2009. Human decay-accelerating factor and CEACAM receptor-mediated internalization and intracellular lifestyle of Afa/Dr diffusely adhering *Escherichia coli* in epithelial cells. *Infect. Immun.* 77, 517–531.
 30. Plancon, L., Du Merle, L., Le Friec, S., et al., 2003. Recognition of the cellular beta1-chain integrin by the bacterial AfaD invasin is implicated in the internalization of afa-expressing pathogenic *Escherichia coli* strains. *Cell Microbiol.* 5, 681–693.
 31. Kansau, I., Berger, C., Hospital, M., et al., 2004. Zipper-like internalization of Dr-positive *Escherichia coli* by epithelial cells is preceded by an adhesin-induced mobilization of raft-associated molecules in the initial step of adhesion. *Infect. Immun.* 72, 3733–3742.
 32. Arikawa, K., Meraz, I.M., Nishikawa, Y., Ogaswara, J., Hase, A., 2005. Interleukin-8 secretion by epithelial cells infected with diffusely adherent *Escherichia coli* possessing Afa adhesin-coding genes. *Microbiol. Immunol.* 49, 493–503.

33. Tieng, V., Le Bouguenec, C., du Merle, L., et al., 2002. Binding of *Escherichia coli* adhesin AfaE to CD55 triggers cell-surface expression of the MHC class I-related molecule MICA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 2977–2982.
34. Servin AL. 2005. Pathogenesis of Afa/Dr diffusely adhering *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol. Rev.* 18:264 –292.
35. Le Bouguйнеc C. 1999. Diarrhea-associated diffusely adherent *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol. Rev.* 12:180 –181.
36. Le Bouguйнеc C, Servin AL. 2006. Diffusely adherent *Escherichia coli* strains expressing Afa/Dr adhesins (Afa/Dr DAEC): hitherto unrecognized pathogens. *FEMS Microbiol. Lett.* 256:185–194.
37. Le Bouguйнеc C, Lalioui L, du Merle L, Jouve M, Courcoux P, Bouzari S, Selvarangan R, Nowicki BJ, Germani Y, Andremont A, Gounon P, Garcia MI. 2001. Characterization of AfaE adhesins produced by extraintestinal and intestinal human *Escherichia coli* isolates: PCR assays for detection of Afa adhesins that do or do not recognize Dr blood group antigens. *J. Clin. Microbiol.* 39:1738 –1745.
38. Nowicki B, Svanborg-edin, Hull CR, Hull S. 1989. Molecular analysis and epidemiology of the Dr hemagglutinin of uropathogenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 57:446 –451.
39. Scaletsky IC, Pedroso MZ, Oliva CA, Carvalho RL, Morais MB, Fagundes-Neto U. 1999. A localized adherence-like pattern as a second pattern of adherence of classic enteropathogenic *Escherichia coli* to HEp-2 cells that is associated with infantile diarrhea. *Infect. Immun.* 67:3410 –3415
40. Snelling AM, Macfarlane-Smith LR, Fletcher JN, Okeke IN. 2009. The commonly-used DNA probe for diffusely-adherent *Escherichia coli* cross-reacts with a subset of enteroaggregative *E. coli*. *BMC Microbiol.* 9:269. doi:10.1186/1471-2180-9-269.
41. Lopes LM, Fabbriцotti SH, Ferreira AJP, Kato MAMF, Michalski J, Scaletsky ICA. 2005. Heterogeneity among strains of diffusely adherent *Escherichia coli* isolated in Brazil. *J. Clin. Microbiol.* 43:1968 –1972.

АДХЕРЕНТНО ИНВАЗИВНИ *E. COLI* (АИЕС)

Мария Павлова

Предполага се, че чревните бактерии играят основна роля в появата на възпалителни заболявания на червата, като болестта на Crohn (CD) и улцерозен колит, засягащи милиони души в САЩ и Европа [1, 2]. Значително намаляване на чревната микробиота, разнообразие със свръхпредставяне на *Enterobacteriaceae*, главно *E. coli*, се наблюдава при пациенти с болестта на Crohn [2, 3]. Въпреки че принадлежат към различни серогрупи, *E. coli* изолирани от пациенти болестта на Crohn имат силно свързани риботипови профили и повечето от тях принадлежат към филогрупите B2 и D [3, 4]. За разлика от непатогенни, коменсални изолати *E. coli*, от лезии при болестта на Crohn, са показали, че ефективно прилепват, нахлуват и оцеляват в епителните клетки и макрофагите, а именно нахлуват и се репликират вътре в чревните епителни клетки, използвайки процес, зависим от механизъм, подобен на макропиноцитоза. Като такава, тази група изолати е колективно наречена адхеренто-инвазивна *E. coli* (АИЕС) [5]. Една трета от АИЕС са изолирани от илеалните лезии на пациенти с болестта на Crohn. По този начин АИЕС включва категория *E. coli*, свързана с персистирането в това мултифакторно заболяване. Критериите за включване в категорията АИЕС включват:

- способност за прилепване и нахлуване в чревни епителни клетки с процес на навлизане, подобен на макропиноцитоза;
- способност за оцеляване и репликация в рамките на макрофагите, без да предизвиква смърт на клетката гостоприемник;
- способност да индуцира освобождаването на големи количества TNF- α от инфектирани макрофаги [5, 6].

Патотипът АИЕС не изразява общи вирулентни фактори, открити в различни други патогенни щамове на *E. coli* и генетичната основа за неговия провъзпалителен и инвазивен фенотип не е напълно разбран [7]. Понастоящем характеристиките, подобни на вирулентност, свързани с АИЕС, се откриват само фенотипно, но последните геномни изследвания започват да определят някои уникални генетични детерминанти които биха могли да се използ-

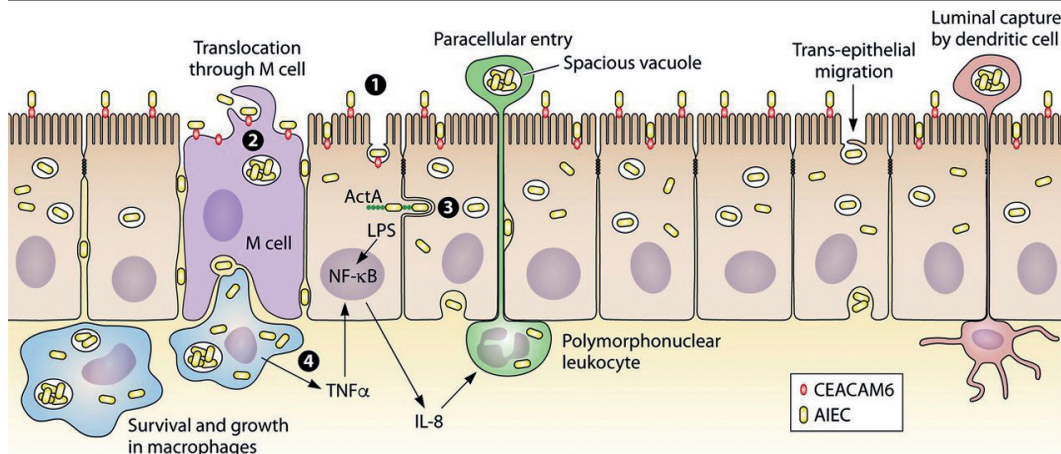
ват за идентифициране на патотипа в бъдеще [8]. АИЕС щамовете имат висока вариабилност на О:Н серотипове, като серогрупите О6 и О22 са най-разпространени. АИЕС щамовете се групират във филогенетичната група В2 и са най-тясно свързани с екстраинтестинални патогени *E. coli* (ЕхРЕС), които са свързани с инфекции на пикочните пътища (уропатогенни *E. coli* [UPEC]) и неонатален менингит. Въпреки това, ЕхРЕС щамове рядко споделят характеристиките на адхезия, инвазия и вътреклетъчна репликация, които идентифицират АИЕС патотип [10, 11].

Патоадаптация

Секвенирането на целия геном на LF82, прототипния щам на АИЕС, и други клинично изолирани АИЕС щамове, са подпомогнали характеризирането на редица придобити гени, генни клъстери и отговорни патоадаптивни мутации за фенотипа АИЕС. Организацията на генома на АИЕС е подобна на тази на други патогенни щамове *E. coli*, с големи участъци от основния геном, прекъснати с геномни острови, вероятно придобити чрез хоризонтален трансфер [8, 12]. Наличието на тези 35 уникални геномни острова вероятно представляват генетичните детерминанти, отличаващи, патотипа, с бактериалната адхезия, инвазия и вътреклетъчно оцеляване. Секвенирането на генома е подпомогнало идентифицирането на четири потенциални детерминанти на вирулентност: първо, секреторна система тип VI, която се използва от грам-отрицателни бактерии за износ на протеини през клетъчната обвивка и се смята, че поддържа вътреклетъчното оцеляване (837, 841); второ, няколко гена, кодиращи адхезини, по-специално пили от тип I, свързания FimH адхезивен върхов протеин, който е важен за адхезията към чревния епител, и дълги полярни фимбрии, които играят решаваща роля в инвазията; трето, различни транскрипционни регулатори на вирулентни гени, които изискват по-нататъшно изследване от функционалната геномика, за да се разбере тяхната роля в оцеляването и растежа на АИЕС; и накрая, гени, участващи в придобиването на желязо, което е доказано, че е основна вирулентна черта в ЕхРЕС щамове. Въпреки че щамът LF82 е считан за прототип за патотипа АИЕС, геномното секвениране разкрива наличието на допълнителен плазмид, наподобяващ *Yersinia pestis*- рMT1, който не присъства в други клинични АИЕС изолати [8-12].

Патогенеза

Патотипът АІЕС се определя от способността да се прилепва към и да нахлува в епителните клетки и да се репликира в епителните клетки и макрофагите (фиг. 1). Интересното е, че много от стратегиите за вирулентност, използвани от АІЕС, са улеснени от генни мутации, свързани с чувствителността към болестта на Crohn. Началният етап на патогенезата на АІЕС в илеума изисква адхезия към клетките гостоприемници. АІЕС изисква медирана от флагела подвижност и използва повърхностната експресия на пили тип 1, за да се придържа към свързани с карциноембрионален антиген клетъчни адхезионни молекули 6 (САЕСАМ6), експресиран върху епителните клетки на гостоприемника. Експресията на САЕСАМ6 е повишена при пациенти с CD и това може да се дължи на генетично предразположение или чрез стимулиране на производството на TNF- и IFN чрез колонизация на АІЕС, поддържайки патологията на заболяването. След адхезия към епителните клетки, АІЕС използва няколко вирулентни фактора, за да улесни инвазията. Една такава стратегия за вирулентност е производството на външно мембранни везикули, които доставят бактериални ефектори до епителните клетки гостоприемници, чрез сливане с епителни клетки и чрез експресията на OmpA, основен мембранно-свързан протеин [13-15]. В допълнение към инвазията на чревните епителни клетки, АІЕС също е способен да се премества през епитела, за да получи достъп до подлежащата лимфоидна тъкан, lamina propria. АІЕС експресира дълги полярни фимбрии, които взаимодействат с M-клетки, монослой от специализирани епителни клетки на повърхността на Пайеровите плаки, позволяващи на АІЕС достъп до lamina propria. След като АІЕС получи достъп до lamina propria, патотипът може да инфектира и да се репликира във фаголизозомите на макрофагите, без да индуцира клетъчна смърт на макрофаги [15, 16]. Непрекъснатата репликация на АІЕС в инфектирани макрофаги води до секреция на високи нива на TNF-причинявайки чревно възпаление и образуване на грануломи при пациенти с болестта на Crohn. CD може да бъде свързана с генетични полиморфизми в гени, свързани с автофагия, като тези за ATG16L1 (свързани с автофагия като 1) и IRGM (свързани с имунитета). Автофагията играе основна роля в предотвратяването на вътреклетъчната бактериална репликация. По този начин, съответните генетични полиморфизми могат да подобряват вътреклетъчната репликация на АІЕС в макрофаги и епителни клетки, причинявайки повишено възпаление и патология [16-18].



Фигура 1. Инвазия на гостоприемни клетки от АИЕС при болестта на Сроhn. Анормалната колонизация на лигавицата на илеума се иницира от взаимодействието на АИЕС с чревните епителни клетки. (1) (2) Чрез използване на процес, подобен на макропиноцитоза, АИЕС навлиза, оцелява и се репликира в цитоплазмата на клетката гостоприемник след лизирание на ендоцитната вакуола. (3) Използвайки своята инвазивна способност и актинови микрофиламенти и микротубули на клетката гостоприемник, АИЕС преминава през чревната бариера през чревни епителни клетки или през М-клетки, нахлува в клетките на гостоприемника и се премества в други клетки. (4) АИЕС е в състояние да оцелее екстензивно в резидентните макрофаги и дендритни клетки и индуцира секрецията на големи количества TNF-α и грануломатозно възпаление.

Епидемиология

Няколко клинични проучвания са открили адхезивни и инвазивни *E. coli* при над 30% от пациентите с болестта на Сроhn. В проучване, включващо 63 пациенти с CD, АИЕС е изолиран от приблизително 36 до 38% от илеалните лезии, докато е открит само при 6% от 102 здрави индивида. Освен това пациентите с болестта на Сроhn имат повишени серумни титри на антитела срещу *E. coli*, особено към протеин С на външната мембрана (OmpC). Повишената серумна реактивност към OmpC корелира с повишена тежест на заболяването и може да се използва като индикатор за тежестта и прогресията на болестта на Сроhn при пациенти. По отношение на CD, последните епидемиологични проучвания показват, че заболяемостта и разпространението нарастват във всички етнически групи

в развития свят, но най-високата честота се наблюдава в Северна Америка, Северна Европа и Обединеното кралство, най-вероятно заради редовните профилактични прегледи на населението в тези географски райони. Изчислено е, че 1,4 милиона души в Съединените щати и 2,2 милиона души в Европа страдат от това инвалидизиращо заболяване [6, 19-24]. Въпреки че епидемиологичните данни за АИЕС във връзка с CD са ограничени, наличните данни предполагат връзка между появата на CD и наличието на АИЕС, което прави този патотип подходяща заплаха за здравето и терапевтична цел.

Клиника, диагностика и терапия

Клиника. АИЕС се свързват с възпалителни заболявания на червата при хора и животни, включително болестта на Crohn и грануломатозен колит при кучета, пилета и пуйки [16, 17]. Проучвания при хора са установили, че АИЕС колонизира чревната лигавица на пациенти с CD и е свързан както с ранни, така и с хронични лезии, което предполага, че АИЕС може да инициира заболяване, както и да допринесе за хронично възпаление [25]. CD се проявява с коремна болка, треска, запушване на червата или диария с наличие на кръв и/или слуз [26].

Диагностика. За да се идентифицират АИЕС в чревни проби, щамовете на *E. coli* се изследват за тяхната способност да нахлуват в епителните клетки и да оцеляват и да се репликират в макрофагите, като се използва стандартен тест с гентамицин (гентамицинът се използва за разграничаване между извънклетъчни прилепнали бактерии и вътреклетъчни бактерии по време на анализи за инвазия. Щамове *E. coli*, резистентни към гентамицин, се изключват) [27].

Терапия. Медираните от АИЕС могат да бъдат лекувани с помощта на стратегии, включени в превенцията на АИЕС репликация, адхезия и инвазия. Документирано е, че клиничните симптоми на CD се подобряват, когато концентрациите на луминални бактерии се намалят чрез чревни промивки или антибактериални лекарства, като антибиотици. Въпреки че антибиотиците се използват широко в клиниката за лечение на болестта на Crohn и други възпалителни заболявания на червата, продължаването на употребата трябва да бъде внимателно обмислено поради драстичните им ефекти върху микробния състав и имунния статус на червата. Бъдещите терапевтични стратегии могат да включват блокиране на адхезията на АИЕС. Въз основа на скорошната кристална структура на взаимодействието между пили тип 1 и САЕСАМ6, би било възможно

да се използват естествени или създадени манозни антагонисти за блокиране на взаимодействието между FimH и САЕСАМ6, като по този начин се инхибира колонизацията. Базираните на адхезин ваксини също могат да бъдат ефективна стратегия за блокиране на колонизацията на АІЕС в червата, тъй като тези ваксини са показали успех при блокиране на колонизацията на UPEC в пикочния мехур на мишката. Функцията на тип 1 пили и следователно способността на АІЕС да колонизира илеума също може да бъде инхибирана чрез предотвратяване на сглобяването на пилус с помощта на наличните в момента пилициди. И накрая, адхезията на АІЕС може да бъде конкурентно инхибирана чрез прилагане на пробиотици на основата на дрожди, тъй като те експресират клетъчни стени, които са богати на свободни манозни остатъци, които биха действали като примамващи лиганди за пили тип 1 [28-32].

Източници:

1. Carvalho, F.A., Barnich, N., Sivignon, A., et al., 2009. Crohn's disease adherent-invasive *Escherichia coli* colonize and induce strong gut inflammation in transgenic mice expressing human CEACAM. *J. Exp. Med.* 206, 2179–2189.
2. Flanagan, P., Campbell, B.J., Rhodes, J.M., 2011. Bacteria in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Biochem. Soc. Trans.* 39, 1067–1072.
3. Jensen, S.R., Fink, L.N., Nielsen, O.H., Brynskov, J., Brix, S., 2011. Ex vivo intestinal adhesion of *Escherichia coli* LF82 in Crohn's disease. *Microb. Pathog.* 51, 426–431.
4. Kotlowski, R., Bernstein, C.N., Sepehri, S., Krause, D.O., 2007. High prevalence of *Escherichia coli* belonging to the B2+D phylogenetic group in inflammatory bowel disease. *Gut* 56, 669–675.
5. Darfeuille-Michaud, A., 2002. Adherent-invasive *Escherichia coli*: a putative new *E. coli* pathotype associated with Crohn's disease. *Int. J. Med. Microbiol.* 292, 185–193.
6. Darfeuille-Michaud, A., Boudeau, J., Bulois, P., et al., 2004. High prevalence of adherent-invasive *Escherichia coli* associated with ileal mucosa in Crohn's disease. *Gastroenterology* 127, 412–421.
7. Barrett JC, et al. 2008. Genome-wide association defines more than 30 distinct susceptibility loci for Crohn's disease. *Nat. Genet.* 40:955–962.
8. Nash JH, Villegas A, Kropinski AM, Aguilar-Valenzuela R, Konczyk P, Mascarenhas M, Ziebell K, Torres AG, Karmali MA, Coombes BK. 2010. Genome sequence of adherent-invasive *Escherichia coli* and

- comparative genomic analysis with other *E. coli* pathotypes. *BMC Genomics* 11:667.
9. Martinez-Medina M, Aldeguer X, Lopez-Siles M, González-Huix F, Lypez-Oliu C, Dahbi G, Blanco JE, Blanco J, Garcia-Gil LJ, Darfeuille-Michaud A. 2009. Molecular diversity of *Escherichia coli* in the human gut: new ecological evidence supporting the role of adherent-invasive *E. coli* (AIEC) in Crohn's disease. *Inflamm. Bowel Dis.* 15:872–882.
 10. Martinez-Medina M, Mora A, Blanco M, Lypez C, Alonso MP, Bonacorsi S, Nicolas-Chanoine M-H, Darfeuille-Michaud A, Garcia-Gil J, Blanco J. 2009. Similarity and divergence among adherent-invasive *Escherichia coli* and extraintestinal pathogenic *E. coli* strains. *J. Clin. Microbiol.* 47:3968–3979.
 11. Barrett JC, et. al. 2008. Genome-wide association defines more than 30 distinct susceptibility loci for Crohn's disease. *Nat. Genet.* 40:955–962.
 12. Miquel S, Peyretailade E, Claret L, de Vallée A, Dossat C, Vacherie B, Zineb EH, Segurens B, Barbe V, Sauvanet P, Neut C, Colombel J-F, Medigue C, Mojica FJM, Peyret P, Bonnet R, Darfeuille-Michaud A. 2010. Complete genome sequence of Crohn's disease-associated adherent-invasive *E. coli* strain LF82. *PLoS One* 5(9):e12714. doi:10.1371 /journal.pone.0012714.
 13. Barnich N, Boudeau J, Claret L, Darfeuille-Michaud A. 2003. Regulatory and functional co-operation of flagella and type 1 pili in adhesive and invasive abilities of AIEC strain LF82 isolated from a patient with Crohn's disease. *Mol. Microbiol.* 48:781–794.
 14. Barnich N, Carvalho FA, Glasser A-L, Darcha C, Jantscheff P, Allez M, Peeters H, Bommelaer G, Desreumaux P, Colombel J-F, Darfeuille-Michaud A. 2007. CEACAM6 acts as a receptor for adherent-invasive *E. coli*, supporting ileal mucosa colonization in Crohn disease. *J. Clin. Invest.* 117:1566–1574.
 15. Bringer M-A, Barnich N, Glasser A-L, Bardot O, Darfeuille-Michaud A. 2005. HtrA stress protein is involved in intramacrophagic replication of adherent and invasive *Escherichia coli* strain LF82 isolated from a patient with Crohn's disease. *Infect. Immun.* 73:712–721.
 16. Glasser AL, Boudeau J, Barnich N, Perruchot MH, Colombel JF, Darfeuille-Michaud A. 2001. Adherent invasive *Escherichia coli* strains from patients with Crohn's disease survive and replicate within macrophages without inducing host cell death. *Infect. Immun.* 69:5529–5537.
 17. Lapaquette P, Glasser A-L, Huett A, Xavier RJ, Darfeuille-Michaud A. 2010. Crohn's disease-associated adherent-invasive *E. coli* are selectively favoured by impaired autophagy to replicate intracellularly. *Cell. Microbiol.* 12:99–113.
 18. Lapaquette P, Bringer M-A, Darfeuille-Michaud A. 2012. Defects

- in autophagy favour adherent-invasive *Escherichia coli* persistence within macrophages leading to increased pro-inflammatory response. *Cell. Microbiol.* 14:791–807.
19. Ambrose NS, Johnson M, Burdon DW, Keighley MR. 1984. Incidence of pathogenic bacteria from mesenteric lymph nodes and ileal serosa during Crohn's disease surgery. *Br. J. Surg.* 71:623–625.
 20. Giaffer MH, Holdsworth CD, Duerden BI. 1992. Virulence properties of *Escherichia coli* strains isolated from patients with inflammatory bowel disease. *Gut* 33:646–650.
 21. Martin HM, Campbell BJ, Hart CA, Mpofu C, Nayar M, Singh R, Englyst H, Williams HF, Rhodes JM. 2004. Enhanced *Escherichia coli* adherence and invasion in Crohn's disease and colon cancer. *Gastroenterology* 127:80–93.
 22. Tabaqchali S, O'Donoghue DP, Bettelheim KA. 1978. *Escherichia coli* antibodies in patients with inflammatory bowel disease. *Gut* 19:108–113.
 23. Arnott IDR, Landers CJ, Nimmo EJ, Drummond HE, Smith BKR, Targan SR, Satsangi J. 2004. Sero-reactivity to microbial components in Crohn's disease is associated with disease severity and progression, but not NOD2/CARD15 genotype. *Am. J. Gastroenterol.* 99:2376–2384.
 24. Loftus, EV, Jr. 2004. Clinical epidemiology of inflammatory bowel disease: incidence, prevalence, and environmental influences. *Gastroenterology* 126: 1504–1517.
 25. Boudeau J, Glasser AL, Masseret E, Joly B, Darfeuille-Michaud A. 1999. Invasive ability of an *Escherichia coli* strain isolated from the ileal mucosa of a patient with Crohn's disease. *Infect. Immun.* 67:4499–4509.
 26. Baumgart DC, Sandborn WJ. 2012. Crohn's disease. *Lancet* 380:1590–1605.
 27. Darfeuille-Michaud A, Boudeau J, Bulois P, Neut C, Glasser A-L, Barnich N, Bringer M-A, Swidsinski A, Beaugerie L, Colombel J-F. 2004. High prevalence of adherent-invasive *Escherichia coli* associated with ileal mucosa in Crohn's disease. *Gastroenterology* 127:412–421.
 28. Prantera C, Scribano ML. 2009. Antibiotics and probiotics in inflammatory bowel disease: why, when, and how. *Curr. Opin. Gastroenterol.* 25:329–333
 29. Wlodarska M, Finlay BB. 2010. Host immune response to antibiotic perturbation of the microbiota. *Mucosal Immunol.* 3:100–103.
 30. Wellens A, Garofalo C, Nguyen H, Van Gerven N, Sløttinger R, Hernalsteens J-P, Wyns L, Oscarson S, De Greve H, Hultgren S, Bouckaert J. 2008. Intervening with urinary tract infections using antiadhesives based on the crystal structure of the FimH-H-oligomannose-3 complex. *PLoS One* 3:e2040.

31. Carvalho FA, Barnich N, Sivignon A, Darcha C, Chan CHF, Stanners CP, Darfeuille-Michaud A. 2009. Crohn's disease adherent-invasive *Escherichia coli* colonize and induce strong gut inflammation in transgenic mice expressing human CEACAM. *J. Exp. Med.* 206:2179–2189.
32. Poggio TV, La Torre JL, Scodeller EA. 2006. Intranasal immunization with a recombinant truncated FimH adhesin adjuvanted with CpG oligodeoxynucleotides protects mice against uropathogenic *Escherichia coli* challenge. *Can. J. Microbiol.* 52:1093–1102.

ИНФЕКЦИИ ПРИЧИНЕНИ ОТ НЕКРОТОКСИЧНИ *ESCHERICHIA COLI* КАТО ОБЩ ПАТОГЕН ПРИ ХОРА И ДОМАШНИ ЖИВОТНИ

Мария Павлова

Понастоящем има достатъчно добре обосновани доказателства, че щамовете **некротоксични *Escherichia coli*** са патогени, както при хората, така и при домашните животни. Въпреки първоначалното им определяне като уропатогенни *E. coli*, тяхната патогенност всъщност не се ограничава до пикочните пътища и обхваща както храносмилателния тракт, така и други органи. Изолати от тази група на патогенни *E. coli* имат сравнително постоянни характеристики групирани в остров на патогенност и принадлежат към ограничен брой серотипове. Най-важното е, че според настоящите познания, животинските щамове от тази група не се различават значително от човешките щамове, което създава проблем за потенциална заплаха за човешкото здраве при контакт с животински резервоари. В този контекст честото отделяне на щамове NTEC-1, главно от котки, трябва да бъде от особено значение за ветеринарното и обществено здраве.

Escherichia coli се срещат главно като чревни коменсали, въпреки че няколко групи *E. coli* могат да причинят заболявания, от гастроентерит до извънчревни прояви, като уроинфекции, сепсис, невроинфекции, при хора и животни. В този кратък обзор ние се фокусираме върху слабопознатите за страната некротоксични *Escherichia coli* (NTEC), които са част от токсин-продуциращите *Escherichia coli* с човешки и животински произход.

Характеристика на цитотоксични некротизиращи фактори при *Escherichia coli*

Некротоксичните *Escherichia coli* (NTEC) първоначално са определени като токсични изолати на *E. coli* от неонатален ентерит в Италия, чиито изолати произвеждат токсин, наречен цитотоксичен некротизиращ фактор (CNF), който предизвиква прогресивно образуване на гигантски многоядрени клетки. Важна е индуцираната от токсините дълбока реорганизация на цитоскелета, характеризираща

се главно с необратимо образуване на дебели снопове от актинови стресови влакна. С това явление може да се обясни инхибирането на клетъчното делене и последващия процес на многоядреност [1,2,3]. Идентифицирани са два типа CNF, като всеки от тях е генетично свързан с няколко други специфични маркера за вирулентност – ситуация, която позволява дефинирането на две отделни хомогенни категории NTEC, наречени NTEC-1 и NTEC-2. CNF1 и CNF2 са силно хомоложни конюгирани протеини, съдържащи 1014 аминокиселини, които упражняват както смъртоносна, така и некротична активност *in vivo* в клетъчни култури. Активността на CNF върху клетките на бозайник се дължи на способността им да активират конститутивно чрез деамидиране Rho- протеините, които регулират физиологията на клетъчния цитоскелет. В NTEC-1 генът, кодиращ CNF1, принадлежи към остров на патогенност, който също включва гените, кодиращи алфа-хемолизин и Р-фимбрии. CNF1 е много смъртоносен за мишки, с 50 % смъртоносна доза, оценена на около 20 ng пречистен материал, което означава, че CNF1 трябва да бъде класиран сред силно смъртоносните бактериални токсини. Клиничните и хистопатологични ефекти, получени от пречистен CNF1, са изследвани при агне, инокулирано интравенозно. Смъртта, предизвикана от токсини, е предшествана от неврологични признаци и секреторна диария. Най-маркантните лезии са оток и кръвоизливи на централната нервна система. CNF1, е по-моцнен от CNF2 в предизвикване на многоядреност на клетките, но с по-малка некротична активност [4,5,6].

В щамовете NTEC-2, CNF2 се кодира от плазмид, предавайки се чрез конюгация. Който плазмид също кодира, в 100% от изолатите, нов член на семейството на цитолеталните раздуващи токсини (Cdt-III) и в около 50% от изолатите, F17b-фимбриалния адхезин, който придава способността да се придържа към чревните вили [6,7]. Цитолеталният раздуващ токсин (Cdt) е описан за първи път от Johnson и Lior през 1988, като топлинно лабилен токсин, присъстващ във филтратите на култури, получени от клинични изолати на *Campylobacter spp.* (включително *C. jejuni*, *C. coli*, *C. fetus*, *C. lari*), *Escherichia coli* и *Shigella dysenteriae*. По-конкретно се съобщава, че Cdt-съдържащите филтрати влияят неблагоприятно на СНО клетките, Vero клетките, HeLa клетките и Hep-2 клетките, като предизвикват прогресивно раздуване в продължение на 96 часа и в крайна сметка водят до загуба на жизненост на клетките между 96 и 120 часа. Наличието на Cdt също се подозира в голяма част от

щамове NTEC-1, които щамове могат да бъдат открити при хора и при всички видове домашни бозайници, докато щамове NTEC-2 са докладвани само при преживни животни [8,9,10,11].

CNF като потенциален фактор на патогенност

Некротичните и силно смъртоносни ефекти, упражнявани от CNF1 и CNF2 при опитни животни [31, 33], показват, че ако се освободи в достатъчни количества по време на инфекция, токсинът потенциално е в състояние да прояви сериозни токични ефекти. На клетъчно ниво първоначалните биологични действия упражнени от CNF, по-специално върху клетъчния цитоскелет, може също да има отношение към патогенността на некротоксичните *E. coli*. Първо, CNF придава способността на клетката да поглъща всякакви частици в контакт с клетъчната мембрана, включително и бактерии.[11]. Придобиване на такъв фагоцитен капацитет, който изисква излагане на епителните клетки на токсина от най-малко 48 часа, изглежда е свързани с прогресиращата невъзможност за навлизане в апоптоза [12]. Тази корелация може да се интерпретира като кохерентна стратегия на патогена за индуциране на дълготрайно състояние на фагоцитоподобна активност в епителните клетки, което позволява бактериално размножаване и дори трансцитоза. Друго ин витро изследване показва, че CNF I заличава микровилите на епитела и намалява трансмиграцията на полиморфонуклеарни левкоцити в червата [13].

Ролята на некротоксичните щамове *E. coli* в заболяванията при човека и животните

Има множество убедителни доказателства, почиващи както на епидемиологични, така и на клинични проучвания, че NTEC са отговорни за различни извънчревни инфекции при хора. Това заключение се основава на сравнението на честотата на факторите на вирулентност в проби от изолати на *E. coli* от клинично дефинирани извънчревни инфекции в сравнение с фекални изолати. Докато изолати, произвеждащи както хемолизин, така и CNF1, рядко се откриват в изпражненията от здрави индивиди, тяхната честота достига средно 40-50% при щамове от инфекции на пикочните пътища, простатит и други извънчревни инфекции [17,18,19,20,21,22,23]. Съобщава се, че честотата на NTEC-1 е сходна при цистит, пиелонефрит и асимптоматична бактериурия [24]. Заслужава да се отбележи, че повечето от щамове NTEC-I, инкриминирани за извънчревни

инфекции, също произвеждат адhezини и че принадлежат към ограничен брой серотипове, главно 02, 04, 06, 08 и 075 [9]. Въпреки че е открит за първи път в неонатален ентерит [1], участието на NTEC-1 при диарийни заболявания при хора не е толкова ясно установено, както в извънчревните инфекции. Въпреки това, няколко клинични и епидемиологични наблюдения предполагат, че NTEC-1 упражнява патогенен ефект върху червата при малки деца. При два отделни взрива на неонатална диария, възникващи в две различни испански болници се съобщават за NTEC-1 на серотип 06: K13, който осигурява потенциалната роля на NTEC-1 за ентерит при кърмачета. Освен това, пиелонефритни щамове *E. coli*, които са характеризирани като типични щамове NTEC-1, експресиращи хемолизин и CNF са инкриминирани в два случая на хемогичен колит при новородени бебета [25,26].

Влиянието на щамовете NTEC е ясно установено при чревни и извънчревни инфекции на хора. Тяхната роля при тежки дизентерични синдроми, както при хора, така и при животни, се потвърждава от няколко клинични доклада. Щамовете NTEC-1, но не и NTEC-2 се съобщава при свине след многогодишни епидемиологични изследвания на базата на отделяне на фекалии от животни с диария в Испания и Англия. Двата тествани щама NTEC-1, принадлежащи на 088 и 032 серотипа, причиняват ентерит, прогресиращ до ентероколит, характеризиращ се клинично с кървави петна диария и бактериемично разпространение в белите дробове на новородени прасенца. Хистопатологичните промени са в съответствие с токсимичен процес и показва, че освен своята патогенност за червата, щамовете NTEC-1 имат особена склонност към белите дробове. Заслужава си като се споменава, че NTEC-щамове от прасета принадлежат в по-голямата си част към същите серотипове като NTEC-1 от хора, главно 02, 04, 08, 054, 078 и 083 [27,28].

Докато NTEC-1 са често изолитани от прасета, то NTEC-2 са открити в изпражненията на млади и възрастни говеда. Описани са случаи на летален хеморагичен колит при юници, дължащ се на щам NTEC-2. Действителната роля на NTEC-2 в заболяването се потвърждава от демонстрацията им при улцеративни възпалителни лезии на дебелото черво и ректума на болните животни [29].

Рискът за придобиване на инфекции от некротоксични *E. coli* при човека значително се увеличава тъй като NTEC-I щамове са докладани многократно при гастроентерит, уроинфекции и други извънчревни инфекции както при котки, така и при кучета. Струва

си да се спомене, че до около 50 % от здравите котки отделят NTEC-1 с изпражненията си според испански доклад. Освен това, щамовете NTEC 1 от кучета и котки принадлежат в към същите серогрупи като NTEC 1 от хора, т.е. 02, 04, 06 и 023 [30,31,32,33]. Освен при домашните кучета и котки, огнища на летален ентерит, дължащ се на NTEC-1 от серогрупа 02 са докладвани и при зайци и коне. И в двата случая щамовете са открити в чисти култури от чревното съдържимо на няколко животни с диария, наблюдение, което предполага тяхната роля в наблюдаваните симптоми – около една трета от зайците са развили диария без кръв (14 000 от 50 000), от която повече от 10% умират. При конете, повечето няколкомесечни животни загиват след кратък стадий на дизентерия с оскъдни хеморагични изпражнения, които са клинични симптоми, напомнящи тези, наблюдавани при юници с щамове NTEC-1 от серогрупа 02 [34,35].

Комбинираната продукция на няколко мощни токсина (хемелизин, CNF, Cdt) от щамове некротоксични *E. coli* ги прави потенциално агресивни патогени, които заслужават да бъдат търсени в по-голям мащаб. Освен това, NTEC-1 от хора и животни е силно консервативен според наличните молекулярни маркери, което показва, че домашните животни могат да представляват резервоари на щамове NTEC, които са патогенни за хората. Няколко проучвания потвърждават, че щамовете NTEC могат да бъдат изолирани от изпражненията на представителен процент здрави деца (CNF1-щамове), котки (CNF1-щамове), кучета (CNF1-щамове) и телета (CNF2-щамове); следователно, асоциацията на щамовете NTEC с диария при хора и животни трябва да бъде внимателно изследвана. В България клинични микробиологични данни по темата липсват, което е казус за бъдещи, крайно нужни изследвания на национално ниво, чиито резултати ще са значими за правилната диагностика на *E. coli* инфекциите.

Източници:

1. Caprioli A., Falbo V., Roda L.G., Ruggeri F.M., Zona C., Partial purification and characterization of an *Escherichia coli* toxic factor that induces morphological cell alterations, *Infect. Immun.* 39 (1983) 1300-1306.
2. Fiorentini C., Fahhri A., Flatau G., Donelli G., Matarrese P., Lemichez E., Falzano L., Boquet P., *Escherichia coli* cytotoxic necrotizing factor

- I (CNF 1),), toxin that activates the Rho GTPase, *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 19532-19537.
3. Blanco JE, Blanco M, Blanco J. *Escherichia coli* enterotoxigenicas, verotoxigenicas y necrotoxigenicas en alimentos y en muestras clinicas. Papel de los animales como reservorio de cepas patogenicas para el hombre. *Microbiologia.* 1995 Mar;11(1):97-110. Spanish. PMID: 7546450.
 4. De Rycke J., Plzissart G., Toxic effects for lambs of cytotoxic necrotising factor from *Escherichia coli*, *Res. Vet. Sci.* 49 (1990) 349-354.
 5. De Rycke J., Gonzalez E.A., Blunco J., Oswald E., Blanco M., Boivin R., Evidence for two types of cytotoxic necrotizing factor in human and animal clinical isolates of *Escherichia coli*. *J. Clin. Microbiol.* 28 (1990) 694-699.
 6. Subekti, D.S., Lesmana, M., Tjaniadi, P., et al., 2003. Prevalence of enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) in hospitalized acute diarrhea patients in Denpasar, Bali, Indonesia. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 47 (2), 399–405
 7. Monika D. Scuron¹, Kathleen Boesze-Battaglia, Mensur Dlakić and Bruce J. Shenker. The Cytolethal Distending Toxin Contributes to Microbial Virulence and Disease Pathogenesis by Acting As a Tri-Perditious Toxin. 2016. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* <https://doi.org/10.3389/fcimb.2016.00168>.
 8. W.M. Johnson, H. Lior A new heat-labile cytolethal distending toxin (CLDT) produced by *Escherichia coli* isolates from clinical material *Microb. Pathog.*, 4 (1988), pp. 103-113
 9. Blanco, J. E., et al. "Serotypes of CNF1-Producing *Escherichia Coli* Strains That Cause Extraintestinal Infections in Humans." *European Journal of Epidemiology*, vol. 10, no. 6, Springer, 1994, pp. 707–11, <http://www.jstor.org/stable/3581706>.
 10. Schmidt G., Selzer J., Lerin M., Aktories K., The Rho-deamidating cytotoxic necrotizing factor I from *Escherichia coli* possesses transglutaminase activity. Cysteine 866 and histidine 881 are essential for enzyme activity, *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 13669-13674.
 11. Flatau G., Lemichr E., Gauthier M., Chardin P., Paris S., Fiorentini C., Boquet P., Toxin-induced activation of the G protein p21 Rho by deamidation of glutamin. *Nature* 387 (1997) 729-733.
 12. Fiorentini C., Fabbri A., Matarrca P., Falzano L., Boquet P., Malorni W., Hinderance of apoptosis and phagocytic behaviour induced by *Escherichia coli* cytotoxic necrotizing factor I: two related activities in epithelial cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 241 (1997) 341-346.
 13. Hofman P., Flatau G., Selva E., Gauthier M., Le Negrate G., Fiorentini

- C., Rossi B., Boquet P., Esc heric ia coli cytotoxic necrotizing factor I effaces microvilli and decreases transmigration of polymorphonuclea leukocytes in intestinal T84 epithelial cell monolayers, *Infect. Immun.* 66 (1998) 2494-2500.
14. Cansu Onlen Guneri, et. Al. The Distribution of Cytotoxic Necrotizing Factors (CNF-1, CNF-2, CNF-3) and Cytolethal Distending Toxins (CDT-1, CDT-2, CDT-3, CDT-4) in *Escherichia coli* Strains Isolated from Extraintestinal Infections and The Determination of Their Phylogenetic Relationship by PFGE. 2020. Research square. DOI: <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-120529/v1>.
 15. Vincenzo Falb, Maria Famiglietti, Alfredo Caprioli. Gene Block Encoding Production of Cytotoxic Necrotizing Factor 1 and Hemolysin in *Escherichia coli* Isolates from Extraintestinal Infections.1992. *Infection and Immunity*. Pp.2182-2187.
 16. Caprioli A., Falbo V., Ruggeri F.M., Baldassarri L., Bisicchia R., Ippolito G., Romoli E., Donelli G., Cytotoxic necrotizing factor production by hemolytic strains of *Escherichia coli* causing extraintestinal infections, *J. Clin. Microbiol.* 25 (1987) 146-149.
 17. Blanco M., Blanco J.E., Alonso M.P., Blanco J.B., Es Virulence factors and 0 groups of cheric hia coli isolates from patients with acute pyelonephritis, cystitis and asymptomatic bacteriuria, *Eur. J. Epidemiol.* 12 (1996) 191-198.
 18. Brauner A., Katouli M., Tullus K., Jacobson S.H., Production of cytotoxic necrotizing factor, verocytotoxin and haemolysin by pyelonephritogenic *Escherichia coli*, *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* (1990) 762-767.
 19. Yamamoto S., Tsukamoto T., Terai A., Kurazono H., Takeda Y., Yoshida O., Distribution of virulence factors in *E.scherichia cnli* isolated from urine of cystitis patients, *Microbiol. Immunol.* 39 (1995) 401-404
 20. Terai A., Yamamoto S., Mitsumori K., Okada Y., Kurazono H., Takeda Y., Yoshida, *Escherichia coli* virulence factors and serotypes in acute bacterial prostatitis, *Int. J. Urol.* (1997) 289-294.
 21. Andreu A., Stapleton A.E., Fennel C., Lockman H.A., Xercavins M., Fernandez F., Stamm W.E., Urovirulence determinants in *Escherichia coli* strains causing prostatitis, *J. Infect. Dis.* 176 (1997)464-469.
 22. Brauner A., Katouli M., Ostenson C.G., P-fimbriation and haemolysin production are the most important virulence factors in diabetic patients with *Escherichia coli* bacteraemia: a multivariate statistical analysis of seven bacterial virulence factors, *J. Infect.* 31 (1995) 27-31.
 - 1
 23. Cherifi A., Contrepolis M., Picard B., Gouillet P., De Rycke J., Fairbrother J., Barnouin J., Factors and markers of virulence in *E.scherichia coli* from human septicemia. *FEMS Microbiol. Lctt.* 58 (I 990) 279-283.

24. Blanco M., Blanco J.E., Alonso M.P., Blanco J.B., Es Virulence factors and O groups of enteric *E. coli* isolates from patients with acute pyelonephritis, cystitis and asymptomatic bacteriuria, *Eur. J. Epidemiol.* 12 (1996) 191-198
25. Blanco J., Gonzalez E.A., Espinosa P., Blanco M., Garabal J.I., Alonso M.P., Enterotoxigenic and necrotising *Escherichia coli* in human diarrhoea in Spain, *Eur. J. Epidemiol.* 8 (1992) 548-552.
26. Nicoletti M., Superti F., Conti C., Calconi A., Zagaglia C., Virulence factors of lactose-negative *Escherichia coli* strains isolated from children with diarrhea in Somalia, *J. Clin. Microbiol.* 26 (1988) 524-529.
27. McLaren I., Wray C., Another animal *Escherichia coli* cytopathic factor, *Vet. Rec.* 119 (1986) 576-577
28. Wray C., Piercy D.W., Carroll P.J., Cooley W.A., Experimental infection of neonatal pigs with CNF toxin-producing strains of *Escherichia coli*, *Res. Vet. Sci.* 54 (1993) 290-298.
29. Wray C., Piercy D.W., Carroll P.J., Johnson C.T., Higgins R., Bovine haemorrhagic colitis associated with CNF+ and F6+ (987P) *Escherichia coli*, *Vet. Rec.* 131 (1992) 220.
30. Beutin L., *Escherichia coli* as a pathogen in dogs and cats, *Vet. Res.* 30 (1999) 285.
31. Blanco J., Blanco M., Wong I., Blanco J.E., Haemolytic *Escherichia coli* strains isolated from stools of healthy cats produce cytotoxic necrotizing factor type 1 (CNF1), *Vet. Microbiol.* 38 (1993) 157-165.
32. Prada J., Baljer G., De Rycke J., Steinruck H., Zimmermann S., Stephan R., Beutin L., Characteristics of alpha-hemolytic strains of *Escherichia coli* isolated from dogs with gastroenteritis. *Vet Microbiol.* 29 (1991) 59-73
33. Yuri K., Nakata K., Katae H., Yamamoto S., Hasegawa A., Distribution of uropathogenic virulence factors among *Escherichia coli* strains isolated from dogs and cats. *J. Vet. Med. Sci.* 60 (1998) 287-290
34. Ansuini A., Candotti P., Vecchi G., Falbo V., Minelli F., Caprioli A., Necrotizing *Escherichia coli* in rabbits and horses, *Vet. Rec.* 134 (1994) 608
35. Wray C., Piercy D.W., Carroll P.J., Johnson C.T., Higgins R., Bovine haemorrhagic colitis associated with CNF+ and F6+ (987P) *Escherichia coli*, *Vet. Rec.* 131 (1992) 220.

ЗНАЧЕНИЕ НА *CURLI* АМИЛОИДНИ ВЛАКНА В ЕТАПИТЕ НА БИОФИЛМ ОБРАЗУВАНЕ ПРИ *ESCHERICHIA COLI*

Екатерина Александрова

Значение на биофилма

През последните години бактериалните съобщества – биофилми, все по-често се разглеждат като неразделна част от начина на живот на много бактерии. Биофилмите се асоциират с възникването на инфекции и обикновено се характеризират с извънклетъчен матрикс, който помага за оцеляването на отделните бактерии в условията на стрес от околната среда [12]. Образуването на биофилми и последващото затваряне на бактериалните клетки в сложна матрица може да повиши резистентността към антимикробни и стерилизирателни агенти, което прави тези организми трудни за ирадикация и контрол [34].

Ролята на образуване на биофилм при инфекции в човека и замърсяването на хранителни продукти е добре проучена. Предполага се, че образувателите се биофилми в помещения за производство на храни са резервоар на бактерии, които биха могли да замърсят хранителните продукти, причинявайки разваляне на храните, инфекции при хората и тежки заболявания. Доказано е, че биофилмите действат като среда за разпространение на шигатоксини при ЕНЕС (ентерохеморагични *E. coli*) и потенциална поява на допълнителни патогенни щамове [7]. ЕНЕС се изоларат както от хора, така и от едър рогат добитък [26].

Биофилми се образуват и по медицинските изделия и импланти като катетри, компоненти на сърдечни пейсмейкъри, изкуствени сърдечни клапи, стави и др, създавайки проблеми за здравето на хората, както и рискове от вътреболнични инфекции от мултирезистентни патогени.

Разбирането на биогенезата на белтъчните структури, отговорни за образуването на биофилм, като *curlI*, е предпоставка за разработването на терапевтични средства, които могат да отслабят образуването на биофилм и колонизацията на гостоприемника. Ентеробактериите, като *Escherichia coli* и *Salmonella spp.*, експресират белтъчни

извънклетъчни влакна, наречени **curli**, които участват в контакта на клетките, както помежду им, така и с различни повърхности [1].

Ролята на *curli* в образуването на биофилм

Протеинът *curli* е вид амилоидно влакно, произведено от определени щамове ентеробактерии. Те са извънклетъчни влакна, разположени върху бактерии като *E. coli* и *Salmonella spp*, като подпомагат образуването на биофилм в извънклетъчния матрикс [2]. Това е многостепенен процес, който включва 4 разграничени етапа:

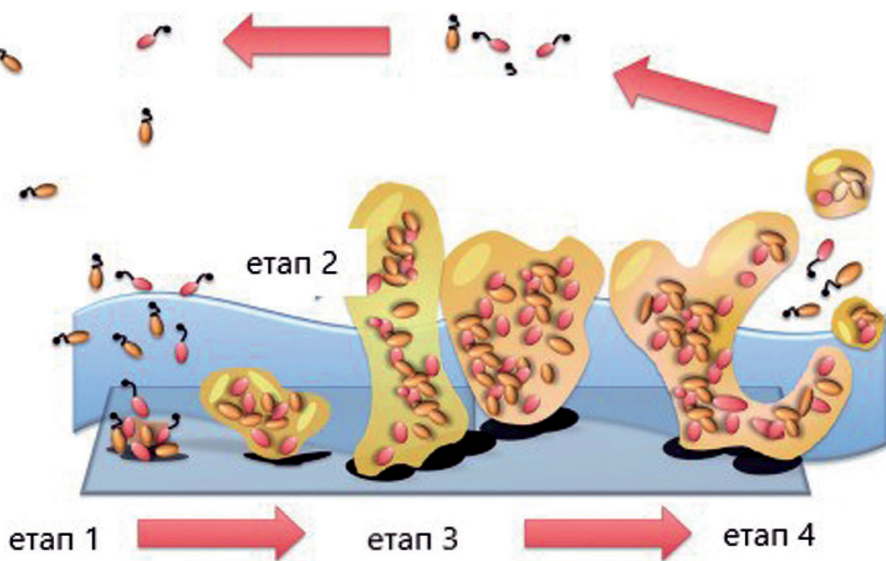
I – **ПЪРВОНАЧАЛЕН КОНТАКТ** или **обратно прикрепване** към повърхността; това зависи от баланса на привличащи и отблъскващи сили между бактериите и повърхността. Като факторите на околната среда, така и бактериалните фактори са важни при това взаимодействие. Прикрепването се влияе от условията на околната среда като температура, рН, йонна сила на средата и грапавината на повърхността в допълнение към бактериалните свойства като хидрофобност и подвижност. Освен това, подвижността, осигурена от камшичета, се счита за важен фактор по време на началния етап на образуване на биофилм при *E. coli*, тъй като K12 щамовете без флагели не произвеждат биофилми [15, 29, 13].

II – **НЕОБРАТИМО ПРИКРЕПВАНЕ** – често се влияе от наличието на повърхностни структури като фимбриални адhezини – фимбрии тип 1, *curli*, пили тип 4, дълги полярни фимбрии и фимбрии F9 и производство на адhezивни молекули като екзополисахариди и адhezин [4, 14].

III – **СЪЗРЯВАНЕ** – по време на съзряването на биофилма бактериите продължават да се размножават и да произвеждат извънклетъчен матрикс. На този етап биофилмът приема триизмерна структура. Този растеж се дължи най-вече на взаимодействията между самите бактерии; няколко повърхностни протеини и компоненти на извънклетъчната матрица участват в бактериалната адhezия и изграждането на биофилма. Два важни фактора за тази стъпка са идентифицирани в *E. coli*: автотранспортни протеини за взаимодействие между клетките и екзополисахариди (EPS) за изграждане на матричната структура.

IV – **ДИСПЕРСИЯ** е последният етап в образуването на биофилм, характеризираща отделянето на бактериите от биофилма и тяхното разпръскване, което допринася за разпространението на бактериите. Това е сложен процес, който включва няколко сигнала и ефектори от околната среда, като нито един механизъм за разпръскване не се използва от всички бактериални видове. Бактериите обикновено

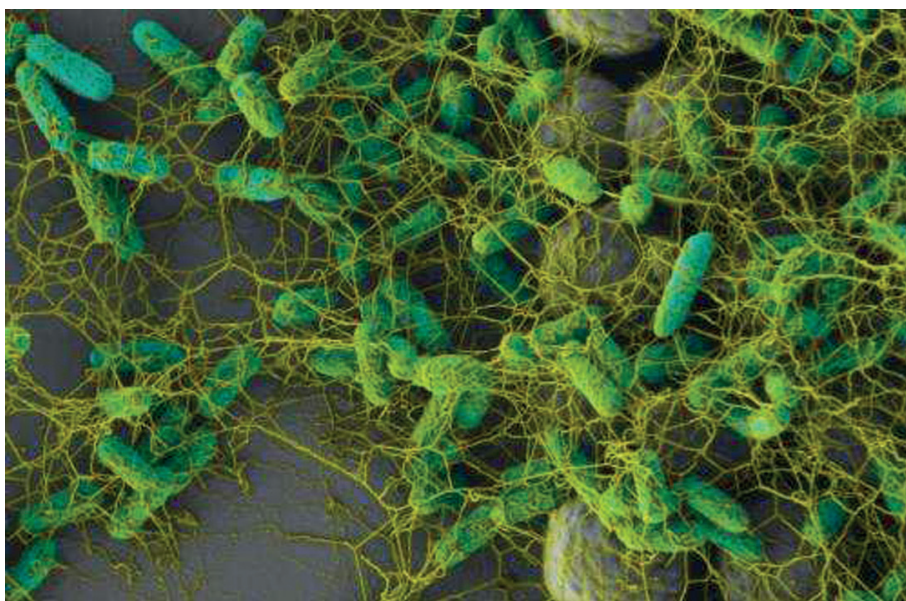
преминават от планктонен начин на живот към биофилм, усещайки промените в околната среда [22]. Разпръскването е най-малко прочетената стъпка в образуването на биофилм за всички бактериални видове и не е изследвана за STEC (шига токсин продуциращи *E. coli*). *E. coli*, различни от STEC, модулирането на критични повърхностни структури, като пили, образуващи сноп тип IV (BFP) в ЕРЕС (ентеропатогенни *E. coli*) и агрегирани прилепнали фимбрии (AAF) в ЕАЕС (ентероагрегативни *E. coli*), води до отделяне на бактерии от биофилма и повърхността [24, 30, 33]. Например в ЕАЕС, положително заредените агрегирани прилепнали фимбрии се намират на повърхността на бактериалната клетка, за да осигурят прилепването на бактериите, когато се произвежда дисперсин, тъй като дисперсинът се свързва и неутрализира заряда на липополизахарида. Когато количеството на произвеждания дисперзин намалява, положително заредените AAFs се струпват върху бактериалната повърхност поради тяхното взаимодействие с отрицателно заредени LPS. Следствие от този колапс, AAF вече не се придържат към абиотичните повърхности и биофилмът се разпръсква. Механизмите, включени в отделянето на биофилм, са от повишен интерес, тъй като разбирането на тези механизми може да доведе до разработването на клинични или индустриални инструменти за премахване на биофилми [3].



Фигура 1. Графично изображение на биофилм образуване при *E. coli*. Етапи 1- първоначален етап; 2- необратимо прикрепване; 3-свързване; 4- дисперсия. Източник: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S058095171930008X>.

Много бактериални повърхностни структури, включително *curli*, флагели, пили и екзополизахариди, играят роля в различни етапи от развитието на биофилма (21). *Curli* позволяват на *Salmonella* Enteritidis да се прикрепят към тефлонови повърхности и такива от неръждаема стомана, което може да доведе до образуване на биофилм и замърсяване на апарати и средства, често използвани в хранително-вкусовата промишленост.

Способността на неадхезивен щам на *E. coli* да образува биофилм зависи от експресията на *csgA* (*curli* специфичен ген А). Това предполага, че *curli* са важни в началните етапи на развитието на биофилма по време на фазата на прикрепване.



Фигура 2. Множество флагели, образуващи биофилм при *E. coli* върху гладка повърхност в околната среда. Източник: <https://phys.org/news/2013-04-crevices-coli-reveals-role-flagellum.html>

Роля на *curli* в патогенезата

През 1989 г. Anre Olsen и сътрудници публикуват в списание Nature откриването на нов клас повърхностни клетъчни структури на *E. coli*, които са извити и изградени от протеинът *curlin*. На тази база, откривателите на тези органели предлагат те да се наричат *curli*. Също така установяват, че само определени щамове могат да образуват тези структури. [28], като в последствие се свързват с много процеси и при род *Salmonella*. *Curli* се образуват от тънки

влакна, които се агрегират на повърхността на клетките [20]. Те се повлияват транскрипционно от сигналите на околната среда като рН, температура и лимит на хранителни вещества [28]. *Curli* влакната участват в адхезията на бактериалната клетка към повърхности и образуване на биофилм. Освен това медиират адхезията и инвазията на клетките гостоприемници, като са мощни индуктори на възпалителния отговор на гостоприемника. Структурата и биогенезата им са уникални сред бактериалните фимбри. Структурно и биохимично *curli* принадлежат към нарастващ клас фимбри, известни като амилоиди. Образуването на амилоидни влакна е отговорно за няколко заболявания, включително Алцхаймер, Хънтингтън и прионовите заболявания, въпреки че *in vivo* процесът все още не е добре проучен [3].



Биогенеза на *curli*

Оцветяването на амилоидните влакна в червено багрилото Конго ред, осигурява удобен начин за идентифициране на продуциращите *curli* бактерии отговорните. 10]. Най-малко шест белтъка, кодирани от различно транскрибираните оперони *csgBA* и *csgDEFG* (*csg: curli* specific gene- *curli* специфичен ген), отговарят за образуването

на *curli* в *E. coli* [17]. Хомоложни оперони са идентифицирани при *Salmonella spp.* и се наричат *agfBA* и *agfDEFG* [10]. За целите на настоящия преглед структурите, кодирани от опероните *agf* и *csg*, наричаме *curli*.

За повечето лабораторни щамове *E. coli* и щамове *Salmonella spp.* експресията на *curli* най-добре се осъществява при температури под 30°C. Доказано е обаче, че много клинични щамове *E. coli*, включително изолати причиняващи сепсис, могат да експресират *curli* при 37°C. Освен това мутациите в промотора *csgD* могат да доведат до щамове, които експресират *curli* независимо от температурата [6, 11].

Някои доказателства сочат, че *curli* имат важна роля в инфекциозния процес. Те участват в прикрепването и инвазията към клетките на гостоприемника, взаимодействието с неговите протеини и активирането на имунната му система. *Curli* се свързват с протеините на извънклетъчния матрикс фибронектин и ламинин [32]. Ролята на тези влакна по време на колонизацията на гостоприемника може да не е напълно оценена, тъй като до сега се е смятало, че те се експресират само при температури под 30°C [27]. Вече е известно, че експресията на *curli* е специфична за всеки щам, като при много клинични изолати се наблюдава продуциране на влакната и при 37°C.

Предполага се, че много от протеините на гостоприемника улесняват разпространението на *curli* продуциращи бактерии [5]. Освен това, *curli* се свързват с разграждащия тъканите ензим плазминоген, в резултат на което се активира плазминогенът до плазмин [9]. По този начин бактериите, продуциращи *curli*, могат да получат достъп до много тъкани на гостоприемника. И не на последно място *curli* влакната се свързват и с фибриногена, забавяйки кръвосъсирването, което би могло да увеличи разпространението на бактериите в околните тъкани [18].

Пример за това е изолирането на бактерии, експресиращи *curli* при 37°C, от пациенти със сепсис.

Роля на *curli* в адхезията и инвазията на клетките на гостоприемника

Curli се експресира от *E. coli* и *Salmonella spp.*, които се прикрепят към различни еукариотни клетъчни линии по-добре, отколкото щамовете, непродуциращите такива. Щам *E. coli* K-12, експресиращ *curli*, се прикрепя по-добре към уроепителни клетки, отколкото

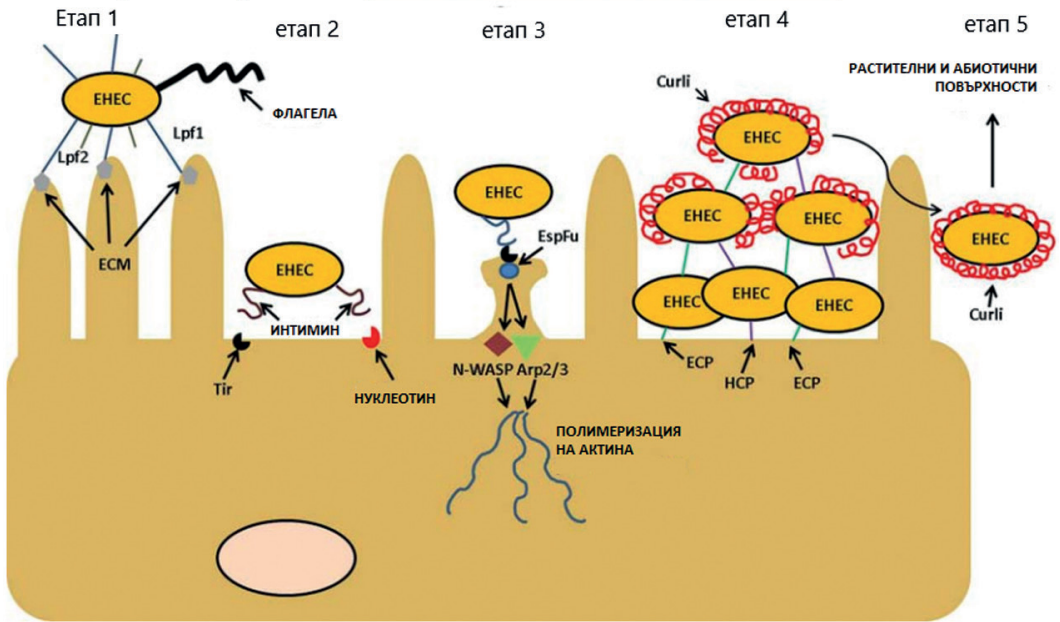
щамове без тези влакна [23]. Експресията на гени, кодиращи *curli* в щам К-12, който обикновено не експресира *curli*, води до инвазия на човешки епителни клетки на маточната шийка (HeLa) [16]. Инвазията от изолати К12 може да бъде инхибирана от пептиди, които блокират образуването на *curli* [8]. *E. coli* 0157:H7, които произвеждат *curli*, се прикрепят и нахлуват в човешки ларингеален епителни клетки (Нер-2) [32]. Също така, 0157:H7 имат повишена вирулентност в миши модел [19].

Salmonella Typhimurium SR-11, експресиращи *curli*, медиират прикрепяне в култури тънкочревни епителни клетки на мишки [31]. Взети заедно, тези резултати предполагат, че *curli* играят важна роля в началните етапи на инфекциозния процес. Интересно е, че *curli* може да насърчава свързването с растителни клетки. *E. coli* К-12, които свръхпродуцират *curli*, се прикрепят добре към люцерната. От друга страна, мутациите в *csgA* или *csgD* не дават отражение за предотвратяването адхезията на *E. coli* 0157:H7 [21]. При *Salmonella enterica* делецията на *csgB*, но не и на *csgA*, намалява прилепването към кълновете на люцерната [2].

По подобен начин чревните патогени също изискват повърхностно локализиране адхезини за колонизиране на червата на гостоприемника и евентуално установяване на заболяване. Известно е, че ентерохеморагичните *Escherichia coli* (ЕНЕС) и като цяло щамовете *E. coli*, произвеждащи Shiga токсин, съдържат голям брой протеини, отговорни за адхезията и допринасят за установяването, устойчивостта и тъканния тропизъм, наблюдавани по време на инфекция с тези патогени. Разбирането как работят тези адхезини е от решаващо значение за получаване на пълна картина на патогенния и патофизиологичен процес, свързан с ЕНЕС. Освен това, тъй като адхезините играят толкова важна роля в инвирулентността, те са мишени за терапевтична интервенция.

Роля на основните фимбриални/афимбриални адхезинови протеини, като фактор, свързан с тъканна колонизация е представена в няколко етапа на фигура 4.

Етап 1 – Lpf (long polar fimbriae – дълги полярни фимрии) взаимодейства с протеини от извънклетъчната мембрана (ЕСМ), като ламинин, колаген IV и фибронектин. След първоначалното взаимодействие с червата ЕНЕС е в състояние да се прикрепят плътно към клетката на гостоприемника. **Етап 2** – това прикрепяне се осъществява чрез взаимодействие на повърхностния протеин интимин с транслоцирания рецепторен протеин Tir и нуклеолина. През **етап 3**



Фиг. 4. Роля на основните филбриални/афилбриални адхезинови протеини, като фактор, свързан с тъканна колонизация. Адхезините са група протеини в ентерохеморагична *Escherichia coli* (ЕНЕС), които участват в прикрепването или колонизирането на този патоген към абиотични (пластмаса или столана) и биологични повърхности, като тези, открити в говежди и човешки черва. Източник: McWilliams B. D. and Torres A. G. *Enterohemorrhagic Escherichia coli Adhesins*

се установява взаимодействие между TIR и интимин, което иницира пренареждане на актина в клетката гостоприемник чрез участието на транслоцирания бактериален протеин EspFu и набирането на няколко белтъка на гостоприемника.

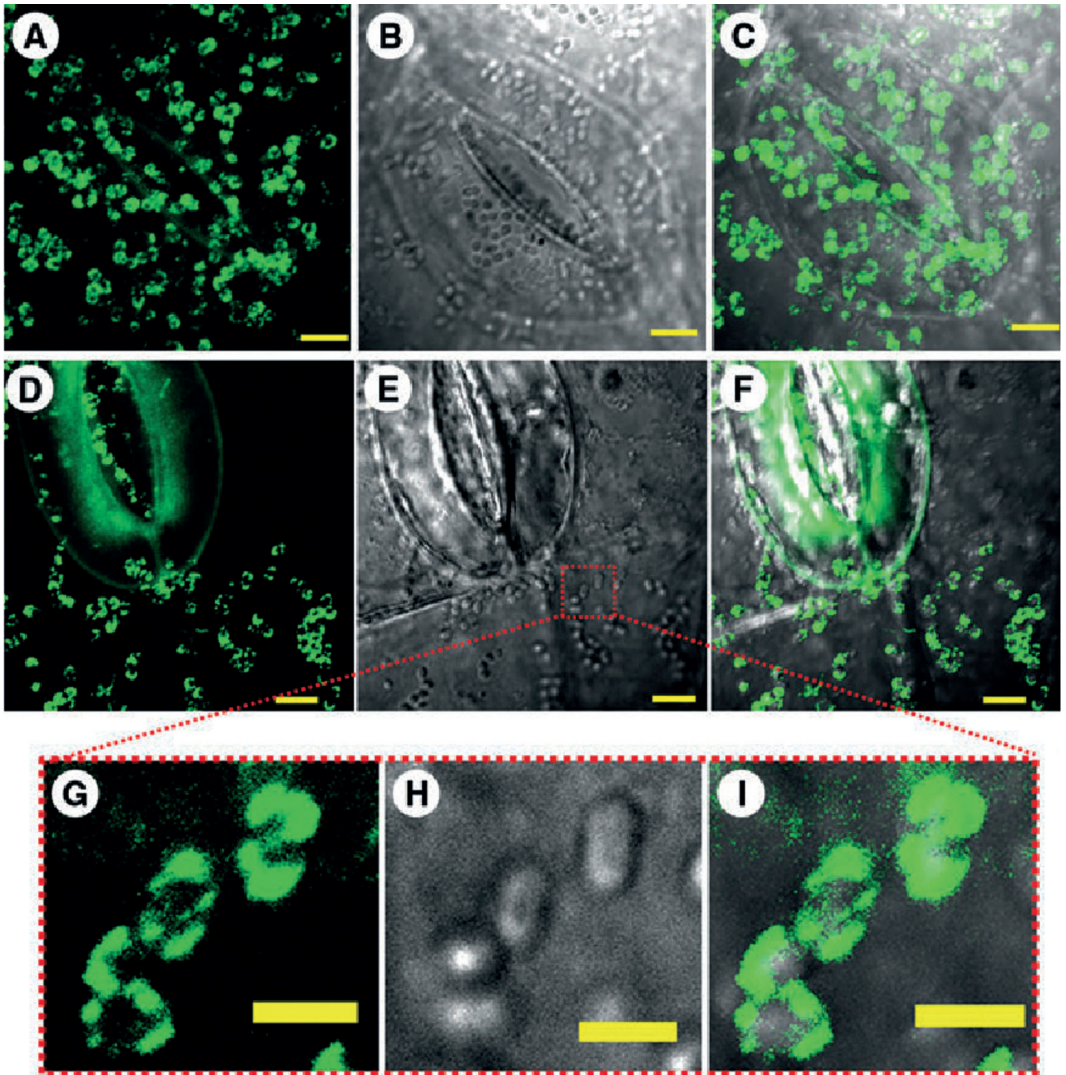
Етап 4 – ECP (автотранспортен протеин при ЕНЕС) и HCP (фимбри, идентифицирани на повърхността на *E. coli* O157:H:7, взаимодействащи с клетките на дебелото черво, допринасящи за адхезията на ЕНЕС) взаимодействат с повърхността на чревни клетки на гостоприемника, като вероятно засилват колонизацията чрез образуване на микроколонии и/или биофилми. Освен това е показано, че *curli* допринася за колонизацията, въпреки че не е доказано взаимодействие с ECP и HCP.

Последен **етап 5** – доминантната експресия на *curli* е предложена като вредна за оцеляването на ЕНЕС в червата, което предполага, че тази повърхностна структура може да стане важна

за взаимодействието на патогена с абиотични повърхности и по време на колонизацията на повърхността на листа на зеленчуци и растения.

Роля на *curli* при адхезията на *Escherichia coli* O157:H7 към листатата на пресни зеленчуци

Епидемиите от шига-токсин продуциращата *Escherichia coli* O157:H7 са свързани с консумацията на пресни продукти, като общопризнато е, че прикрепването на бактерии към растителни тъкани представлява първата стъпка в замърсяването на пресни продукти. *Macarisin* и сътрудници инокулират спаначени листа и ги инкубират при 22°C, като на 0, 24 и 48 часа след инкубацията са определени популациите на слабо и силно прикрепените *E. coli* O157:H7. Експресиращите *curli* щамове *E. coli* O157:H7 развиват по-силна адхезия с повърхността на листата, докато мутантите без *curli* и се прикрепват към спанака значително по-слабо. Използвани са два щама *E. coli* O157:H7, добре проучени ентерохеморагични изолати (EDL933 и 86-24), изолирани от две независими огнища на заболяване при човека, за да се разграничи ролята на *Culri* и целулозата в прикрепването на този патоген към повърхности на спанак. Относителното прикрепване на *E. coli* O157:H7 към спанака се увеличава с времето за инкубиране на щамовете, експресиращи *curli*. Лазер сканираща конфокална микроскопия (LSCM) на инокулираните листа разкрива, че *curli*-експресиращите *E. coli* O157:H7 са заобиколени от извънклетъчни структури, силно имунооцветени с анти-*curli* антители. Производството на целулоза не е било необходимо, за да се развие силно прикрепване към листата на спанака. Тези резултати показват, че влакната *curli* са от съществено значение за силната адхезия на *E. coli* O157:H7 към спанака, докато целулозата не е необходима за това [25]. Дефицитните на *curli* мутанти обаче (EDL933 и 86-24), не успяват да се прикрепят и след 24 часа. LSCM анализът на инокулираните листа на спанака разкрива, че бактериите, които са здраво прикрепени към повърхността на листата, са заобиколени от извънклетъчен матрикс, представени на фигура 5 [25].



Фигура 5. Лазерно сканираща конфокална микроскопия (LSCM), изображения на конститутивен *curli* мутант 86-24 RCS GDC (A–C) и *div* тип щам 86-24 (D–I), прикрепени към повърхността на листа от спанак. Зелената флуоресценция в едноканални флуоресцентни изображения (лява колона) показва наличието на *curli*, разпознати от анти-*curli* поликлонални антители. Предпазните клетки също са леко флуоресцентно зелени поради автофлуоресценцията на клетъчната стена. Изображения с диференциален интерферентен контраст (DIC) (централна колона) илюстрират бактериални клетки, прилепнали към предпазните и епидермалните клетки и в отвора на устицата. Дясната колона показва наслагани на DIC и флуоресцентни изображения. Панел G–I представя увеличен изглед на бактерии, произвеждащи екстрацелуларен матрикс, интензивно и мунооцветен с анти-*curli* антители. Скала = 5 μm (A–F), 2 μm (G–I). Източник: www.liebertonline.com/fjpd.

ИЗТОЧНИЦИ:

1. Austin JW, Sanders G, Kay W, Collinson S. Thin aggregative fimbriae enhance *Salmonella enteritidis* biofilm formation. *FEMS Microbiol. Lett.* 1998;162:295–301.
2. Barak J, Gorski L, Naraghi-Arani P, Charkowski A. *Salmonella enterica* virulence genes are required for bacterial attachment to plant tissue. *Appl. Environ. Microbiol.* 2005;71:5685–91.
3. Barnhart M. M. and Chapman M. R. curli Biogenesis and Function. *Annu Rev Microbiol.* 2006; 60: 131–147.
4. Beloin, C., Valle, J., Latour-Lambert, P., Faure, P., Kzreminski, M., Balestrino, D., et al. (2004). Global impact of mature biofilm lifestyle on *Escherichia coli* K-12 gene expression. *Mol. Microbiol.* 51, 659–674.
5. Bian Z, Brauner A, Li Y, Normark S. Expression of and cytokine activation by *Escherichia coli* curli fibers in human sepsis. *J. Infect. Dis.* 2000;181:602–12.
6. Bokranz W, Wang X, Tschape H, Romling U. Expression of cellulose and curli fimbriae by *Escherichia coli* isolated from the gastrointestinal tract. *J. Med. Microbiol.* 2005;54:1171–82.
7. Carpentier B, Cerf O. Biofilms and their consequences, with particular reference to hygiene in the food industry. *J Appl Bacteriol.* 1993;75:499–511. /3
8. Chapman MR, Robinson LS, Pinkner JS, Roth R, Heuser J, et al. Role of *Escherichia coli* curli operons in directing amyloid fiber formation. *Science.* 295:851–85. This paper demonstrates that curli are a bacterial amyloid.
9. Cherny I, Rockah L, Levy-Nissenbaum O, Gophna U, Ron E, Gazit E. The formation of *Escherichia coli* curli amyloid fibrils is mediated by prion-like peptide repeats. *J. Mol. Biol.* 2005;352:245–52.
10. Collinson S, Clouthier S, Doran J, Banser P, Kay W. *Salmonella enteritidis* agfBAC operon encoding thin, aggregative fimbriae. *J. Bacteriol.* 1996;178:662–67.
11. Collinson S, Doig P, Doran J, Clouthier S, Trust T, Kay W. Thin, aggregative fimbriae mediate binding of *Salmonella enteritidis* to fibronectin. *J. Bacteriol.* 1993;175:12–18
12. Costerton JW, Lewandowski Z, Caldwell DE, Korber DR, Lappin-Scott HM. Microbial biofilms. *Annu. Rev. Microbiol.* 1995;49:711–45.
13. Danese, P. N., Pratt, L. A., Dove, S. L., and Kolter, R. (2000). The outer membraneprotein, antigen 43, mediates cell-to-cell interactions within *Escherichia coli* biofilms. *Mol. Microbiol.* 37, 424–432.
14. Farfan, M. J., and Torres, A. G. (2012). Molecular mechanisms that mediate col-onization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains. *Infect. Immun.* 80,903–913.

15. Fletcher, M. (1988). Attachment of *Pseudomonas fluorescens* to glass and influence of electrolytes on bacterium-substratum separation distance. *J. Bacteriol.* 170,2027–2030.
16. Gophna U, Barlev M, Seijffers R, Oelschlager T, Hacker J, Ron E. curli fibers mediate internalization of *Escherichia coli* by eukaryotic cells. *Infect. Immun.* 2001;69:2659–65.
17. Hammar M, Arnqvist A, Bian Z, Olsen A, Normark S. Expression of two *csg* operons is required for production of fibronectin- and congo red-binding curli polymers in *Escherichia coli* K-12. *Mol. Microbiol.* 1995;18:661–70. In this work the two curli gene operons were identified.
18. Herwald H, Morgelin M, Olsen A, Rhen M, Dahlback B, et al. Activation of the contact-phase system on bacterial surfaces—a clue to serious complications in infectious diseases. *Nat. Med.* 1998;4:298–302.
19. Hood SK, Zottola EA. Adherence to stainless steel by foodborne microorganisms during growth in model food systems. *Int J Food Microbiol.* 1997;37:145–153.
20. Hu M, Zhang C, Mu Y, Shen Q, Feng Y. Indole affects biofilm formation in bacteria. *Indian journal of microbiology.* 2010;50:362-8 / 12
21. Jeter C, Matthyse A. Characterization of the binding of diarrheagenic strains of *E. coli* to plant surfaces and the role of curli in the interaction of the bacteria with alfalfa sprouts. *Mol. Plant Microbe Interact.* 2005;18:1235–42.
22. Kaplan, J. B. (2010). Biofilm dispersal: mechanisms, clinical implications, and potential therapeutic uses. *J. Dent. Res.* 89, 205–218.
23. Kikuchi T, Mizunoe Y, Takade A, Naito S, Yoshida S. curli fibers are required for development of biofilm architecture in *Escherichia coli* K-12 and enhance bacterial adherence to human uroepithelial cells. *Microbiol. Immunol.* 2005;49:875–84. This paper demonstrates that curli are expressed in biofilms at 37°C.
24. Knutton, S., Shaw, R. K., Anantha, R. P., Sonnenberg, M. S., and Zorgani, A. A. (1999). The type IV bundle-forming pilus of enteropathogenic *Escherichia coli* undergoes dramatic alterations in structure associated with bacterial adherence, aggregation and dispersal. *Mol. Microbiol.* 33, 499–509.
25. Macarisin D., Patel J., Bauchan G., Giron J. A., and Sharma V. K. Role of curli and Cellulose Expression in Adherence of *Escherichia coli* O157:H7 to Spinach Leaves. *Foodborne Pathogens and Disease.* 2012, vol. 9, (2)
26. Nesse LL, Sekse C, Berg K, Johannesen KC, Solheim H, Vestby LK, Urdahl AM. Potentially pathogenic *Escherichia coli* can form a biofilm under conditions relevant to the food production chain. *Appl Environ Microbiol.* 2014;80:2042–2049. /24

27. Olsen A, Arnqvist A, Hammar M, Sukupolvi S, Normark S. The RpoS sigma factor relieves H-NS-mediated transcriptional repression of *csgA*, the subunit gene of fibronectin-binding curli in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 1993;7:523–36.
28. Olsen A, Jonsson A, Normark S. Fibronectin binding mediated by a novel class of surface organelles on *Escherichia coli*. *Nature.* 1989;338:652–55.
29. Pratt, L. A., and Kolter, R. (1998). Genetic analysis of *Escherichia coli* biofilm formation: roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili. *Mol. Microbiol.* 30,285–293.
30. Sheikh, J., Czczulin, J. R., Harrington, S., Hicks, S., Henderson, I. R., LeBouguenec, C., et al. (2002). A novel dispersin protein in enteroaggregative *Escherichia coli*. *J. Clin. Invest.* 110, 1329–1337.
31. Sukupolvi S, Lorenz RG, Gordon JI, Bian Z, Pfeifer JD, et al. Expression of thin aggregative fimbriae promotes interaction of *Salmonella typhimurium* SR-11 with mouse small intestinal epithelial cells. *Infect. Immun.* 1997;65:5320–25.
32. Uhlich GA, Keen J, Elder R. Variations in the *csgD* promoter of *Escherichia coli* O157:H7 associated with increased virulence in mice and increased invasion of HEp-2 cells. *Infect. Immun.* 2002;70:395–99
33. Velarde, J. J., Varney, K. M., Inman, K. G., Farfan, M., Dudley, E., Fletcher, J., et al. (2007). Solution structure of the novel dispersin protein of enteroaggregative *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 66, 1123–1135.
34. Van Houdt R, Michiels C. Role of bacterial cell surface structures in *Escherichia coli* biofilm formation. *Res. Microbiol.* 2005;156:626–33.

УРОПАТОГЕННИ *E. COLI* И УРОИНФЕКЦИИ

Йорган Калчев

Уроинфекциите са сред най-честите инфекции в медицинската практика, както при амбулаторни пациенти, така и при хоспитализирани [1–3]. В развиващите се страни относителният дял на уроинфекциите сред всички инфекции, свързани с медицинското обслужване достига 24% [4]. Придобитите в обществото уроинфекции са втората най-честа инфекция сред децата. До 7 г. възраст до 8% от момчетата и до 2% от момчетата биват засегнати, като предимно това става в кърмаческия период [3]. Уроинфекциите не подлежат на задължително съобщаване и поради това реалната заболяемост не е точно известна. Установено е, че жените биват инфектирани значително по-често като заболяемостта в репродуктивния период от цистит варира между 0.5-0.7 случая на човек за година [1]. До 30% при жените се наблюдава и повторен епизод на уроинфекция Пиелонефритът е значително по-рядък и съставлява около 250 000 случая годишно в САЩ [5]. До 16% на хоспитализираните лица се поставя уринарен катетър, който увеличава риска за възникване на уроинфекция, свързана с катетъра до 7% всеки ден. Изчислено е, че само в САЩ, от уроинфекции, свързани с медицинското обслужване загиват около 13 000 души на година [6,7].

Рискови фактори за възникването на инфекциите на уринарния тракт са добре известни. Това включва анамнеза за вече прекарана уроинфекция, диабет, сексуална активност, менопауза, употреба на уринарни катетри, скорошна урологична интервенция, обструкции на уринарния тракт и рефлукс на урина [1,2,4,5,8]. Асимптоматична бактериурия се открива между 4-7 % при бременните и макар и рядко, до 2% от всички бременни може да прогресира до пиелонефрит [1,4]. Млади мъже, при които не е извършена циркумцизия, имат повишен риск от инфекция с уропатогенни *E. coli*, манифестиращ се като симптоматичен уретрит [9].

Уропатогенните *E. coli* са най-често срещаните от ескраин-тестиналните патовари, причиняващи до 90% от всички случаи на неусложнени, придобити в обществото уроинфекции [3,4]. Появата на силно вирулентен, полирезистентен клон на *E. coli* като

секвенционен тип 131 [ST 131] вече заемат голям относителен дял сред инфекциите и силно ограничават терапевтичните опции при заболяните [10–12]. Сред хоспитализираните пациенти и усложнени уроинфекции се изолират предимно други представители на разред *Enterobacterales*, като това са *Proteus spp.*, *Klebsiella spp.*, *Enterobacter spp.*, *P. aeruginosa*, *Enterococcus spp.* и по-рядко *E. coli* [2,3,13].

Патогенеза

Възникването на инфекция на уринарния тракт, причинена от уропатогенни *E. coli*, включва няколко последователни етапа. Основен резервоар за УРЕС е гастроинтестиналният тракт [14–17]. Бактериите постъпват в него чрез консумация на животински продукти, най-вече контаминирано пилешко и свинско месо, но също и посредством друга замърсена с уропатогенни серовари храна и вода [14]. Поради своята устойчивост *E. coli* могат да пребивават дълго време в околната среда и да се интегрират сред други микробиологични съобщества. След попадането в гастроинтестиналният тракт, УРЕС може да го колонизират с години и той служи като траен резервоар и източник за инфекция на уринарния тракт [14].

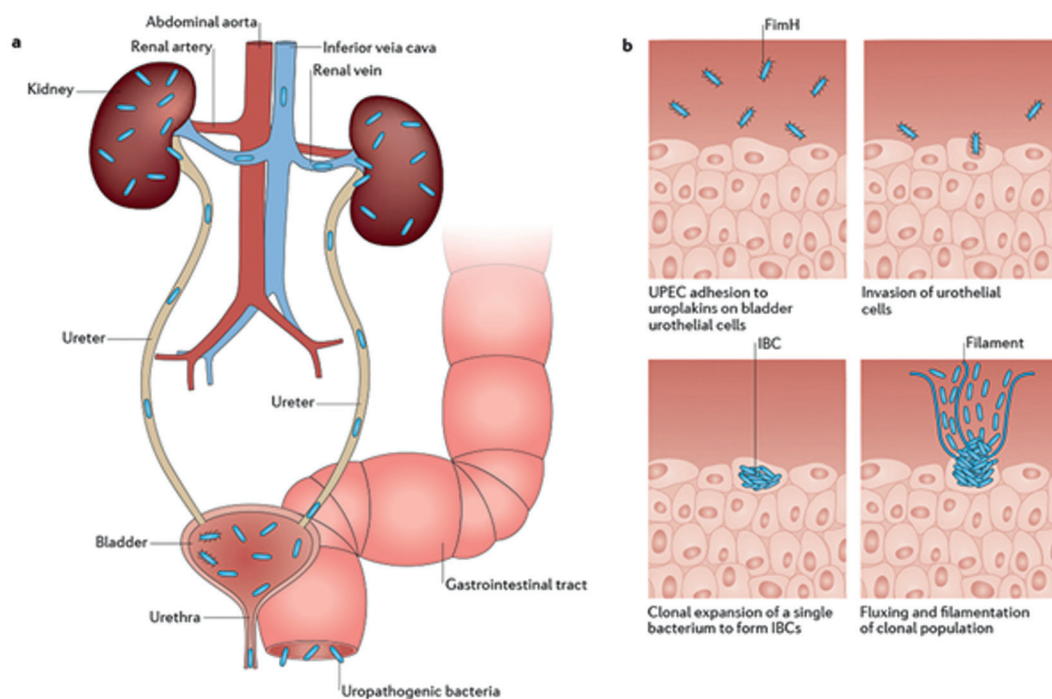
Следващата стъпка включва колонизиране на периуретралното пространство и последваща колонизация и на уретрата. Инфекциите се развиват почти винаги асцендентно. Променената микробиота на влагалището с редукция на лактобацилите спомага колонизацията на влагалището с УРЕС [18]. Употребата на кондоми, поради съдържащият се в тях спермицид и скорошна сексуалната активност за установени рискови фактори за възникване на уроинфекция при млади жени, докато при пост-менопаузални жени, от най-голямо значение имат инконтиненцията и захарният диабет [17, 19, 20].

След навлизането на уропатогенните патовари в уретрата, те адхерират върху уроепитела. За това спомагат множеството адхезивни фактори на вирулентност. Адхезията опосредства образуването на биофилми и противодействие на локалните защитни фактори на мукозата, покриваща уринарния тракт, като например уринарния клирънс на бактерии, блокиране на ексфолиацията на епителни клетки, както и фактори, интерфериращи с провъзпалителната реакция [21–23, 26].

Въпреки че, уроинфекциите са причинени от екстрацелуларни УРЕС, тези патовари могат да се преживяват и да се развиват интрацелурно. След колонизирането на епитела, те инвазират стената на пикочния мехур и образуват вътреклетъчни общества, подпомагащи

възникването на рекурентни инфекции. [14, 16, 17, 26]. Установени са и различни генетични фактори, предразполагащи към възникването от уроинфекции. Това се дължи на полиморфизми в гени, кодиращи рецептори за прикрепяне на UPEC, както и такива, регулиращи вродения имунитет [24, 25].

Хематогенният път на разпространение също е възможен за възникване на пиелонефрит. В тези случаи рядко става въпрос за UPEC, а най-често това е *S. aureus* в хода на бактериемия или ендокардит [17].



Източник: Klein RD, Hultgren SJ. *Urinary tract infections: microbial pathogenesis, host-pathogen interactions and new treatment strategies. Nature reviews. Microbiology. 2020;18[4]:211-226. DOI: 10.1038/s41579-020-0324-0. PMID: 32071440; PMCID: PMC7942789*

Фактори на вирулентност при UPEC

Урината е неблагоприятна среда за растеж и размножаване на голям брой микроорганизми. Причина за това са множество фактори като хипертоничната среда, киселото рН, производството на антимикробни протеини, наличието на нитрити, високи нива на D-серин, ниска концентрация на желязо, еднопосочното движение на урината [27].

За да предизвикат инфекция, микроорганизмите трябва да могат да противодействат на антимикробните свойства на урината. UPEC щамовете притежават уникален арсенал от фактори на вирулентност, които им позволяват да преживяват, колонизират, инвазират, избягват атаката на имунната система и така да причиняват инфекции на урогениталния тракт. Това са молекули и структури, чието производство е кодирано от гени върху мобилни генетични елементи. Това позволява бързата им дисеминация между отделните бактериални клетки чрез хоризонтален генетичен трансфер. Вирулентност-асоциираните гени се включват в плазмиди, фаги и са част от т. нар. острови на патогенността.

Обикновено се селектират от ГИТ на пациента, тези щамове, разполагащи с подходящите адхезивни свойства, позволяващи им да колонизират влагалището и периуретралното пространство. Различните комбинации дават отражение върху възникването на множество обособени генетични профили [28].

Факторите на вирулентност също така се свързват и с определен профил на антимикробна резистентност, като значително по-често се откриват продуценти на широкоспектърни бета-лактамази [ESBLs] и мултирезистентни [MDR] варианти, спрямо авирулентни щамове [29, 30]. Щамовете, които причиняват предимно цистит или пиелонефрит, се различават по своите O-, H- и K-антигени. [29, 31]. Установено е, че *E. coli* стимулира по-силно имунната система, което от своя страна се асоциира с по-силно изразена симптоматика [29]. До 85% от уропатогенните патовари са склонни да образуват биофилми, което значително увеличава тяхната резистентност към прилагане на антибиотици и засилва тяхната вирулентност [32].

Най-общо стратегиите, които използват уропатогенните щамове включват адхезия специфично към уроепителя, захващане на желязото, производство на токсини. Факторите на вирулентност може да се разделят в две големи групи – повърхностни [свързани за бактериалната клетка] и секреторни [33].

Фимбрии [пили] – подпомагат адхезията, инвазията, стимулиране на продукцията на цитокини и подпомагат образуването на биофилми. Най-голямо значение имат Р фимбриите [Р пили, Раp пили] Наричат се така тъй като техният рецептор върху епителните клетки на уроепителя се среща и на повърхността на еритроцитите и определя кръвна група Р [34]. За тяхното изграждане е необходим набор от протеини, всички от които са кодирани от раp оперона, който е част от островите на патогенност [35]. Чрез адхезия, UPEC

се захващат за уроепителя и го колонизират, без да бъдат отмити от преминаващата урина. Клас II се асоциира предимно с възникването на пиелонефрит и бактериемия, докато клас III при цистит [36, 29]. Силно антигенни са и водят до възникване на силен имунен отговор посредством TLR-4 и последваща тъканна деструкция. Неутрофилите нямат рецептори, с които да разпознат тези пили [29]. Тип 1 фимбриите свързват гликопротеина уроплакин и спомагат за инвазията на бактерия в епителните клетки с последващо вътреклетъчно персистиране. [29, 37, 38]. Открити са и множество други фимбриални и нефимбриални адхезивни елементи като S фимбрии, Dr хемаглутиназини, последните от които, също спомагат за инвазията на UPEC [29].

Флагели – *E. coli* е подвижен перитрих. С помощта на флагелите, бактерията може да се придвижва асцендентно срещу посоката на движение на урината и така да достигне бъбрека.

ЛПЗ [липополизахарид] е структурен компонент от външната мембрана на Gram [-] бактерии, в това число и на *E. coli*. Създава непреодолима бариера за хидрофобни антибиотици, индуцира възпалителен отговор и спомага за интегритета на бактериалната клетка [39, 40].

UPEC образуват и капсула – наличието на по-големи количества от капсулни K-антигени [K1, K5, K12] участва в защитата на бактериите от полиморфоядрените левкоцити, блокирайки фагоцитозата. [29, 31]

Секреторните фактори включват молекули, които не са свързани с клетката, а се отделят от нея след образуване. Продукцията на хемолизини уврежда паренхимните и епителните клетки на тубулите, като по този начин спомага за инвазията на уропатогенните изолати [41]. Бактериите образуват различни сидерофори – по подобие на други бактерии, така и при UPEC желязото е от огромно значение. Урината е бедна на желязо, затова, уропатогенните щамове имат по-добре развита система за секвестрация на желязо спрямо диарогенните патовари, тъй като в урината желязото е оскъдно. Поради това тези бактерии продуцират в повишени количества сидерофори като аеробактин, ентеробактин [29, 42]. UPEC образуват токсини, които имат негативно влияние като намаляват перисталтиката на уретерите, което води до забавено изпразване и движения на урината. Описани са и *curli* протеини – екстрацелуларни фибрилери протеини, участващи в изграждането на биофилми [43].

Спектър на уроинфекциите и клинична картина

Всяка инфекция, засягаща уринарната система се означава като уроинфекция. С термина бактериурия се означава единствено присъствието на бактерии в урината, но това не винаги се свързва с инфекция, а може да означава също така и колонизация. При уроинфекция, освен присъствието на патогенен микроорганизъм, са налице клинични оплаквания, като в урината се откриват сегментоядрени левкоцити [пиурия]. От друга страна, при колонизацията тези промени отсъстват – няма клинични симптоми и пиурия [44, 45].

Съществуват различни начини на класификация на уроинфекции. Според мястото на възникване на инфекциозния процес, уроинфекциите могат да се разделят на уретрит, цистит и пиелонефрит [46]. От практическа гледна точка е особено удобно разделянето на уроинфекциите на горни [пиелонефрит], долни [цистит] и асимптоматична бактериурия. Тази класификация подпомага установяването на най-вероятният причинител, начина на възникване на инфекцията. и терапевтичния подход – вид антибиотик, продължителност на приема и начин на въвеждане [47]. Най-честата уроинфекция е циститът, при която възпалителния процес е ограничен в стената на пикочния мехур.

От терапевтична гледна точка се използва и концепцията за разделянето на инфекциите на уринарния тракт на две групи – неусложнени и усложнени. Неусложнени са тези, които възникват остро и спорадично и се очаква леко клинично протичане без усложнения [45, 48, 49]. При усложнените има състояние или рисков фактор, които предполагат по-вероятно тежко клинично протичане [44, 48, 49]. Те включват уроинфекции при мъже, бременни жени, лица с функционални и структурни аномалии на уrogenиталната система, имунокомпрометирани пациенти и такива с бъбречни заболявания [44, 45, 48-50]. Катерът-свързани уроинфекции [catheter-associated urinary tract infections – CA-UTIs] по-често се описват като самостоятелна категория. За такива се считат уроинфекции при катетризиранни лица, възникващи минимум след 48ч. от поставянето на кететъра [49].

Европейската асоциация по урология дефинира рекурентните инфекции като поне 3 епизода в година или 2 за последните 6 месеца [49]. Често уроинфекциите се характеризират с релапси и реинфекции. За релапс говорим тогава, когато инфекцията се причинява от същия микроорганизъм след проведено адекватно лечение, докато реинфекцията се дължи на нов микроорганизъм [46].

Клиничните симптоми могат да се характеризират с различна тежест. При деца под 2 г. възраст, те често са неспецифични [47]. От друга страна, клиничната симптоматика при възрастни лесно насочва към наличието на уроинфекция. Често при инфекции на долния уринарен тракт се описва често уриниране, парене при уриниране, мътна урина, тежест или дискомфорт над симфизата. [44, 45, 48, 50] При инфекция, ангажираща горния уринарен тракт обикновено класическата клинична изява е с температура, болка по фланговете и дизурия. [44, 45, 48]. При много възрастни лица уроинфекцията може да се прояви чрез делир и когнитивни нарушения [45].

Микробиологично изследване на урина.

Вземане, транспорт и съхранение на клиничен материал.

МБ изследване на урина [урокултура] не е рутинен тест за скрининг, а се назначава при наличие на определени индикации. Те включват наличие на симптоми, предполагащи възможна уроинфекция, при пациенти със синдром на системния възпалителен отговор [SIRS] и в търсене на източника на инфекция, скрининг на бременни жени за асимптоматична бактериурия [първи триместър], усложнени уроинфекции [по-голяма вероятност за терапевтичен неуспех, налага се по-продължително антибиотично лечение, носят по-голям риск от усложнения]. Урокултурата може дефинитивно да даде етиологична диагностика на уроинфекцията и да даде възможност за определяне на антимикробната чувствителност на изолата. Този метод се приема за „златен стандарт“ в диагностиката на уроинфекции [51, 52].

Правилното вземане, транспорт и съхранение на клиничния материал е от основно значение за да не се компрометира микробиологичният резултат. За целта е от огромно значение познаване на правилата за вземане, транспорт и съхранение от страна на лекарите и правилно инструктиране на пациентите. Най-подходящият клиничен материал за изследване е урината. Събирането на средна порция урина е най-широко застъпеният и предпочитан метод, защото е неинвазивен, не носи риск за пациента. Въпреки това, в определени случаи не може да се прилага и изисква спазване на много правила от страна на лекаря и пациента. Вземането на урина чрез супрапубична пункция е инвазивен метод, който се прилага рядко, крие най-много рискове за пациента, но носи най-малко рискове за контаминиране на пробата и отразява най-точно състоянието на урината. Урината от катетър е слабо предпочитан метод за събиране

на материал за урокултура, поради колонизацията и наличието на асимптомна бактериурия [51–53].

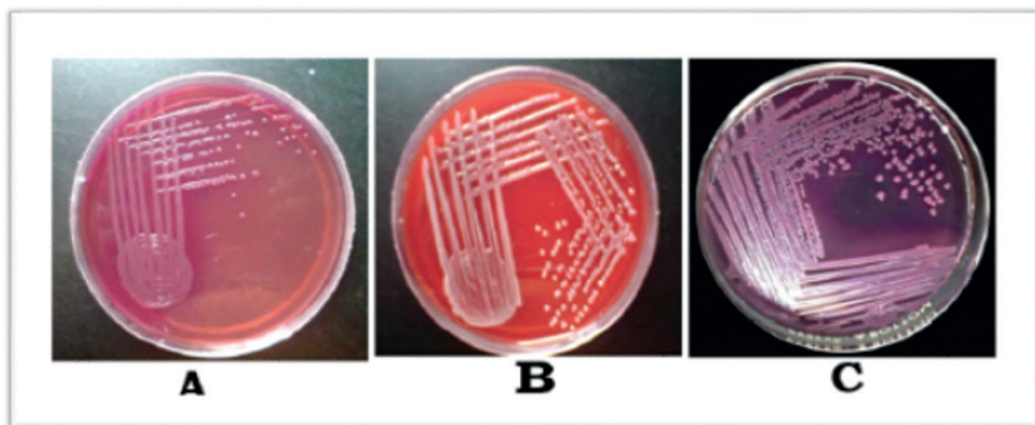
Дисталната трета на уретрата е нормално колонизирана с резидентна микробиота. Тя включва коагулазо-негативни стафилококи [без *S. saprophyticus*], зеленеещи и нехемолитични стрептококи, *Enterococcus spp.*, непатогенни [коменсални] *Corynebacterium spp.* [дифтероиди], *Neisseria spp.*, *Mycobacterium spp.*, *Mycoplasma spp.*, лактобацили [възрастни жени]. Откриват се и гъбички и анаероби [*Peptostreptococcus spp.*, *Prevotella spp.*]. Уринарният тракт над нивото на уретрата е стерилен при здрави лица. Урината също е стерилна при здрави индивиди. Тези обстоятелства на дистална колонизация на уретрата имат за цел да покажат лесната контаминация на клиничния материал при неговото събиране чрез акта на микция. За да се избегне това е необходимо да се следват редица правила за правилно събиране на урината [52].

Определянето на микробно число [МЧ] е единствения начин за разграничаване на контаминация от истинска инфекция. Следва да се има предвид, че скорошна или сегашна употреба на антибиотични средства, приемането на големи обеми течности, лечение с диуретици намаляват микробното число и може да доведат до фалшиво негативни резултати. Неправилно съхранение [над 2 ч. извън хладилник] повишава микробното число и може да се отчете фалшиво положителен резултат. Поради това транспортът на клиничния материал трябва да става максимално бързо [до 2ч.]. Ако това е невъзможно – урината може да се съхранява в хладилник на 4о С до 24 ч. [4].

При симптоми и 1 микроорганизъм в МЧ поне 10⁵/мл. при метода на средната порция се счита за сигнификантна бактериурия [80% шанс истинска уроинфекция, а не контаминация. При два последователни дори 95%]. За асимптомна бактериурия се смята микробно число в степен над 10⁵/мл. в две последователни проби през 24 ч. При безсимптомни жени – 10⁴-10⁵/мл. обикновено е израз на контаминация. Симптомни жени може да имат инфекция и при 10²-10⁵/мл. За асимптомни мъже 10³/мл. може да се приеме за сигнификантно микробно число. При инвазивни техники на взимане на урина 10²/мл. също се счита за сигнификантно [52, 55].

Тъй като урината е най-честият клиничен материал за МБ изследване [до 40% от всички проби] и 60-80% от всички клинични материали урина са стерилни или контаминирани често се използват скриниращи техники с цел да се отделят отделят стерилните

урини още преди да се направи микробиологична посявка. Този подход предотвратяване на използването на множество хранителни среди, води до редуциране на разходите, намалява натоварването на лабораторния персонал и дава възможност резултатът да бъде съобщен в рамките на деня на клинициста [при стерилна урина]. Използват се бързи, скринингови методи, които обаче имат по-ниска чувствителност от урокултивирането и могат да изпуснат ниско степенна бактериурия, когато тя е важна [през временен катетър, супрапубична аспирация] [56].



Изолиране на E. coli от проба урина на различни твърди хранителни среди. А- Мак Конки агар, лактозо положителни колонии; В- Кръвен агар, нехемолитични колонии и С- Левин агар, глюкозни колонии с метален блясък. Източник: Tariq AL, Reyaz AL, Sathiamoorthi T [2016] Isolation and Identification of Antibiotic Mediated Resistant Betalactum Producing Escherichia coli from Urinary Tract Infected Patients in Erode District, Tamil Nadu, India. Int J Drug Dev & Res. 2016;8:38-42

Антимикробна терапия

Изоляцията, идентификацията, определянето на микробното число и тестването на антимикробната чувствителност на изолата гарантира успеха на прилагане на антибиотично лечение. Причина за това е, че дори бактериите от един вид проявяват различна чувствителност към антимикробни препарати. Конкретната комбинация се определя като резистотип. Единствения начин да узнаем със сигурност какъв е резистотипът на конкретния изолат и след като бактерия бъде изолиран от урина, идентифициран и се приложат in

in vitro тестове за антимикробната чувствителност. Често лечението се започва на сляпо, без да са проведени такива тестове. Това лечение се нарича емпирична терапия, и в своята същност е лечение „на сляпо“, тоест без да се познава конкретния бактерия и неговият конкретен резистотип. Тази практика е довела до значително повишаване на нивата на антимикробна резистентност и редуциране на ефективността на пероралната терапия, защото в емпиричната терапия се използват широкоспектърни групи антибиотични препарати. До 50% от предписаните антибиотици в болничните заведения за уроинфекции са ненужни или неподходящи. Прилагането на ефективни мерки и разработването на антимикробна политика намалява болничния престой като не се установява намаленото предписване на антибиотици да влияе върху смъртността [57, 58].

Уропатогенните *E. coli* се свързват предимно с неусложнени уроинфекции на горните и долните уринарни пътища, като това е силно зависимо от конкретния патоген. Микробиологичното тестване не е задължително при наличие на класически оплаквания. Препоръките на Европейската асоциация по урология са за антибиотична терапия при неусложнени уроинфекции. Тя следва да е краткосрочна, като показани за емпирична терапия са фосфомицин [3 грама еднократно], нитрофурантоин [2x100 мг/ден, 5 дена], триметоприм/сулфаметоксазол [2x1 таблетка дневно, за 3 дни] или пивмецилиам [2x400мг/ден, 3-7 дни]. Фосфомицинът има добро покритие на ESBLs продуценти. Не се препоръчва използването на аминокпеницилини с или без инхибитори както и перорални цефалоспоринови, поради високите нива на резистентност. Аминопеницилини без протектори или цефалоспоринови са оправдани при бременни с уроинфекция, но могат да се приложат успешно фосфомицин и нитрофурантоин [без последен триместър]. Флуорохинолоните, макар и ефективни, следва да не се прилагат за емпирична терапия на неусложнени уроинфекции, поради широкия си спектър и причинените смущения в микробиотата. При мъже с неусложнен цистит терапията следва да е с триметоприм/сулфаметоксазол или флуорохинолон за 7 дни, с цел да се покрие и вероятността от развитие на простатит [59-62].

За неусложнен пуелонефрит, препоръките са да не се дават нитрофурантоин, фосфомицин и пивмецилиам. Единствено показани за орална емпирична терапия са флуорохинолоните и цефалоспорините. Карбапенемни антибиотици следва да се дават едва след културелно доказани продуценти на широкоспектърни беталактамази. Препоръката е за използването на ципрофлоксацин [2x500

мг/ден или 1г/ден, за 7 дни] или левофлоксацин [2x750мг/ден, за 5 дни], ако нивата на резистентност към флуорихинолини е под 10%. При нива над 10% емпиричната терапия трябва да се насочи към цефалоспорици [59–62].

Лечението на асимптомна бактериурия следва да се прави след щателна преценка за ползата и риска. Това е така, тъй като често бактериалният растеж в урината при такива пациенти се свързва с колонизация, а не инфекция. Дори повече, установено е, че щамът има протективен ефект. Поради това, в много ситуации не се препоръчва търсенето и третирането на бактериалния изолат. Рядко асимптоматична бактериурия може да доведе до увреждане на

ЕМПИРИЧНА АНТИБИОТИЧНА ТЕРАПИЯ НА НЕУСЛОЖНЕНИ УРОИНФЕКЦИИ ПРИ ВЪЗРАСТНИ

Антибиотик	Дневна доза	Начин на прием	Продължителност
Неусложнен цистит [небременни жени]			
nitrofurantoin	2x100 mg	per os	5 дни
fosfomycin	3 g	per os	еднократно
trimethoprim-sulfamethoxazole	2x160/800 mg	per os	3 дни
Неусложнен пиелонефрит			
ciprofloxacin	2x500 mg	per os	5-7 дни
levofloxacin	750 mg	per os	5-7 дни
ofloxacin	2x400 mg	per os	5-7 дни
<i>Алтернатива</i>			
trimethoprim-sulfamethoxazole + 1 доза ceftriaxone или аминогликозид	2x160/800 mg	per os	14 дни
amoxicillin/clavulanic acid	875/125 mg	per os	14 дни

Забележка: уроинфекциите при бременни жени, както и уроинфекциите при мъже по презулпция се считат за усложнени и не се третират емпирично както неусложнените

бъбреците. Поради това, препоръките на Европейската асоциация по урология са срещу скринирането и лечението на асимптомна бактериурия при лица без рискови фактори. На терапия подлежат лица с асимптомна бактериурия, когато се касае за бременни жени както и пациенти с недобре контролиран захарен диабет [59–61,63]. Актуализираните гайдлайни на Американското дружество по инфекциозни болести [IDSA] и Европейската Асоциация по Урология [EAU] не препоръчват да се провежда скрининг и лечение на асимптомна бактериурия при новородени и деца, лица без рискови фактори, здрави жени в репродуктивна възраст, постменопаузални жени, възрастни, настанени в домове, пациенти с добре контроли-

ЕМПИРИЧНА АНТИБИОТИЧНА ТЕРАПИЯ НА НЕУСЛОЖНЕНИ УРОИНФЕКЦИИ ПРИ ДЕЦА

Антибиотик	Дневна доза	Начин на прием
Неусложнени уроинфекции при деца под 2 г.		
ceftriaxone + аминогликозид [ampicillin/gentamicin]	75-100 mg/kg еднократно	i.v.
Неусложнени уроинфекции при деца над 2 г.		
ceftriaxone + аминогликозид [ampicillin/gentamicin]	75-100 mg/kg еднократно	i.v.
ceftazidime	50 mg/kg през 8 ч.	i.v.
ceftazidime	50 mg/kg през 8 ч.	i.v.
amoxicillin/clavulanic acid	10-15 mg/kg през 8ч.	per os
cephalexin	50-100 mg/kg през 8ч.	per os
trimethoprim-sulfamethoxazole	6-12 mg/kg [TMP] през 12 ч.	per os
cefixime	8 mg/kg еднократно	per os
cefpodoxime	10 mg/kg през 12 ч.	per os

ран захарен диабет [61, 62]. При неврологични оперативни интервенции, лица след бъбречна трансплантация, постоянни уринарни катетри, и увреждане на гръбначния стълб, водещ до дисфункция на пикочния мехур [62, 63]. Препоръките са за скрининг и терапия на асимптоматична бактериурия при бременни жени, както и преди извършване на ендоскопски урологични процедури, при които има риск от травмиране и нарушаване на целостта на мукозата. Лечението на асимптомната бактериурия при лица с рекурентни симптоматична уроинфекция е дори вредно за пациента, повишавайки риска от нов епизод.

Източници:

1. Gupta K, Grigoryan L, Trautner B. Urinary Tract Infection. *Ann Intern Med.* 2017;167[7]:ITC49–64.
2. Sobel JD, Kaye D. Urinary Tract Infections. *Mand Douglas, Bennett's Princ Pract Infect Dis.* 2015;1:886-913.e3.
3. Millner R, Becknell B. Urinary Tract Infections. *Pediatr Clin North Am.* 2019;66[1]:1–13.
4. Guglietta A. Recurrent urinary tract infections in women: risk factors, etiology, pathogenesis and prophylaxis. *Future Microbiol.* 2017;12[3]:239–46.
5. Foxman B. Urinary Tract Infection Syndromes Occurrence, Recurrence, Bacteriology, Risk Factors, and Disease Burden. *Infect Dis Clin N Am.* 2014;28:1–13.
6. Lo E, Nicolle LE, Coffin SE, Gould C, Maragakis LL, Meddings J, et al. Strategies to Prevent Catheter-Associated Urinary Tract Infections in Acute Care Hospitals: 2014 Update. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2014 ;35[5]:464–79.
7. Klevens RM, Edwards JR, Richards CL, Horan TC, Gaynes RP, Pollock DA, et al. Estimating Health Care-Associated Infections and Deaths in U.S. Hospitals, 2002. *Public Health Rep.* 2007;122[2]:160.
8. Tandogdu Z, Wagenlehner FME. Global epidemiology of urinary tract infections. *Curr Opin Infect Dis.* 2016;29[1]:73–9.
9. Barnhouse DH. Circumcision and urinary tract infection. *JAMA J Am Med Assoc.* 1992;268[1]:54c – 54.
10. Zhang S, Zhang Q, Huang J, Cao Y, Zhao Z, Li B. Epidemic Potential of *Escherichia coli* O16:H41-ST131: Compared with Pandemic O25b:H30-ST131 Lineage. *Infect Drug Resist.* 2021;14:2625–32.
11. Nicolas-Chanoine MH, Blanco J, Leflon-Guibout V, Demarty R, Alonso MP, Caniza MM, et al. Intercontinental emergence of *Escherichia coli*

- clone O25:H4-ST131 producing CTX-M-15. *J Antimicrob Chemother.* 2008;61[2]:273–81.
12. Johnson JR, Porter S, Thuras P, Castanheira M. Epidemic Emergence in the United States of *Escherichia coli* Sequence Type 131-H30 [ST131-H30], 2000 to 2009. *Antimicrob Agents Chemother.* 2017;61[8].
 13. Gaynes R, Edwards JR. Overview of nosocomial infections caused by gram-negative bacilli. *Clin Infect Dis.* 2005;41[6]:848–54.
 14. Gupta K, Grigoryan L, Trautner B. Urinary Tract Infection. *Ann Intern Med.* 2017;167[7]:ITC49–64.
 15. Guglietta A. Recurrent urinary tract infections in women: risk factors, etiology, pathogenesis and prophylaxis. *Future Microbiol.* 2017;12[3]:239–46
 16. Millner R, Becknell B. Urinary Tract Infections. *Pediatr Clin North Am.* 2019;66[1]:1–13.
 17. Sobel JD, Kaye D. Urinary Tract Infections. *Mand Douglas, Bennett's Princ Pract Infect Dis.* 2015 Jan 1;1:886-913.e3.
 18. Raz R, Gennesin Y, Wasser J, Stoler Z, Rosenfeld S, Rottensterich E, et al. Recurrent urinary tract infections in postmenopausal women. *Clin Infect Dis.* 2000;30[1]:152–6.
 19. Moore EE, Hawes SE, Scholes D, Boyko EJ, Hughes JP, Fihn SD. Sexual Intercourse and Risk of Symptomatic Urinary Tract Infection in Post-Menopausal Women. *J Gen Intern Med.* 2008;23[5]:595.
 20. Hu KK, Boyko EJ, Scholes D, et al. Risk Factors for Urinary Tract Infections in Postmenopausal Women. *Arch Intern Med.* 2004;164[9]:989–993.
 21. Dhakal BK, Mulvey MA. The UPEC pore-forming toxin α -hemolysin triggers proteolysis of host proteins to disrupt cell adhesion, inflammatory, and survival pathways. *Cell Host Microbe.* 2012 Jan 19;11[1]:58–69.
 22. Muenzner P, Bachmann V, Zimmermann W, Hentschel J, Hauck CR. Human-restricted bacterial pathogens block shedding of epithelial cells by stimulating integrin activation. *Science* [80-]. 2010;329[5996]:1197–201.
 23. Muenzner P, Kengmo Tchoupa A, Klauser B, Brunner T, Putze J, Dobrindt U, et al. Uropathogenic *E. coli* Exploit CEA to Promote Colonization of the Urogenital Tract Mucosa. *PLOS Pathog.* 2016;12[5]:e1005608.
 24. Zaffanello M, Malerba G, Cataldi L, Antoniazzi F, Franchini M, Monti E, et al. Genetic Risk for Recurrent Urinary Tract Infections in Humans: A Systematic Review. *J Biomed Biotechnol.* 2010;2010: 321082.
 25. Godaly G, Ambite I, Svanborg C. Innate immunity and genetic determinants of urinary tract infection susceptibility. *Curr Opin Infect*

- Dis. 2015;28[1]:88.
26. Klein RD, Hultgren SJ. Urinary tract infections: microbial pathogenesis, host-pathogen interactions and new treatment strategies. *Nature reviews. Microbiology*. 2020;18[4]:211-226. DOI: 10.1038/s41579-020-0324-0.
 27. Ipe DS, Horton E, Ulett GC. The basics of bacteriuria: Strategies of microbes for persistence in urine. *Front Cell Infect Microbiol*. 2016;6:14.
 28. Tanabe RHS, Dias RCB, Orsi H, de Lira DRP, Vieira MA, Dos Santos LF, et al. Characterization of Uropathogenic *Escherichia coli* Reveals Hybrid Isolates of Uropathogenic and Diarrheagenic [UPEC/DEC] *E. coli*. *Microorganisms*. 2022;10[3]:645.
 29. Sobel JD, Kaye D. Urinary Tract Infections. *Mand Douglas, Bennett's Princ Pract Infect Dis*. 2015 Jan 1;1:886-913.e3.
 30. Shah C, Baral R, Bartaula B, Shrestha LB. Virulence factors of uropathogenic *Escherichia coli* [UPEC] and correlation with antimicrobial resistance. *BMC Microbiol*. 2019;19[1].
 31. Johnson JR, Kuskowski MA, Gajewski A, Soto S, Horcajada JP, Jimenez De Anta MT, et al. Extended virulence genotypes and phylogenetic background of *Escherichia coli* isolates from patients with cystitis, pyelonephritis, or prostatitis. *J Infect Dis*. 2005;191[1]:46–50.
 32. Zhao F, Yang H, Bi D, Khaledi A, Qiao M. A systematic review and meta-analysis of antibiotic resistance patterns, and the correlation between biofilm formation with virulence factors in uropathogenic *E. coli* isolated from urinary tract infections. *Microb Pathog*. 2020;144: 104196.
 33. Shah C, Baral R, Bartaula B, Shrestha LB. Virulence factors of uropathogenic *Escherichia coli* [UPEC] and correlation with antimicrobial resistance. *BMC Microbiol*. 2019;19[1]:1–6.
 34. Ambite I, Lutay N, Godaly G, Svanborg C. Urinary Tract Infections and the Mucosal Immune System. *Mucosal Immunol Fourth Ed*. 2015;2–2:2039–58.
 35. Waksman G, Hultgren SJ. Structural biology of the chaperone-usher pathway of pilus biogenesis. *Nat Rev Microbiol*. 2009;7[11]:765–74.
 36. Biggel M, Xavier BB, Johnson JR, Nielsen KL, Frimodt-Müller N, Matheeußen V, et al. Horizontally acquired papGII-containing pathogenicity islands underlie the emergence of invasive uropathogenic *Escherichia coli* lineages. *Nat Commun*. 2020;11[1].
 37. Bahrani-Mougeot FK, Buckles EL, Lockatell C V., Hebel JR, Johnson DE, Tang CM, et al. Type 1 fimbriae and extracellular polysaccharides are preeminent uropathogenic *Escherichia coli* virulence determinants in the murine urinary tract. *Mol Microbiol*. 2002;45[4]:1079–93.
 38. Stærk K, Grønne RB, Nielsen TK, Petersen NA, Palarasah Y,

- Torres-Puig S, et al. *Escherichia coli* type-1 fimbriae are critical to overcome initial bottlenecks of infection upon low-dose inoculation in a porcine model of cystitis. *Microbiology*. 2021;167[10]:001101.
39. Zhang G, Meredith TC, Kahne D. On the essentiality of lipopolysaccharide to Gram-negative bacteria. *Curr Opin Microbiol*. 2013;16[6]:779–85.
 40. Terlizzi ME, Gribaudo G, Maffei ME. UroPathogenic *Escherichia coli* [UPEC] Infections: Virulence Factors, Bladder Responses, Antibiotic, and Non-antibiotic Antimicrobial Strategies. *Front Microbiol*. 2017;8:1566.
 41. Nagamatsu K, Hannan TJ, Guest RL, Kostakioti M, Hadjifrangiskou M, Binkley J, et al. Dysregulation of *Escherichia coli* α -hemolysin expression alters the course of acute and persistent urinary tract infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*.;112[8]:E871–80.
 42. Bahrani-Mougeot F, Gunther NW, Donnenberg MS, Mobley HLT. Uropathogenic *Escherichia coli*. *Escherichia Coli*. 2002;239–68.
 43. Evans ML, Chapman MR. Curli Biogenesis: Order out of Disorder. *Biochim Biophys Acta*. 2014;1843[8]:1551.
 44. Millner R, Becknell B. Urinary Tract Infections. *Pediatr Clin North Am*. 2019;66[1]:1–13.
 45. Sobel JD, Kaye D. Urinary Tract Infections. Mand Douglas, Bennett's Princ Pract Infect Dis. 2015 Jan 1;1:886-913.e3.
 46. Guglietta A. Recurrent urinary tract infections in women: risk factors, etiology, pathogenesis and prophylaxis. *Future Microbiol*. 2017;12[3]:239–46.
 47. Tullus K, Shaikh N. Urinary tract infections in children. *Lancet*. 2020;395[10237]:1659–68.
 48. Gupta K, Grigoryan L, Trautner B. Urinary Tract Infection. *Ann Intern Med*. 2017;167[7]:ITC49–64.
 49. EAU Guidelines. Edn. presented at the EAU Annual Congress Amsterdam, the Netherlands 2022. ISBN 978-94-92671-16-5.
 50. Foxman B. Urinary Tract Infection Syndromes Occurrence, Recurrence, Bacteriology, Risk Factors, and Disease Burden. *Infect Dis Clin N Am*. 2014;28:1–13.
 51. Sinawe H, Casadesus D. Urine Culture. *Nephrol Urol Small Anim [Internet]*. 2022;62–9.
 52. Sobel JD, Kaye D. Urinary Tract Infections. Mand Douglas, Bennett's Princ Pract Infect Dis. 2015;1:886-913.e3.
 53. Tan CW, Chlebicki MP. Urinary tract infections in adults. *Singapore Med J*. 2016;57[9]:485.
 54. Silver SA, Baillie L, Simor AE. Positive urine cultures: A major cause of inappropriate antimicrobial use in hospitals? *Can J Infect Dis Med Microbiol*. 2009;20[4]:107.
 55. Gupta K, Grigoryan L, Trautner B. Urinary Tract Infection. *Ann*

- Intern Med. 2017;167[7]:ITC49–64.
56. Holm A, Aabenhus R. Urine sampling techniques in symptomatic primary-care patients: a diagnostic accuracy review. *BMC Fam Pract.* 2016;17[1].
 57. Steinberg DI. Review: Interventions improve hospital antibiotic prescribing and reduce hospital stay but do not affect mortality. *Ann Intern Med.* 2017;166[10]:JC59.
 58. Davey P, Marwick CA, Scott CL, Charani E, Mcneil K, Brown E, et al. Interventions to improve antibiotic prescribing practices for hospital inpatients. *Cochrane database Syst Rev.* 2017;2[2].
 59. Gupta K, Grigoryan L, Trautner B. Urinary Tract Infection. *Ann Intern Med.* 2017;167[7]:ITC49–64.
 60. Millner R, Becknell B. Urinary Tract Infections. *Pediatr Clin North Am.* 2019;66[1]:1–13.
 61. Sobel JD, Kaye D. Urinary Tract Infections. *Mand Douglas, Bennett's Princ Pract Infect Dis.* 2015 Jan 1;1:886-913.e3.
 62. EAU Guidelines. Edn. presented at the EAU Annual Congress Amsterdam, the Netherlands 2022. ISBN 978-94-92671-16-5, EAU Guidelines Office, Arnhem, The Netherlands.
 63. Colgan R, Jaffe GA, Nicolle LE. Asymptomatic Bacteriuria. *Am Fam Physician.* 2020;102[2]:99–104.

МЕХАНИЗМИ НА РЕЗИСТЕНТНОСТ КЪМ БЕТА-ЛАКТАМНИ АНТИБИОТИЦИ ПРИ *E. COLI*

Петя Станкова

Бета-лактамите, с тяхната добра поносимост, бактерициден ефект и широк спектър на действие, са най-често използваните антибиотици (Brolund A et al., 2016). Масовото им и донякъде неконтролирано прилагане обуславя лесното и бързо възникване на резистентност при бактериите, включително и при *E. coli*. Най-честият механизъм на устойчивост, който бактериите придобиват към този клас антибактериални средства, е продукцията на бета-лактамази – ензими, разграждащи бета-лактамите. Най-проблемни са тези ензими, които повлияват и трета генерация цефалоспорини (широко-спектърни бета-лактамази (ESBL-) - TEM-, SHV-, CTX-M и карбапенемите (карбапенемази) – KPC, NDM, OXA-48 и др. (Gauthier L, et al., 2018). Продуцентите на карбапенемази и широкоспектърни бета-лактамази от сем. *Enterobacteriaceae* се доказват с нарастваща честота в целия свят (Ghafourian et al., 2015). ESBL принадлежат най-вече към клас А на класификацията на Ambler, обикновено са плазмидно кодирани и придават устойчивост на тези бактерии, които ги произвеждат, към пеницилини, цефалоспорини от първо, второ и трето поколение и монобактами (напр. aztreonam), но не могат да хидролизират цефамицините (cefoxitin) или карбапенеми (imipenem, meropenem) и се инхибират от β -лактамазни инхибитори като clavulanic acid, tazobactam или sulbactam (Gauthier L, et al., 2018). Голям проблем за разпространението на ESBL е факта, че кодиращите ги гени, могат да бъдат локализирани на мобилни генетични елементи като транспозони, интегрони, конюгативни плазмиди, заедно с гени за устойчивост към други групи антибиотици като аминогликозиди, хинолони и антифолатни агенти (Brolund A et al., 2016). Това води до повишена възможност за селекция и до появата на изключително резистентни и панрезистентни изолати, които бързо се разпространяват. Допълнителен проблем представлява затрудненото откриване на продуцентите на тези ензими (Prevel R et al., 2019).

Escherichia coli е един от първите бактериални видове, който колонизира чревният тракт още след раждането (Galindo-Méndez, M.,

2020). Освен коменсал в червата на хора и животни, този бактерий може да причини, както диарийни заболявания (т.нар ентеропатогенни *E. coli*), които се асоциират с определени серотипове, така и различни от тях (екстраинтестиналните патогенни *E. coli* (ExPEC)), към които спадат причинителите на урогенитални инфекции и неонатални менингити, както и разнообразие от вътреболнични инфекции (*Poolman u Wacker, 2016*).

Escherichia coli е сред най-честите проблемни за терапия Грам-отрицателни бактерии, поради продукцията на широкоспектърни бета-лактамази и карбапенемази, които придават резистентност съответно към цефалоспорини и карбапеними (*Mojica MF et al., 2020*). Един от най-обичайните механизми на резистентност при *E. coli* е продукцията на ESBL- CTX-M-, SHV- и TEM ензими (*D'Andrea MM et al., 2013*). SHV-1, -11 и TEM-1, -2 са тясно спектърни бета-лактамази, които инактивират пеницилините и цефалоспорините първа генерация и се инхибират от бета-лактамазните инхибитори. SHV-1 ензимите се локализируют хромозомно при *K. pneumoniae*, в резултат на което те са с вродена резистентност към ampicillin (*Ghafourian S et al., 2015*). Останалите представители от семействата на TEM и SHV, са в състояние да инактивират включително и цефалоспорините трета генерация и затова са наречени бета-лактамази с разширен спектър (ESBL). Те се получават в резултат на различен брой точкови мутации на основните ензими SHV-1, -11 и TEM-1, -2 (*Mojica MF et al., 2020*). Продуценти на TEM и SHV ESBL са широко разпространени до 2000 г, понастоящем те се докладват като единични изолати (*D'Andrea MM et al., 2013*).

В днешно време преобладават CTX-M ензимите. Те са група ESBL, които се различават генетично от TEM и SHV ESBL. Като ново семейство CTX-M ESBL за първи път са докладвани през 1989г. в Германия - CTX-M-1 (cefotaximase-Munich), (*Bauernfeind A et al. 1990*). Преносът на blaCTX-M гените се приема, че се дължи на мобилни генетични елементи (MGEs) като ISEcp1 или ISCR1, които мобилизират тези генетични детерминати в *Kluuyvera* и ги пренасят към плазмидите и чрез тях в много видове ентеробактерии. CTX-M ензимите хидролизират cefotaxime и cefepime като CTX-M-15 е устойчив и на ceftazidime. Те са групирани в пет клъстера (CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9 и CTX-M-25 (*Galindo-Méndez, M. 2020*). Най-често срещаните CTX-M ESBL, открити при хора от целия свят са CTX-M-15, които принадлежат към групата CTX-M-1, последвани от CTX-M-14, принадлежащи към групата CTX-M-9 (*D'Andrea MM et*

al., 2013). Локализацията им е както плазмидна – напр. IncF, така и понякога се интегрират и в хромозомата (*D'Andrea MM et al.*, 2013). Прескачането се подпомага от IS елементите. Проучвания в няколко различни страни показват, че blaCTX-M-15 често се пренася върху IncF плазмидите (*Cantyn R et al.*, 2000; *Coque TM et al.*, 2008; *Marcadü G et al.*, 2009; *Partridge SR et al.*, 2011; *Lahlaoui H et al.*, 2015; *Irrgang A et al.*, 2017). За останалите типове CTX-M, като напр. CTX-M-3 в Полша и други източно-европейски страни, важно значение играят и други плаزمиди като IncL/M плазмиди (*Baraniak A et al.*, 2002), на CTX-M-65 в Китай чрез F33: A-: B-тип плазмиди (*He L et al.*, 2013) и разпространението на CTX-M-14 в Испания и Обединеното кралство чрез IncK плазмиди (*Dhanji H et al.*, 2012).

От друга страна, свързването на CTX-M-кодиращи плазмиди с много успешни вирулентни клонални линии на *E. coli*, генерира редица така наречени „високорискови“ мултирезистентни и вирулентни клонове (*Woodford N et al.*, 2011), които допринасят за бързото и глобално разпространение на ESBL от тип CTX-M. За разпространението на продуцентите на CTX-M-15, играе важна роля разпространението на вирулентни интернационални клонове като ST131(филогенетична група B2), който се свързва с екстраинтестинални инфекции, включително инфекция на пикочните пътища, бактериемия и менингит (*Johnson et al.*, 2005; *Jakobsen et al.*, 2011; *Hansen et al.*, 2014)

E. coli ST131 е преобладаващ секвенционен тип в много страни от развития свят и е свързан с мултилекарствена резистентност и вирулентност, има способността лесно да колонизира и да се предава сред хората (*Doi Y et al.*, 2012). Поради това се счита за най-значимият високорисков клон сред произвеждащите ESBL *E. coli* и е отговорен за бързото увеличаване на резистентността към бета-лактами (*Mathers et al.*, 2015). Въпреки че ST131 щамовете не се считат за хипервирулентни, повечето от тях демонстрират наличието на гени за резистентност към флуорохинолони (*Ben Zakour NL et al.*, 2016). Те имат способността да бъдат постоянни чревни колонизатори дори при липса на експозиция на антибиотици, състояние, което предхожда някои инфекции като тези в пикочните пътища и може лесно да се предават сред хора от всички възрасти (*Galindo-Múndez, M.* 2020). Клиничното значение на този ST тип, се подчертава от много проучвания, които демонстрират високия му потенциал за вирулентност (*Can F et al.*, 2015; *Nicolas-Chanoine MH et al.*, 2017).

Други клонални комплекси също играят важна роля в разпространението на СТХ-М ензимите като определени ST типове се асоциират с определена филогрупа (*Naseer and Sundsfjord, 2011*). Секвенционни типове ST405 и ST38 (филогенетична група D) са свързани с разпространението, както на СТХ-М-15, така и на СТХ-М-9 група ензими (главно СТХ-М-9 и СТХ-М-14), съответно (*Naseer and Sundsfjord, 2011*). В допълнение, *E. coli* ST10 (филогенетична група A), който е типичен член на микробиотата на червата на човека, но също е отговорен за чревни и извън-чревни инфекции, е свързан с разпространението на различни СТХ-М групи (СТХ-М-1, СТХ-М-2 и СТХ-М-9 групи), (*Jakobsen et al., 2011; Hansen et al., 2014*).

Другите СТХ-М групи са по-рядко срещани в различни географски райони, като СТХ-М-2 групата обикновено се съобщава от Южна Корея и Япония, групата СТХ-М-8 от Южна Америка и СТХ-М-25 група от Израел (*D'Andrea MM et al., 2013*). Освен TEM, SHV и СТХ-М група ESBL, някои други групи от ESBL се идентифицират спорадично, но те остават сравнително редки (напр: GES, VEB, PER, SFO група ESBL), (*Nordmann P et al., 2014*).

Докладваните карбапенемази при *E. coli* включват предимно карбапенемази от *Klebsiella pneumoniae* (KPC), метало- β -лактамази (MBL), включително VIM, IMP, GIM и NDM ензими, както и оксацилин-хидролизиращи метало- β -лактамази (OXA). KPCs (*K. pneumoniae* carbapenemase) са клинично най-често срещаните ензими от клас А карбапенемазите. Тези ензими се характеризират с плазмидна локализация и широко разпространение (*Nordmann P et al., 2014*). Първият KPC продуцент – KPC-1, е идентифициран в *K. pneumoniae* през 1996 г. в Северна Каролина (*Maurer F et al., 2015*). Различни доклади по света показват, че преобладаващите типове в *E. coli* са от типовете New Delhi metallo- β -lactamase (NDM-1) и carbapenem-hydrolyzing oxacillinase-48 (OXA-48) (*Nordmann P et al., 2014; Gauthier L, et al., 2018*). В последните години се наблюдава сериозно увеличаване на разпространението на метало-бета-лактамазите чрез подвижни генетични елементи – напр. клас 1 интегрони (*Nordman P et al., 2014*). NDM – 1 MBL е изолирана за пръв път през 2008 г. от пациент в Швейцария, който преди това е хоспитализиран в Ню Делхи, Индия (*Maurer F et al., 2015*). Тези продуценти се характеризират с много високи нива на резистентност, голяма част от които са чувствителни само на tigecycline, colistin и отчасти на fosfomycin (*Gauthier L, et al., 2018*). При *E. coli*, NDM-1, последван

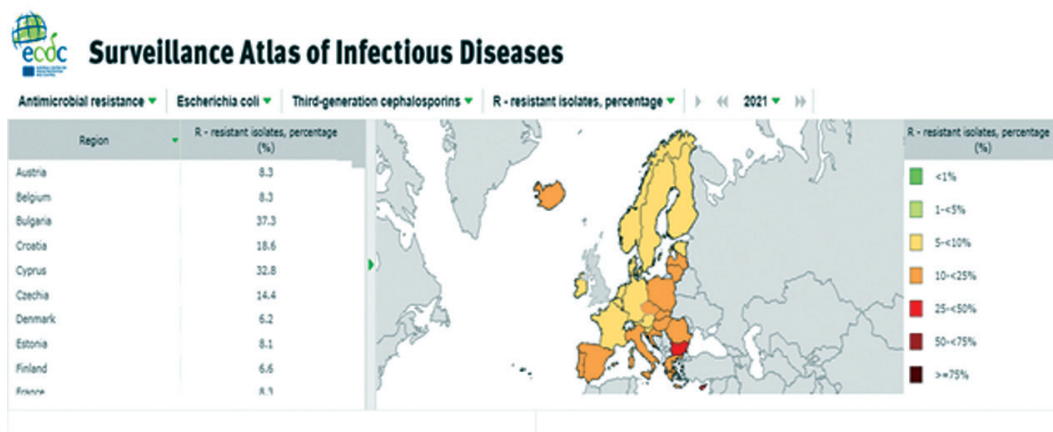
от NDM-5, са преобладаващите варианти при човешки инфекции в различни части на света. В китайско проучване от 2018г на Shen и сътрудници, най-често срещан в червата на човека и едрия рогат добитък е варианта NDM-5. Допълнителна и важна констатация от това проучване е идентифицирането на щамове NDM-5 *E. coli*, които коекспресират гени за резистентност към colistin, mcr-1, в червата на здрави индивиди, ситуация, която ако не се контролира правилно може да допринесе за бъдещо разпространение на *E. coli* щамове, резистентни към последен избор клас антибиотици – полимиксини (Shen Z et al., 2018).

Първият съобщен щам с OXA – 48 тип карбапенемаза е *K. pneumoniae*, продуциращ OXA-48, който е плазмидно кодиран (Турция, 2003 г.). Характерно за OXA-48/OXA-181 е, че слабо хидролизират карбапенемите и широкоспектърни цефалоспорини като ceftazidime и aztreonam. Активността им се инхибира от клавулановата киселина или EDTA (Nordman P et al., 2012). Докладите за откриване на *E. coli*, носител на blaOXA, са се увеличили през последните 3 години в различни части на света Мианмар (Aung MS et al., 2018), Съединените щати (Hasassri ME et al., 2016) и Тайланд (Lunha K et al., 2016). И в трите проучвания изолираните щамове са ко-експресиращи blaOXA-48 или негови варианти и blaNDM5. Щамове *E. coli*, носители на OXA-48, също са изолирани в Европа (Galindo-Méndez, M., 2020).

През първото десетилетие от появата на ESBL-продуциращи *Enterobacteriaceae* се счита че те се срещат предимно в болници или други здравни и социални заведения като старчески домове (Jacoby GA et al., 1997). Въпреки това, докладите за инфекции с ESBL *E. coli*, възникващи сред пациенти без предишна хоспитализация, посещение в клиника за хемодиализа или получаване на домашни грижи, започват да се появяват в началото на века (Arpin C et al., 2007). Възщност това разпространение и изобилието от *E. coli*, произвеждащи ESBL, е една от определящите характеристики на епидемиологията на ESBL в развития свят през XXI век. Първите основни доказателства за тази епидемиологична промяна са представени в проучване от 2001 и 2002 г. в болница в Севиля, Испания. Почти половината от случаите на инфекция с *E. coli*, произвеждащи ESBL, наблюдавани в болницата, представляват инфекции, възникнали в общността (Rodriguez-Bano J et al., 2004). Рисковите фактори за ESBL продуциращи *E. coli* включват: захарен диабет, скорошна употреба на флуорохинолони и прием в болница в рамките на предходната

година. Подобни наблюдения са направени по същото време в Обединеното кралство (Woodford N et al., 2004), Италия (Brigante G et al., 2005) и други страни, свързани с появата на СТХ-М продуциращи *E. coli* в обществото. Това явление се наблюдава по-късно и в САЩ (Doi Y et al., 2013), (Freeman JT et al., 2009). По-голямата част са *E. coli* ST131, носители на blaCTX-M-15, което е доказателство за това, че *E. coli* ST131 е движеща сила за разпространение на ESBL в общността (Doi Y et al., 2013), като болниците и домовете за възрастни хора продължават да бъдат основната екологична ниша при хората (Banerjee R et al., 2013).

Темповете на производство на ESBL постоянно се увеличават през последното десетилетие, както за *E. coli*, така и за други ентеробактерии в развитите страни. Процентът на ESBL сред уропатогенни *E. coli* в американските болници се увеличава от 7.8% през 2010 г. до 18.3% през 2014 г., и достига 27.7% за нозокомиални щамове през 2014 г., по-голямата част от които произвеждат СТХ-М-15. Намалява и чувствителността срещу не-бета-лактамни средства, с чувствителност към флуорохинолони обикновено под 30% (Castanheira M et al., 2015). В Европа процентите на ESBL продуциращи *E. coli* се различават значително зависимо от регионите с много ниски проценти, наблюдавани в страните от Северна Европа и тези с много по-високи проценти, наблюдавани в Източна и Южна Европа (Jones RN et al., 2014). По данни на ECDC за 2021 г. за разпространение на инвазивни изолати *E. coli*, резистентни на трета генерация цефалоспорини, България е на първо място с 37.3%, следвана от Кипър – 32.8%. (Фиг.1).



Фигура 1. Разпространение на резистентни на трета генерация цефалоспорини *E. coli* в ЕС при инвазивни изолати

В България първата широкоспектърна бета-лактамаза е докладвана през 1992 г. (Keuleyan E et al., 1992). При мащабно проучване на ESBLs за периода 1996 - 2003 г. са доказани продуценти на TEM-139, SHV-2, SHV-5, SHV-12, CTX-M-3 и CTX-M-15 ензими в девет медицински центъра в София, Плевен, Стара Загора (Markovska R et al., 2008; Jacoby G et al., 2003). След появата на CTX-M-3 и CTX-M-15 ензимите през 2001 и 2002г. техният брой бързо се увеличава, като през 2008-2009г при проучване на 118 *E. coli* от три болнични заведения в София, преобладаващ тип за България са CTX-M-15 ензимите (Иванова Д и сътр., 2010; Markovska R et al., 2012). В мащабно проучване върху 193 щам (изолирани от 2001 до 2009) в шест различни болнични заведения във София, Варна и Плевен е доказано продуцирането основно на CTX-M-15 ензим, както и в проучване от 2003-2009 г. с преобладаване на клона *E. coli* ST131 ((Markovska R et al., 2008) Markovska R et al., 2012).

В България през последните години са установени и продуценти на карбапенемази (NDM-1, KPC-2) при *E. coli.*, (Markovska R et al., 2015; Poirel L et al., 2014). В София е установен клон NDM-1 *E. coli* (Poirel L et al., 2014), а във Варна KPC-2 ST131 *E. coli* (Markovska R et al., 2017).

Проучване през 2015 г. на чревното носителство на ESBL продуциращи ентеробактерии в български болници в София и Варна, доказва ESBL *E. coli*, носители на CTX-M-15 (41%), следвани от CTX-M-3 продуценти – 40% (Markovska et al., 2021).

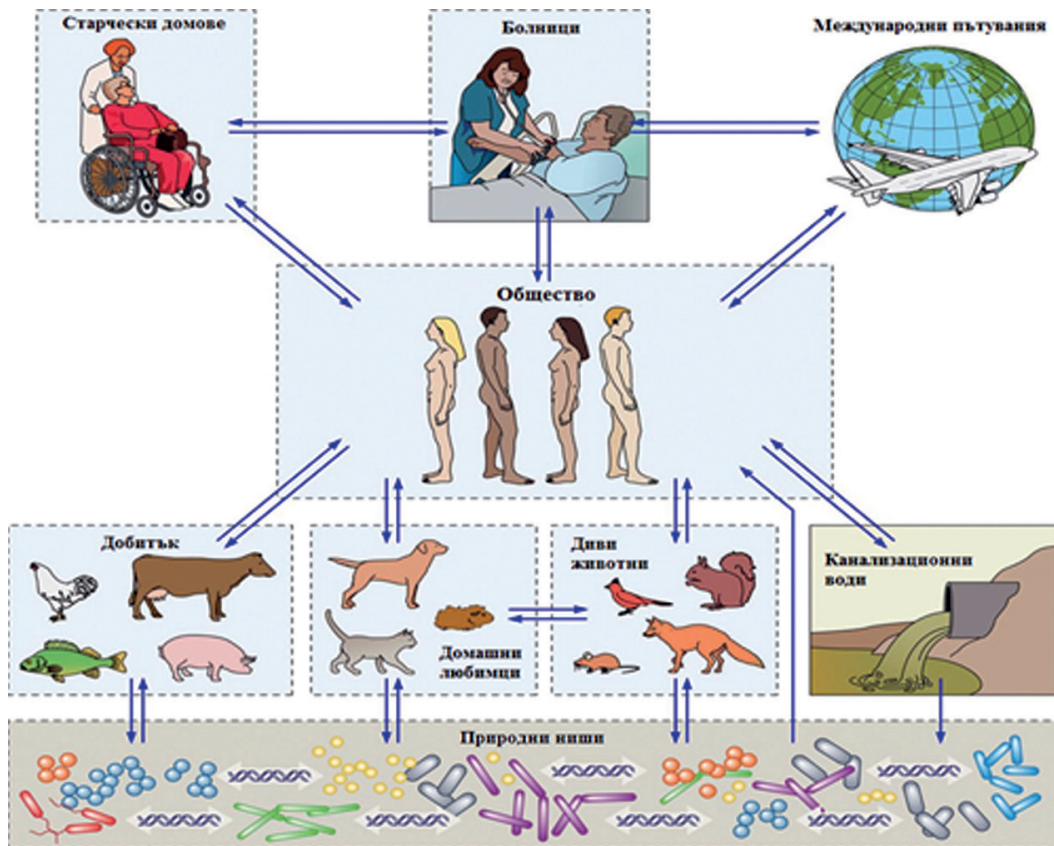
Всички тези данни ни доказват бързото разпространение на ESBL/карбапенемаза продуциращите *E. coli* и важността от правилното управление на инфекциите - както за правилната антимикробна терапия, така и за контрола на инфекции (Karanika S et al., 2016).

Няколко човешки дейности са идентифицирани, като ключови двигатели на настоящата криза с антибиотичната резистентност. Основният от тях е прекомерната употреба на антибиотици (Ghafourian et al., 2015). Съобщените действия, довели до прекомерна употреба на антибиотици, са многофакторни и включват различни отрасли като здравеопазване, животновъдство и фармацевтична промишленост (Galindo-Méndez, M., 2020). Примери са: емпиричното предписване на антибиотици от медицинските специалисти, широкото им приложение в животновъдството и рибовъдството, пациенти, които не спазват режимите на антибиотично лечение, липсата на разработени нови антибиотици (Mathers et al., 2015).

Един от най-важните фактори за разпространението на ESBL и карбапенемаза *E. coli* е чревното носителство. Чревния тракт е един от основните резервоари на ESBL *E. coli* и на други терапевтично проблемни Грам-отрицателни бактерии. Те се доказват с нарастваща честота, както в развиващите се, така и в развитите страни. Основни рискови фактори за увеличаване на разпространението им чрез чревното носителство са: неправилна антибиотична употреба, инвазивни процедури, продължителен болничен престой и престой в интензивни отделения, имунодефицитни състояния, съпътстващите заболявания, употреба на инхибитори на протонната помпа и не на последно място диария. Допринасящи източници още са домашните животни и храни с животински произход, най-вече полусурови и сурови телешки месни продукти, както и грижата за едър рогат добитък, значителният рисков фактор са пътувания до развиващите се страни и директното предаване на антибиотик устойчиви патогенни *E. coli* в рамките на домакинствата и обществото. И не на последно място околната среда е резервоар не само на ESBL продуциращи *E. coli*, а и на редица клинично значими представители от разред *Enterobacteriales* (Фиг. 2), (Станкова П, 2020).

Като част от нормалната флора на топлокръвните животни *E. coli* е подложена на антибиотичен натиск, в резултат на употребата на антибиотици в животновъдството (Looft N et al., 2011). Природните среди като води и почви или особено пречиствателните станции, се считат за бактериални генетични реактори, в които се осъществява активен генетичен обмен (Фиг. 2) Гените, кодиращи антибиотичната резистентност, често се свързват с подвижни елементи като плазмиди и транспозони, които могат да се обменят между бактерии, принадлежащи към различни филогенетични родове (Wellington EM et al., 2013). Много проучвания съобщават за мултирезистентни щамове *E. coli*, открити в околната среда, показващи възможни рискове за общественото здраве, произтичащи от човешки дейности (Dhanji H et al., 2011; Jang J et al., 2013).

Препоръчва се систематичен скрининг за чревно носителство на ESBL ентеробактерии, спазване на хигиенните норми в интензивните отделения и ограничаване на емпиричната антимикробна терапия (Prevel R et al., 2019). Систематичният скрининг за чревно носителство на ESBL/карбапенемаза продуциращи ентеробактерии все още се счита за стандарт за намаляване честотата на клиничните изолати притежаващи тези ензими в болниците (Lowe CF et al., 2013). Прието от експертите е, че най-добрият начин за иден-



Фигура 2. Представяне на основните храносмилателни или екологични резервоари на ESBL, към които принадлежи човешката общност. Източник: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/CMR.00023-13>

тификация на откритите ензими при скрининга е съчетаването на фенотипни с молекулярно-генетични методи (Maurer F et al., 2015). Важно е стриктното спазване на мерки за контрол на инфекциите от всичките медицински и немедицински служители (Siegel JD et al., 2007). Съществуват основателни епидемиологични доказателства, които показват, че полирезистентните микроорганизми могат да се пренасят от едно лице на друго чрез мръсни ръце, контакт със замърсени повърхности в непосредствена близост до пациента, както и придобиване от болничната среда. Миенето на ръцете е един от начините за контрол на разпръскването на ESBL/карбапенемаза продуциращи ентеробактерии в обществото и болниците. Заплашителен факт е липсата на тези евтини и доказани мерки, като редовното миене на ръцете в много части на света (Halder AK et al., 2010).

За съжаление, въпреки използването на различни стратегии, е отчетено постоянно повишаване на процента на чревното носителство на ESBL/карбапенемаза продуциращите ентеробактерии, което способства за нарастването на антимикробна резистентност (*Karanika S et al., 2016; Woerther PL et al., 2013*).

Поради непрекъснато увеличаващия се брой инфекции, причинени от мултирезистентни *E. coli*, дължащо се на лесното му предаване по фекално-орален път, нарастващия брой чревни носители сред хората и животните, както и други източници в околната среда, разбирането на епидемиологията на проблемните полирезистентни *E. coli* и техните механизми на резистентност, са ключови компоненти в борбата срещу тези инфекции (*Prevel R et al., 2019*). Честотата на ESBL и карбапенемазните продуценти, както в обществото, така и в болниците, нараства благодарение на широкото разпространение на мобилни генетични елементи и сериозният селективен антибиотичния натиск, което престава да бъде опасност за здравето на хората и може да доведе до връщане в предантибиотичната ера. Необходими са спешни стратегии за борба с антимикробната резистентност за контрол на инфекциите.

**Специална благодарност
на проф. г-р Р. Марковска, гл
за помощта при изготвянето
на тази глава от монографията**

Източници:

1. Иванова Д, Р. Марковска, Б.Маркова, М.Лесева, И.Митов. Молекулярно-генетично типичане на клинично значими щамове *E.coli* и *K.pneumoniae*, продуциращи широкоспектърни бета-лактамази (ESBL) в три софийски болници. 8ми Нац. Конгрес по клинична микробиология и инфекции на Българската асоциация на микробиолозите. Пловдив, 2010. 22-25.04.2010 г. Стр 17
2. П. Станкова, дисертационен труд на тема: „Молекулярно-генетични, микробиологични и епидемиологични аспекти на чревното носителство на карбапенемаза и широкоспектърни бета-лактамаза продуценти“
3. Arpin C, Coulange L, Dubois V, et al. Extended-spectrum-beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae strains in various types of private health care centers. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007;51(9):3440-3444. doi:10.1128/AAC.01431-06

4. Aung MS, San N, Maw WW, San T, Urushibara N, Kawaguchiva M, et al. Prevalence of extended-spectrum beta-lactamase and carbapenemase genes in clinical isolates of *Escherichia coli* in Myanmar: Dominance of blaNMD5 and emergence of blaOXA-181. *Microbial Drug Resistance*. 2018;24(9):1333-1344. DOI: 10.1089/mdr.2017.0387
5. Banerjee R, Johnston B, Lohse C, Porter SB, Clabots C, Johnson JR. *Escherichia coli* sequence type 131 is a dominant, antimicrobial-resistant clonal group associated with healthcare and elderly hosts. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2013;34(4):361-369. doi:10.1086/669865
6. Baraniak A, Fiett, J., Sulikowska, A., Hryniewicz, W., Gniadkowski, M., 2002. Countrywide spread of CTX-M-3 extended-spectrum -lactamase-producing microorganisms of the family Enterobacteriaceae in Poland. *Antimicrob. Agents Chemother*. 46, 151–159
7. Bauernfeind A, Grimm H, Schweighart S. A new plasmidic cefotaximase in a clinical isolate of *Escherichia coli*. *Infection*. 1990;18(5):294-298. doi:10.1007/BF01647010
8. Ben Zakour NL, Alsheikh-Hussain AS, Ashcroft MM, et al. Sequential Acquisition of Virulence and Fluoroquinolone Resistance Has Shaped the Evolution of *Escherichia coli* ST131 [published correction appears in *MBio*. 2016 Jun 28;7(3):null]. *mBio*. 2016;7(2):e00347-16. Published 2016 Apr 26. doi:10.1128/mBio.00347-16
9. Brigante G, Luzzaro F, Perilli M, et al. Evolution of CTX-M-type beta-lactamases in isolates of *Escherichia coli* infecting hospital and community patients. *Int J Antimicrob Agents*. 2005;25(2):157-162. doi:10.1016/j.ijantimicag.2004.09.013
10. Brolund A, Sandegren L Characterization of ESBL disseminating plasmids. *Infect Dis (Lond)*. 2016;48(1):18-25. doi: 10.3109/23744235.2015.1062536. Epub 2015 Jul 1.
11. Can F, Azap OK, Seref C, et al. Emerging *Escherichia coli* O25b/ST131 clone predicts treatment failure in urinary tract infections. *Clin Infect Dis*. 2015;60:523–527.
12. Cantyn R, Coque TM. The CTX-M β -lactamase pandemic. *Curr Opin Microbiol*. 2006;9:466–475. doi: 10.1016/j.mib.2006.08.011.
13. Castanheira M, Deshpande LM, Woosley LN, Serio AW, Krause KM, Flamm RK. Activity of plazomicin compared with other aminoglycosides against isolates from European and adjacent countries, including Enterobacteriaceae molecularly characterized for aminoglycoside-modifying enzymes and other resistance mechanisms. *J Antimicrob Chemother*. 2018;73(12):3346-3354. doi:10.1093/jac/dky344
14. Coque TM, Novais A, Carattoli A, Poirel L, Pitout J, et al. Dissemination of clonally related *Escherichia coli* strains expressing extended-spectrum β -lactamase CTX-M-15. *Emerg Infect Dis*. 2008;14:195–200.

- doi: 10.3201/eid1402.070350
15. Dale AP, Woodford N. Extra-intestinal pathogenic *Escherichia coli* (ExPEC): Disease, carriage and clones. *J Infect.* 2015;71(6):615-626. doi:10.1016/j.jinf.2015.09.009
 16. D'Andrea MM, Arena F, Pallecchi L, Rossolini GM. CTX-M-type β -lactamases: a successful story of antibiotic resistance. *Int J Med Microbiol.* 2013 Aug;303(6-7):305-17
 17. Dhanji H, Murphy NM, Akhigbe C, Doumith M, Hope R, Livermore DM, Woodford N. Isolation of fluoroquinolone-resistant O25b:H4-ST131 *Escherichia coli* with CTX-M-14 extended-spectrum β -lactamase from UK river water. *J Antimicrob Chemother.* 2011 Mar;66(3):512-6. doi: 10.1093/jac/dkq472. Epub 2010 Dec 15.
 18. Dhanji H, Khan, P., Cottell, J.L., Piddock, L.J., Zhang, J., Livermore, D.M., Woodford, N., 2012. Dissemination of pCT-like IncK plasmids harboring CTX-M-14 extended-spectrum β -lactamase among clinical *Escherichia coli* isolates in the United Kingdom. *Antimicrob. Agents Chemother.* 56, 3376–3377.
 19. Doi Y, Adams-Haduch JM, Peleg AY, D'Agata EM. The role of horizontal gene transfer in the dissemination of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates in an endemic setting. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2012;74(1):34-38. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2012.05.020
 20. Doi Y, Park YS, Rivera JI, et al. Community-associated extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* infection in the United States. *Clin Infect Dis.* 2013;56(5):641-648. doi:10.1093/cid/cis942
 21. ECDC. Antimicrobial resistance surveillance in Europe. Surveillance report. 2021. <https://atlas.ecdc.europa.eu/public/index.aspx>
 22. Freeman JT, Sexton DJ, Anderson DJ. Emergence of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in community hospitals throughout North Carolina: a harbinger of a wider problem in the United States?. *Clin Infect Dis.* 2009;49(2):e30-e32. Doi:10.1086/600046
 23. Galindo-Méndez, M. (2020). Antimicrobial Resistance in *Escherichia coli*. In (Ed.), *E. Coli Infections - Importance of Early Diagnosis and Efficient Treatment*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.93115>
 24. Gauthier L, Dortet L, Cotellon G, Creton E, Cuzon G, Ponties V, et al. Diversity of carbapenemase-producing *Escherichia coli* isolates in France in 2012-2013. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 2018;62(8):e00266-18. DOI: 10.1128/AAC.00266-18
 25. Ghafourian S, Nourkhoda Sadeghifard, Sara Soheili, Zambari Sekawi. Extended Spectrum Beta-lactamases: Definition, Classification and

- Epidemiology Curr Issues Mol Biol. 2015;17:11-21.
26. Halder AK, Tronchet C, Akhter S, Bhuiya A, Johnston R, Luby SP. Observed hand cleanliness and other measures of handwashing behavior in rural Bangladesh. BMC Public Health. 2010 Sep 9;10:545. doi: 10.1186/1471-2458-10-545.
 27. Hansen F., Olsen S. S., Heltberg O., Justesen U. S., Fuglsang-Damgaard D., Knudsen J. D., et al. (2014). Characterization of third-generation cephalosporin-resistant *Escherichia coli* from bloodstream infections in Denmark. Microb. Drug Resist. 20 316–324. 10.1089/mdr.2013.0157
 28. Harwood VJ, Staley C, Badgley BD, Borges K, Korajkic A. Microbial source tracking markers for detection of fecal contamination in environmental waters: relationships between pathogens and human health outcomes. FEMS Microbiol Rev. 2014;38(1):1-40. doi:10.1111/1574-6976.12031
 29. Hasassri ME, Boyce TG, Norgan SA, Cunningham PR, Jeraldo S, Weissman S, et al. An immunocompromised child with bloodstream infection caused by two *Escherichia coli* strains, one harboring NDM-5 and the other harboring OXA-48-like carbapenemase. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2016;60:3270-3275. DOI: 10.1128/AAC.03118-15
 30. Huttner BD, de Lastours V, Wassenberg M, Maharshak N, Mauris A, Galperine T, Zanichelli V, Kapel N, Bellanger A, Olearo F, Duval X, Armand-Lefevre L, Carmeli Y, Bonten M, Fantin B, Harbarth S; R-Gnosis WP3 study group. A 5-day course of oral antibiotics followed by faecal transplantation to eradicate carriage of multidrug-resistant Enterobacteriaceae: a randomized clinical trial. Clin Microbiol Infect. 2019 Jul;25(7):830-838
 31. Irrgang A, Falgenhauer L, Fischer J, Ghosh H, Guiral E, et al. CTX-M-15-producing *E. coli* isolates from food products in Germany are mainly associated with an IncF-type plasmid and belong to two predominant clonal *E. coli* lineages. Front Microbiol. 2017;8:2318. doi: 10.3389/fmicb.2017.02318.
 32. Jakobsen L., Garneau P., Kurbasic A., Bruant G., Stegger M., Harel J., et al. (2011). Microarray-based detection of extended virulence and antimicrobial resistance gene profiles in phylogroup B2 *Escherichia coli* of human, meat and animal origin. J. Med. Microbiol. 60 1502–1511. 10.1099/jmm.0.033993-0
 33. Jacoby G, R. Vacheva-Dobrevsky 2003. Epidemiology of Extended Spectrum beta-Lactamases in Sofia, Bulgaria. Eur J Clin Microbiol Infect Dis; 22: 385-388.
 34. Jacoby GA. Extended-spectrum beta-lactamases and other enzymes providing resistance to oxyimino-beta-lactams. Infect Dis Clin North

- Am. 1997;11(4):875-887. doi:10.1016/s0891-5520(05)70395-0
35. Jang J et al. J Environmental Escherichia coli: ecology and public health implications-a review. Appl Microbiol. (2017)
 36. Johnson J. R., Murray A. C., Kuskowski M. A., Schubert S., Prere M. F., Picard B., et al. (2005b). Distribution and characteristics of *Escherichia coli* clonal group A. Emerg. Infect. Dis. 11 141–145. 10.3201/eid1101.040418
 37. Jones RN, Flonta M, Gurler N, Cepparulo M, Mendes RE, Castanheira M. Resistance surveillance program report for selected European nations (2011). Diagn Microbiol Infect Dis. 2014;78(4):429-436. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2013.10.008
 38. Karanika S, Karantanos T, Arvanitis M, Grigoras C, Mylonakis E. Fecal Colonization With Extended-spectrum Beta-lactamase-Producing Enterobacteriaceae and Risk Factors Among Healthy Individuals: A Systematic Review and Metaanalysis. Clin Infect Dis. 2016
 39. Keuleyan E, V Kaludova, R Marinova. 1992. Comparative susceptibility to β -lactams and spectra of β -lactamases in clinical Enterobacteriaceae strains. 4th Biennial Conference on Chemotherapy of Infectious Diseases and Malignancies, Prague, Czechoslovakia. Program and Abstracts, Abstr 217
 40. Khoder M, Tsapis N, Domergue-Dupont V, Gueutin C, Fattal E. 2010. Removal of residual colonic ciprofloxacin in the rat by activated charcoal entrapped within zinc-pectinate beads. Eur. J. Pharm. Sci. 41:281–288.
 41. Lahlaoui H, de Luca F, Maradel S, Ben-Haj-Khalifa A, Ben Hamouda H, et al. Occurrence of conjugative IncF-type plasmids harboring the blaCTX-M-15 gene in Enterobacteriaceae isolates from newborns in Tunisia. Pediatr Res. 2015;77:107–110. doi: 10.1038/pr.2014.153.
 42. Livermore DM. Current Epidemiology and Growing Resistance of Gram-Negative Pathogens. Korean J Intern Med. 2012 Jun;27(2):128-42.
 43. Looft T, Allen HK. Collateral effects of antibiotics on mammalian gut microbiomes. Gut Microbes. 2012;3(5):463-467. doi:10.4161/gmic.21288
 44. Lowe CF, Katz K, McGeer AJ, Muller MP. 2013. Efficacy of admission screening for extended-spectrum beta-lactamase producing Enterobacteriaceae. PLoS One 8:e62678. doi:10.1371/journal.pone.0062678
 45. Lowy FD. Antimicrobial resistance: The example of *Staphylococcus aureus*. The Journal of Clinical Investigation. 2003;111(9):1265-1273. DOI: 10.1172/JCI18535
 46. Lunha K, Chanawong A, Lulitanond C, Wilailuckana N, Charoensri L, Wonglakorn P. High level carbapenem-resistant OXA-48-producing

- Klebsiella pneumoniae with a novel OmpK36 variant and low-level, carbapenem-resistant, non-porin-deficient, OXA-181-producing *Escherichia coli* from Thailand. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 2016;85:221-226. DOI: 10.1016/j.diagmicrobio.2016.03.009
47. Marcadiñ G, Deschamps C, Boyd A, Gautier V, Picard B, et al. Replicon typing of plasmids in *Escherichia coli* producing extended-spectrum β -lactamases. *J Antimicrob Chemother*. 2009;63:67–71. doi: 10.1093/jac/dkn428.
 48. Markovska R, Sredkova M, Markova B, Bojkova K, Gergova R, Bauernfeind A, Mitov I. High prevalence of CTX-M-15-producing O25b-ST131 *Escherichia coli* clone in Bulgarian hospitals. *Microb Drug Resist*. 2012 Aug;18(4):390-5. doi: 10.1089/mdr.2011.0186. Epub 2012 Feb 21.
 49. Markovska R, Schneider I., Keuleyan E., Sredkova M., Ivanova D., Markova B., Lazarova G, Dragijeva E., Savov E, Haydouchka I, Hadjieva N, Setchanova L, Mitov I., Bauernfeind A.. 2008. Extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae in Bulgarian hospitals. *Microb Drug Resist*. 14(2):119-128.
 50. Markovska R, Stoeva T, Bojkova K, I Mitov. Investigation of extended-spectrum beta-lactamase producing Enterobacteriaceae among *Klebsiella pneumoniae* и *Escherichia coli* strains in two university hospitals - Varna. *Medizinski pregled*. 2012; 48(1): 43-49
 51. Markovska R, Stoeva T, Boyanova L, Stankova P, Pencheva D, Kaneva R, Mitev V, Mitov I. Isolation of *Escherichia coli* ST131 producing KPC-2 in Bulgaria. *Infect Dis (Lond)*. 2017 May;49(5):429-431
 52. Markovska, R.; Stankova, P.; Stoeva, T.; Ivanova, D.; Pencheva, D.; Kaneva, R.; Boyanova, L. Fecal Carriage and Epidemiology of Extended-Spectrum Beta-Lactamase/Carbapenemases Producing Enterobacteriales Isolates in Bulgarian Hospitals. *Antibiotics* 2021,10, 747. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10060747>
 53. Mathers AJ, Peirano G, Pitout JD. The role of epidemic resistance plasmids and international high-risk clones in the spread of multidrug-resistant Enterobacteriaceae. *Clin Microbiol Rev*. 2015 Jul;28(3):565-91
 54. Maurer F, Castelberg C, Quiblier C, Bloemberg G, Hombach M, Evaluation of Carbapenemase Screening and Confirmation Tests with Enterobacteriaceae and Developent of a Practicial Diagnostic Algorithm, *J Clin Microbiol*. 2015 January;53(1):95-104
 55. Mendes RE, Mendoza M, Banga Singh KK, et al. Regional resistance surveillance program results for 12 Asia-Pacific nations (2011). *Antimicrob Agents Chemother*. 2013;57(11):5721-5726. doi:10.1128/AAC.01121-13
 56. Mojica MF, De La Cadena E, Hernández-Gymez C, Correa A, Appel

- TM, Pallares CJ, Villegas MV Performance of disk diffusion and broth microdilution for fosfomycin susceptibility testing of multi-drug resistant clinical isolates of Enterobacterales and *Pseudomonas aeruginosa*. *J Glob Antimicrob Resist*. 2020 Jan 28. pii: S2213-7165(20)30004-7. doi: 10.1016/j.jgar.2020.01.003. [Epub ahead of print]
57. Naseer U, Sundsfjord, A., 2011. The CTX-M conundrum: dissemination of plasmids and *Escherichia coli* clones. *Microb. Drug Resist*. 17, 83–97.
 58. Nicolas-Chanoine MH, Bertrand X, Madec JY *Escherichia coli* ST131, an Intriguing Clonal Group *Clin Microbiol Rev*. 2014 Jul; 27(3): 543–574. doi: 10.1128/CMR.00125-13
 59. Nordmann P, Poirel L. The difficult-to-control spread of carbapenemase producers among Enterobacteriaceae worldwide. *Clinical Microbiology and Infection*. 2014;20(9):821-830. DOI: 10.1111/1469-0691.12719
 60. Partridge SR, Zong Z, Iredell JR. Recombination in IS26 and Tn2 in the evolution of multiresistance regions carrying blaCTX-M-15 on conjugative IncF plasmids from *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011;55:4971–4978. doi: 10.1128/AAC.00025-11.
 61. Pitout JD. 2009. IPSAT P1A, a class A beta-lactamase therapy for the prevention of penicillin-induced disruption to the intestinal microflora. *Curr. Opin. Invest. Drugs* 10:838–844.
 62. Poirel L, Savov E, Nazli A, et al. Outbreak caused by NDM-1- and RmtB-producing *Escherichia coli* in Bulgaria. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014;58(4):2472-2474. doi:10.1128/AAC.02571-13
 63. Prevel R, Boyer A, M'Zali F, Lasheras A, Zahar JR, Rogues AM, Gruson D. Is systematic fecal carriage screening of extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae still useful in intensive care unit: a systematic review. *Crit Care*. 2019 May 14;23(1):170. doi: 10.1186/s13054-019-2460-3.
 64. Poolman JT, Wacker M. Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli*, a Common Human Pathogen: Challenges for Vaccine Development and Progress in the Field. *J Infect Dis*. 2016;213(1):6-13. doi:10.1093/infdis/jiv429
 65. M'Zali F, Lasheras A, Zahar JR, Rogues AM, Gruson D. Is systematic fecal carriage screening of extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae still useful in intensive care unit: a systematic review. *Crit Care*. 2019 May 14;23(1):170. doi: 10.1186/s13054-019-2460-3.
 66. Rodriguez-Bano J, Lopez-Cerero L, Navarro MD, Diaz de Alba P, Pascual A. 2008. Faecal carriage of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli*: prevalence, risk factors and molecular epidemiology. *J. Antimicrob. Chemother*. 62:1142–1149
 67. Rood IGH et al. Review: Molecular detection of extended spectrum- β -lactamase- and carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in a

- clinical setting. *Diagn Microbiol Infect Dis.* (2017)
68. Shen Z, Hu Y, Sun Q, Hu F, Zhou H, Shu L, et al. Emerging carriage of NDM-5 and MCR-1 in *Escherichia coli* from healthy people in multiple regions in China: A cross sectional observational study. *EClinicalMedicine.* 2018;6:11-20. DOI: 10.1016/j.eclinm.2018.11.003
 69. Siegel JD, Rhinehart E, Jackson M, Chiarello L; Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee. Management of multidrug-resistant organisms in health care settings, 2006. *Am J Infect Control.* 2007 Dec;35(10 Suppl 2):S165-93. Review. No abstract available.
 70. Singh R, de Groot PF, Geerlings SE, Hodiament CJ, Belzer C, Berge IJMT, de Vos WM, Bemelman FJ, Nieuwdorp M. Fecal microbiota transplantation against intestinal colonization by extended spectrum beta-lactamase producing *Enterobacteriaceae*: a proof of principle study. *BMC Res Notes.* 2018 Mar 22;11(1):190
 71. Wellington EM, Boxall AB, Cross P, et al. The role of the natural environment in the emergence of antibiotic resistance in gram-negative bacteria. *Lancet Infect Dis.* 2013;13(2):155-165. doi:10.1016/S1473-3099(12)70317-1
 72. World Health Organization, 2017 WHO Publishes List of Bacteria for Which New Antibiotics Are Urgently Needed. 2017. Available from: <https://www.who.int/news-room/detail/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed> [Accessed: 09 April 2020]
 73. Woerther PL, Burdet C, Chachaty E, Andreumont A. Trends in human fecal carriage of extended-spectrum β -lactamases in the community: toward the globalization of CTX-M. *Clin Microbiol Rev.* 2013 Oct;26(4):744-58.
 74. Woodford N, Ward ME, Kaufmann ME, et al. Community and hospital spread of *Escherichia coli* producing CTX-M extended-spectrum beta-lactamases in the UK. *J Antimicrob Chemother.* 2004;54(4):735-743. doi:10.1093/jac/dkh42

МОДИФИЦИРАН БЪРЗ CARBA NP ТЕСТ (МСNPVЗ) ЗА ФЕНОТИПНО ОТКРИВАНЕ НА КАРБАПЕНЕМАЗИ ПРИ ГРАМ-НЕГАТИВНИ МИКРООРГАНИЗМИ

Иван Н. Иванов
Стефана Събчева
Красимира Иванова

Карбапенемазите представляват специфични β -лактамази, които могат да хидролизират карбапенемите и голяма част от другите β -лактами. Продукцията на карбапенемази е основната причина за възникване на резистентност към карбапенеми, а продуциращите ги бактерии причиняват инфекции, при които терапевтичните опции са ограничени и често се характеризират с високи нива на смъртност (1). Поради това, че се кодират от мобилни генетични елементи (MGE), включително от конюгативни плазмиди, предаването и разпространението им в болнични условия е изключително бързо и представлява значителен епидемиологичен риск.

Разпространението на карбапенем резистентни Грам-негативни бактерии както в Европа, така и в България продължава да нараства през последните години (2). В нашата страна бяха идентифицирани карбапенемази от всички класове сред представителите на сем. *Enterobacteriales*, докато при *P. aeruginosa* и *A. baumannii* се докладват съответно метало-беталактамази (Клас В) и ОХА-деривати от клас D (2).

Първоначалният скрининг за потенциални продуценти на карбапенемази се базира основно на резултатите от изпитването на антимикробната чувствителност. След установяване на занижени нива на чувствителност към карбапенеми, в зависимост от граничните стойности на използваните стандарти (EUCAST), е необходимо да се извършат допълнителни фенотипни тестове за определяне типа (идентификация) на карбапенемазите. Такива методи са например Модифицираният Ходж тест (МНТ), Carba NP теста (Carbapenemase Nordmann-Poirel), CIM (Carbapenem Inactivation Method), MALDI-TOF и др. Повечето от тях изискват 18-24-часа за отчитане (CIM, МНТ), имат незадоволителна чувствителност (МНТ), изискват апаратура (MALDI-Tof), скъпи са или неприложими в рутинни условия.

Тук представяме лесен, бърз и достъпен метод за детекция на карбапенемази от всички класове в рамките на два до три часа (в зависимост от броя на изпитваните изолати). Основните предимства пред оригиналния Carba NP метод са по-високата чувствителност (>98% особено по отношение на ОХА-карбапенемазите), достъпността и лекотата на изпълнение (4). Тестът е разработен, валидиран и въведен като рутинен в НРЛ-КМАР, НЦЗПБ и към момента с него са изследвани над 700 изолата.

Реактиви, консумативи и референтни щамове

Необходимо е всички реагенти да са с високо качество и чистота (минимум чисти за анализ – ЧЗА).

- Cetyltrimethylammonium bromide (СТАВ) – пермеабилзиращ катионен детергент

- Калиев хидроксид (основа) – за корекция на рН

- Калиев сулфат – осмотичен и солеви баланс

- Фенол ред, натриева сол – рН индикатор; работен разтвор от 0.5%

- Цинков сулфат – ко-фактор за метало-беталактамази

- 1,5мл епруветки тип Епендорф

- референтни щамове

- *E. coli* ATCC 25922 – негативна контрола; не продуцира карбапенемази

- *K. pneumoniae* ATCC ВАА-2814 – позитивна контрола, продуцент на КРС-3 карбапенемаза; **Забележка:** при липса на ATCC ВАА-2814 е допустимо да се използва кой да е щам *Stenotrophomonas maltophilia* с вродена метало-беталактамаза L1

Приготвяне на разтвори

Състав на Solution C за приготвяне на 50 ml разтвор: към 2.5 ml от изходен разтвор на 0.5 % phenol red се добавят 100 µl 0.1M ZnSO₄, 500 µl 2% СТАВ, 187 µl 0.1M КОН, 1.09g K₂SO₄ и стерилна дестилирана вода до обем 50 ml. Не е необходима допълнителна корекция на рН. Получената тъмно червена смес се разделя на две равни части в епруветки по 25 ml. Едната се маркира като Solution C, а към другата се добавят 150 mg Imipenem/ Cilastatin (Imecitin) до крайна концентрация 6mg/ml и се бележи Solution CI.

Непосредствено след добавянето на Imecitin, разтворите C и CI се разпределят в аликвоти по 1 ml (достатъчни за изпитване на 5 щамата), обозначават се с дата, и се съхраняват на –70°C или –80°C

до 12 месеца. На всеки три месеца е необходимо реактивите да се изпитват с контролни щамове.

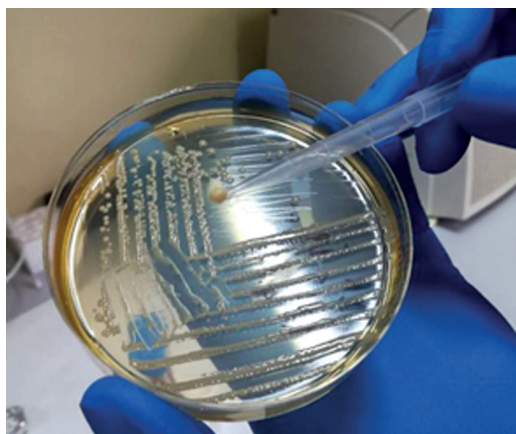
Протокол

Използват се 24 до 48 часови култури от **неселективни агарови среди – Мюлер-Хинтън** (може и директно от антибиограма) или **Кръвен/ Колумбия агар**. **Цветните и селективни среди са несъвместими, тъй като могат да променят цвета и/или рН на реагентите**. Тестът е подходящ за изпитване на бактерии от раз. *Enterobacteriales*, както и за НФГБ от *p. Pseudomonas* и *Acinetobacter*.

Процедура

1. Подготвя се разтвор на Imecitin, в концентрация 6мг/мл в Solution C (в случай, че разтворът е бил приготвен предварително и съхраняван на -70°C , тази стъпка се пропуска)

2. За изпитването на всеки изолат се използват по две епруветки, във всяка от които с помощта на накрайник за пипета (P1000) се разстила на дъното и по стените количество бактериална маса с размер малко по-голям от оризово зърно (при *Acinetobacter* spp. може и по-голямо количество) (**Фиг. 1 и Фиг. 2**).



Фигура 1



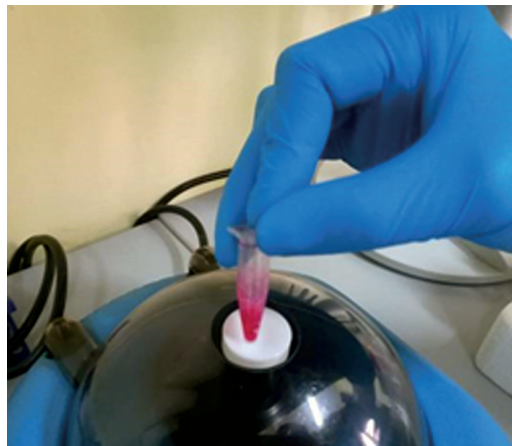
Фигура 2

3. Към първата епруветка се добавят 200 μl Solution C (отрицателната контрола), а във втората се добавят 200 μl Solution C + Imecitin (CI). Епруветките се хомогенизират на вортекс до хомогенно суспендиране на цялото количество култура (**Фиг. 3 и Фиг. 4**).

Винаги се залагат и подходящи контролни щамове съответно за положителна и отрицателна контрола (напр. за MBL *S. maltophilia*).



Фигура 3



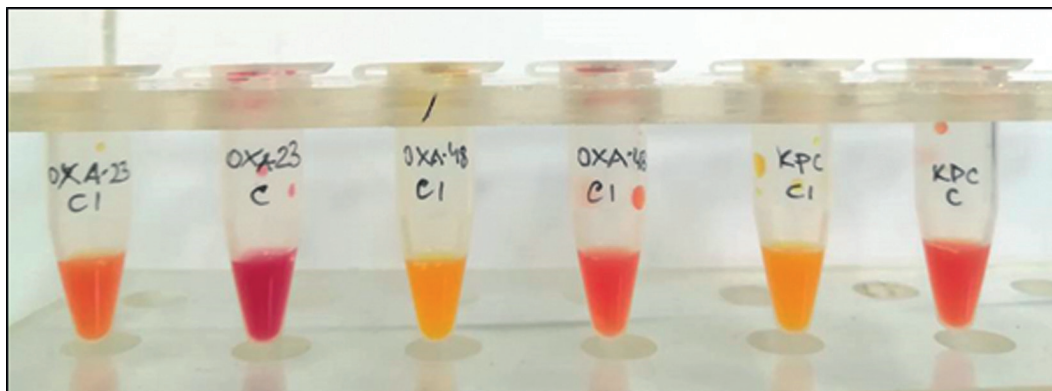
Фигура 4

4. Следва инкубация на 35-37°C за 2 часа и отчитане на изолата през следните интервали от време: 15, 30, 60 и 120 минути.

Интерпретация на резултатите:

- Ако двете епруветки, не променят цвета си и останат червени се счита, че тестовия изолат **не** продуцира карбапенемаза.

- В случай, че епруветката съдържаща Imecitin (CI) промени цвета си в жълт или светло оранжев, а отрицателната контрола запазва червеният си цвят, с голяма вероятност тестваният изолат **е продуцент на карбапенемаза**. Промяната на цвета се дължи на понижаване на рН, настъпваща при хидролизата на имипенем. Обикновено KPC и NDM продуцентите позитивират веднага, докато OXA-продуценти *Acinetobacter spp.* едва на втория час (**Фиг. 5**).



Фигура 5. Положителен MCNPrv3 тест при три изолата продуценти на OXA-23, OXA-48 и KPC-2

• Ако цветът на отрицателната контрола се промени в жълт, резултатът се тълкува като **невалиден**.

Източници:

1. Zhou R, Fang X, Zhang J, et al. Impact of carbapenem resistance on mortality in patients infected with Enterobacteriaceae: a systematic review and meta-analysis *BMJ Open* 2021;11:e054971. doi: 10.1136/bmjopen-2021-054971
2. Brolund A, Lagerqvist N, et al. Worsening epidemiological situation of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in Europe, assessment by national experts from 37 countries, July 2018. *Euro Surveill.* 2019 Feb;24(9):1900123
3. Ivanova K., Ivanov I.N., et al. Evaluation of the Carba Np test for detection of carbapenem-producing Enterobacteriaceae: Preliminary results. *Probl. Inf. Parsit.Dis.* Vol 43,2015, 2:12-14;
4. Иванова К. Бета-лактамази с карбапенемазна активност – микробиологични и молекулярно генетични проучвания. Дисер., София 2017.

КЛИНИЧНА КАРТИНА ПРИ ЧРЕВНИ ЕШЕРИХИОЗИ

Сравнителен анализ на получените резултати по проект на ФНИ КП-06-М43/2 „Проучване върху динамиката на безсимптомно заразноносителство на патогенни *Escherichia coli* в България чрез комплексна диагностика на колиентерити в съвременни условия“ със световните литературни данни по проблема

Валери Велев

От средата на 1940 г. *E. coli* е признат от медицината и като причинител на диарийни заболявания, а не само като безвреден чревен коменсал. В последствие започват да се доказват различни патогенетични механизми за причина на диария и спрямо тях и наличието на биологични разлики в типовете *E. coli* те се разделят на няколко основни групи ЕРЕС, ЕТЕС, През годините, особено с развитието на биохимичните и молекулярно-генетичните методи в микробиологията, все повече се разгадават интимните механизми за патогенезата, епидемиологията и значението на *E. coli*, като причинител на гастроентерити, понякога с тежка симптоматика, особено в ранна детска възраст. В свои работи, описва еволюцията на *E. coli* като стомашно чревен патоген въпреки, че се открива широко в околната среда и се среща като коменсал в червата на редица бозайници. Обикновено става дума за развитие на острови на патогенност, като тези трансферни събития са независими едно от друго с образуване на различни по своята природа вирулентни гени [1-3]. Според други автори, редица коменсални бактерии, включително *E. coli*, в процеса на еволюция сравнително бързо са придобили гени за взаимодействие с гостоприемниковата клетка, но липсват други гени, които да транслират токсини, нужни да направят бактерията реално патогенна. Въпреки това при прехвърляне на определени клъстери от патогенни *E. coli* към коменсални, ги правят патогенни сравнително бързо. Тоест, предполага се, че един патогенен щам прехвърля своята болестотворност върху безвредни щамове сравнително лесно.

В индустриално развитите страни *E. coli*, през 60-те и 70-те години на ХХ век, рядко се описва като патоген причинител на диария.

По-скоро се срещат внесени единични случаи при пътувания в тропични и субтропични страни, т. нар. „диария на пътуващите“ [1, 4, 5]. Първоначално всички диарогенни щамове са неправилно наречени ентеропатогенни (ЕРЕС) и са открити голям брой О-серотипове свързани с подобни щамове. Скоро става ясно, че различни щамове *E. coli* причиняват различна по своята клинична характеристика клинична картина, най-често диарийен синдром [6, 7].

В наши клинични наблюдения, финансирани от ФНИ по проект КП-06-М43/2 на едни от диарийните подгрупи, които правят впечатление са ентеротоксигенните *E. coli* (ЕТЕС), които поразяват лигавицата на тънкото черво предизвиквайки секреторна диария. При този тип диарийен синдром има преминаване на течности от чревната стена към чревния лумен. В този случай тялото губи големи количества течности, изхожданията са сравнително чести, големи по обем, воднисти. При по-тежка инфекция, диарийният синдром може да добие сериозен интензитет с изхождания с изцяло течна консистенция (т. нар. холероподобна диария). Тя е характерна най-вече за вирусни чревни инфекции (ротавирусни, норовирусни), вибриобактерии (холера), някои случаи на инфекция с *Campylobacter sp.*, и разбира се за инфекции с ЕТЕС. В случая причина са специфични ентеротоксини, прикрепващи бактериите към тънкочревната лигавица [8, 9].

Секреторните диарии са опасни главно за кърмачета и малките деца, както и за възрастни хора, поради бързо настъпващата дехидратация. **Наблюдавали сме множество деца под 6 м с изключително интензивна диария. Прави впечатление, че тези от тях, които са на естествено хранене се възстановяват сравнително по-бързо.** Опасността от тежка дехидратация и дори смърт е особено сериозна в икономически изостаналите райони на света, където дори достъпът до орална рехидратация е труден. Поради тази причина острата диария е втората причина за детска смъртност при деца до 5 години след пневмониите [10, 11]. Ентероинвазивните *E. coli* (ЕИЕС) също атакуват основно тънкочревната лигавица, но предизвикват възпалителна диария подобна на тази при бактериалната дезинтерия (шигелоза). При нея има активна възпалителна реакция в тънкочревната мукоза и субмукоза, което води до усилена пасивна загуба на течности и протеини. **При нашите болни обикновено по клиничен ход инфекцията с ЕИЕС е неразличима от шигелозата. Освен това щамовете**

ЕИЕС експерисрат някои соматични антигени много сходни с антигените на род *Shigella*. Респективно тези *E. coli* предизвикват диарийен синдром с по-интензивни или по-оскъдни изхождания, най-често фекалната маса е малко количество, примесена с кръв и слуз. Често, такава находка се нарича „дизинтерийна хрчка“, но може да се предизвика и от ЕИЕС. В тези ситуации, поради по-малката загуба на обем течности и соли, тежка дехидратация настъпва по-рядко. Чести и мъчителни са коремните болки, в някои случаи класически тенезми - усещане, че ампулата на ректума е пълна, но при опит за дефекация, той остава безрезултатен. Малко преди изхожданията болните изпитват силни коремни болки, облекчаващи се временно след изхождане. Имали сме редица случаи на толкова силни коремни болки, особено при по-големи деца, че се е налагало да се правят консултации с детски хирург за отхвърляне на остър хирургичен корем. В единични случаи при коремна ехография сме наблюдавали и малко количество свободно подвижна течност в малкия таз и около гънките на тънките червеа, поради тежестта на възпалителния процес.

Първият доклад за доказан щам на ЕИЕС е от 1947 г. По-късно се оказва, че това е *E. coli* O124. Десетина години по-късно погрешно интерпретирани щамове *Shigella* се оказват ЕИЕС [12, 13]. Ентероинвазивните щамове най-често биват изолирани и доказвани в Южна Америка и Източна Европа. Ентероинвазивните щамове са най-честият източник на епидемични взривове в детски и лечебни заведения. Боледуват главно преморбидно увредени кърмачета - недоносени, хипотрофични, анемични и често боледуващи от други инфекциозни заболявания деца [14]. **Ние сме наблюдавали недоносени новородени с много тежко протичане и трудни за овладяване дехидратация и деминерализация.** ЕИЕС притежават токсини чрез които проникват в чревната клетка, което води до инвазия на лигавицата с разязвяване. Налице е и вътречревно намножаване на бактериите. Заболяването протича като класически възпалителен ентерит, макар че рядко може да се засегнат и части от колона. Освен диарийният синдром, повишената температура и коремните болки, възможно е и повръщане, което най-често е свързано с общата интоксикация на организма [12, 14]. Провеждането на адекватни микробиологични изследвания е от съществено значение за да се различат шигелозата от ЕИЕС. Шигелозата в повечето

случаи изисква антибиотично лечение, докато ЕИЕС - инфекцията се самоограничава, а болният се лекува само симптоматично и патогенетично. Опасността идва от реконвалесцентното носителство, което може да продължи с месеци и в детски колективи има важно епидемиологично значение [14, 15].

Терминът ентеропатогенни *E. coli* (ЕРЕС) днес се отнася за тези бактерии, които образуват специфични ултраструктурни лезии по микровилите на тънкочревната лигавица. **ЕРЕС е основният причинител на остра диария при кърмачета и малки деца. Особено застрашени от инфекцията са деца под 6 месеца. Такива са и повечето от нашите пациент с ЕРЕС-диария** [16, 17]. Както при типичните така и при атипичните ЕРЕС основно участва тип три секреторната система (ТЗСС), идентична и за много други диарийни агенти, и чрез още редица интимни молекулни механизми предизвиква основно секреторна тънкочревна диария със загуба на голям обем течности. Кърмачетата са особено застрашени от изотонична рехидратация, а основният терапевтичен метод остава рехидратацията с изотонични разтвори [18, 19]. **В нашата детска клиника обикновено използваме 500 мл банки серум с 5% глюкоза с добавена ампула Sol. KCl 15% от 10 ml. В редки случаи е възможно да се развие хипотонична (хипонатриемична дехидратация) поради интензивни загуби на Na⁺ и последващото намаляване на осмоларността на плазмата с клетъчна хиперхидратация.** Това състояние е свързано с интензивни тънкочревни диарии и големи загуби на течности с понижени нива на Na⁺ и Cl⁻ в плазмата. Повишените загуби на K⁺ често могат да усложнят ситуацията, нивата на бикарбонатите и рН в плазмата също са вариабилни. В такива случаи от правилното рехидратиране и коригиране на диселектролитемията зависи живота на кърмачето, което все още има сравнително ниски възможности само да „буферира“ проблема чрез бъбречната функция. Обратен по знак процес е хипертоничната дехидратация, която изключително рядко настъпва при диария. При кърмачета е свързана с патологични обилни изпотявания, обилни уринирания предизвикани от някои медикаменти и други [18]. В повечето случаи клиницистите използват при тези две състояния унифицираните разтвори на СЗО за интравенозна рехидратация, **ние използваме модифициран разтвор, при който вместо NaCl 0.9% допълваме банката със Sol. glucosae 5% до 500 ml. Така избягваме хипернатриемичността на разтвора и банката ни придобива вида: Ser. glucosae 5% / 200 ml+Sol.**

KCl 15%/10 ml+ Sol. NaHCO₃ 8.4%/20 ml и допълваме банката със Sol. glucosae 5% до 500 ml.

Ентерохеморагичните *E. coli* (ЕНЕС) са важен патоген, атакуващ основно лигавицата на дебелото черво и причиняващ хеморагичен колит. Той се характеризира с малки по обем, но чести, кървави изпражнения. Характерно от епидемиологична гледна точка е, че основният резервоар на патогена са дебелите черва на говедата, което налага стриктна хигиена при работата в този селскостопански сектор и работата с този тип месни храни. ЕНЕС е изолиран за пръв път от пациент с кървава диария през 1982 и бързо води до пандемия [20]. Освен контакт с говеда, консумация на говеждо месо, непастъризирано мляко, крос-контаминация на зелени салати, бобови кълнове, в последно време има единични съобщения за заразяване и със сурово брашно [21]. Шига-подобният токсин (веротоксин) е основният вирулентен фактор в ЕНЕС. Веротоксинът е отговорен за редица болестотворни прояви, като освен хеморагичната диария, тежко и опасно състояние е Хеморагично-уремичният синдром (ХУС) и бъбречната недостатъчност. Шига-подобният токсин притежава цитотоксичност и чрез увреда в рибозомите води до прекратяване на протеиновия синтез и клетъчна смърт, отделно се активират и някои пътища на апоптозата [22]. Важен за развитието на ХУС е щамът ЕНЕС O157. При проучване на деца с ЕНЕС инфекция в Чили, се оказва, че развилите ХУС са по-често заразени със серогрупа O157 отколкото контролите (45,5% срещу 9% $p = 0,007$) [23]. Самият ХУС се характеризира с хемолитична анемия, тромбоцитопения и повишено ниво на азотни тела в кръвта (бъбречна недостатъчност). Обикновено синдромът се среща при малки деца и е диария-асоцииран хемолитично-уремичен синдром. Освен посочените симптоми и синдроми свързани с тромбоцитите и бъбреците, децата имат диарийен синдром с кървави примеси. Наблюдава се обикновено през лятото и ранната есен. Среща се еднакво и при двата пола. Наблюдава се най-често във възрастта от 6 месеца до 6 години. Заболяването е животозастрашаващо, често изисква интензивно лечение и хемодиализа. В някои случаи бъбречната недостатъчност прогресира до хронична. ХУС е една от причините при инфекция с диарогенни *E. coli* да се избягва антибактериални средства и болните да се лекуват симптоматично и патогенетично [22, 24]. **От всички проучени случаи на хеморагични диарии при хоспитализираните деца в СБАЛИПБ, няла лабораторно потвърден етиологичен причинител на диарията *E. coli* O157 за периода на проект КП-06-M43/2.**

Ентероагрегативните *E. coli* (ЕАЕС) се считат за патоген водещ изключително често до остра водниста диария сред малки деца в развиващите се страни. След ЕТЕС той е вторият по-честота причинител на тежки тънкочревни диарии със загуба на голямо количество течности, малките деца са заплашени от изоставане в растежа или остра дехидратация [11, 25]. ЕТЕС е и много чест причинител на остра секреторна диария при имunosупресивни болни, главно пациенти с HIV/СПИН [26, 27].

Дифузно-адхерентните *E. coli* (DAEC) са хетерогенен колипатоген, който причинява дифузен модел върху клетъчни HeLa клетки [28]. DAEC се свързва с водниста диария при малки деца до 5 години, при възрастни най-често е причинител на уроинфекции, при бременност може да даде усложнения по време на раждането и при майката и при новороденото. Обикновено секреторната диария е толкова по-упорита, колкото по-малко е детето. Най-често боледуват децата между 1 и 1.5 години. Много често се срещат възрастни асимптомни носители на DAEC. Това има както епидемиологично значение, така и според някои автори води до по-висок риск от дадени възпалителни чревни заболявания - болест на Крон, и др [14, 29, 30].

Адхерентно-инвазивни *E. coli* (AIEC) напоследък се описват като едни от най-важните идиопатични причинители на възпалителни чревни заболявания - т. нар. IBD (Болест на Крон, Хеморагичен колит). Тези тежки хронични състояния засягат основно тънките черва. Прогресирането към дисталните части на дебелите черва говори за сериозна прогноза на заболяването. В много случаи AIEC присъстват и като носителство в здрави индивиди, като част от нормалната микробиота. Все още не е идентифициран отделен агент, който да се приеме за водещ причинител на IBD. В допълнение на това, освен AIEC или DAEC, при болни с IBD се намират и други чревни патогени като *Campylobacter sp.*, Цитомегаловирус и други [31-33].

Свързаната с диария хемолитична *E. coli* (Diarrhea-associated hemolytic *E. coli*) (DHEC) е тип дифузно прилепнала *E. coli*, като името ѝ идва от дифузното прилепване към култивирани клетки. В някои среди все още се спори за тяхната патогенност, но последните проучвания показват, че най-често са диарогенни бактерии, като инфекцията се проявява най-вече в бедните райони на света с мукоидни оскъдни изхождания, фебрилитет и втрисане. Обикновено заболяването е самоограничавашо се [29].

Клиничните прояви според патотипа и лабораторно потвърдените в НРЛ по Чревни инфекции, НЦЗПБ клинични изолати

диарогенни *E. coli*, като етиологични причинители на педиатрични диарии, са обобщено представени в следващата глава „Някои клинични прояви при основните диарийни подгрупи *E. coli*. Резултати по проект към ФНИ № КП-06-М43/2 от 30.11.2020“.

E. coli произвежда цитолетални токсини (CDT)-producing *E. coli*, са най-новият описан клас, които произвеждат комбинирани токсини от няколко други подтипа *E. coli*. За сега е ясна близостта на някои от токсините, които произвежда с тази на *Campylobacter sp.* и фактът, че причинява диария у някои птици. Диарогенната му роля у хората все още се уточнява [19].

Диарогенните *E. coli* продължават да бъдат сериозно предизвикателство пред общественото здраве и безопасността на храните. С времето еволюцията на чревните патотипове на *E. coli* са се създали и продължават да се създават множество патотипове секретирани токсини, имащи агрегативни способности, възможности за

ПАТОГРУПИ <i>E. COLI</i>	ОСНОВНА КЛИНИЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА
ЕТЕС	Засягат тънкото черво. Секреторна диария със загуба на голямо количество течност поради интензивна водниста диария.
ЕИЕС	Атакуват тънкочревната лигавица, но диарията е от възпалителен тип (дизинтериоподобна). Има пасивна загуба на течности и протеини, с примеси на кръв.
ЕНЕС	Атакуват основно лигавицата на дебелото черво и причиняват хеморагичен колит. Той се характеризира с малки по обем, но чести, кървави изпражнения. Отговорен е за тежки състояния като ХУС и ОБН.
ЕАЕС	Обикновено подобно на ЕТЕС са тежки причинители на интензивни тънкочревни воднисти диарии. Протичат изключително тежко при имunosупресирани.
ДАЕС	Причиняват водниста диария най-често при деца до 5 години, а при възрастни се свързват най-често с уроинфекции. Бременни носители на ДАЕС могат да имат усложнения при раждането.

колонизация в чревния тракт и увреждащи различни техни структури. Появата на нови патотипове, част от които хибридни, например щам ЕАЕС/STEC (*E. coli* серотип O104: Н4) причиняват епидемии на много места по света. Всички тези факти показват колко голямо значение имат системите за надзор в здравните системи. Важни фактори са адекватната микробиологична диагностика на болните, както и наблюдението на животновъдството и храните в световен мащаб. Оптималното наблюдение е невъзможно без подготвени специалисти и нови молекулни технологии, като високопроизводително секвениране за събиране на профилите на вирулентност за различните патотипове *E. coli* [34]. В бъдеще това може да подпомогне разработването на някои терапевтични средства, а защо не и ефективни ваксини.

Източници:

1. Hart CA, Batt RM, Saunders JR. Diarrhoea caused by *Escherichia coli*. *Annals of Tropical Paediatrics*.1993; 13, 121-131.
2. Pupo, GM, Karadis DR., Lan R. et al. Evolutionary relationships among pathogenic and non-pathogenic *Escherichia coli* strains inferred from multilocus enzyme electrophoresis and *mdh* sequence studies. *Infection and Immunity*.1997; 64, 2685–2692
3. Lee, CA. Pathogenicity islands and the evolution of bacterial pathogens. *Infectious Agents and Disease*. 1996; 5, 1–7.
4. Groisman, EA., Ochman, H. How *Salmonella* became a pathogen. *Trends in Microbiology*. 1997; 5, 343–348
5. McDaniel, TK. & Kaper, JB. A cloned pathogenicity island from enteropathogenic *Escherichia coli* confers the attaching and effacing phenotype on *E. coli* K-12. *Molecular Microbiology*. 1997; 23, 399–407
6. Black RE, Merson MH, Huq I, et al. Incidence and severity of rotavirus and *Escherichia coli* diarrhoea in rural Bangladesh. *Lancet* 1981; i:141-3.
7. Honda T, Glass RI, Akhtar Q, et al. A simple assay to detect *Escherichia coli* producing heat labile enterotoxin: Results of a field study of the Biken test in Bangladesh. *Lancet* 1981; ii:609-10
8. Elliott EJ. Acute gastroenteritis in children. *BMJ*. 2007; 334(7583):35-38.
9. Mirhoseini A, Amani J, Nazarian S. Review on pathogenicity mechanism of enterotoxigenic *Escherichia coli* and vaccines against it. *Microb Pathog*. 2018 Apr;117:162-169.
10. Koletzko S, Osterrieder S. Acute infectious diarrhea in children. *Dtsch*

- Arztebl Int. 2009; 106(33):539-47.
11. Finberg L. Dehydration in infancy and childhood. *Pediatr Rev.* 2002; 23(8):277-82.
 12. Iijima Y, Oundo JO, Hibino T, et al. High Prevalence of Diarrheogenic *Escherichia coli* among Children with Diarrhea in Kenya. *Jpn J Infect Dis.* 2017 Jan 24;70(1):80-83.
 13. Павлова М., Попов М., Александрова Е, и съавт. Шигелоза при деца – клинично протичане и антимикробна чувствителност. *Обща медицина*, 22, 2020, № 6.
 14. Noguera-Obenza M, Cleary TG. Diarrheogenic *Escherichia coli*. *Curr Probl Pediatr.* 1999 Aug;29(7):208-16.
 15. Rappelli, Paola, et al. „Pathogenic enteric *Escherichia coli* in children with and without diarrhea in Maputo, Mozambique.“ *FEMS Immunology & Medical Microbiology* 43.1 (2005): 67-72.
 16. Songe M, Hang'ombe BM, Knight-Jones T.J, et al.. Antimicrobial resistant enteropathogenic *Escherichia coli* and *Salmonella* spp. in houseflies infesting fish in food markets in Zambia. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 2017, 14, 21.
 17. Hernandez RT, Elias W.P, Vieira M.A et al. An overview of atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* 2009, 297, 137–149.
 18. Greenbaum LA. Pathophysiology of body fluids and fluid therapy. In: Kliegman RM, Stanton BF, Schor NF, Geme III JW, Behrman RE, editors. *Nelson Textbook of Pediatrics*. 19th ed. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2011. p.212-42.
 19. Farf6n-Garcna AE, Ariza-Rojas SC, Vargas-C6rdenas FA, et al. Virulence mechanisms of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Rev Chilena Infectol.* 2016;33(4):438-450.
 20. Welinder-Olsson C, Kaijser B. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC). *Scand. J. Infect. Dis.* 2005, 37, 405–416.
 21. Meng J, LeJeune J.T, Zhao T, et al. Enterohemorrhagic *Escherichia coli*. In *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers*; ASM Press: Washington, DC, USA, 2012; pp. 287–309.
 22. Gyles C. Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: An overview. *J. Anim. Sci.* 2007, 85, E45–E62.
 23. Thomas DE, Elliott EJ. Interventions for preventing diarrhea-associated hemolytic uremic syndrome: systematic review. *BMC Public Health.* 2013 Sep 3;13:799.
 24. Jimbo K, Shimizu T. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) infection in infants and children. *Nihon Rinsho.* 2012 Aug;70(8):1338-42.
 25. Jenkins C. Enteroaggregative *Escherichia coli*. In *Escherichia coli, a Versatile Pathogen*; Springer: Cham, Switzerland, 2018; pp. 27–50.

26. Donnenberg M. *Escherichia coli*: Pathotypes and Principles of Pathogenesis; Academic Press: New York, NY, USA, 2013.
27. Beauchamp CS, Sofos JN. Diarrheagenic *Escherichia coli*. In *Pathogens and Toxins in Foods: Challenges and Interventions*; ASM Press: Washington, DC, USA, 2009; pp. 71–94.
28. Croxen MA, Law RJ, Scholz R, et al. Recent advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol. Rev.* 2013, 26, 822–880.
29. Le Bouguйнеc C, Servin AL. Diffusely adherent *Escherichia coli* strains expressing Afa/Dr adhesins (Afa/Dr DAEC): Hitherto unrecognized pathogens. *FEMS Microbiol. Lett.* 2006, 256, 185–194.
30. Mansan-Almeida R, Pereira AL, Giugliano LG. Diffusely adherent *Escherichia coli* strains isolated from children and adults constitute two different populations. *BMC Microbiol.* 2013, 13, 1–14.
31. Palmela C, Chevarin C, Xu Z, et al. Adherent-invasive *Escherichia coli* in inflammatory bowel disease. *Gut* 2018, 67, 574–587.
32. Graham DB, Xavier RJ. Pathway paradigms revealed from the genetics of inflammatory bowel disease. *Nature* 2020, 578, 527–539.
33. Caruso R, Lo BC, Nъсез G. Host–microbiota interactions in inflammatory bowel disease. *Nat. Rev. Immunol.* 2020, 20, 411–426.
34. Velev V, Pavlova M, Alexandrova E. et. al. Prevalence of diarrheagenic *E. coli* among hospitalised children in a clinical centre. *Acta Med Bul XLVIII*, 2021, 4, 5-8.

ПРОУЧВАНЕ ВЪРХУ РАЗПРОСТРАНЕНИЕТО НА *E. COLI* ЕНТЕРИТИ В БЪЛГАРИЯ ЗА ПЕРИОД ОТ ДЕСЕТ ГОДИНИ (2011–2020 Г.)

***Резултати по проект към ФНИ № КП-06-М43/2 от
30.11.2020, „Проучване върху динамиката на безсимп-
томно заразноносителство на патогенни *Escherichia
coli* в България чрез комплексна диагностика на ко-
лиентерити в съвременни условия“***

*Мария Павлова
Екатерина Александрова*

Това епидемиологично проучване има за цел да се определи и оцени значимостта и разпространението на инфекции причинени от различни категории диарогенна *E. coli* в България за десетгодишен период 2011–2020. Да актуализира епидемиологични данни за държаваи нужни при изпълнение на бъдещи мерки за превенция, бърза и точна диагностика на инфекции причинени колиентерити.

Материали и методи

Етиологичната роля и разпространение на диарогенни *E. coli* между българското население за последно десетилетие са определени чрез ретроспективни микробиологични и епидемиологични данни. Бяха използвани официална статистика от Националния Център за Общественото Здраве и Анализ (НЦОЗА), данни от годишни анализи на заразните заболявания на регионалните здравни инспекции (РЗИ) и данни от собствени епидемиологични проучвания на НРЛ по Чревни инфекции, НЦЗПБ. Епидемиологичните показатели за колиентерит в България за на период 2011–2020 са представени в таблична и графича форма.

Според Наредба № 21/2005 г. процедура за регистрация, комуникация и отчитане на инфекциозен заболявания на Министерство на здравеопазването на Република България, всички ДЕС изолати трябва да бъдат изпратени заедно с клинични и епидемиологични данни в НРЛ по Чревни инфекции, НЦЗПБ гр. София за идентифициране и потвърждаване на бактериалните причинители. Всичко данни на получените човешки бактериални изолати *E. coli* от

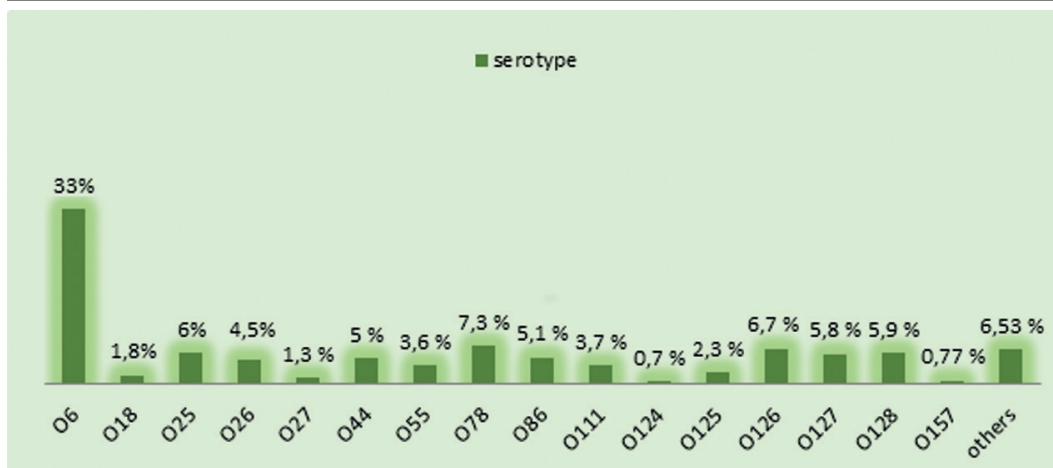
цялата страна са съхранени за минимум от 10 години. Обобщихме данните за всички докладвани изолати на DEC за периода от 2011 г. до 2020 г. в НРЛ по Чревни инфекции, заедно с тези, изследвани от нас и компилирахме окончателни резултати.

Резултати

За изследвания период от десет години 2011–2020 г. са регистрирани лабораторно потвърдени чревни инфекции от DEC 3 633 (3 633/ 530 870), 7,26% от регистрираните случаи на остри инфекциозни заболявания (ОИЗ) без грип и остри респираторни заболявания, туберкулоза, СПИН и полово предавани инфекции и COVID-19. Най-високи стойности за *E. coli* инфекции са били докладвани през 2011 г. с **514** случаи и най-ниски през 2017 г. само **240** случаи (Таблица 1). Сезонното разпространение на DEC инфекциите е изразено с повишена честота през топлите месеци май – септември. Териториалният анализ на инфекцията показва най-висока заболеваемост в североизточните административно-териториални единици на България: Варна (48, 93% 000), Силистра (24, 47% 000), Добрич (23, 37% 000), Шумен (19, 33% 000) и Югоизточни административно-териториални единици на страната: Ямбол (33, 63% 000), Сливен (21, 35% 000) и Бургас (8, 49% 000). Обобщените данни определят ролята

YEAR	NUMBER OF ACUTE INFECTIOUS DISEASES (without Influenza and Acute Respiratory Diseases, Tuberculosis, AIDS and Sexually Transmitted Infections, and COVID-19)	NUMBER OF DEC	DEC MORBIDITY (per 100,000)	% relative share of all ACUTE INFECTIOUS DISEASES
2011	58 259	514	6,98%000	0,88
2012	60 998	446	6,09%000	0,73
2013	67 916	333	4,57%000	0,49
2014	50 800	368	5,08%000	0,72
2015	54 471	382	5,30%000	0,7
2016	61 283	360	5,03%000	0,59
2017	52 393	240	3,38%000	0,46
2018	48 092	307	4,35%000	0,64
2019	54 397	385	5,50%000	0,71
2020	22 261	298	4,29%000	1,34
SUM	530 870	3 633	5,1%000	7,26

Таблица 1. Заболеваемост от DEC инфекции и регистрираните случаи на остри заразни заболявания за 10-годишен период 2011–2020 г. в България



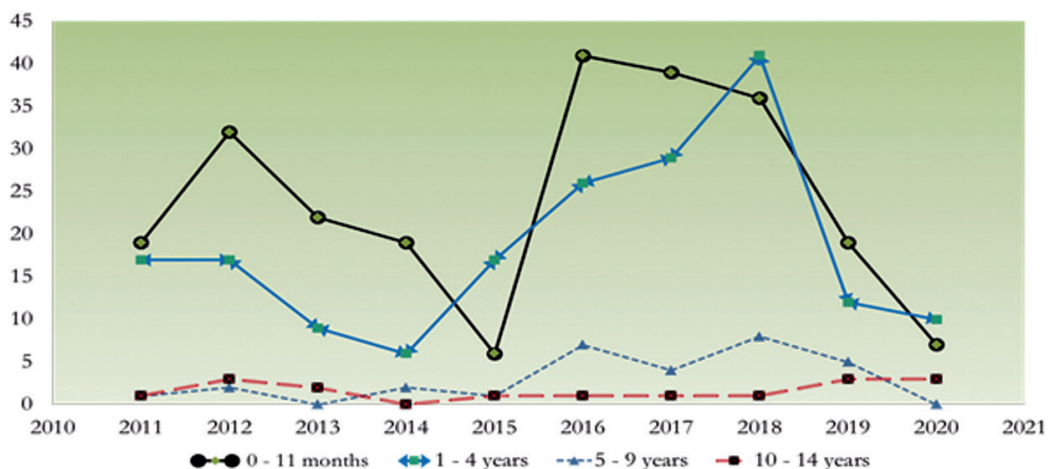
Фигура 1: Разпространение на диарогенни *E. coli* за периода 2011–2020 г. в България според O-групата

на токсигенните *E. coli* O6 като водещ етиологичен причинител на епидемични и спорадични ентерити в страната, следвани от токсигенните серотипове O78; ентеропатогенна *E. coli* O126; O127, O128; O44, които са представени на Фигура 1. С изключение на един случай от 2011 г., всички изолати, принадлежащи към ЕНЕС O157, са отрицателни за Н:7 фаза по данни от първичните бактериологични изследвания на клиничните микробиологични лаборатории в страната. Клиничните прояви не са свързани с характерните усложнения на ХУС. През 2011 г. е докладван случай на ентерохеморагична инфекция, причинена от ***E. coli* O157 Н:7** (заболеваемост 0,01% 000). Касае се за жена на 55 години от Ямбол, без данни за контакт с болен човек или животно и без доказан причинител в консумираната храна. Няма епидемиологични данни за връзката с избухването на O157 Н:7 в Германия през същата година.

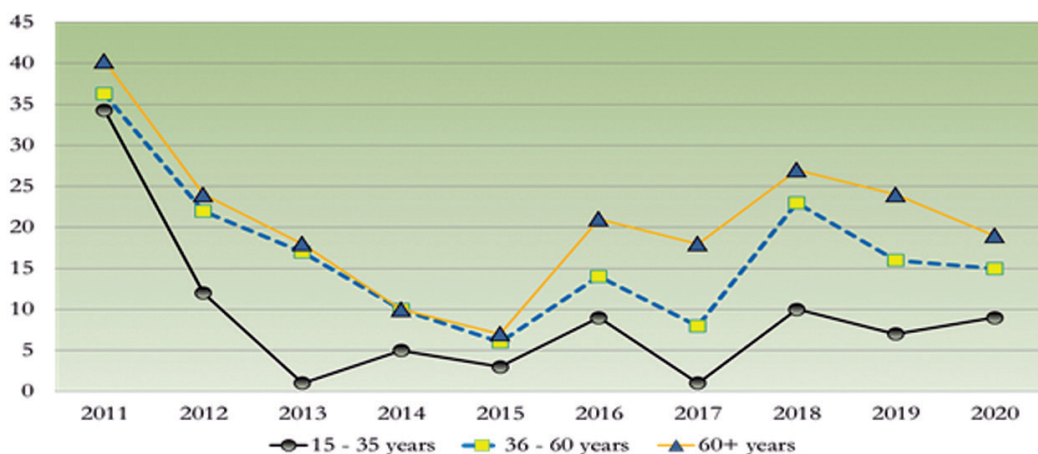
През изследвания период са докладвани няколко неонатални менингити от различни области на България. Пет инцидента, причинени от *E. coli* O6, са докладвани през 2013 г. и още два неонатални менингити от *E. coli* O18 през 2012 г. Последните инциденти, причинени от *Escherichia coli* O25, са през юни 2020 г., като са засегнати три бебета на възраст 0-20 дни от същото неонатологично отделение в университетска болница в Северна България. Може да се предполага нозокомиална инфекция поради получените от нас резултати от ВОХ и ERIC1/2 PCR профила, но те не бяха достатъчни, без доклад от епидемиологично изследване, което беше възпрепятствано от разпространението на инфекцията Covid-19.

Във възрастовата структура най-засегнати от ДЕС инфекции са кърмачетата и малките деца със заболяемост по възрастови групи, както следва: 0-11 месеца – **141, 86% 000**; 1-4 години – **57, 59% 000**; 5-9 години – **8, 50% 000**, както е показано на Фигура 2 и Фигура 3. От всички 3 633 случая на ДЕС, разпределени по пол, **1805 (49,68%)** случая на ДЕС са регистрирани при жени и **1828 (50,32%)** случая при мъже за десетгодишния период на изследване.

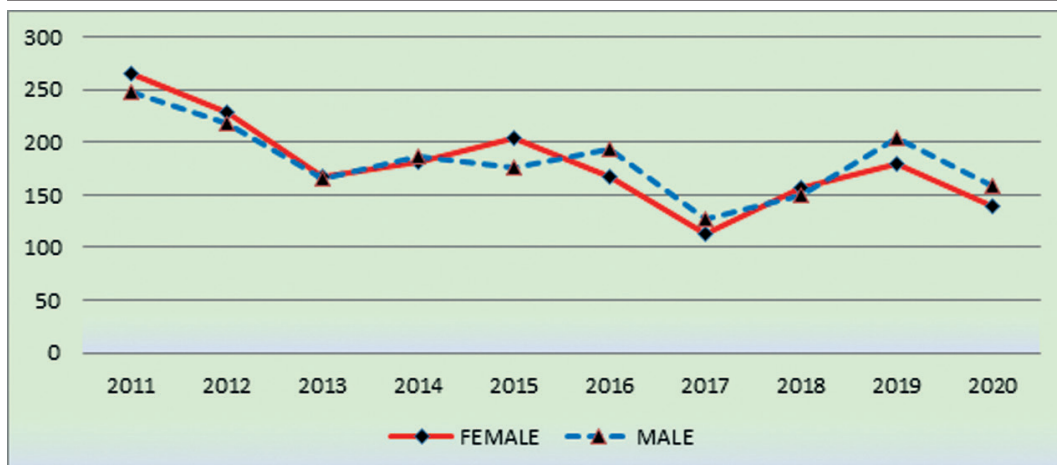
През 2011–2020 г. са регистрирани общо седем епидемии. Всяко от огнищата е потвърдено с източник на заразена храна. Етиологичните агенти на епидемиите са *E. coli* O6 (повече от един път); O18; O168; O59; O44 (Фигура 5).



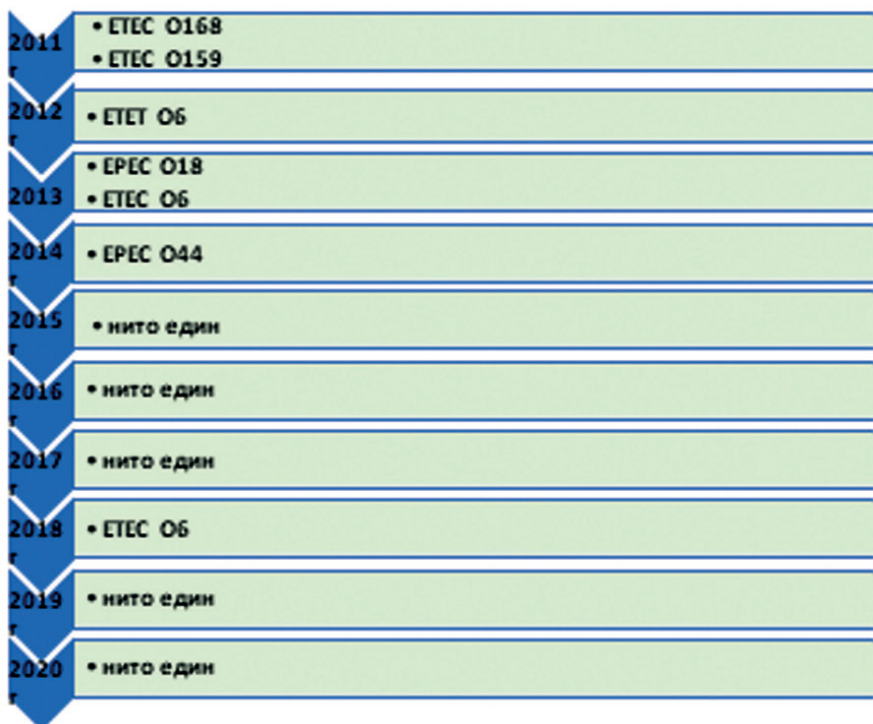
Фигура 2: Разпределение на ДЕС инфекциите по възрастова структура 0–18 години за периода 2011–2020 г. в България



Фигура 3: Разпределение на ДЕС инфекциите според възрастовата структура 15–60+ години за периода 2011–2020 г. в България



Фигура 4: Докладвани случаи на DEC (3 633) разпределени от пол, 1 805 (49,68%) случая при жени и 1 828 (50,32%) случая при мъже за на период 2011–2020 г България



Фигура 5: Годишно разпределение на докладваните огнища на DEC за на период 2011–2020 г в България

През това десетилетие са регистрирани 2 смъртни случая (0,26% от всички лица с остри инфекциозни заболявания), което определя

YEAR	NUMBER of death cases of acute infectious diseases without Influenza and Acute Respiratory Diseases, Tuberculosis, AIDS and Sexually Transmitted Infections, and COVID-19	AID mortality (per 100,000)	AID total lethality (%)	NUMBER of death cases of DEC	DEC mortality (per 100,00)	DEC total lethality (%)
2011	64	0,87% 000	0,11	1	0,01	0,19
2012	84	1,15% 000	0,14	0	0,00	0,00
2013	79	1,08% 000	0,12	0	0,00	0,00
2014	77	1,06% 000	0,15	1	0,01	0,27
2015	71	0,99% 000	0,13	0	0,00	0,00
2016	82	1,15% 000	0,13	0	0,00	0,00
2017	93	1,31% 000	0,18	0	0,00	0,00
2018	90	1,28% 000	0,19	0	0,00	0,00
2019	87	1,24% 000	0,16	0	0,00	0,00
2020	52	0,75% 000	0,23	0	0,00	0,00
SUM	779	1,19%000	1,54	2	0,002	0,46

Таблица 2. Смъртност при DEC инфекции и докладваните случаи на остри инфекциозни заболявания и за 10 годишен период 2011–2020 г в България

общата смъртност за DEC чревна инфекция от **0,46%**, Таблица 2. През 2011 г. има смъртен случай – мъж на 66 години с диагноза хеморагичен *E. coli* ентерит, причинен от серотипове O27 и O139. А през 2014 г. има смъртен случай от *E. coli* ентерит – дете на 1 г. от област Пловдив, хоспитализирано в инфекциозно отделение. Детето е било с хидроцефалия и спина бифида. Смята се, че инфекцията с *E. coli* е довела до изход „letalis“, поради преморбидно увреден терен. До момента в България няма регистриран смъртен случай от HUS, причинен от диарогенна *E. coli*.

Дискусия

Escherichia coli са бактерии, открити в околната среда, храните и червата на хора и животни. Диарейните *E. coli* са най-честата причина за броя на хранителните епидемии, пътници диария, хронична диария при HIV-инфектирани пациенти и основната причина, неонатални менинги и не на последно място педиатрична диария. Ентеротоксигенната *E. coli* допринася значително за общата заболяемост и може да е свързана със забавен растеж при заразени деца, освен това тези диарийни заболявания са причина за стотици хиляди смъртни случаи при деца всяка година. ЕТЕС е преобладаващият патоген, представляващ повече от половината от случаите,

при които диарогенната *E. coli* е идентифицирана като етиологичен агент. Тъй като много пътници пристигат от региони с лоши санитарни условия са били изложени на висок риск от заразяване с повсеместно разпространена ЕТЕС инфекция (12-15). Тенденцията за разпространение на ЕТЕС в България не се различава от други проучвания в Европа, Азия или Америка. ЕТЕС са водещите патогени (*E. coli* O6 , последван от O78), причиняващ педиатрична диария и етиологични агенти при огнища на ДЕС от 2011-2020 г. На второ място след ЕТЕС по честота на изолиране са ЕРЕС (*E. coli* O126, O127, O128), които са характерни за диария при възрастни (25-45 години) и асимптоматични носители. Докато ЕНЕС и ЕПЕС инфекциите са с нисък дял сред българското население. Лабораторно доказани случаи на O157 са Н:–. За щастие клиничните прояви не са свързани с характерните усложнения на ХУС. Изключение прави случай на 55-годишна жена с ентерохеморагична инфекция, но без епидемиологични данни за произхода на инфекцията. В същото време в Германия са регистрирани десетки случаи на O157 Н:7, епидемия, отнела човешки животи, но нямаме данни, които да свържат българския случай с германската епидемия.

Новородени са високо рискови за менингит, който би могъл да доведе до неврологични усложнения. Ешерихия коли е на второ място като причина за неонатален менингит който се свързва, като причина за неонатална смъртност (процентите варират между 10% и 15%). Определени серотипове на *E. coli* преобладават между доказаните щамове, причинили извънчревни инфекции при възрастни и деца – O1, O2, O4, O6, O7, O8, O16, O18. Световните данните за смъртност от серотипове – O6 и O18, причиняващи неонатологични менингит през последните години, съвпадат с тези в България. През 2020 г. четири случаи на менингит от *E. coli* O25 са регистриран от едно неонатално отделение за период от месец. Екипът на проекта извърши молекулярни проучвания използвайки ВОХ и ERIC1/2 PCR за доказване на свързаност между щамовете и евентуално нозокомиална инфекция. Но настъпилата епидемична ситуация от Covid-19 на държавата, попречи на осъществяването на епидемиологични проучвания на терен .

Сезонното разпределение на ДЕС инфекциите (май-септември), както и най-засегнатите възрастови групи, не се открояват от общите данни за Европа и света. Най-засегнатите възрастови групи са бебетата, следвани от малките деца. Все още недоразвитата имунна система при децата и недобре усвоените хигиенни навици са основен

фактор за епидемии в детските колективи – детски градини, учебни центрове и др. Друг важен фактор е асимптоматичното носителство при много възрастни, участващи в приготвянето на храна, както у дома, така и детски и обществени кухни. Избухванията, докладвани от DEC, са 90% сред детски групи и само 10% в семейства. Относно половото разпространение на инфекциите, не се наблюдават значителни разлики. И двата пола са почти по равно засегнати при всяка възраст.

Като цяло случаите на DEC инфекции 7,26% от общия брой на остриите инфекциозни заболявания (без грип и остри респираторни заболявания, туберкулоза, СПИН и полово предавани инфекции и COVID-19) в страната са малко в сравнение с отчетените случаи от други европейски страни. Най-вероятно това се дължи на намалената диагностика в микробиологичните лаборатории в България. Пълната диагностика на диарии, причинени от диарогенни *E. coli* до идентифициране на серотип трябва да се извършва от болнични микробиологични лаборатории и лабораториите на РЗИ. Педиатрични и имунокомпрометирани пациенти са приоритет. Тази практика на пренебрегване на други групи пациенти води до неточни данни за диарийните инфекции в страната, както и увеличава риска от разпространение на патогени, особено сред безсимптомните носители, които са резервоар за бъдещи инфекциозни диарии и/или епидемични взривове.

Заклучение

Диарията продължава да бъде здравен проблем в световен мащаб, тъй като включва широк спектър от етиологични агенти. Сред бактериалните патогени *E. coli* играе важна роля. Но в България през периода 2011-2020 г. се наблюдава намаление на регистрираните случаи на ентерити от *E. coli*, което се обуславя от тенденцията към увеличаване на случаите на етиологично недешифриран ентероколит. Освен това през 2020 г. се наблюдава значително намаление на броя на случаите в сравнение с предходни години (2019 г. – 54 397 случаи, заболеваемост 777,10% 000; 2018 г. – 48 092 случаи, заболеваемост 682,15% 000; 2017 г. – 52 393 случаи, заболеваемост 737,74 % 000), което е резултат от комплексното въздействие на фактори, възникнали и действали в развитието на епидемията от COVID-19 до края на същата година.

**ПРОУЧВАНИЯ ВЪРХУ АНТИМИКРОБНАТА
РЕЗИСТЕНТНОСТ НА *E. COLI*, ПРИЧИНИТЕЛИ
НА ДИАРИИ ПРИ МАЛКИТЕ ДЕЦА ЗА
ПОСЛЕДНИТЕ ДЕСЕТ ГОДИНИ 2011–2020**

***Резултати по проект към ФНИ № КП-06-М43/2 от
30.11.2020, „Проучване върху динамиката на безсимп-
томно заразносителство на патогенни *Escherichia
coli* в България чрез комплексна диагностика на ко-
лиентерити в съвременни условия“***

*Мария Павлова
Екатерина Александрова*

През последните години редица изследователи съобщават за увеличаваща се резистентност към антибактериални лекарствени средства на *E. coli*, изолирани при спорадични и особено епидемично свързани инфекциозни диарии. Патогенните *E. coli* продължават да са една от основните причини на диарии в детска възраст, като най-често засегнатата възрастова група са под 5 години. В тази възрастова група диариите бързо могат да се комплицират, особено ако етиологичният причинител проявява устойчивост към често прилаганите в терапията антимикуробни препарати. През последните години в България е не добре описвано състоянието на резистентните инфекции от интестинално патогенни *Escherichia coli* при деца. Основен фокус на българските изследователи са вътреболнични инфекции, постхирургични, уринарни, бактериемии, причинени от *E. coli* сред възрастните пациенти. С оглед на състоянието и данните за страната ние си поставихме за **цел да се проследи фенотипната резистентност на диарогенните *E. coli*, като причинители на диарии в детска възраст през последните десет години 2021–2020.**

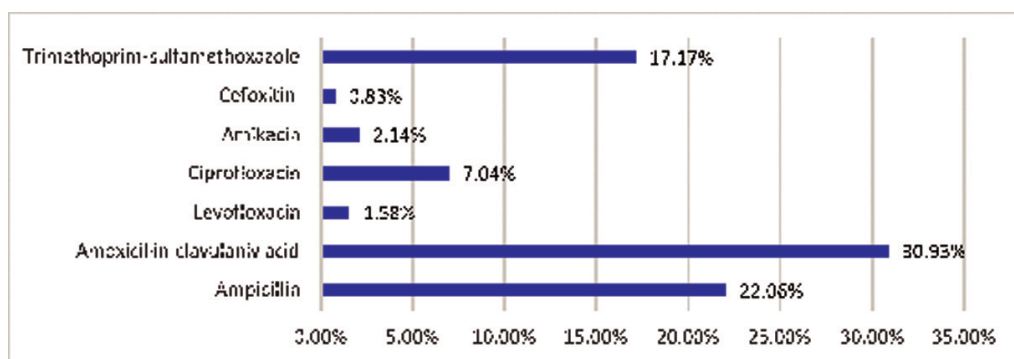
Ние проучихме чувствителността към антибактериални лекарствени средства на 250 клинични изолати диарогенни *E. coli* от деца (0-5 годишни) от различни градове на страната за периода 2011–2020 г. По двадесет и пет щамове от всяка година на изследвания период, като са включени, както спорадични, така и щамове от епидемии. Всички изолати *E. coli* са изпратени за бактериална

идентификация и потвърждаване от различни микробиологични лаборатории в страната през 2011-2020г. в НРЛ по Чревни инфекции, НЦЗПБ, София, където са фенотипно и серологично идентифицирани и съхранявани при -80°C в бактериална колекция на НРЛ. Резистентността към антибактериалните средства определихме чрез дисково-дифузионен метод според EUCAST на Amikacin- 30 μg (AK); Ampicillin- 10 μg (AMP); Levofloxacin- 5 μg (LEV); Ciprofloxacin- 5 μg (CIP); Cefoxitin- 30 μg (FOX); Amoxicillin-clavulaniv acid- 20-10 μg (AMC) и Trimethoprim-sulfamethoxazole- 1.25 - 23.75 μg (SXT), (Oxoid™) на Мюлер–Хинтон агар, при 37°C за 18-24 часа. За контрола използвахме *Escherichia coli* ATCC 25922.

Резултати

От изследваните изолати диарогенни *E. coli* 46,2% (115/250) са ЕТЕС, с лидер *E. coli* O6 70,4% (81/115), ЕРЕС са 40,4% (101/250) с най-голям дял от тях е *E. coli* O111 45,5% (46/101) и останалите 13,4% (34/250) принадлежат на ЕІЕС с най-често изолиран представител за патогрупата е *E. coli* O124 32,4% (11/34). Прави впечатление изразената честота на изолати ЕТЕС O6 и ЕРЕС O111.

ДЕС изолатите проявиха най-висока фенотипна резистентност към AMC – 30,93%; следвана от AMP – 22,06% и SXT – 17,17%. Резистентностите към тези антибактериални лекарствени средства плавно се повишават при щамове изолирани след 2014г. На второ място е изразена резистентността към CIP- 7,04%, AK- 2,14% и FOX- 0,83% запазват сравнително постоянни стойности през годините



Фигура 1. Антимикробна резистентност към Ampicillin, Amoxicillin-clavulaniv acid, Amikacin, Levofloxacin, Ciprofloxacin, Cefoxitin и Trimethoprim-sulfamethoxazole на изолати диарогенни *E. Coli*, изолирани от деца (0-5 годишна възраст) за периода 2011-2020 в Република България

2011-2020. Особено трябва да подчертаем изразената резистентност към LEV – 1,58% се наблюдава едва през последните четири години 2018–2020 от периода на проучването. Едновременна устойчивост на повече от три антибактериални лекарствени средства не се наблюдаваше. Впечатление прави, че изолатите *E. coli*- 64,3% (9/14) от различни епидемични взривове през 2011–2020 са чувствителни на всички тествани антибиотици. Изключение правят 35,7% епидемични *E. coli* (5/14), които проявяват резистентност, както следва: AMC и АК (*E. coli* O6); AMC и SXT (*E. coli* O6); SXT и CIP (*E. coli* O111); АК и SXT (*E. coli* O44), АК и CIP (*E. coli* O18).

Обсъждане

Ентеротоксигенните *E.coli* е най-разпространеният ентеропатоген в развиващите се страни, който представлява приблизително 210 милиона епизода на диария и приблизително 380 000 смъртни случая [1]. В България данните за разпространението на ЕТЕС, като най-чест причинител на инфекциозни диарии, и по-специално при педиатричните пациенти, не се различават. ЕТЕС са най-чести етиологични причинители на спорадични и епидемични случаи на ентероколит сред деца на възраст 0-5 години за периода 2011–2020 г. През последните десетилетия антимикробната резистентност се превърна в глобална заплаха за общественото здравеопазване в световен мащаб. Сред онези бактерии, които представляват най-голяма заплаха за човешкото здраве поради нарастващата си резистентност към антибиотици, са членовете на семейството *Enterobacteriaceae*, особено *Escherichia coli*. Един от факторите за този проблем е завишената консумация и безотговорното предписване на антибиотици. Също така, употребата на антибиотици в животновъдството благоприятства разпространението и персистирането на резистентни бактерии при хората посредством два различни механизма: чрез консумация на замърсено с антибиотици месо, които антибиотици предизвикват селективен натиск върху микробиота на гостоприемника и/или чрез консумация на месо, контаминирано с резистентни на антибиотици бактерии. Различни проучвания по света показват, че готовите за консумация животински продукти са замърсени с щамове на *E. coli*, устойчиви на различни видове антибиотици, главно към β -лактами чрез бактериална продукция на β -лактамази с разширен спектър (ESBL) [2, 3]. Това се потвърждава и от изпитваните български изолати ДЕС. Получените резултати от фенотипното изпитване на изолати диарогенни *E. coli* от 0-5 годишни деца от различни области

на страната сочат плавно повишаваща се резистентност през последните 6 години (2015–2020) към АМС – 30,93%; АМ – 22,06% и SXT – 17,17%. Това би могло да се обясни с широкото приложение на тези антибактериални препарати през последните години и във връзка с това бързо развитие и разпространение на резистентност към тях. Устойчивостта към останалите включени в проучването антибиотици CIP – 7,04%, AK- 2,14% и FOX- 0,83% запазват сравнително постоянни стойности през годините 2011-2020. Анализирайки получените резултати, ние предполагахме, че повишаващите се стойности на резистентни *E.coli* изолати сред малките деца, най-вероятно са с произход на инфекциите заболели възрастни лица и/или безсимптомни носите, които често са доказвани в годините, като източник на епидемии предавани с храни.

Трябва да се отбележи изразената резистентност към LEV- 1,58% за последните години – 2018, 2019 и 2020. Очакваме тази устойчивост сравнително да нарастне в близко бъдеще, поради масовата употреба на Levofloxacin при възрастните лица, особено сред лекуваните от Covid-19, вследствие това да се отрази и на педиатричните пациенти. Коеето се потвърждава и от други автори [4, 6].

Поради непрекъснато нарастващия брой инфекции, причинени от резистентни *E. coli* поради лекотата му на предаване по фекално-орален път сред хората и от източници на околната среда, разбирането на епидемиологията на тези щамове и техните механизми на резистентност са от ключово значение в борбата с тези инфекции. Получените резултати показват необходимост от определяне на резистотипа на българските изолатите диарогенни *E. coli* с оглед изготвяне на рационални схеми на лечение – един от съществените въпроси от борбата с ДЕК инфекции и по-специално на борбата със заболяемостта при малките деца.

Източници:

1. Pediatrics: General Medicine Archana Chatterjee. 2019. Pediatric Escherichia Coli Infections Clinical Presentation. Medscape. <https://emedicine.medscape.com/article/970451-overview>
2. Kaesbohrer A, Bakran-Lebl K, Irrgang A, Fischer J, Kämpf P, Schiffmann A. Diversity in prevalence and characteristics of ESBL/pAmpC producing *E. coli* in food in Germany. *Veterinary Microbiology*. 2019;233:52-60. DOI: 10.1016/j.vetmic.2019.03.025
3. Galindo-Múndez M. Reservoirs of CTX-M extended spectrum

-
- β -lactamase-producing Enterobacteriaceae in Oaxaca, Mexico. *Journal of Microbiology & Experimentation*. 2019;7(1):43-47. DOI: 10.15406/jmen.2019.07.00239.
4. Michalis Polemis et.al. COVID-19 and Antimicrobial Resistance: Data from the Greek Electronic System for the Surveillance of Antimicrobial Resistance—WHONET-Greece (January 2018–March 2021). *Life* 2021, 11(10), 996; <https://doi.org/10.3390/life11100996>.
 5. Chih-Cheng Lai, Shey-Ying Chen, Wen-Chien Ko, Po-Ren Hsueh. Increased antimicrobial resistance during the COVID-19 pandemic *Int J Antimicrob Agents*. 2021 Apr; 57(4): 106324. Published online 2021 Mar 19. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2021.106324.
 6. David M Livermore, Antibiotic resistance during and beyond COVID-19, *JAC-Antimicrobial Resistance*, Volume 3, Issue Supplement_1, June 2021, Pages i5–i16, <https://doi.org/10.1093/jacamr/dlab052>

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разнообразието от щамове *E. coli* е забележително, вариращо от полезни обитатели на стомашно-чревния тракт до различни патогени, способни да причинят чревни или извънчревни заболявания. Докато някои клинични прояви на патогенните *E. coli* са по-тежки от други, все още остава основен проблем за общественото здраве. Ясно е, че патогенните *E. coli* продължават да се развиват, както е илюстрирано от хибридният щам EAEC и STEC, които предизвикаха голямо огнище в цяла Европа през 2011 г. Това също сочи към лесното предаване на патогенните *E. coli*, ниските инфекциозни дози на много от патотипите и потенциалът за разпространение сред различни източници са изключителни. Храна, вода, домашни любимци, животни и човекът са потенциални източници и таргети на заразяване и предаване. Необходими са нови технологии за бързо идентифициране, характеризиране и наблюдение на патогенната *E. coli*. Надяваме се, че разработването на стратегии за бърза идентификация на патогени ще осигури на клиницистите по-бърза диагноза за бързо и подходящо лечение на пациентите. Дълбочината и изобилието от информация, която може да бъде получена чрез високопроизводително секвениране, ще помогне за информиране на клиничните нужди, като напр. потенциална антибиотична резистентност и идентифициране на патогенно-специфични вирулентни фактори и нуждите на епидемиологията за наблюдение на разпространението на патогени. Последователностите на целия геном могат също да осигурят детайли с висока разделителна способност за типизиране и обследване на епидемии, тъй като е доказано, че анализът на геномни последователности може да осигури типизиране с висока разделителна способност на щамове от епидемични огнища. Ограничаващият фактор за цялата тази информация обаче все още е значимата и надеждна биоинформатика. Освен това все още има твърде много хипотетични гени и гени с неизвестна функция, което възпрепятства способността ни да разберем напълно тези патогени. Чрез генериране на повече набори от геномни данни, ние несъмнено ще разкрием повече гени (т.е. допринасящи за пангенома). Количеството информация, получена от последователностите на целия геном, ще осигури

по-задълбочено разбиране на връзките между патогените и техните гостоприемници, как се развиват и как това в крайна сметка се отразява на човешкото здраве.

Гл. ас. Мария Павлова, дм



Гл. ас. Мария Павлова, дм има научна степен Доктор по микробиология от 2017 г. с дисертация на тема „Молекулярни методи за идентификация и типирание на *Campylobacter jejuni/coli*“. Ръководител е на два успешно завършили научни проекти и участник в още няколко, включително и международни към ECDC и University of Oxford. Автор е на редица научни публикации в страната и чужбина, както и автор и редактор на две монографии: „*Salmonella Typhi* – класика или предизвикателство“, 2019 г. и „Кампилобактериози. Клинични и лабораторни особености“, 2019 г. Хоноруван преподавал е на студенти по медицина и организатор и водещ лектор на СДО курсове към НЦЗПБ. Национално координационно лице е към ECDC за салмонелозите и кампилобактериозите в България. Участник в изготвянето на инструктивни материали за диагностика и превенция на инфекции, предавани с храни и води. Има богат опит в диагностиката на бактериални чревни инфекции, както с класически, така и с молекулярно генетични методи.

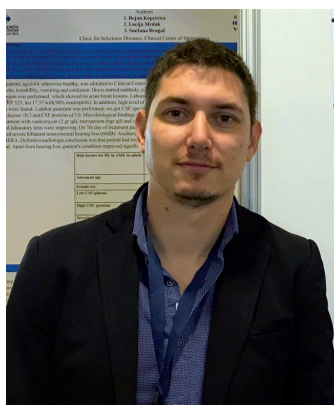


Доц. Валери Велев, дм е завършил медицина в МУ – София с три признати специалности: по медицинска биология, медицинска паразитология и инфекциозни болести. Има научна степен Доктор по инфекциозни болести от 2017 г., и научна степен Доцент от 2021 г. Първоначално работи клинична работа като лекар-асистент в Детска клиника на СБАЛИПБ „Проф. Ив. Киров“, а от 2021 г. е избран за началник на Диагностично-консултативния блок на болницата. Паралелно с това е и доцент към Катедрата по инфекциозни болести, паразитология и тропическа медицина на МУ – София. Притежава национален сертификат по Абдоминална ехография 1 ст. – ВСД. Защитил е дисертация на тема: „Кампилобактериоза в

детска възраст – клинично протичане, лабораторна диагностика и етиологично лечение“. Преподава лекционни курсове и практически модули на студенти на български и английски език по Медицинска паразитология, Тропическа медицина, Вектор-преносими инфекции и паразитози. Клинични интереси: детски инфекциозни и паразитни болести, зоонози, чревни инфекции.



Доц. Иван Н. Иванов има богат опит в областта на молекулярната биология, микробиологията и генетиката. Той е експерт в областта на молекулярната диагностика и типизирането на особено опасни и нововъзникващи патогени, с докторска дисертация на тази тема. Освен това, той има опит в изучаването на мутациите асоциирани с антимикробна резистентност и различни молекулярни механизми. Автор е на повече от 52 научни публикации, преминал е през редица обучения и специализации и е участвал в шест международни изследователски проекта, три от които са пряко свързани с нововъзникващи патогени.



Гл. ас. д-р Йордан Калчев, дм завършва медицина с отличие през 2014 г. в Медицински университет – Пловдив. Започва работа в отделение по анестезиология и интензивно лечение, а по-късно работи в университетската клиника по нервни болести на УМБАЛ „Св. Георги“ – Пловдив. През 2016 г. след спечелен конкурс е назначен като асистент към катедрата по медицинска микробиология и имунология „Проф. д-р Елисей Янев“ към Медицински университет – Пловдив. През 2021 г. защитава успешно дисертационен труд за придобиване на ОНС „Доктор“ по микробиология. Придобива специалност по клинична микробиология през 2021 г. и работи като лекар микробиолог

в лабораторията по микробиология на УМБАЛ „Св. Георги“ – Пловдив. През същата година е назначен за главен асистент по микробиология.



Екатерина Александрова е родена през 1986 г. в Пловдив. През 2011 г. придобива бакалавърска степен в Университета по хранителни технологии – Пловдив със специалност „Технологии за производството на зърнени, фуражни, хляб, хлебни и сладкарски изделия.“ През 2015 г. придобива магистърска степен в СУ „Св. Климент Охридски“ по специалност „Микробиология и микробиологичен контрол“. От 2014 до 2015 г. работи като асистент в Институт по криобиология и хранителни технологии. От 2015 г. до момента работи в Националния център по заразни и паразитни болести в НРЛ по чревни инфекции, патогенни коки и дифтерия. Има богат опит в диагностиката на бактериални чревни инфекции. Активно участва в научни проекти, публикации и научни форуми. От 2018 г. преподава на специализанти в СДО курсове към НЦЗПБ.



Д-р Петя Станкова е асистент към Катедра по „Медицинска микробиология“, МФ, МУ – София. Защищава ОНС „Доктор“ към МУ – София на тема: „Молекулярно-генетични, микробиологични и епидемиологични аспекти на чревното носителство на карбапенемаза и широкоспектърни бета-лактамаза продуценти“ през 2020г. През същата година придобива и специалност по „Микробиология“.

Съдържание

Рецензия от проф. д-р Грозданка Лазарова, дм.....	3
Въведение.....	5
Мария Павлова	
Кратка историческа справка.....	6
Мария Павлова	
Обща характеристика на бактериалния вид <i>Escherichia coli</i>	9
Мария Павлова	
Серологична класификация на патогенните щамове <i>Escherichia coli</i>	12
Мария Павлова	
Серология на групата Coli според Кауфман, 1947.....	17
Мария Павлова	
О- и Н- типизиране на <i>Escherichia coli</i>	19
Мария Павлова	
Изолране и идентифициране на диарогенни <i>E. coli</i>	26
Мария Павлова	
Медицинското значение на инфекции, причинени от шига токсин, продуциращи <i>Escherichia coli</i> и клинично-патологични характеристики на STEC инфекциите.....	28
Мария Павлова	
Методи за откриване на шига токсин продуциращи <i>E. coli</i> (STEC) и техните токсини.....	37
Мария Павлова	
Изолране на STEC.....	47
Мария Павлова	
Серологична диагностика на STEC инфекция.....	53
Мария Павлова	
Ентероинвазивни <i>E. coli</i> / <i>Shigella</i>	58
Мария Павлова	

Диагностика, терапия и превенция на инфекции от ЕИЕС.....	74
Мария Павлова	
Ентероитоксигенни <i>Escherichia coli</i>	79
Мария Павлова	
Ентероагрегативни <i>E. coli</i> (ЕАЕС).....	98
Мария Павлова	
Дифузно адхерентни <i>E. coli</i> (ДАЕС).....	109
Мария Павлова	
Адхерентно инвазивни <i>E. coli</i> (АИЕС).....	118
Мария Павлова	
Инфекции, причинени от некротоксични <i>Escherichia coli</i> като общ патоген при хора и домашни животни.....	127
Мария Павлова	
Значение на <i>Curli</i> амилоидни влакна в етапите на биофилм образуване при <i>Escherichia coli</i>	135
Екатерина Александрова	
Уропатогенни <i>E. coli</i> и уроинфекции.....	148
Йордан Калчев	
Механизми на резистентност към бета-лактамни антибиотици при <i>E. coli</i>	165
Петя Станкова	
Модифициран бърз CARBA NP тест (MCNPV3) за фенотипно откриване на карбапенемази при грам-негативни микро- организми.....	182
Иван Н. Иванов, Стефана Събчева, Красимира Иванова	
Клинична картина при чревни ешерихиози.....	187
Валери Велев	
Проучване върху разпространението на <i>E. coli</i> ентерити в България за период от десет години (2011–2020 г.).....	197
Мария Павлова, Екатерина Александрова	

Проучвания върху антимикробната резистентност на <i>E. coli</i> , причинители на диарии при малките деца за последните десет години 2011–2020	205
Мария Павлова, Екатерина Александрова	
Заключение.....	210
Мария Павлова	
Биографии на авторите.....	212

**Мария Павлова, Валери Велев
Екатерина Александрова, Йордан Калчев
Петя Станкова, Иван Н. Иванов**

**КЛИНИЧНО ЗНАЧИМИ *ESCHERICHIA*
COLI. ДИАГНОСТИКА И
РАЗПРОСТРАНЕНИЕ В БЪЛГАРИЯ**

Българска
Първо издание

Формат: 70/100/16

Печатни коли: 13,6

ИК „Българи“

София, 2022

ISBN 978-619-7656-25-1

