

Ветеринарная микробиология, патология, терапия

УДК 579.6:579.25

doi: 10.15389/agrobiology.2022.2.356rus

ВОЗБУДИТЕЛИ КОЛИБАКТЕРИОЗА СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННОЙ ПТИЦЫ — НОСИТЕЛИ ГЕНОВ, АССОЦИИРОВАННЫХ С ВИРУЛЕНТНОСТЬЮ ЭКСТРАИНТЕСТИНАЛЬНЫХ И КИШЕЧНЫХ *Escherichia coli**Ю.С. ПОСПЕЛОВА¹ ✉, М. STARČIČ ERJAVEC², М.В. КУЗНЕЦОВА¹

С расширением объемов производства в птицеводстве и интенсификацией отрасли возрастает угроза распространения колибактериоза среди сельскохозяйственной птицы, поэтому существует острая необходимость в мониторинге птичьих патогенных *Escherichia coli* (avian pathogenic *Escherichia coli*, АРЕС), изучении генетического разнообразия последних и выявлении штаммов, представляющих опасность для здоровья человека. Определение генов, ассоциированных с вирулентностью, и степени специфической адгезии может быть полезным в комплексной оценке эпидемической и эпизоотической значимости штаммов *E. coli*, выделенных от сельскохозяйственных животных. В настоящей работе по результатам комплексного молекулярного скрининга штаммов *E. coli*, выделенных от птиц во время вспышек колибактериоза, на наличие у них генов различных патотипов эшерихий впервые показано, что штаммы характеризовались высоким потенциалом патогенности и могли быть носителями генов сразу нескольких патотипов, при этом детерминанты кишечных патогенных *E. coli* (ИРЕС) встречались чаще других. Позитивный адгезивный профиль по ряду генов положительно коррелировал с уровнем адгезии штаммов к эритроцитам кур (*Gallus gallus* L.) и человека. Цель работы — дать генотипическую характеристику штаммов *E. coli*, выделенных от сельскохозяйственной птицы с колибактериозом, а также оценить взаимосвязь между адгезивным генотипом и специфической адгезией к эритроцитам. В работе использовали 28 штаммов *E. coli* с уникальным генотипом согласно ERIC-ПЦР, выделенных в 2016-2018 годах из разных органов (исключая кишечник) цыплят-бройлеров (*Gallus gallus* L.) кросса Ross 308 с генерализованным колибактериозом. С помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) по конечной точке детектировали гены вирулентности ($n = 28$), характерные для четырех условных групп: гены, обеспечивающие патогенность бактерий вида *E. coli*, встречающиеся у различных патотипов, гены патогенных для птиц *E. coli* (АРЕС), кишечных патогенных *E. coli* (ИРЕС: ЕРЕС/ЕТЕС/ЕНЕС/ЕaggЕС) и уропатогенных *E. coli* (УРЕС). Протоколы для всех типов ПЦР применяли в их авторских вариантах. Амплификацию проводили на термоциклере DNA Engine Dyad Thermal Cycler («Bio-Rad», США). Визуализацию полос и документирование данных осуществляли с использованием системы гель-документации Gel-Doc XR («Bio-Rad», США). При определении адгезии бактерий к эритроцитам клеточным субстратом служили формализированные эритроциты человека 0(I) группы Rh(+) и птичьи эритроциты. Адгезивные свойства клеток оценивали с помощью индекса адгезивности микроорганизма (среднее число бактерий, прикрепившихся к одному эритроциту, участвующему в адгезии). Показано, что культуры были носителями множественных генов вирулентности, характерных для различных патотипов *E. coli* (АРЕС, УРЕС, ИРЕС). По генетическому профилю изученные штаммы эшерихий имели большее сходство со штаммами, вызывающими острые кишечные инфекции у человека, чем с уропатогенными *E. coli*. Наличие специфических маркерных генов позволило идентифицировать большинство штаммов как АРЕС, которые могут содержать детерминанты патогенности, в частности токсины, характерные для патотипа ИРЕС (за исключением генов шигаподобных токсинов и энтерогемолизина). На основании кластерного анализа генетических профилей культуры были отнесены к трем условным группам: патогенные для птиц и человека (наличие одновременно 2-6 генов, связанных с АРЕС, и 2-6 генов, связанных с ExРЕС или ИРЕС; 24 штамма), патогенные для птиц и не патогенные для человека (наличие 2-6 генов, связанных с АРЕС, и 0-1 гена, связанного с ExРЕС или ИРЕС; 2 штамма) и непатогенные (0-1 ген из любой группы, АРЕС, ExРЕС, ИРЕС, 2 штамма). Выявлено, что 75 % штаммов, выделенных как патогенные для птиц и человека, характеризовались высокими частотами встречаемости генов вирулентности, острова патогенности SHI-2, а также генов бета-лактамаз расширенного спектра и участков интегронов 1-го класса. Специфическая адгезия штаммов *E. coli* была более выражена в отношении куриных эритроцитов, чем человеческих. При этом, независимо от типа эритроцитов, высокая адгезивная активность бактерий коррелировала с большей выживаемостью в сыворотке крови хозяина (*iss*⁺ генотип) и способностью лизировать эритроциты (*hlyF*⁺ генотип). Полученные данные о молекулярных и адгезивных свойствах возбудителей колибактериоза птиц позволяют оценить их зоонозный потенциал и эпизоотическую значимость, а

* Работа выполнена в рамках государственного задания НИОКТР АААА-А19-119112290009-1 и научного проекта С-26/792.

также могут служить основой для усовершенствования системы мониторинга колибактериоза в птицеводческих хозяйствах.

Ключевые слова: патогенные для птиц *Escherichia coli*, АРЕС, IPEC, гены вирулентности, специфическая адгезия, зоонозный потенциал.

Патогенные для птиц *Escherichia coli* (avian pathogenic *Escherichia coli*, АРЕС) — животный патотип эшерихий, обнаруженный в кишечной микрофлоре у некоторых видов птиц и вызывающий внекишечные инфекции у иммунокомпрометированных особей (1). Штаммы АРЕС становятся основной причиной колибактериоза — синдрома, связанного с аэросаккулитом, перикардитом, а часто и сепсисом у сельскохозяйственной птицы (2, 3). Вспышки заболевания на птицеводческих предприятиях приводят к сокращению производства яиц на 2-3 % и смертности поголовья до 30 %, что влечет за собой экономические потери (4). По экспертным оценкам, в любой момент времени колибактериоз имеют не менее 30 % особей всех коммерческих стад в США (5). В России колибактериоз составляет от 60 до 88 % всех инфекций сельскохозяйственной птицы (6).

Согласно современной классификации, популяция АРЕС входит в группу внекишечных патогенных *E. coli* (extraintestinal pathogenic *E. coli*, ExPEC), к которой относят также уропатогенные *E. coli* (uropathogenic *E. coli*, UPEC), ассоциированные с неонатальным менингитом *E. coli* (neonatal meningitis-causing *E. coli*, NMEC), сепсис-ассоциированные *E. coli* (sepsis-associated *E. coli*, SEPEC) и другие патотипы (2, 5). Использование молекулярных подходов для идентификации факторов вирулентности эшерихий значительно расширило знания о патогенетических механизмах АРЕС-инфекции (7). Согласно гипотезе, предложенной L.K. Nolan с соавт. (3), патотип АРЕС обусловлен наличием специфических маркерных генов. Определить штамм в эту группу позволяет присутствие минимального набора генетических детерминант: *ompT* (протеаза наружной мембраны), *iutA* (рецептор аэробактина), *iss* (фактор выживаемости в сыворотке), *iroN* (рецептор энтерохелина) (3, 5). Кроме того, в развитие колибактериоза вовлечены разнообразные гены вирулентности, кодирующие адгезины, токсины, факторы защиты, системы получения железа, а также аутопереносчики и белок IbeA, что и определяет множество проявлений (форм) инфекций птиц, возникающих в результате экспрессии различных комбинаций детерминант вирулентности (6).

V.G. Maturana с соавт. (8) пришли к выводу, что штаммы АРЕС представляют не однородную группу, а в зависимости от комбинации детерминант патогенности подразделяются на подгруппы-субпатотипы, каждый из которых связан с определенным инфекционным синдромом. Исследования L. Mageiros с соавт. (9) показали, что штаммы патотипа АРЕС возникают из повсеместно распространенных комменсальных кишечных бактерий, в том числе за счет горизонтального переноса генов, экспрессирующих факторы патогенности, позволяя дивергентным клонам вызывать инфекцию птицы. Установлено, что большинство АРЕС содержат высококонсервативный кластер сцепленных с плазмидами генов вирулентности, встречающийся у относительно небольшого количества фекальных изолятов *E. coli* от здоровых птиц (AFEC) (10).

Исследования последних лет позволили предположить, что штаммы АРЕС могут представлять опасность для здоровья людей (11, 12). С одной стороны, описана возможность трансмиссии АРЕС через продукты питания, в том числе мясо птицы (13), с другой — выявленная гомология последовательностей ДНК между АРЕС и другими патотипами ExPEC показывает, что они тесно связаны филогенетически (10). Так, у внекишечных

штаммов *E. coli*, патогенных для человека, в геноме детектирован ген *iss*, который экспрессирует фактор, отвечающий за выживаемость бактерий в сыворотке крови. Ген локализован на большой плазмиде вирулентности ColV, типичной для штаммов *E. coli*, патогенных для птиц, что указывает на возможную передачу плазмиды и, следовательно, обмен генами вирулентности между штаммами *E. coli* человека и птиц (10, 14). Результаты, полученные К.Е. Rodríguez-Siek с соавт. (15) и Т.Т. Johnson с соавт. (16, 17), подтверждают тесную связь между культурами АРЕС и UPEC/MNEC. Отмечено появление и распространение гибридных и гетеропатогенных штаммов *E. coli*, несущих соответственно паттерны генов ExPEC и представителей кишечных патогенных *E. coli* (intestinal pathogenic *E. coli*, IPEC) или двух и более патотипов IPEC (18, 19). Наличие сходных ассоциированных с вирулентностью генов, обнаруженных в штаммах IPEC/ExPEC и АРЕС, подтверждает, что последние могут либо сами выступать в качестве зооантропонозных патогенов, либо служить резервуаром детерминант вирулентности для *E. coli*, обуславливающих инфекции у человека (12, 20).

Для установления связи между присутствием определенных факторов патогенности АРЕС и их проявлением в биотопах хозяина используют различные биологические системы, в том числе экспериментальную инфекцию (21, 22). Подтверждена роль плазмиды rColV в вирулентности для птиц и, возможно, человека: трансконъюганты (комменсальный штамм с rАРЕС-02-ColV) вызывали гибель куриных эмбрионов и инфекцию мочевыводящих путей у мышей, а также хорошо росли в человеческой моче (23), тем не менее способность АРЕС вызывать болезни у людей окончательно не доказана.

В настоящей работе по результатам комплексного молекулярного скрининга штаммов *E. coli*, выделенных от птиц во время вспышек колибактериоза, на наличие у них генов трех патотипов эшерихий (АРЕС, UPEC, IPEC) впервые показано, что штаммы характеризовались высоким патогенным потенциалом и могли быть носителями генов сразу всех патотипов, при этом детерминанты IPEC встречались чаще других. Впервые установлено, что позитивный адгезивный профиль по ряду генов положительно коррелирует с уровнем адгезии штаммов к эритроцитам кур и человека.

Цель работы — дать генотипическую характеристику штаммов *Escherichia coli*, изолированных от сельскохозяйственной птицы с колибактериозом, а также оценить взаимосвязь между адгезивным генотипом и специфической адгезией к эритроцитам.

Методика. В работе использовали 28 штаммов *E. coli* с уникальным генотипом согласно ERIC-ПЦР, выделенных в 2016-2018 годах из разных органов (исключая кишечник) цыплят-бройлеров (*Gallus gallus* L.) кросса Ross 308 с генерализованным колибактериозом (24). Штаммы депонированы в Ex коллекции культур (the Ex culture collection) кафедры биологии биотехнологического факультета Университета Любляны (Univerza v Ljubljani, Словения).

Определение принадлежности штамма к филогенетической группе, чувствительности к антибиотикам и наличия генов, кодирующих наиболее распространенные бета-лактамазы расширенного спектра (БЛРС), описано нами ранее (24). В выборке ($n = 28$) с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) по конечной точке детектировали гены вирулентности, характерные для четырех условных групп: гены, обеспечивающие патогенность бактерий вида *E. coli*, встречающиеся в различных патотипах, гены патогенных для птиц *E. coli* (АРЕС), кишечных патогенных *E. coli* (IPEC: EPEC/ETEC/ENEK/EaggEC) и уропатогенных *E. coli* (UPEC).

Для всех типов ПЦР использовали праймеры и протоколы предложивших их авторов. Амплификацию проводили на термоциклере DNA Engine Dyad Thermal Cycler («Bio-Rad», США). Визуализацию полос и документирование данных осуществляли с использованием системы гель-документации Gel-Doc XR («Bio-Rad», США).

Адгезию бактерий к эритроцитам (специфическая адгезия) определяли по методу В.И. Брилис и соавт. (38). Клеточным субстратом служили формализированные эритроциты человека 0(I) группы Rh(+) и птичьих эритроциты. Клетки предварительно дважды отмывали в 0,01 М фосфатно-буферной среде (ФБС) и стандартизовали до плотности 100 млн/мл. Взвесь микробных клеток, стандартизованную в ФБС до 2,0 по McFarland, и эритроцитов смешивали в равных количествах (0,1 мл) в пробирках типа Эппендорф, встряхивали в течение 20 мин при 37 °С, после чего готовили мазки на предметном стекле. Мазки высушивали при комнатной температуре, фиксировали метанолом в течение 10 мин и окрашивали 2 % метиленовым синим.

Подсчитывали число микробных клеток, прикрепившихся к одному эритроциту, для не менее чем 25 эритроцитов. Адгезивные свойства клеток оценивали с помощью индекса адгезивности микроорганизма (ИАМ): среднее число бактерий, прикрепившихся к одному эритроциту, участвующему в процессе адгезии. Микроорганизмы считали неадгезивными при $ИАМ \leq 1,75$, низкоадгезивными — при 1,76-2,5, среднеадгезивными — при 2,51-4,0, высокоадгезивными — при $ИАМ \geq 4,0$.

Статистическую обработку данных проводили в программах Microsoft Excel 2013 и Statistica v. 6.0 («StatSoft, Inc.», США). Для оценки количественных показателей рассчитывали медиану и квартили — $Me (Q1-Q3)$. Связь между признаками выявляли при помощи непараметрического коэффициента ранговой корреляции Спирмена (R_s). Достоверность различий двух зависимых выборок оценивали с помощью W -критерия Уилкоксона (Wilcoxon signed-rank test), независимые выборки сравнивали с использованием U -критерия Манна-Уитни (Mann-Whitney U -test). Классификацию штаммов проводили методом иерархической кластеризацией (tree cluster analyses; мера расстояния — евклидово расстояние). Для сравнения качественных признаков применяли χ^2 (с поправкой Йейтса) или точный F -критерий Фишера (F -test). При $p < 0,05$ делали вывод о наличии статистически значимой разницы между сравниваемыми выборками.

Результаты. Среди 28 индивидуальных штаммов *E. coli* были обнаружены носители как общих для всех патотипов генов вирулентности, так и генов, характерных для представителей групп АРЕС, UРЕС и IРЕС (табл. 1).

Исследованные штаммы эшерихий имели высокий общий вирулентный потенциал. Ген *fimH*, кодирующий фимбриальный адгезин, несли 92,8 % штаммов, ген капсулообразования *kpmsT* — 82,1 %, ген белка наружной мембраны с протеазной активностью *ompT* — 71,4 %, ген системы захвата и транспорта железа *iroN* — 67,8 %. Почти у половины штаммов (46,4 %) мы выявили все перечисленные гены, у 32,1 % — три гена, у 14,3 % — два гена, по одному штамму несли один ген и ни одного из перечисленных генов. Отдельно стоит отметить, что 53,6 % штаммов имели ген позитивного регулятора конъюгации *traJ*.

Среди генов, наиболее часто характеризующих патотип АРЕС, самым распространенным оказался ген специфического птичьего гемолизина *hlyF* (82,1 %), следующим был птичий адгезин Yqj (*yqi*) — 60,7%, *iss* несли 57,1 % штаммов, *iutA* — 42,8 %. Четверть штаммов имели все четыре гена, 21,4 % — три гена, 25,0 % — два гена, 21,4 % — один ген и только два

штамма не имели ни одного гена из указанной группы. Наличие специфических маркерных генов позволило идентифицировать большинство штаммов эшерихий как АРЕС.

1. Детектированные гены вирулентности у штаммов АРЕС (*avian pathogenic Escherichia coli*), выделенных от цыплят-бройлеров (*Gallus gallus* L.) кросса Ross 308 с генерализованным колибактериозом ($n = 28$, 2016-2018 годы)

Ген	Патотип	Фактор вирулентности и его функция	Ссылка
<i>fimH</i>	УРЕС, NMEC,	Универсальный фимбриальный адгезин	(25)
<i>ompT</i>	SEPEC, АРЕС	Поверхностный белок с протеазной активностью	(26)
<i>kpsMTII</i>		Ген формирования капсулы 2 типа	(27)
<i>iroN</i>		Рецепторный белок системы захвата и транспорта железа	
<i>traI</i>		Позитивный регулятор конъюгативного переноса плазмиды	(28)
<i>hlyF</i>	АРЕС	Специфический птичий гемолизин F	(29)
<i>Iss</i>		Фактор, повышающий выживаемость клетки в сыворотке крови	(10)
<i>iutA</i>		Гомолог адгезина	(30)
<i>yqi</i>		Специфический птичий адгезин	(21)
<i>beA</i>	ЕРЕС, ЕТЕС,	Инвазивный протеин	(27)
<i>Iha</i>	ЕНЕС, EaggEC	Адгезин	(31)
<i>eaeA</i>		Интимин	
<i>stx1</i>		Шигатоксин	
<i>stx2</i>			
<i>estI</i>		Термостабильный энтеротоксин	
<i>estII</i>			
<i>ehxA</i>		Энтерогемолизин	
<i>eltA</i>		Термостабильный энтеротоксин	
<i>eastI</i>		Энтероагрегативный термостабильный энтеротоксин	
<i>subAB</i>		Цитотоксин субтилаза	(32)
<i>hlyA</i>		Альфа-гемолизин	(33)
<i>papGII</i>	УРЕС	Фимбриальный адгезин, связывает рецептор Gal-alpha1-4Gal, обнаруженный на эпителиальных клетках, выстилающих верхние мочевыводящие пути	(30)
<i>papGIII</i>			
<i>papC</i>		Белок-носитель наружной мембраны, участвует в экспорте и сборке субъединиц пилей через внешнюю мембрану	
<i>sfaDE</i>		Нефимбриальный адгезин	
<i>afa/</i>		Гемагглютинины уропатогенной кишечной палочки, опосредуют прилипание к верхним мочевыводящим путям	(27)
<i>draBC</i>		Опосредует агрегацию, образование биопленок и адгезию для ряда белков внеклеточного матрикса; опосредует адгезию к эпителиальным клеткам мочевого пузыря T24 человека	(34)
<i>upaG</i>			
<i>usp</i>		Уропатогенный специфический протеин, колицин	(35)

Примечание. УРЕС — uropathogenic *E. coli*, NMEC — neonatal meningitis-causing *E. coli*, SEPEC — sepsis-associated *E. coli*, АРЕС — avian pathogenic *E. coli*, ЕРЕС — enteropathogenic *E. coli*, ЕТЕС — enterotoxigenic *E. coli*, ЕНЕС — enterohemorrhagic *E. coli*, EaggEC — enteroaggregative *E. coli*, ExPEC — extraintestinal pathogenic *E. coli*.

В представленной выборке штаммов отсутствовали гены шигаподобного токсина (*stx1/2*), гены основного фактора адгезии ЕНЕС интимина (*eaeA*) и энтерогемолизина (*ehxA*). При этом 75 % культур были носителями гена *subAB*, кодирующего цитотоксин субтилазу, характерный для шигатоксин-продуцирующих штаммов *E. coli*. Широко представлены были носители генов других энтеротоксинов из группы ЕТЕС. Гены термостабильных энтеротоксинов *estI/II* были детектированы соответственно у 42,8 и 82,1 % штаммов, больше половины штаммов (60,7 %) несли ген энтероагрегативного термостабильного энтеротоксина (*eastI*), термостабильный энтеротоксин (*eltI*) был найден у 14,3 % культур. Кроме того, 75 % АРЕС имели ген адгезина *iha*, относящийся к факторам патогенности диареогенных *E. coli*. Девятнадцать штаммов (67,8 %) несли четыре и более из перечисленных генов, шесть (24,1 %) — от одного до трех генов, три штамма не имели генов этой группы.

Из группы генов, наиболее характерных для уропатогенных штаммов *E. coli*, были обнаружены только *upaG* (67,8 %) и *usp* (7,1 %).

При сравнении распространенности анализируемых маркерных генов в птичьих штаммах оказалось, что гены патогенности, общие для всех патотипов *E. coli*, в выборке встречались чаще, чем гены АРЕС (W -test: $p = 0,029$)

или UPEC (W -test: $p < 0,01$); APEC встречались чаще, чем UPEC (W -test: $p < 0,01$); гены IPEC имели схожую частоту встречаемости в сравнении с генами, общими для всех групп, но значительно превышали частоту APEC и UPEC (W -test: $p < 0,01$) (рис. 1).

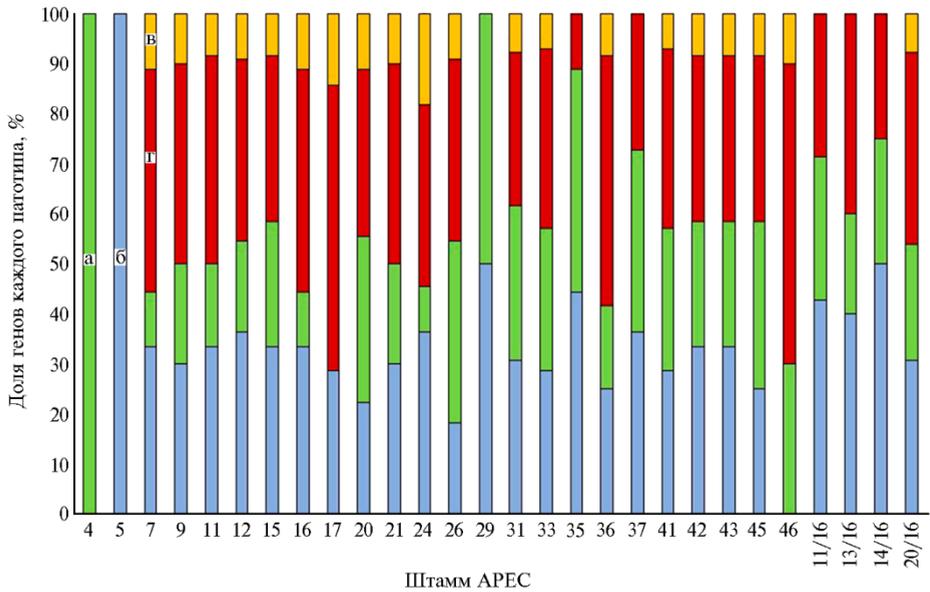


Рис. 1. Соотношение генов, общих для всех патотипов (б), APEC (avian pathogenic *Escherichia coli*) (а), UPEC (uropathogenic *E. coli*) (в) и IPEC (intestinal pathogenic *E. coli*) (г) в штаммах APEC (avian pathogenic *Escherichia coli*), изолированных от цыплят-бройлеров (*Gallus gallus L.*) кросса Ross 308 с генерализованным колибактериозом ($n = 28$, 2016-2018 годы).

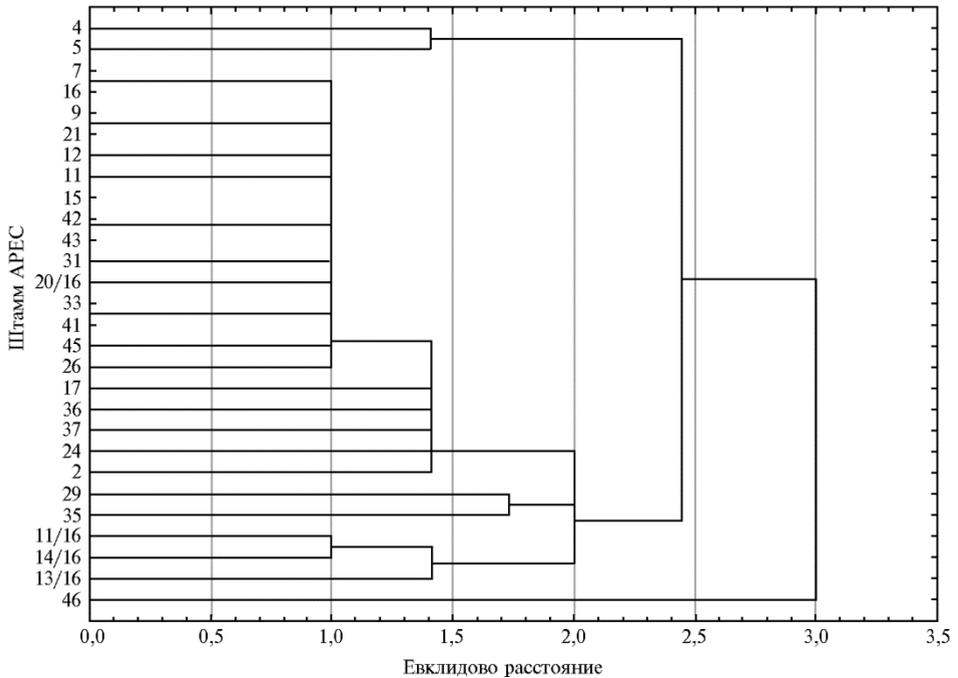


Рис. 2. Результаты кластерного анализа (Cluster analysis, Statistica v.6.0) распределения генов патогенности среди штаммов APEC (avian pathogenic *Escherichia coli*), изолированных от цыплят-бройлеров (*Gallus gallus L.*) кросса Ross 308 с генерализованным колибактериозом ($n = 28$, 2016-2018 годы).

По результатам кластерного анализа наличия генов патогенности были выделены три условных группы штаммов (рис. 2): патогенные для птиц и человека (наличие одновременно 2-6 генов, связанных с АРЕС, и 2-6 генов, связанных с ExРЕС или IРЕС) (24 штамма); патогенные для птиц и не патогенные для человека (наличие 2-6 генов, связанных с АРЕС, и 0-1 гена, связанного с ExРЕС или IРЕС) (2 штамма); непатогенные (0-1 ген из любой группы, АРЕС, ExРЕС, IРЕС) (2 штамма). Штаммы с филогруппой В1 в 85,7 % были отнесены в первую группу. Исходя из полученных ранее данных (24), группа штаммов, выделенных как патогенные для птиц и человека, характеризовалась высокой частотой встречаемости не только генов вирулентности, но и генов БЛРС, таких как СТХ (57,1 % штаммов) и ТЕМ (71,4 % штаммов). Кроме того, 42,8 % представителей этой группы имели ген *traJ* (60 % от общей частоты встречаемости гена в выборке) и 28,5 % — участки интегров 1-го класса (75 % от общей частоты встречаемости в выборке).

Для определения связи между присутствием генов, ассоциированных с вирулентностью и антибиотикоустойчивостью, культуры распределили в группы сравнения: 0-2 и 3-4 гена (для генов общей вирулентности и маркеров АРЕС) и 0-3 и 4-6 генов (для маркеров IРЕС). АРЕС, имеющие 0-2 гена из группы общей вирулентности в 42,85 % случаев были устойчивы к пяти и более антибиотикам, в то время как штаммы с 3-4 генами — в 57,14 % случаев. Для генов, характеризующих группу АРЕС, разница была еще более значимой: 42,85 % устойчивых к пяти и более антибиотикам среди носителей 0-2 генов и 64,28 % — среди носителей 3-4 генов. Интересно, что для генов группы IРЕС соотношение было обратным: штаммы с 0-3 генами были устойчивы к пяти и более антибиотикам в 66,66 % случаев, а штаммы с большим числом генов — только в 47,36 %. Такая тенденция сохранялась для любой комбинации числа имеющихся генов и антибиотиков, к которым у штамма выработана устойчивость. Следует также отметить, что корреляция между указанными признаками была значима только для генов группы АРЕС ($R_s = 0,426$), а для генов IРЕС полностью отсутствовала ($R_s = -0,041$). Преобладающая часть изученных нами штаммов, согласно ИАМ, была отнесена к низкоадгезивной группе, независимо от типа используемых эритроцитов (60,71 % культур в тесте с куриными эритроцитами и 85,71 % культур — с человеческими эритроцитами), при этом корреляции между показателями ИАМ не выявляли ($R_s = 0,046$) (рис. 3).

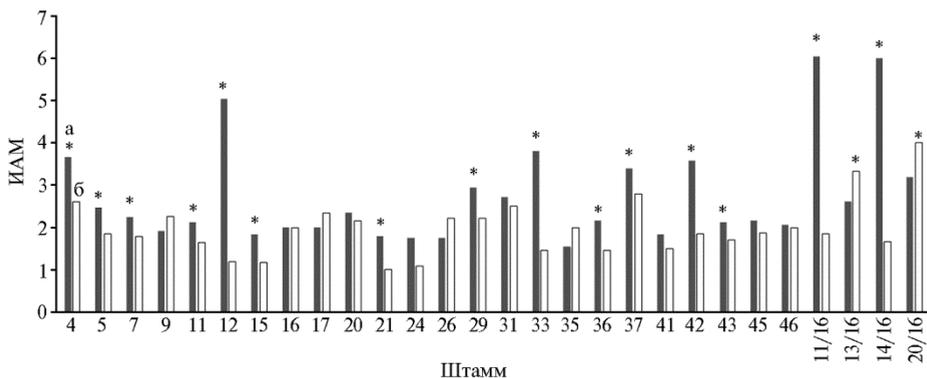


Рис. 3. Индекс адгезивности микроорганизма (ИАМ) у штаммов АРЕС (*avian pathogenic Escherichia coli*), изолированных от цыплят-бройлеров (*Gallus gallus* L.) кросса Ross 308 с генерализованным колибактериозом, в отношении куриных (а) и человеческих (б) эритроцитов ($n = 28$, 2016-2018 годы).

* Различия между вариантами с разными типами эритроцитов статистически значимы при $p \leq 0,05$ (W -test).

Для большей части штаммов АРЕС адгезивная активность в отношении куриных и человеческих эритроцитов достоверно различалась. Клетки 15 штаммов (53,57 %) лучше прикреплялись к поверхности куриных эритроцитов, двух штаммов (7,14 %) — к человеческим эритроцитам, и у 11 культур (39,29 %) показатели адгезии не различались. Средний показатель ИАМ — $Me(Q1-Q3)$ составил соответственно 2,21(1,96-3,25) и 1,87(1,61-2,24), для птичьих и человеческих эритроцитов и оказался ниже в последнем случае ($p = 0,0057$). В группе штаммов, патогенных для птиц и человека согласно генотипу, степень адгезии к эритроцитам птиц, как и в общей выборке, была все еще достоверно выше, чем к эритроцитам человека (W -test: $p = 0,007$), что определялось большим тропизмом АРЕС к эритроцитам птицы.

При анализе связи между числом генов вирулентности и степенью адгезии к двум типам эритроцитов были получены зависимости, аналогичные таковым для антибиотикорезистентности. Если в группах генов вирулентности, общих для всех патотипов, и генов АРЕС индексы адгезии были примерно одинаковыми у штаммов с разным числом детектированных генов, то внутри группы генов ИРЕС степень адгезии к обоим типам эритроцитов оказалась выше у штаммов с меньшим числом генетических детерминант (табл. 2). Отдельно были проанализированы показатели адгезивной активности клеток бактерий с генотипами iss^- и iss^+ , а также $hlyF^-$ и $hlyF^+$, дающими штаммам с позитивным генотипом преимущество выживания при системной коли-инфекции и обеспечивающими повреждение эритроцитов. Выявлена тенденция к увеличению показателей ИАМ у iss^+ штаммов: 2,88(1,85-3,40) против 2,14(2,00-2,47) и 2,07(1,67-2,23) против 1,83(1,47-2,27) при адгезии соответственно на человеческих и птичьих эритроцитах. Аналогично показатели ИАМ у $hlyF^+$ штаммов были выше в обоих моделях, при этом в отношении куриных эритроцитов эта разница оказалась статистически значимой: 2,35(1,93-2,27) против 2,00(2,00-2,07) при $p \leq 0,01$.

2. Степень специфической адгезии штаммов АРЕС (avian pathogenic *Escherichia coli*), изолированных от цыплят-бройлеров (*Gallus gallus* L.) кросса Ross 308 с генерализованным колибактериозом, в зависимости от генотипа ($n = 28$, 2016-2018 годы)

Группа	ИАМ	
	0-2 гена	3-4 гена
Гены, встречающиеся в различных патотипах <i>E. coli</i>	2,35 (2,00-2,54)	2,16 (2,00-3,410)
	2,23 (2,07-2,47)*	1,79 (1,47-2,00)
Гены группы АРЕС (avian pathogenic <i>E. coli</i>)	2,20 (2,00-3,40)	2,24 (2,00-3,13)
	1,82 (1,51-2,20)	2,00 (1,75-2,23)
Гены группы ИРЕС (intestinal pathogenic <i>E. coli</i>)	0-3 гена	4-6 генов
	2,94 (2,47-3,66)*	2,00 (1,46-2,98)
	2,15 (1,86-2,60)*	1,79 (1,47-2,11)

Примечание. ИАМ — индекс адгезивности микроорганизма. Над чертой — ИАМ в отношении куриных эритроцитов, под чертой — ИАМ в отношении человеческих эритроцитов.

* Различия между штаммами с разным числом генов статистически значимы при $p \leq 0,05$ (U -test).

Патотип АРЕС считается относительно новым в классификации *E. coli*, и, несмотря на активное изучение его представителей во всем мире, вопросы об автономности этой экологической группы и ее зоонозном потенциале остаются открытыми. Каждый из описанных экстра- и интраинтестинальных патотипов представляет собой группу серотипов, объединенных определенными факторами вирулентности. Тем не менее следует отметить, что из-за пластичности генома *E. coli* не удастся окончательно идентифицировать субпатотипы эшерихий, поскольку некоторые штаммы сочетают в себе основные характеристики вирулентности различных групп и считаются потенциально более вирулентными гибридными вариантами

(18). Филогенетический анализ позволил установить, что АРЕС имеют значительное генетическое сходство с доминантными патогенами ExРЕС человека и, кроме того, могут быть источником ColV-локализованных генов или даже целых плазмид для других штаммов ExРЕС (10). L. Zhao с соавт. (37) вывели, что различные гены UРЕС и АРЕС имели сходную тенденцию к экспрессии в эксперименте с перекрестным заражением мышей и птиц. По средством моделирования неонатального менингита у крыс показано, что некоторые штаммы АРЕС способны вызывать менингит у млекопитающих, и, возможно, человека, а штаммы NMEС вызывают колисептициемию у птиц. Эти данные подтверждают гипотезу о том, что АРЕС обладают зоонозным потенциалом (38). В настоящее время исследования биоразнообразия эшерихий направлены, с одной стороны, на поиск филогенетического родства между представителями АРЕС и штаммами других патотипов, с другой — на оценку их потенциальной патогенности (в том числе эпидемической опасности) для человека. Учитывая, что все штаммы *E. coli* в нашем исследовании выделены из паренхиматозных органов (селезенка, печень, почки), легких и внутреннего содержимого костей погибшей птицы, они были расценены нами как патотип АРЕС и взяты для дальнейшего детального изучения генотипа.

Известно, что не существует ни одного фактора патогенности ExРЕС, связанного исключительно с конкретным заболеванием или макроорганизмом, при этом способность условно-патогенных эшерихий вызывать инфекционный процесс в различных биотопах иммунокомпетентных хозяев опосредована наличием определенных детерминант вирулентности. По данным J.R. Johnson с соавт. (39), штамм можно считать ExРЕС, если он содержит два или более из следующих генов вирулентности: *pap* (Р-фимбрии), *sfa/foc* (S/F1С-фимбрии), *afa/dra* (Dr, связывающий адгезины), *iutA* (рецептор аэробактина) и *kpsM II* (синтез капсулы группы 2). Структура распределения генов ExРЕС (см. табл. 2) позволила ассоциировать с этой группой штаммы *E. coli*, выделенные при колибактериозе сельскохозяйственной птицы, за исключением двух культур. Чтобы классифицировать штамм как принадлежащий к группе АРЕС, согласно Т.Т. Johnson с соавт. (5), необходимо присутствие в его геноме не менее двух маркерных генов. Строго к патотипу АРЕС были отнесены 25 (89,3 %) культур. Аналогичным образом R.R. Spurbeck с соавт. (40) предложили набор из четырех генов для идентификации штаммов ExРЕС с уропатогенным потенциалом. В нашем исследовании из группы генов, наиболее характерных для уропатогенных штаммов *E. coli*, были обнаружены только *upaG* и *usp*, которые часто встречаются в геноме АРЕС (41, 42).

Сравнение генетических и фенотипических характеристик АРЕС и ИРЕС остается обширной областью изучения с точки зрения выявления гетеропатогенных и гибридных штаммов эшерихий (18). В России выявлен новый штамм *E. coli* серотипа O101:H33, проявляющий свойства и несущий гены, характерные одновременно для энтерогеморрагических и энтеротоксигенных штаммов *E. coli*: *stx2a*, *eae*, *ehxA* и *est1* (19). Описаны также гибридные штаммы, филогенетически расположенные между шига-токсин-продуцирующими *E. coli* и UРЕС. Показано, что они обладают факторами патогенности, характерными для обеих патогрупп, и способны вызвать как диарею, так и инфекцию мочевыводящих путей (43). Единичные работы посвящены сравнению генотипов птичьих патогенов и возбудителей острых кишечных инфекции человека (44). В нашем исследовании в представленной выборке штаммов отсутствовали гены шигаподобного токсина (*stx1/2*), тем не менее 75 % культур были носителями гена *subAB*, кодирующего ци-

тотоксин субтилазу, характерный для шига-токсинпродуцирующих штаммов *E. coli* — STEC (45). Известно, что STEC синтезируют два разных типа цитотоксинов, а именно собственно StxI/II и цитотоксин субтилазу (SubAB), которые сходны по структуре и состоят из одной субъединицы А и пентамера субъединицы В. Цитотоксин субтилаза вызывает различные клеточные эффекты, включая ингибирование синтеза белка, подавление активации ядерного фактора-каппа В, апоптотическую гибель клеток и образование стрессовых гранул (46). Внутривнутришнее введение мышам очищенного цитотоксина субтилазы приводило к обширному микроваскулярному тромбозу, а также к некрозу мозга, почек и печени и было фатальным для животных. Пероральное заражение животных штаммом *E. coli* K-12 с клонированными генами *subA* и *subB* вызывало резкую потерю массы у мышей. Эти данные свидетельствуют о том, что цитотоксин субтилаза может вносить вклад в патогенез заболеваний человека и стать новым токсическим маркером вирулентности среди *E. coli*, полученных от животных.

Горизонтальный перенос генов — важный механизм эволюции бактерий, который обуславливает сложность и пластичность их геномов. Известно, что условно-патогенные и патогенные *E. coli* могут происходить из комменсальных штаммов после приобретения ассоциированных с вирулентностью генов, которые обычно находятся на хромосоме в определенных регионах, называемых островами патогенности (pathogenicity island, PAI) (9, 47). PAI могут включать гены белков системы секреции III типа, токсинов, факторов инвазии и систем захвата железа, по которым PAI можно идентифицировать (48). В нашем исследовании мы проверяли два гена, детерминирующих PAI, — *eaeA* (ген, кодирующий у штаммов ЕРЕС и ЕНЕС основной фактор адгезии интимин в острове патогенности LEE, locus enterocyte effacement) и *iutA* (ген, кодирующий рецептор аэробактина в острове патогенности SHI-2, Shigella pathogenicity island 2). Ген *eaeA*, маркирующий локус сглаживания эритроцитов, обнаружен не был, тогда как *iutA*, указывающий на наличие одного из островов патогенности шигелл и обозначенный как SHI-2 PAI, выявлен у 42,8 % культур, что также свидетельствует об их потенциальной патогенности для человека. Например, 75 % *iutA*⁺ изолятов несли 10 и более генов вирулентности и были устойчивы к 5 и более антибиотикам, в то время как *iutA*⁻ удовлетворяли этим критериям только в 50,0 и 33,3 % случаев. Кроме того, более половины всех штаммов имели участки конъюгативных плазмид, 60 % из которых были отнесены в группы патогенных для птиц и человека, что указывает на возможность эффективного распространения детерминант патогенности посредством горизонтального переноса.

Плазмиды rColV уже давно ассоциируются с вирулентностью *E. coli* несмотря на то, что их одноименный признак — продукция бактериоцина ColV не считается признаком вирулентности (10). Учитывая, что гены *iss*, *ompT*, *hlyF*, *repA* (RepFIB replication protein) и *traJ*, кодирующие последовательности предполагаемых областей вирулентности и переноса rAPES-O2-ColV, обнаруживались в нашей коллекции APES с высокой частотой, можно предполагать, что они были носителем этой плазмиды. Тем не менее следует отметить, что патогенность APES напрямую не коррелирует с наличием других плазмид, как в некоторых патотипах *E. coli* (49). Например, предполагаемые плазмидные гены были широко распространены как среди APES, так и среди комменсальных штаммов *E. coli* кур, в последнем случае среднее число плазмидных генов на изолят было даже больше, чем среди APES (9).

Для выявления патогенности штамма для человека используют ко-

личественный метод определения адгезии бактерий на эритроцитах (36). Способность бактерий *E. coli* прикрепляться к эритроцитам и агглютинировать их может определяться чувствительными к маннозе фимбриями I-го типа. Они представляют собой наиболее распространенный тип бактериальных адгезинов и экспрессируются как комменсальными, так и патогенными штаммами энтеробактерий. Несмотря на общую первичную специфичность этих фимбрий к маннозе, существует разнообразие в степени адгезии между разными видами, а также между разными изолятами одного вида. Так, FimH большинства штаммов фекальной *E. coli* не обеспечивает прочного связывания с рецепторами, которые содержат концевые остатки мономаннозы (Man1), однако некоторые варианты FimH уропатогенной *E. coli* обладают относительно высокой способностью связывания Man1 из-за наличия функциональных точечных мутаций в различных положениях в молекуле FimH (50). Кроме того, маннозорезистентные адгезины, обозначенные как Afa/Dr адгезины, распознающие антигенные системы групп крови Кромера, фактор ускорения распада комплемента или CD55 (complement decay-accelerating factor; DAF) в качестве рецептора, были обнаружены в изолятах IPeC и UPeC. Интересно, что адгезин AfaE, экспрессируемый в изолятах *E. coli* от различных животных, не распознает DAF человека, тогда как *afaE8*-подтип, впервые идентифицированный в изолятах *E. coli* от животных, впоследствии был ассоциирован с уропатогенной *E. coli* человека (51).

По-видимому, естественное появление разнообразных вариантов адгезинов может отражать продолжающуюся адаптивную молекулярную эволюцию *E. coli* по усовершенствованию механизмов закрепления в биотопах разнообразных хозяев. В связи с этим нами проведена оценка адгезивного фенотипа APeC с использованием различных эритроцитов для доказательства возможного избирательного преимущества клеток-мишеней. Преобладающая часть изученных нами штаммов отнесена к низкоадгезивной группе независимо от типа эритроцитов, при этом средний показатель ИАМ при использовании птичьих эритроцитов оказался выше, чем человеческих, что напрямую связано с источником происхождения штаммов. Тем не менее у 11 штаммов степень адгезии не зависела от типа эритроцитов, а у двух культур была достоверно выше на человеческих, чем на птичьих клетках. Следует также подчеркнуть, что показатели адгезивной активности бактерий с генотипом *iss*⁺ и *hlyF*⁺ были выше, чем в группе штаммов, не несущих эти гены, что дает им преимущество при развитии системной коли-инфекции.

Таким образом, подавляющее большинство штаммов *Escherichia coli*, выделенных из органов цыплят-бройлеров с генерализованным колибактериозом, были охарактеризованы как патогенные для птиц и человека, что свидетельствует о потенциале APeC как резервуара факторов вирулентности для возбудителей инфекций человека. В их геноме присутствовали одновременно гены вирулентности, характерные для нескольких патотипов (с преобладанием гибридных патотипов APeC/IPeC), при этом многие штаммы APeC по генетическому профилю имели сродство с группой диареогенных эшерихий. Эпидемически опасные для человека, они могут реализовывать свой патогенный потенциал в большей степени за счет генов токсинообразования и генетических детерминант, связанных с общей вирулентностью, чем за счет факторов адгезии, и без связи с профилем антибиотико-чувствительности. Специфическая адгезия штаммов *E. coli* была более выражена в отношении куриных эритроцитов, чем человеческих. При этом, независимо от типа эритроцитов, высокая адгезивная активность бактерий коррелировала с большей выживаемостью в сыворотке крови хозяина (*iss*⁺ генотип) и возможностью лизиса эритроцитов (*hlyF*⁺ генотип). Полученные

данные о молекулярных и адгезивных свойствах возбудителей колибактериоза птиц позволяют оценить их зоонозный потенциал и эпизоотическую значимость, а также могут служить основой для усовершенствования системы мониторинга колибактериоза в птицеводческих хозяйствах.

ЛИТЕРАТУРА

1. Dho-Moulin M., Fairbrother J.M. Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). *Veterinary Research*, 1999, 30(2-3): 299-316.
2. Kunert Filho H.C., Brito K.C.T., Cavalli L.S., Brito B.G. Avian Pathogenic *Escherichia coli* (APEC) — an update on the control. In: *The battle against microbial pathogens: basic science, technological advances and educational programs* /A. Méndez-Vilas (eds.), Formatex Research Center, Spain, 2015.
3. Nolan L.K., Barnes H.J., Vaillancourt J.P., Tahseen A., Logue C.M. *Colibacillosis*. In: *Disease of Poultry, 13th Edition* / D.E. Swayne (eds.), John Wiley & Sons, Inc., USA, 2013.
4. Solà-Ginés M., Cameron-Veas K., Badiola I., Dolz R., Majó N., Dahbi G., Viso S., Mora A., Blanco J., Piedra-Carrasco N., González-López J.J., Migura-García L. Diversity of multi-drug resistant avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) causing outbreaks of colibacillosis in broilers during 2012 in Spain, *PLoS ONE*, 2015, 10(11): e0143191 (doi: 10.1371/journal.pone.0143191).
5. Johnson T.J., Wannemuehler Y., Doetkott C., Johnson S.J., Rosenberger S.C., Nolan L.K. Identification of minimal predictors of avian pathogenic *Escherichia coli* virulence for use as a rapid diagnostic tool *Journal of Clinical Microbiology*, 2008, 46(12): 3987-3996 (doi: 10.1128/JCM.00816-08).
6. Джаилиди Г.А., Пономаренко Ю.Ю., Лозаберидзе А.Е. Анализ эпизоотического состояния птицеводства в Российской Федерации. *Ветеринария Кубани*, 2014, 2: 25-27.
7. Dziva F., Stevens C.M.P. Colibacillosis in poultry: unravelling the molecular basis of virulence of avian pathogenic *Escherichia coli* in their natural hosts. *Avian Pathology*, 2008, 37(4): 355-366 (doi: 10.1080/03079450802216652).
8. Maturana V.G., de Pace F., Carlos C., Pires M.M., de Campos T.A., Nakazato G., Stheling E.G., Logue C.M., Nolan L.K., da Silveira W.D. Subpathotypes of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) exist as defined by their syndromes and virulence traits. *The Open Microbiology Journal*, 2011, 5: 55-64 (doi: 10.2174/1874285801105010055).
9. Mageiros L., Méric G., Bayliss S.C., Pensar J., Pascoe B., Mourkas E., Calland J.K., Yahara K., Murray S., Wilkinson T.S., Williams L.K., Hitchings M.D., Porter J., Kemmett K., Feil E.J., Jolley K.A., Williams N.J., Corander J., Sheppard S.K. Genome evolution and the emergence of pathogenicity in avian *Escherichia coli*. *Nature Communication*, 2021, 12(1): 765 (doi: 10.1038/s41467-021-20988-w).
10. Johnson T.J., Siek K.E., Johnson S.J., Nolan L.K. DNA Sequence of a ColV plasmid and prevalence of selected plasmid-encoded virulence genes among avian *Escherichia coli* strains. *Journal of Bacteriology*, 2006, 188: 745-758 (doi: 10.1128/JB.188.2.745-758.2006).
11. Manges A.R. *Escherichia coli* and urinary tract infections: the role of poultry-meat. *Clinical Microbiology and Infection*, 2016, 22(2): 122-129 (doi: 10.1016/j.cmi.2015.11.010).
12. Vincent C., Boerlin V.P., Daignault D., Dozois C.M., Dutil L., Galanakis C., Reid-Smith R.J., Tellier P.P., Tellis P.A., Ziebell K., Manges A.R. Food reservoir for *Escherichia coli* causing urinary tract infections. *Emerging Infectious Diseases*, 2010, 16(1): 88-95 (doi: 10.3201/eid1601.091118).
13. Bergeron C., Prussing C., Boerlin P., Daignault D., Dutil L., Reid-Smith R.J., Zhanel G.G., Manges A.R. Chicken as reservoir for extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* in humans, Canada. *Emerging Infectious Diseases*, 2012, 18(3): 415-421 (doi: 10.3201/eid1803.111099).
14. Johnson T.J., Jordan D., Kariyawasam S., Stell A.L., Bell N.P., Wannemuehler Y.M., Alarcyn C.F., Li G., Tivendale K.A., Logue K.M., Nolan L.K. Sequence analysis and characterization of a transferable hybrid plasmid encoding multidrug resistance and enabling zoonotic potential for extraintestinal *Escherichia coli*. *Infection and Immunity*, 2010, 78(5): 1931-1942 (doi: 10.1128/IAI.01174-09).
15. Rodriguez-Siek K.E., Giddings C.W., Doetkott C., Johnson T.J., Fakhr M.K., Nolan L.K. Comparison of *Escherichia coli* isolates implicated in human urinary tract infection and avian colibacillosis. *Microbiology*, 2005, 151(6): 2097-2110 (doi: 10.1099/mic.0.27499-0).
16. Johnson T.J., Kariyawasam S., Wannemuehler Y., Mangiamela P., Johnson S.J., Doetkott C., Skyberg J.A., Lynne A.M., Johnson J.R., Nolan L.K. The genome sequence of avian pathogenic *Escherichia coli* strain O1:K1:H7 shares strong similarities with human extraintestinal pathogenic *E. coli* genomes. *Journal of Bacteriology*, 2007, 189(8): 3228-3236 (doi: 10.1128/JB.01726-06).
17. Johnson T.J., Wannemuehler Y., Johnson S.J., Stell A.L., Doetkott C., Johnson J.R., Kim K.S., Spanjaard L., Nolan L.K. Comparison of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strains from human and avian sources reveals a mixed subset representing potential zoonotic pathogens. *Applied and Environmental Microbiology*, 2008, 74(22): 7043-7050 (doi: 10.1128/AEM.01395-08).
18. Santos A.C.M., Santos F.F., Silva R.M., Gomes T.A.T. Diversity of hybrid- and hetero-pathogenic *Escherichia coli* and their potential implication in more severe diseases. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2020, 10: 339 (doi: 10.3389/fcimb.2020.00339).

19. Онищенко Г.Г., Дятлов И.А., Светоч Э.А., Воложанцев Н.В., Баннов В.А., Карцев Н.Н., Борзенков В.Н., Фурсова Н.К., Шемякин И.Г., Богун А.Г., Кисличкина А.А., Попова А.В., Мякинина В.П., Теймуразов М.Г., Полосенко О.В., Кафтырева Л.А., Макарова М.А., Матвеева З.Н., Гречанинова Т.А., Григорьева Н.С., Кича Е.В., Забалуева Г.В., Кутасова Т.Б., Коржаев Ю.Н., Башкетова Н.С., Бушманова О.Н., Сталевская А.В., Чхинджерия И.Г., Жебрун А.Б. Молекулярно-генетическая характеристика шига-токсинпродуцирующих *Escherichia coli*, выделенных при вспышке пищевой инфекции в Санкт-Петербурге в 2013 году. *Вестник РАМН*, 2015, 70(1): 70-81.
20. Bélanger L., Garenaux A., Harel J., Boulianne M., Nadeau E., Dozois C.M. *Escherichia coli* from animal reservoirs as a potential source of human extraintestinal pathogenic *E. coli*. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 2011, 62(1): 1-10 (doi: 10.1111/j.1574-695X.2011.00797.x).
21. Antao E.M., Ewers C., Gurlebeck D., Preisinger R., Homeier T., Li G., Wieler L.H. Signature-tagged mutagenesis in a chicken infection model leads to the identification of a novel avian pathogenic *Escherichia coli* fimbrial adhesion. *PLoS One*, 2009, 4(11): e7796 (doi: 10.1371/journal.pone.0007796).
22. Li G., Laternus C., Ewers C., Wieler L.H. Identification of genes required for avian *Escherichia coli* septicemia by signature-tagged mutagenesis. *Infection and Immunity*, 2005, 73(5): 2818-2827 (doi: 10.1128/IAI.73.5.2818-2827.2005).
23. Skyberg J.A., Johnson T.J., Johnson J.R., Clabots C., Logue C.M., Nolan L.K. Acquisition of avian pathogenic *Escherichia coli* plasmids by a commensal *E. coli* isolate enhances its abilities to kill chicken embryos, grow in human urine, and colonize the murine kidney. *Infection and Immunity*, 2006, 74(11): 6287-6292 (doi: 10.1128/IAI.00363-06).
24. Kuznetsova M.V., Gizatullina J.S., Nesterova L.Yu., Starčič Erjavec M. *Escherichia coli* isolated from cases of colibacillosis in Russian poultry farms (Perm krai): sensitivity to antibiotics and bacteriocins. *Microorganisms*, 2020, 8(5): 741 (doi: 10.3390/microorganisms8050741).
25. Guiral E., Bosch J., Vila J., Soto S.M. Prevalence of *Escherichia coli* among samples collected from the genital tract in pregnant and nonpregnant women: relationship with virulence. *FEMS Microbiology Letters*, 2011, 314(2): 170-173 (doi: 10.1111/j.1574-6968.2010.02160.x).
26. Subedi M., Luitel H., Devkota B., Bhattarai R.K., Phuyal S., Panthi P., Shrestha A., Chaudhary D.K. Antibiotic resistance pattern and virulence genes content in avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) from broiler chickens in Chitwan, Nepal. *BMC Veterinary Research*, 2018, 14: 113 (doi: 10.1186/s12917-018-1442-z).
27. Johnson J.R., Stell A.L. Extended virulence genotypes of *Escherichia coli* strains from patients with urosepsis in relation to phylogeny and host compromise. *Journal of Infectious Disease*, 2000, 181(1): 261-272 (doi: 10.1086/315217).
28. Maslennikova I.L., Kuznetsova M.V., Toplak N., Nekrasova I.V., Žgur Bertok D., Starčič Erjavec M. Estimation of the bacteriocin ColE7 conjugation-based “kill”—“anti-kill” antimicrobial system by real-time PCR, fluorescence staining and bioluminescence assays. *Letters in Applied Microbiology*, 67(1): 47-53 (doi: 10.1111/lam.12884).
29. Moulin-Schouleur M., Répérant M., Laurent S., Brée A., Mignon-Grasteau S., Germon P., Rasschaert D., Schouler C. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strains of avian and human origin: link between phylogenetic relationships and common virulence patterns. *Journal of Clinical Microbiology*, 2007, 45(10): 3366-3376 (doi: 10.1128/JCM.00037-07).
30. Yamamoto S., Terai A., Yuri K., Kurazono H., Takeda Y., Yoshida O. Detection of urovirulence factors in *Escherichia coli* by multiplex polymerase chain reaction. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 1995, 12(2): 85-90 (doi: 10.1111/j.1574-695X.1995.tb00179.x).
31. Chapman T.A., Wu X.-Y., Barchia I., Bettelheim K.A., Driesen S., Trott D., Wilson M., Chin J.C.C. Comparison of virulence gene profiles of *Escherichia coli* strains isolated from healthy and diarrheic swine. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 72(7): 4782-4795 (doi: 10.1128/AEM.02885-05).
32. Orden J.A., Horcajo P., de la Fuente R., Ruiz-Santa-Quiteria J.A., Domínguez-Bernal G., Carrión J. Subtilase cytotoxin-coding genes in verotoxin-producing *Escherichia coli* strains from sheep and goats differ from those from cattle. *Applied and Environmental Microbiology*, 2011, 77(23): 8259-8264 (doi: 10.1128/AEM.05604-11).
33. Kerényi M., Allison H.E., Bátai I., Sonnevend A., Emödy L., Plaveczy N., Páll T. Occurrence of *hlyA* and *sheA* genes in extraintestinal *Escherichia coli* strains. *Journal of Clinical Microbiology*, 1998, 43(6): 2965-2968 (doi: 10.1128/JCM.43.6.2965-2968.2005).
34. O'Hara R.W., Jenks P.J., Emery M., Upton M. Rapid detection of extra-intestinal pathogenic *Escherichia coli* multi-locus sequence type 127 using a specific PCR assay. *Journal of Medical Microbiology*, 2019, 68(2): 188-196 (doi: 10.1099/jmm.0.000902).
35. Nakano M., Yamamoto S., Terai A., Ogawa O., Makino S., Hayashi H., Nair G.B., Kurazono H. Structural and sequence diversity of the pathogenicity island of uropathogenic *Escherichia coli* which encodes the USP protein. *FEMS Microbiology Letters*, 2001, 205(1): 71-76 (doi: 10.1111/j.1574-6968.2001.tb10927.x).

36. Брилис В.И., Брилен Т.А., Ленцнер Х.П. Методика изучения адгезивного процесса микроорганизмов. *Лабораторное дело*, 1986: 210-212.
37. Zhao L., Gao S., Huan H., Xu X., Zhu X., Yang W., Gao Q., Liu X. Comparison of virulence factors and expression of specific genes between uropathogenic *Escherichia coli* and avian pathogenic *E. coli* in a murine urinary tract infection model and a chicken challenge model. *Microbiology*, 2009, 155(5): 1634-1644 (doi: 10.1099/mic.0.024869-0).
38. Tivendale K.A., Logue C.M., Kariyawasam S., Jordan D., Hussein A., Li G., Wannemuehler Y., Nolan L.K. Avian-pathogenic *Escherichia coli* strains are similar to neonatal meningitis *E. coli* strains and are able to cause meningitis in the rat model of human disease. *Infection and Immunity*, 2010, 78(8): 3412-3419 (doi: 10.1128/IAI.00347-10).
39. Johnson J.R., Murray A.C., Gajewski A., Sullivan M., Snippes P., Kuskowski M.A., Smith K.E. Isolation and molecular characterization of nalidixic acid-resistant extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* from retail chicken products. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2003, 47(7): 2161-2168 (doi: 10.1128/AAC.47.7.2161-2168.2003).
40. Spurbeck R.R., Dinh Jr. P.C., Walk S.T., Stapleton A.E., Hooton T.M., Nolan L.K., Kim K.S., Johnson J.R., Mobley H.L.T. Isolates that carry *vat*, *fyuA*, *chuA*, and *yfcV* efficiently colonize the urinary. *Infection and Immunity*, 2012, 80(12): 4115-4122 (doi: 10.1128/IAI.00752-12).
41. Sarowska J., Futoma-Koloch B., Jama-Kmieciak A., Frej-Madrzak M., Ksiaczyc M., Bugla-Ploskonska G., Choroszy-Krol I. Virulence factors, prevalence and potential transmission of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* isolated from different sources: recent reports. *Gut Pathogens*, 2019, 11: 10 (doi: 10.1186/s13099-019-0290-0).
42. Li T., Castañeda C.D., Arick M.A., Hsu C., Hsu C., Kiess A.S., Zhang L. Complete genome sequence of multidrug-resistant avian pathogenic *Escherichia coli* strain APEC-O2-MS1170. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 2020, 23: 401-403 (doi: 10.1016/j.jgar.2020.11.009).
43. Toval F., Schiller R., Meisen I., Putze J., Kouzel I.U., Zhang W., Karch H., Bielaszewska M., Mormann M., Muthing J., Dobrindt U. Characterization of urinary tract infection-associated shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *Infection and Immunity*, 2014, 82(11): 4631-4642 (doi: 10.1128/IAI.01701-14).
44. Dziva F., Hauser H., Connor T.R., van Diemen P.M., Prescott G., Langridge G.C., Eckert S., Chaudhuri R.R., Ewers C., Mellata M., Mukhopadhyay S., Curtiss R., Dougan G., Wieler L.H., Thomson N.R., Pickard D.J., Stevens M.P. Sequencing and functional annotation of avian pathogenic *Escherichia coli* serogroup O78 strains reveal the evolution of *E. coli* lineages pathogenic for poultry via distinct mechanisms. *Infection and Immunity*, 2013, 81(3): 838-849 (doi: 10.1128/IAI.00585-12).
45. Булгакова Н.Ф. Идентификация с помощью метода ПЦР гена цитотоксина субтиказы среди штаммов шига-токсигенных *Escherichia coli*, выделенных от людей, крупного рогатого скота, свиней (Польша). *Ветеринария. Реферативный журнал*, 2007, 3: 759.
46. Tsutsuki H., Ogura K., Moss J., Yahiro K. Host response to the subtilase cytotoxin produced by locus of enterocyte effacement-negative shiga-toxigenic *Escherichia coli*. *Microbiology and Immunology*, 2020, 64(10): 657-665 (doi: 10.1111/1348-0421.12841).
47. Naderi G., Haghi F., Zeighami H., Hemati F., Masoumian N. Distribution of pathogenicity island (PAI) markers and phylogenetic groups in diarrheagenic and commensal *Escherichia coli* from young children. *Gastroenterol Hepatol Bed Bench*, 2016, 9(4): 316-324.
48. Yoon S.H., Park Y., Kim J.F. PAIDB v2.0: exploration and analysis of pathogenicity and resistance islands. *Nucleic Acids Research*, 2015, 43(D1): D624-D630 (doi: 10.1093/nar/gku985).
49. Johnson T.J., Nolan L.K. Pathogenomics of the virulence plasmids of *Escherichia coli*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2009, 73(4): 750-774 (doi: 10.1128/MMBR.00015-09).
50. Thomas W.E., Trintchina E., Forero M., Vogel V., Sokurenko E.V. Bacterial adhesion to target cells enhanced by shear force. *Cell*, 2002, 109(7): 913-923 (doi: 10.1016/s0092-8674(02)00796-1).
51. Le Bouguéne C., Servin A.L. Diffusely adherent *Escherichia coli* strains expressing Afa/Dr adhesins (Afa/Dr DAEC): hitherto unrecognized pathogens. *FEMS Microbiology Letters*, 2006, 256: 185-194 (doi: 10.1111/j.1574-6968.2006.00144.x).

¹Институт экологии и генетики микроорганизмов
УрО РАН — филиал ПФИЦ УрО РАН,

614000 Россия, г. Пермь, ул. Голева, 13,
e-mail: gizatullina.julia@yandex.ru ✉, mar@iegm.ru;

²Department of Biology, Biotechnical Faculty,
University of Ljubljana,

Jamnikarjeva 101, 1000, Ljubljana, Slovenia,
e-mail: marjanca.starcic.erjavec@bf.uni-lj.si

Поступила в редакцию
13 декабря 2021 года

AND INTESTINAL PATHOGENIC *Escherichia coli*

J.S. Pospelova¹ ✉, M. Starčič Erjavec², M.V. Kuznetsova¹

¹Perm Federal Research Center, Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms UB RAS, 13, ul. Goleva, Perm, 614081 Russia, e-mail gizatullina.julia@yandex.ru (✉ corresponding author), mar@iegm.ru;

²Department of Biology, Biotechnical Faculty, University of Ljubljana, Jamnikarjeva 101, 1000, Ljubljana, Slovenia, e-mail marjanca.starctic.erjavec@bf.uni-lj.si

ORCID:

Pospelova J.S. orcid.org/0000-0001-9625-1151

Kuznetsova M.V. orcid.org/0000-0003-2448-4823

Starčič Erjavec M. orcid.org/0000-0003-0200-573X

The authors declare no conflict of interests

Acknowledgements:

The work was carried out within the framework of the state task NIOKTR AAAA-A19-119112290009-1 and scientific project S-26/792.

Received December 13, 2021

doi: 10.15389/agrobiologia.2022.2.356eng

Abstract

The expansion and intensification of poultry farming increases the risk of spreading colibacillosis among poultry, so there is an urgent need to monitor avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC), study their genetic diversity and identify strains that pose a threat to human health. Determination of virulence-associated genes and the degree of specific adhesion may be useful for a comprehensive assessment of the epidemic and epizootic significance of *E. coli* strains isolated from livestock. In this study, an extended molecular analysis of *E. coli* strains isolated from poultry during outbreaks of colibacillosis was performed with the objective to genotypically characterize the isolated *E. coli* strains and to evaluate the relationship between genes encoding adhesins and specific adhesion to erythrocytes. It was shown for the first time that the strains were characterized by a high potential for pathogenicity and could be carriers of genes for several pathotypes at once, while the genes of intestinal pathogenic *E. coli* (IPEC) were detected often than others. A positive adhesive profile for a number of genes correlated positively with the activity of strain adhesion to chicken (*Gallus gallus* L.) and human erythrocytes. In the study 28 non-clonal *E. coli* strains, as determined by ERIC-PCR, isolated from various organs (except the intestine) of Ross 308 cross broilers (*Gallus gallus* L.) with generalized colibacillosis in 2016–2018 were characterized. Polymerase chain reaction (PCR) was used to detect virulence-associated genes characteristic of four different *E. coli* pathotypes, the APEC, exintestinal pathogenic (ExPEC), intestinal pathogenic *E. coli* (IPEC: Enteropathogenic *E. coli* EPEC, Enterotoxigenic *E. coli* ETEC, Enterohemorrhagic *E. coli* EHEC, Enteroaggregative *E. coli* EaggEC), and uropathogenic *E. coli* (UPEC). Previously published protocols were used for all types of PCRs and amplifications were performed in the DNA Engine Dyad Thermal Cycler (Bio-Rad, USA). Band visualization and data documentation were performed using the Gel-Doc XR gel documentation system (Bio-Rad, USA). Formalinized human erythrocytes of the type 0(I) Rh(+) and avian erythrocytes were used as cell substrates for the determination of bacterial adhesion to erythrocytes. To evaluate the bacterial adhesion properties the adhesion index was calculated as the average number of bacteria bound to an erythrocyte in the adhesion assay. The obtained results showed that the characterized strains possessed a high pathogenic potential, as they carried genes associated with APEC, ExPEC as well as IPEC. The presence of APEC-specific marker genes identified most of the strains as APEC. However, potential for human pathogenicity was also found among the analyzed strains. As the IPEC-associated genes were found more frequently than ExPEC-associated genes, the *E. coli* strains studied were more similar to strains causing acute intestinal infections in humans, particularly due to the fact that they carried genes encoding toxins characteristic of IPEC (with the exception of genes for Shiga-like toxins and enterohemolysins). Based on cluster analysis of genetic profiles, the strains studied could be classified into three groups: (i) pathogenic to birds and humans, characterized by the presence of 2–6 genes associated with APEC and 2–6 genes associated with ExPEC or IPEC (24 strains), (ii) pathogenic to birds and nonpathogenic to humans, characterized by the presence of 2–6 genes associated with APEC and 0–1 gene associated with ExPEC or IPEC (2 strains), and (iii) nonpathogenic, characterized by the possession of none or one gene from each pathotype, APEC, ExPEC, IPEC (2 strains). It was found that 75 % of the first group, pathogenic to birds and humans, carried not only a high number of virulence-associated genes, but also pathogenicity island SHI-2, as well as genes for extended-spectrum beta-lactamases and class 1 integrons. Specific adhesion of *E. coli* strains was more pronounced on chicken erythrocytes than on human ones. Statistical analysis revealed several positive correlations between the chicken and human erythrocytes adhesion profiles and a number of genes encoding adhesins. The high adhesion activity of the bacteria, regardless of the type of erythrocyte, also correlated with longer survival in host blood serum (genotype *iss+*) and the possibility of erythrocyte lysis (genotype *hlyF+*). The obtained data on the molecular and adhesive properties of causative agents of colibacillosis in birds allow us to assess their zoonotic potential and epizootic significance and can also serve as the basis for improving the monitoring system for colibacillosis in poultry farms.

Keywords: avian pathogenic *Escherichia coli*, APEC, ExPEC, IPEC, virulence-associated genes, zoonotic potential.