

Міністерство освіти і науки України
Національний університет «Києво-Могилянська академія»
Факультет природничих наук
Кафедра лабораторної діагностики біологічних систем

Кваліфікаційна робота

освітній ступінь – магістр

на тему: **«ОСОБЛИВОСТІ ІНФІКУВАННЯ *ESCHERICHIA COLI*
ЛЮДИНИ ТА МЕТОДИ ЇЇ ВИЯВЛЕННЯ»**

Виконала: студентка 2-го року навчання,
спеціальності 091 Біологія

Деменко Тетяна Олександрівна

Керівники:

Білько Денис Іванович, к.б.н., доцент

Сільвія Шнель, професорка загальної та
грунтової мікробіології

Рецензент: _____

Кваліфікаційна робота захищена

з оцінкою _____

Секретар ЕК _____

«__» _____ 2024 р.

Київ – 2024

ЗМІСТ

УМОВНІ СКОРОЧЕННЯ.....	4
ВСТУП.....	6
РОЗДІЛ I. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	10
1.1 Особливості бактерії <i>Escherichia coli</i>	10
1.2 Види та штами <i>Escherichia coli</i>	12
1.3 Шляхи передачі <i>Escherichia coli</i>	15
1.4 Резистентність до антибіотиків.....	16
1.5 Поширення <i>Escherichia coli</i> на території Німеччини.....	17
РОЗДІЛ II. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.....	20
2.1 Сучасні методи виявлення <i>Escherichia coli</i>	20
2.2 Метод ДНК-зондів.....	22
2.3 Серологічні методи для визначення серотипу <i>E. Coli</i>	23
2.4 Полімеразна ланцюгова реакція. Метод для ампліфікації специфічних фрагментів ДНК <i>Escherichia coli</i>	24
2.5 Електрофорез ДНК в агарозному гелі. Метод для розділення та визначення розміру ампліфікованих фрагментів ДНК.....	31
РОЗДІЛ III. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ.....	35
3.1 Кількість інфікованих на ентерогеморагічну <i>Escherichia coli</i> протягом 2014-2020 років в Німеччині.....	35
3.2 Сезонні коливання інфікованих на ентерогеморагічну <i>Escherichia coli</i>	44

3.3 Виявлення *Escherichia coli* за допомогою методу ПЛР і електрофорезу ДНК
в агарозному
гелі.....45

ЗАГАЛЬНІ ВИСНОВКИ.....48

СПИСОК ВИКОРИСАНИХ ДЖЕРЕЛ.....50

ДОДАТОК А.....55

ДОДАТОК Б.....58

ДОДАТОК В.....60

УМОВНІ СКОРОЧЕННЯ

- аГУС – Атиповий гемолітико-уремічний синдром
- ВООЗ – Всесвітня організація охорони здоров'я
- ГУС – Гемолітико-уремічний синдром
- ДНК – Дезоксирибонуклеїнова кислота
- ІФА – Імуноферментний аналіз
- МПА – МакКонкі-агар
- МПБ – МакКонкі-Бокса
- мРНК – Матрична рибонуклеїнова кислота
- ПЛР – Полімеразна ланцюгова реакція
- УФ – Ультрафіолетове світло
- COVID-19 – офіційна назва коронавірусної інфекції (Corona Virus Disease 2019)
- dATP – Дезоксиаденінотрифосфат (Desoxyadenosintriphosphat)
- dCTP – Дезоксицитидинтрифосфат (Desoxycytidintriphosphat)
- dGTP – Дезоксигуанозинтрифосфат (Desoxyguanosintriphosphat)
- dTTP – Дезокситимідинотрифосфат (Desoxythymidintriphosphat)
- EAEC – Ентероагрегативні *Escherichia coli* (Enterogaagregative *Escherichia coli*)
- EANEC – Ентероагрегативні і ентерогеморагічні *Escherichia coli* (Enterogaagregative haemorrhagic *Escherichia coli*)
- E. coli* – *Escherichia coli*
- EIEC – Ентероінвазивні *Escherichia coli* (Enteroinvasive *Escherichia coli*)
- EHEC – Ентерогеморагічні *Escherichia coli* (Enterohaemorrhagic *Escherichia coli*)
- ЕPEC – ентеропатогенні *Escherichia coli* (Enteropathogenic *Escherichia coli*)
- ETEC – Ентеротоксигенні *Escherichia coli* (Enterotoxigenic *Escherichia coli*)
- LEE – Генетичний локус (Locus of Enterocyte Effacement)
- LT – Ентеротоксин (Heat-Labile Enterotoxin)

PCR–RFLP (ПЛР–ПДРФ) – полімеразна ланцюгова реакція – поліморфізм довжин рестрикційних фрагментів

qPCR – Полімеразна ланцюгова реакція у реальному часі (Quantitative polymerase chain reaction)

RT-PCR – Полімеразна ланцюгова реакція з використанням зворотної транскрипції (reverse transcription PCR)

STEC – Шига-токсин продукуючі *E.coli* (Shiga toxin-producing *Escherichia coli*)

ST – Ентеротоксин (Heat-Stable Enterotoxin)

VTEC – Веротоксигенні *Escherichia coli* (Verocytotoxin-producing *Escherichia coli*)

ВСТУП

Представники родини *Enterobacteriaceae* є невід'ємною частиною біосфери. Завдяки своїй полібіотрофії та адаптаційним властивостям, вони широко поширені в абіотичних об'єктах навколишнього середовища, а також у живих організмах.

Escherichia coli є найбільш інтенсивно та найкраще вивченою з усіх бактерій. Вперше дана бактерія була описана у 1885 році Теодором Ешеріхом, німецьким педіатром, який відзначив її високу поширеність у кишковій мікрофлорі здорових людей, а також її здатність спричиняти серйозні захворювання.

Згідно зі звітом ВООЗ, щорічно фіксується до 275 мільйонів випадків діарейних захворювань у дорослих і дітей. *Escherichia coli* займає значне місце серед збудників інфекційного гастроентериту. У немовлят цей показник становить від 29,4% до 81,4%, а у дорослих - від 5% до 15%. У загальній структурі гастроентеральних інфекцій ешерихіози складають від 2,8% до 3,4%. За даними ВООЗ, ешерихіози є найпоширенішими серед діарейних захворювань у новонароджених і малих дітей. У дорослих вони часто спостерігаються як діарея під час подорожей. [1]

За даними Всесвітньої організації охорони здоров'я, інфекція *E. coli* є однією з найпоширеніших причин захворюваності на підвищення температури і гострої діареї у всьому світі, особливо серед дітей і людей зі слабким імунітетом. Ситуація з кишковою паличкою в світі може бути різною в залежності від країни та регіону.

Важливість *Escherichia coli* як збудника інфекцій людини була відома з 1890-х років. Кишкова паличка відіграє важливу роль як найпоширеніша причина бактеріальних інфекцій сечовивідних шляхів. Їх також побуюються як збудників зараження крові та більш серйозних інфекцій.

Ситуація з кишковою паличкою може варіюватися в залежності від країни. У розвинених країнах із високим рівнем санітарії та гігієни, випадки інфекцій *E. coli* можуть бути рідкісними, особливо серед населення з достатньою доступністю до чистої води та якісної продукції. У той час, у менше розвинених країнах або в тих, де існують проблеми з гігієною, водопостачанням та санітарією, випадки кишкової палички можуть бути більш поширеними. Більшість випадків зазвичай пов'язані з недостатньою обробкою їжі, вживанням забрудненої води або недодержанням правил гігієни.

Вивчення патогенних організмів є основою для розуміння механізмів захворювання. Знання про ці організми дозволяють розробляти стратегії, що допомагають попереджати та контролювати захворювання. Поширення і розвиток патогенних мікроорганізмів може впливати на імунну систему та призводити до ряду захворювань, тому їх вивчення є критичним для підтримання загального здоров'я населення.

Вивчення механізмів інфікування *Escherichia coli* людини та методів її виявлення є надзвичайно важливими. Точна та швидка діагностика інфекцій *E. coli* у пацієнтів дозволяє розпочати ефективне лікування та управління захворюванням. Вивчення та застосування різних методів діагностики *E. coli* є важливим для швидкого та точного виявлення цієї бактерії в клінічних та харчових зразках.

Інфекції, спричинені *E. coli*, залишаються серйозною загрозою для громадського здоров'я у всьому світі. Деякі штами *E. coli* можуть призводити до важких захворювань, таких як діарея з кров'ю, гемолітичний уремичний синдром (ГУС) та навіть смертельні випадки. Лише невеликий відсоток бактерій у світі викликає інфекції та захворювання. Ці бактеріальні інфекції мають великий вплив на здоров'я населення.

Деякі штами *E. coli* стають все більш резистентними до антибіотиків, ускладнюючи лікування інфекцій та збільшуючи ризик ускладнень. Наявність

штамів *E. coli*, які можуть швидко поширюватися та призводити до епідемій, ставить під загрозу громадське здоров'я та вимагає швидкого виявлення та контролю. Нові штами бактерій можуть призводити до непередбачуваних епідемій та інфекцій

Раннє виявлення інфекції *E. coli* дозволяє вчасно вжити заходів щодо лікування та профілактики ускладнень, що може врятувати життя та запобігти подальшому поширенню інфекції. Належне розуміння механізмів зараження бактерій та шляхів їх поширення дозволяє розробляти ефективні стратегії запобігання та контролю інфекцій. Це включає в себе вакцинацію, поліпшення гігієнічних стандартів, контроль якості харчових продуктів і води.

У зв'язку з цим **метою роботи** став аналіз методів діагностики *Escherichia coli*, а саме використання полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР). Проведення аналізу епідеміологічних даних щодо кількості випадків інфікування ентерогеморагічною *Escherichia coli* протягом 2014-2023 років на території Німеччини та визначення інтенсивності зараження в різних її частинах. Аналіз сезонності захворювання на ентерогеморагічну *Escherichia coli* для встановлення тенденцій у поширенні за різних умов та періодів року.

Для досягнення вказаної мети були поставлені наступні **завдання**:

1. Визначити ефективність використання полімеразної ланцюгової реакції для діагностики *Escherichia coli*.
2. Провести аналіз даних щодо кількості випадків інфікування ентерогеморагічною *Escherichia coli* (ЕНЕС) протягом 2014-2023 років на території Німеччини.
3. Проаналізувати епідеміологічні дані для визначення інтенсивності зараження в різних частинах Німеччини на ентерогеморагічну *Escherichia coli*.

4. Проаналізувати сезонність захворювання на ентерогеморагічну *Escherichia coli*.

Об'єкт дослідження - ефективність методу полімеразної ланцюгової реакції у виявленні *Escherichia coli*.

Предмет дослідження – особливості поширення ентерогеморагічної *Escherichia coli* (ЕНЕС) на території Німеччини.

РОЗДІЛ I

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1 Особливості бактерії *Escherichia coli*

Escherichia coli — це неспороутворююча грамнегативна бактерія, яка зазвичай рухається за допомогою перитрихальних джгутиків. *Escherichia coli* - це бактерії короткої форми з заокругленими кінцями, що можуть бути поліморфними, тобто мати вигляд як кокобактерії, так і нитки. Вони мають розміри приблизно $1,1-1,5 \times 2,0-6,0$ мікрометрів. Більшість штамів *E. coli* мають капсулу або мікрокапсулу, є рухливими за рахунок перитрихів, але також можуть існувати нерухливі штами. Кишкова паличка є основною непатогенною частиною факультативної мікрофлори кишечника людини. Проте деякі штами *E. coli* набули здатності викликати захворювання шлунково-кишкового тракту, сечовидільної системи та центральної нервової системи. Діарейні штами *E. coli* можна розділити на щонайменше п'ять різних категорій, кожна з яких має власні патогенні механізми. Ці організми, ймовірно, є найпоширенішою причиною діареї у дітей у всьому світі. Інфекції, спричинені діарейними штамми *E. coli*, супроводжуються різними клінічними синдромами, такими як діарея мандрівників (ентеротоксигенна *E. coli*), геморагічний коліт і гемолітико-уремічний синдром (ентерогеморагічна *E. coli*), хронічна діарея (ентероагрегативна *E. coli*) та водяниста діарея у немовлят (ентеропатогенна *E. coli*) [45].

Escherichia coli - це факультативні анаероби, які можуть рости як у наявності кисню, так і в його відсутності. Вони не вимогливі до поживних середовищ і швидко ростуть на різних середовищах, таких як МакКонкі-агар (МПА) і МакКонкі-Бокса (МПБ). На щільних середовищах ці бактерії утворюють колонії у вигляді плоских опуклих S-колоній з рівними або трохи хвилястими краями (діаметром 3-5 мм) або плоскі R-колоній з нерівними краями.

Escherichia coli є ферментативно активними мікроорганізмами. Вони демонструють добре виражені сахаролітичні властивості, здатні розщеплювати різні вуглеводи, такі як глюкоза, лактоза, маніт, мальтоза, сахароза, арабіноза та інші, до кислоти та газу. Деякі штами не ферментують лактозу і сахарозу. Крім того, вони можуть відновлювати нітрати до нітритів. Ці бактерії є оксидазонегативними та каталазопозитивними.

Бактерія *Escherichia coli* виконує важливі функції в кишечнику людини, такі як розщеплення поживних речовин і захист від патогенів. Проте за межами кишкового тракту *E. coli* є індикатором забруднення питної води та їжі фекаліями. У людей зі слабкою імунною системою, таких як діти та люди похилого віку, *E. coli* може спричиняти інфекції сечовивідних шляхів, перитоніт, запалення жовчовивідних шляхів, менінгіт, пневмонію та сепсис.

Геморагічний коліт іноді прогресує до гемолітико-уремічного синдрому, що є важливою причиною гострої хвороби нирок у дітей та причиною захворюваності і смертності у дорослих. Відомо, що з 1980-х років ентерогеморагічна *E. coli* O157:H7 (ЕНЕС O157:H7) викликає ці синдроми, але все частіше фіксуються клінічні випадки та спалахи, спричинені іншими серогрупами ЕНЕС. У деяких регіонах не-O157 ЕНЕС може викликати більше випадків захворювання, ніж ЕНЕС O157:H7. У 2011 році незвичайний штам ентероагрегативної *E. coli* (ЕАЕС) серотипу O104:H4 став причиною серйозного спалаху геморагічного коліту та ГУС в Європі. Спільною рисою всіх штамів *E. coli*, пов'язаних із ГУС, є здатність виробляти веротоксини, а також здатність зв'язуватися з кишечником людини та колонізувати його. Оскільки гени веротоксину можуть передаватися між бактеріями, можуть виникати додаткові патотипи *E. coli*, пов'язані з ГУС [20, 16].

Жуйні тварини, особливо велика рогата худоба та вівці, є основними носіями ЕНЕС O157:H7 та багатьох інших штамів *E. coli*, що виробляють веротоксин. Деякі тварини переносять ці організми в шлунково-кишковому тракті і виділяють їх з фекаліями, хоча не всі заражені тварини є

переносниками. Інші види тварин також можуть іноді заражатися. Більшість інфікованих тварин не мають клінічних ознак захворювання, хоча деякі штами, що не належать до O157 серогрупи, можуть викликати кишкові захворювання у молодих тварин, а ЕНЕС O153 асоціюється з хворобою, схожою на ГУС, у кроликів. Люди можуть заразитися ЕНЕС через прямий контакт з тваринами-носіями, їхніми фекаліями, зараженими людьми або забрудненими ґрунтом чи водою. Також зараження може відбутися через споживання недосмаженого м'яса, інших продуктів тваринного походження, забруднених овочів, фруктів та інших продуктів. Заразна доза для людей дуже низька, що підвищує ризик захворювання. Тварини не вважаються резервуарами для ентероагрегативних *E. coli*, що продукують веротоксин, які, ймовірно, зберігаються в організмі людей, але також можуть бути передані через їжу.

1.2. Види та штами *Escherichia coli*

Зараз відомі різні патогенні категорії *E. coli*, що викликає діарею. Кожен патотип визначається окремим набором детермінантів, пов'язаних з вірулентністю, які разом визначають клінічні, патологічні та епідеміологічні особливості захворювання, яке вони викликають. П'ять патотипів були ентеропатогенні *E. coli* (ЕРЕС), ентеротоксигенна *E. coli* (ЕТЕС), ентероінвазивна *E. coli* (ЕІЕС), ентерогеморагічна *E. coli* (ЕНЕС) та ентероагрегативна *E. coli* (ЕАЕС) (Таблиця 1) [45].

Клінічна, патологоанатомічна та епідеміологічна характеристика захворювань, спричинених п'ятьма основними патотипами діарейної кишкової палички.

Патотип	Клінічний прояв	Патологія	Інфіковані особи
ЕТЕС	Водяниста діарея	Без помітних змін	Діти в менш розвинених країнах, мандрівники до цих

			країн
ЕІЕС	Дизентерія	Запалення та ураження слизової оболонки переважно товстого кишечника	Будь-який вік, частіше зустрічається в країнах, що розвиваються
ЕРЕС	Неспецифічний гастроентерит	Вражають весь кишечник	Діти віком до 2 років у менш розвинених країнах
ЕНЕС	Діарея з кров'ю	Геморагічний коліт; вражають товстий кишечник; некроз у важких випадках	Діти та люди похилого віку в промислово розвинутих країнах
ЕАЕС	Постійна діарея	Запалення; цитотоксичні зміни в ентероцитах	Діти в менш розвинених країнах; мандрівників до цих країн

Патогенні штами *Escherichia coli* відрізняються за своєю вірулентністю. Патогенні *E. coli* можна класифікувати на патотипи за цими факторами. Існує п'ять основних патотипів, які здатні викликати шлунково-кишкові захворювання у людей: ентеропатогенні *E. coli* (ЕРЕС), ентеротоксигенні *E. coli* (ЕТЕС), ентероагрегативні *E. coli* (ЕАЕС), ентероінвазивні *E. coli* (ЕІЕС) та ентерогеморагічні *E. coli* (ЕНЕС), також деякі автори виділяють веротоксигенні *E. coli* (VТЕС) шостим патотипом. Нещодавно була запропонована нова категорія - ентероагрегативні і ентерогеморагічні *E. coli* (ЕАНЕС) [16].

Сучасна номенклатура та характеристики патотипів *E. coli*

Патотип	Клінічна картина	Типові генетичні маркери
ETEC	водяниста діарея від легкої до важкої форм	термолабільний ентеротоксин (LT) та/або термостабільний холерний токсин-подібний ентеротоксин (ST); різні фактори колонізації (наприклад, CFA/I, CS6, CS30 тощо)
EIEC	високоінвазивні; викликають шигельоз/бацилярну дизентерію з діареєю, лихоманкою та потенційним пошкодженням стінок кишечника; може перейти до ГУС	плазміда інвазії pINV, токсин Шига, ентеротоксин на хромосомному островці патогенності, відсутність джгутиків
EPEC	прикріплення та пошкодження поверхонь епітеліальних клітин кишечника; діарея, яка часто супроводжується лихоманкою, блювотою та зневодненням	локус видалення ентероцитів (LEE), що включає інтимін (eae); пучоки (bfp, лише в типовому EPEC, tEPEC; відсутній у атиповому EPEC, aEPEC)
EHEC	від легкої до кривавої діареї (геморагічний коліт), що супроводжується лихоманкою, спазмами в животі або блювотою; може призвести до ГУС	Шига токсин 1 або 2 (stx1 і stx2), LEE (у деяких, але не у всіх лініях)

EAEC	часто водяниста або іноді хронічна діарея; можливе прогресування до ГУС	Плазміди вірулентності рАА, що містять гени фімбрій агрегованої адгезії
-------------	---	---

Різновиди кишкової палички, які викликають харчові отруєння у людей, виробляють Шига-токсин, що позначається як stx (Shiga toxin). Цей токсин отримав свою назву через схожість симптомів ураження з тими, що спричиняють бактерії *Shigella dysenteriae* (збудник дизентерії). Відомі два типи цього токсину: stx1 і stx2. Існує понад 70 різних серогруп *E. coli*, що продукують Шига-токсин, але найбільш небезпечним і поширеним є штам *E. coli* O157:H7, що часто викликає криваву діарею та іноді призводить до відмови нирок [28].

1.3 Шляхи передачі *Escherichia coli*

Escherichia coli є бактерією, яка може передаватися людині різними шляхами. Ці шляхи включають передачу через харчовий ланцюг, прямий контакт із зараженими тваринами або людьми, а також непрямий контакт через забруднене середовище. Шляхи передачі бактерії *Escherichia coli* є ключовим аспектом вивчення цього патогена, оскільки вони визначають ризики зараження та сприяють розробці стратегій контролю та запобігання захворюванням.

Одним з основних шляхів передачі *E. coli* є споживання недоготовлених або недостатньо оброблених продуктів харчування. Бактерія може потрапити в їжу через забруднені руки, обладнання або незадовільні умови зберігання. М'ясо, птиця, молоко, сирі фрукти та овочі можуть бути джерелом зараження, якщо вони не були належним чином оброблені або приготовлені перед споживанням. Інший шлях передачі *E. coli* полягає в контакті зі забрудненими водними джерелами. Контакт з водою для пиття, купання в забруднених водоймах або використання забрудненої води для приготування їжі може призвести до інфікування. Також інфікування може відбуватися через прямий контакт з інфікованими тваринами або їхніми відходами. Тварини, особливо велика рогата худоба, можуть бути носіями *E. coli* і передавати її через фекалії.

Прямий контакт з інфікованими тваринами або їхніми відходами може призвести до передачі бактерії людині. Крім того, люди можуть інфікуватися *E. coli* через контакт з іншими інфікованими людьми або через недостатню гігієну рук. Недостатнє миття рук після відвідування туалету або перед споживанням їжі може призвести до передачі бактерії від однієї людини до іншої.

Розуміння шляхів передачі бактерії *E. coli* дозволяє розробляти ефективні стратегії контролю та запобігання зараженням. Важливою частиною цих стратегій є належна гігієна, правильна обробка та приготування їжі, очищення води і дотримання стандартів санітарії у всіх сферах життя. Таким чином, інфікування людини бактерією *E. coli* може мати серйозні наслідки для громадського здоров'я, і важливо підтримувати високі стандарти гігієни та безпеки, щоб запобігти поширенню цієї патогенної бактерії.

1.4 Резистентність до антибіотиків

Було показано, що кишкова паличка може мати високу стійкість до багатьох антибіотиків, які використовуються людьми з 1930-х років. Це частково пояснюється високою швидкістю придбання генів і здатністю до горизонтального перенесення штамів *E. coli*. Виникнення резистентності до антибіотиків є багатофакторним процесом, але головним чином це зумовлено діяльністю людини та збільшенням використання антибіотиків у медицині, ветеринарії та харчовій промисловості. Відомий приклад високовірулентного ExPEC є мультирезистентний *E. coli* ST131, пов'язаний з інфекціями сечовивідних шляхів і крові, який сприяв поширенню гена CTX-M-15 [5].

Загалом, штами *E. coli* еволюціонували, щоб протистояти основним класам антибіотиків, таким як β -лактами, хінолони, аміноглікозиди, сульфонаміди та фосфоміцин. Штами *E. coli*, що продукують AmpC, домінують у кишківнику як тварин, так і людей, а також у забрудненні навколишнього середовища в країнах, що розвиваються. Через зростання частоти важких інфекцій, спричинених *E. coli*, що продукує ESBL та AmpC, ми обмежені у

використанні останніх резервних класів антибіотиків, таких як поліміксини та карбапенеми. Крім того, в Європі було виявлено штами *E. coli*, що містять карбапенем-гідролізуючу оксациліназу-48 (Оха-48), зокрема, в Німеччині було зафіксовано 134 випадки штамів *E. coli*, що містять варіант ОХА-48 ОХА-244. Пізніше цей варіант було ідентифіковано у 119 штамів *E. coli* з інших європейських країн [45].

На сьогоднішній день патогени, стійкі до антимікробних препаратів, спричиняють 700 000 смертей щорічно, і до 2050 року ця кількість може зрости до 10 мільйонів смертей на рік, що перевищить 8,2 мільйона смертей від раку, які фіксуються зараз. Розробка нових терапевтичних підходів залишатиметься надзвичайно важливою. Окрім того, альтернативні стійкі профілактичні стратегії, такі як вакцинація, можуть допомогти обмежити поширення резистентної до антибіотиків *E. Coli* [45].

Резистентність *Escherichia coli* до протимікробних препаратів є надзвичайно важливою проблемою, оскільки вона поширена як серед людей, так і в тваринницькому секторі, як стверджує One Health. У тварин мультирезистентність *E. coli* може призводити до важко-лікувальних інфекцій. Хоча шляхи передачі резистентних ізолятів *E. coli* від тварин до людини ще не повністю з'ясовані, деякі дані підтверджують роль харчового ланцюга. Було показано, що ці бактерії часто колонізують продукти харчування в роздрібній торгівлі у багатьох країнах і континентах. Інші шляхи передачі можуть включати прямий контакт з тваринами або непрямі передачі через навколишнє середовище.

1.5 Поширення *Escherichia coli* на території Німеччини

Escherichia coli широко поширена в Німеччині і може викликати різні проблеми зі здоров'ям. До 2023 року, офіційні дані про кількість випадків зараження *Escherichia coli* в Німеччині за останні 10 років можна знайти у звітах інституту Роберта Коха та інших організаціях з охорони здоров'я та

епідеміологічних досліджень. Також моніторинг та реєстрація *Escherichia coli* у Німеччині здійснюється різними установами, зокрема Інститутом Роберта Коха, Федеральним інститутом оцінки ризиків та державними службами охорони здоров'я та безпеки харчових продуктів. Ці організації регулярно проводять програми епіднагляду для збору даних про інфекції кишкової палички, розслідування спалахів і вжиття заходів профілактики та контролю.

Уряд Німеччини та медичні органи активно вживають різноманітних заходів для запобігання та контролю інфекцій *E. coli*. Це включає проведення програм нагляду за безпекою харчових продуктів і води, освітні кампанії для громадськості з приводу безпечних практик харчування та гігієни, а також оперативне реагування на випадки спалахів. Федеральний інститут оцінки ризиків та інші органи регулярно перевіряють харчові продукти на присутність *E. coli*, особливо на наявність потенційно патогенних штамів, таких як ЕНЕС (ентерогеморрагічна *E. coli*). Відбираються проби різних харчових продуктів, зокрема м'яса, молочних продуктів, фруктів та овочів.

У Німеччині також проводяться різні дослідницькі проекти для вивчення властивостей штамів кишкової палички, включаючи їх фактори вірулентності, стійкість до антибіотиків і моделі поширення.

Продукти харчування, такі як сире м'ясо, непастеризовані молочні продукти та непомиті овочі, можуть стати потенційними джерелами інфекції *E. coli*. Забруднена питна вода також може стати значним джерелом інфекції *E. coli*. Незважаючи на те, що в Німеччині загалом якість питної води висока, місцеві проблеми зі забрудненням води можуть призвести до виникнення спалахів. Протягом останніх років були випадки, коли заражена їжа призводила до спалахів або ізольованих випадків інфекції *E. coli*. В 2011 році в Німеччині стався значний випадок вірулентного штаму кишкової палички *Escherichia coli* O104:H4, який призвів до серйозної епідемії гострого геморагічного синдрому та інших ускладнень. Цей випадок був пов'язаний з споживанням зеленої салату.

У Німеччині, відповідно до дослідження, проведеного інститутом Роберта Коха, шляхи передачі ізольованих випадків захворювання ЕНЕС виявилися залежними від віку. Виявлено, що прямий контакт з рогатою худобою, вівцями або козами є найвищим ризиком захворювання для дітей віком до трьох років, які є групою з найвищим рівнем захворюваності на хвороби ЕНЕС та ГУС. Інші фактори ризику у цієї вікової групи включають споживання сирого молока. З іншого боку, у дітей віком від дев'яти років і дорослих, ймовірно, головним чином виникають харчові захворювання, зокрема, через споживання м'яса ягняти та сирі ковбаси, що є великими факторами ризику.

Одним з ключових шляхів поширення *Escherichia coli* є через продовольчі продукти. Німеччина відома своєю розвиненою сільськогосподарською галуззю, включаючи вирощування овочів, фруктів, зернових та тваринництва. Якщо не дотримуватися належних стандартів гігієни під час виробництва, обробки та переробки продуктів харчування, це може призвести до забруднення їжі бактерією *E. coli*.

РОЗДІЛ II

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1 Сучасні методи виявлення *Escherichia coli*

Етапи ідентифікації та підтвердження наявності *E.coli* включають біохімічні тести, серотипування та дослідження ключових генів, що асоційовані з вірулентністю. Виявлення *E. coli* має велике значення в біологічних та медичних дослідженнях, а також у практиці харчової та водопостачальних галузях. Для цього використовуються різноманітні методи: метод ДНК-зондів, серологічні методи для визначення серотипу *E. Coli*, полімеразна ланцюгова реакція та інші.

Escherichia coli є широко поширеною бактерією, яка зазвичай мешкає в кишечнику людини та тварин. Хоча більшість штамів *E. coli* є нешкідливими, деякі з них можуть спричиняти серйозні захворювання, такі як ентерогеморагічний *E. coli* (ЕНЕС), який може призвести до тяжкої діареї та гемолітико-уремічного синдрому. Визначення серотипу *E. coli* є важливим елементом у діагностиці та епідеміологічному контролі цих інфекцій.

Escherichia coli, що продукує токсин шига є найпоширенішою причиною ГУС. Захворюваність на ГУС серед осіб, інфікованих *Escherichia coli*, коливається від 5% до 15%, переважно вражаючи дітей молодше 5 років. Як правило, діарея з кров'ю з'являється приблизно на 2-3 день після контакту, а симптоми ГУС розвивається через 3-10 днів після початку діареї. Іншими поширеними симптомами є блювота (67%), лихоманка (37%) і біль у животі (29%) [20]. Після потраплення до організму, STEC проникає в слизову оболонку кишечника і виділяє токсин Шига, який зв'язується з рецептором Gb3. Комплекс шига-токсин – Gb3 зв'язується з рибосомами клітин, пригнічуючи синтез білка і викликаючи апоптоз, а також виробляються запальні цитокіни. Окрім цитотоксичних ефектів, шига-токсин може активувати систему

комплементу, пригнічуючи фактор комплементу Н. Після проникнення в кровотік шига-токсин продовжує зв'язуватися з клітинами через рецептор Gb3. Пошкодження ендотелію відбувається через: 1) пряму цитотоксичність шига-токсину; 2) порушення гемостатичного шляху; 3) підвищене вивільнення цитокінів; 4) активацію альтернативного шляху. Це пошкодження ендотелію ініціює патологічні процеси. При атиповому гемолітико-уремічному синдромі (аГУС) активується альтернативний шлях комплементу, з особливим акцентом на регуляторному факторі Н, який стабілізує С3 та інактивує С3b.

Наприклад діагностика ешерихіозів, що спричинені діареєгенними штамами *Escherichia coli*, базується на ізоляції чистої культури патогенного мікроорганізму та його ідентифікації. Для цього беруться зразки випорожнень і блювотних мас. У деяких випадках також вивчають виділення з носа, вуха, кров, сечу. За епідеміологічними ознаками проводяться дослідження харчових продуктів, води, зразки з рук обслуговуючого персоналу та побутових речей.

Культуральний метод є одним з основних способів виявлення *E. coli*. Він включає посів зразків на селективні та диференціальні живильні середовища, такі як агар МакКонкі або агар Ендо. Після інкубації проводиться ідентифікація колоній на основі їх морфологічних та біохімічних властивостей. Цей метод є надійним, але потребує багато часу і спеціального обладнання. Біохімічні тести використовуються для визначення ферментативної активності *E. coli*. Вони включають тести на розщеплення лактози, утворення індолу, відновлення нітратів. Ці тести допомагають підтвердити наявність *E. coli* в зразках. Імуноферментний аналіз заснований на взаємодії антигенів *E. coli* з антитілами. Це високочутливий метод, який дозволяє виявити наявність бактерій у зразках. ІФА може використовуватися для скринінгу великих обсягів зразків, що робить його корисним у масових обстеженнях. Секвенування ДНК використовується для точного визначення штамів *E. coli* та виявлення генів резистентності до антибіотиків. Полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР) є високочутливим і специфічним методом, який дозволяє виявити наявність специфічних генів *E.*

coli шляхом ампліфікації їх ДНК. ПЛР дозволяє швидко виявити навіть невелику кількість бактерій у зразках.

2.2 Метод ДНК-зондів

Зонди нуклеїнових кислот є потужними інструментами, які використовуються для ідентифікації та вивчення специфічних послідовностей ДНК або РНК у складних біологічних зразках. Використання ДНК-зондів для виявлення термолабільних (LT) і термостабільних (ST) ентеротоксинів у ETEC зробило революцію у вивченні цих організмів.

Для підготовки зразків зонда нуклеїнової кислоти зазвичай використовуються два загальні методи. Перший передбачає інокуляцію очищених культур на чашки з агаром для отримання колонійних плям, у яких від 30 до 50 таких культур інокують на чашку. Після інкубації ріст бактерій переноситься на нітроцелюлозний або ватманський фільтрувальний папір для гібридизації (як альтернатива, культури можна вирощувати безпосередньо на нітроцелюлозі, що покриває пластину з агаром). Бактеріальний ріст на папері може бути лізований, денатурований і гібридизований із зондом *in situ*, а потім рентгенографічне зображення генерується під впливом рентгенівської плівки.

Зонди на основі нуклеїнових кислот можуть бути поділені на два типи: олігонуклеотидні і полінуклеотидні (фрагментні). Полінуклеотидні зонди ДНК можуть бути отримані з генів, які кодують певний фенотип, або бути емпіричними зондами, що були виявлені під час широкого тестування і пов'язані з наявністю певного фенотипу. Хоча емпіричні зонди можуть дати корисні результати, зазвичай зонди, які представляють самі гени вірулентності, є більш ефективними.

Олігонуклеотидні зонди отримують з послідовності ДНК цільового гена. Температуру відпалу та інші параметри гібридизації і відмивання потрібно визначати набагато точніше, ніж для полінуклеотидних зондів. Крім того, навіть незначні відмінності між генами вірулентності у різних штаммах можуть

призвести до отримання хибно-негативних результатів при використанні олігонуклеотидних зондів. Тим не менш, олігонуклеотидні зонди мають перевагу у тому, що зазвичай дають швидші і чистіші результати, ніж полінуклеотидні методи, що особливо важливо при скринінгу дуже малих генів.

2.3 Серологічні методи для визначення серотипу *E. Coli*

Серологічні методи - це набір аналітичних технік, що ґрунтуються на взаємодії між антигенами (речовинами, що викликають імунну відповідь) та антитілами (білками, які реагують з антигенами). Один з компонентів реакції завжди відомий, тоді як інший є об'єктом дослідження. Серологічні методи широко використовуються в мікробіології для діагностики патогенних мікроорганізмів.

Визначення серотипу *E. coli* відіграє важливу роль в історії вивчення цих патогенів. До того, як були ідентифіковані специфічні фактори вірулентності у діарейних штаммах *E. coli*, серотипічний аналіз був основним методом диференціації патогенних штамів. Згідно з модифікованою схемою Кауфмана, серотипування *E. coli* здійснюється на основі аналізу їхніх О (соматичних), Н (джгутикових) і К (капсульних) поверхневих антигенних профілів. Аглютинаційні тести є одними з найпоширеніших серологічних методів. Вони включають змішування зразка *E. coli* з специфічною антисироваткою на предметному склі або у пробірці. Наявність аглютинації (утворення видимих грудок) свідчить про позитивну реакцію на відповідний антиген. Наявність К-антигенів спочатку визначали за допомогою бактеріальних аглютинаційних тестів. Штам *E. coli*, який не міг аглютинуватися з антисироваткою О, але ставав аглютинованим після нагрівання культури, вважався таким, що містить К-антиген. На сьогоднішній день відомо 170 різних О-антигенів, кожен з яких визначає певну серогрупу. [31]

Специфічна комбінація О- і Н-антигенів визначає "серотип" ізоляту. *E. coli* певних серогруп можуть бути пов'язані з певними клінічними синдромами,

але загалом серологічні антигени самі по собі не забезпечують вірулентність. Натомість, серотипи та серогрупи виступають легко ідентифікованими хромосомними маркерами, що в свою чергу корелюють з певними вірулентними клонами.

Серологічні методи широко застосовуються для ідентифікації патогенних серотипів *E. coli* в лабораторних умовах.

2.4 Полімеразна ланцюгова реакція. Метод для ампліфікації специфічних фрагментів ДНК *Escherichia coli*

Техніка полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР), винайдена в 1985 році Кері Б. Маллісом, дозволила вченим зробити мільйони копій дефіцитного зразка ДНК. Ця методика зробила революцію в багатьох аспектах сучасних досліджень, включаючи діагностику генетичних дефектів і виявлення патогенних захворювань в клітинах людини. ПЛР є великим прогресом у молекулярній діагностиці патогенних мікроорганізмів, у тому числі *E. coli*. ПЛР-праймери були успішно розроблені для кількох категорій *E. Coli*.

Полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР) — це метод у лабораторній практиці, що дозволяє швидко збільшити кількість конкретного уривка ДНК від мільйонів до мільярдів копій. Цей уривок можна подальшому досліджувати більш детально.

Поява методу ПЛР була визначена передовими досягненнями в області молекулярної генетики, зокрема, завдяки розшифруванню послідовностей геномів деяких мікроорганізмів. Важливим кроком було відкриття унікального ферменту - Таq -ДНК-полімерази, яка знайдена в бактеріях, що існують у гарячих джерелах. Цей фермент відзначається винятковою термостійкістю, здатністю зберігати активність при високих температурах, включаючи 95 °С, і має оптимальну робочу температуру 72 °С.

Існує велика кількість видів ПЛР, основними виділяють:

Стандартна ПЛР – виявляє специфічні гени *E. coli* шляхом ампліфікації ДНК. Використовується для початкової діагностики та підтвердження наявності бактерій.

PCR–RFLP (ПЛР–ПДРФ) – спочатку проводиться ПЛР, після чого отриманий продукт піддається рестрикції.

RT-PCR (Reverse Transcription PCR) – ПЛР із використанням зворотної транскрипції, що дозволяє виявляти експресію певних генів у клітинах.

Nested PCR (вкладена ПЛР) – використовується для зниження кількості побічних продуктів реакції.

Inverse PCR (інвертована ПЛР) – застосовується у випадках, коли відома лише невелика ділянка всередині потрібної послідовності.

ПЛР у реальному часі (qPCR) – є вдосконаленою версією стандартної ПЛР, яка дозволяє одночасно ампліфікувати та моніторити ампліфікацію цільової ДНК в реальному часі. Дозволяє не тільки виявляти, але й кількісно оцінювати кількість ДНК в режимі реального часу. Використовує флуоресцентні зонди або барвники для візуалізації процесу ампліфікації. Полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР) у реальному часі є процесом, який відбувається *in vitro*, призначений для збільшення кількості конкретного фрагмента ДНК у вибірковий спосіб, створюючи велику кількість копій цього фрагмента. Для проведення ПЛР у реальному часі потрібні різні компоненти, включаючи матричну ДНК, праймери, нуклеотиди (dNTP) та термостабільну ДНК-полімеразу. Однією з головних переваг такої техніки є можливість точно визначати кількість початкових цільових послідовностей ДНК та кількість синтезованих ампліконів на кожному етапі реакції. Це важливо для точного визначення рівня мРНК у генетичних дослідженнях та визначення вірусного навантаження у клінічних пробах. Крім того, ця методика дозволяє уникнути додаткових обробок після завершення реакції, що зменшує ризик перехресного забруднення через амплікони з попередніх реакцій. Таким чином, ПЛР у

реальному часі відіграє ключову роль у виявленні та кількісному аналізі цільових нуклеїнових кислот і має широкий спектр застосувань.

Мультиплексна ПЛР – дозволяє одночасно ампліфікувати кілька різних послідовностей ДНК. Використовується для одночасного виявлення кількох патогенних штамів або генів.

Унікальна властивість ДНК полягає в її здатності до самовідтворення після розплітання подвійної спіралі та розділення ланцюгів ДНК. Цей процес, відомий як реплікація, здійснюється за допомогою ферменту ДНК-полімерази, який копіює послідовність ДНК. Реплікація розпочинається з короткого одноланцюгового фрагмента ДНК, відомого як праймер, який зв'язується зі специфічною послідовністю на початку цільового фрагмента ДНК. У результаті реплікації утворюються два однакових подвійноспіральных фрагмента ДНК.

Процеси реплікації відбуваються в пробірці у циклічному режимі. Перехід від однієї стадії до іншої здійснюється зміною температури у реакційній суміші.

Для проведення кожного аналізу методом ПЛР потрібні певні складові, включаючи матричну ДНК, праймери, нуклеотиди і ДНК-полімераза. ДНК-полімераза виступає як ключовий фермент, який з'єднує окремі нуклеотиди, утворюючи кінцевий продукт ПЛР. Нуклеотиди складаються з чотирьох основ - аденіну, тиміну, цитозину і гуаніну, які є будівельними блоками для ДНК-полімерази при створенні продукту ПЛР. Праймери у реакції визначають конкретний уривок ДНК, який потрібно ампліфікувати. Вони представляють собою короткі фрагменти ДНК з певною послідовністю, яка є комплементарною до цільової ДНК, що має бути виявлена та збільшена.

Тақ полімераза

ДНК-полімераза, яка зазвичай використовується в ПЛР, називається Тақ-полімеразою. Цей фермент був вперше виявлений в бактерії *Thermus aquaticus*, яка живе у гарячих джерелах, таких як гарячі джерела термальних вод. Одна з

ключових особливостей Таq полімерази полягає в тому, що вона може працювати при високих температурах, навіть під час денатурації, коли подвійний ланцюг ДНК розділяється на одиничні нитки. Це робить Таq полімеразу ідеальним інструментом для використання в ПЛР, оскільки реакція відбувається при високих температурах, необхідних для розділення подвійного ланцюга ДНК. Таq полімераза дозволяє відтворювати мільйони копій конкретного уривка ДНК шляхом продукції нових молекул ДНК, що є ключовим етапом в ПЛР.

Оптимальна температура активності Таq-полімерази становить 75–80 °С. При цій температурі фермент здатний до швидкої полімеризації, синтезуючи приблизно 150 нуклеотидів за секунду на молекулу ферменту. Однак при відхиленні від цього оптимального діапазону температур швидкість розширення ДНК зменшується. Наприклад, при 70 °С Таq-полімераза синтезує близько 60 нуклеотидів за секунду, а при 55 °С - 24 нуклеотиди за секунду.

При температурах вище 90 °С активність Таq-полімерази знижується, але сам фермент не денатурується і залишається активним. При проведенні реакції важлива присутність певних іонів у реакційній суміші. Навіть невеликі кількості хлориду калію (KCl) та іонів магнію (Mg^{2+}) сприяють ферментативній активності Таq-полімерази.

Використання термостабільної Таq-полімерази дозволяє проводити ПЛР при високих температурах, що сприяє високій специфічності праймерів та зменшує утворення неспецифічних продуктів, наприклад, димерів праймерів. Крім того, використання такої термостабільної полімерази усуває потребу в постійному додаванні нового ферменту на кожному етапі термоцикування. Таким чином, використання полімерази Таq було ключовою ідеєю, яка зробила ПЛР доступною для вирішення багатьох завдань молекулярної біології, пов'язаних з аналізом ДНК.

Дезоксирибонуклеотиди (dNTPs) відіграють ключову роль у полімеразній ланцюговій реакції (ПЛР), яка є методом ампліфікації специфічних послідовностей ДНК. Дезоксирибонуклеотиди (dNTP) – це чотири будівельні блоки (дезоксиаденінотрифосфат (dATP), дезокситимідинотрифосфат (dTTP), дезоксигуанозинотрифосфат (dGTP) і дезоксицитидинотрифосфат (dCTP)), які використовуються ДНК-полімеразою для створення нового ланцюга ДНК під час ПЛР. Наявність всіх чотирьох типів dNTPs (dATP, dGTP, dCTP та dTTP) у правильній пропорції забезпечує точний синтез комплементарних ланцюгів.

Праймери LaC93f/Com-1 та LaC213R/Com-2 були спеціально розроблені для виявлення *E. coli*. Вони є короткими синтетичними олігонуклеотидами, які комплементарні до специфічних ділянок геному *E. coli*. Використання цих праймерів дозволяє забезпечити високу специфічність та чутливість ПЛР для детекції цієї бактерії. Праймери LaC93f/Com-1 та LaC213R/Com-2 є специфічними для виявлення *E. coli* за допомогою ПЛР. Ці праймери можуть бути спрямовані на конкретні гени або регіони ДНК, що є унікальними для *E. coli*. LaC93f має специфічну послідовність, яка зв'язується з певною ділянкою ДНК *E. coli*. Цей форвардний праймер забезпечує початок ампліфікації. Послідовність LaC93f/Com-1 була ретельно вибрана для максимального зв'язування з унікальними послідовностями *E. coli*, що мінімізує ризик неспецифічної ампліфікації. Він забезпечує початок ампліфікації та є критично важливим для ініціації процесу ПЛР. LaC213R/Com-2 реверсний праймер комплементарний до іншої специфічної ділянки ДНК *E. coli*. Він визначає кінцеву точку ампліфікації, забезпечуючи точне і ефективне копіювання цільового фрагмента ДНК. Праймер LaC213R зв'язується з іншою ділянкою ДНК *E. coli*, яка є комплементарною до форвардного праймера. Магній необхідний для активації ДНК-полімерази та підтримання стабільності дводольних структур ДНК.

Хід проведення ПЛР на виявлення ДНК *Escherichia coli*:

1. Підготовка робочого місця до проведення реакції.

2. Спочатку готується «Мастермікс», додавши всі необхідні реагенти для ПЛР в реакційний ковпачок і ретельно перемішуючи. Кількість, яку необхідно приготувати, залежить від кількості ПЛР реакції.

В реакції використовується:

- сліпий контроль,
- позитивний контроль,
- два зразки *Escherichia coli*.

Сліпий контроль служить для перевірки того, що всі використані хімікати не містять ДНК. Усі реагенти слід зберігати в охолоджену контейнері, окрім моменту піпетування. Для кожного етапу дозування береться новий наконечник і використаний викидається у контейнер для відходів. Під час кожного дозування перевіряється наявність рідини в наконечнику піпетки, а також те, що вона повністю додана в змішувальну суміш.

3. «Мастер мікс» необхідно ретельно перемішати.
4. Вноситься 24 мкл «Мастер мікс» у кожен із чотирьох ковпачків для ПЛР-реакцій по 30 мкл..
5. Помістіть кришки для ПЛР-реакцій у термоциклер.

Реагенти і їх кількість для приготування «Мастер міксу»

Реагенти	Об'єм, в мікролітрах	«Мастер мікс», об'єм для 4 зразків
H ₂ O	17	68
Буфер з MgCl ₂	2,5	10
dNTPs	2,5	10
LaC93f/Com-1	0,5	2
LaC213R/Com-2	0,5	2
Taq полімераза	1	4

Всі компоненти змішують у пробірці, після чого поміщають у термоциклер — пристрій, який дозволяє повторювати цикли ампліфікації ДНК у три основні етапи. Термоциклер оснащений термоблоком з отворами, куди вставляють пробірки або пластини з реакційною сумішшю ПЛР. Пристрій змінює температуру блоку в окремих, точних і попередньо запрограмованих кроках. Спочатку реакційну суміш нагрівають до температури, вищої за температуру плавлення двох комплементарних ланцюгів цільової ДНК, що дозволяє їм розділитися в процесі денатурації. Потім температуру знижують, щоб специфічні праймери могли зв'язатися з цільовими сегментами ДНК — цей процес називається гібридизацією або відпалом. Відпал між праймерами та цільовою ДНК відбувається лише за умови комплементарності їх послідовностей. Після цього температуру знову підвищують, що дозволяє ДНК-полімеразі подовжувати праймери, додаючи нуклеотиди до ланцюга ДНК, що розвивається. Кожне повторення цих трьох кроків призводить до подвоєння кількості скопійованих молекул ДНК.

Денатурація – ланцюг ДНК нагрівають приблизно до 95°C протягом 1 хвилини, щоб розділити два ланцюги.

Відпал – температура падає приблизно до 55°C протягом 1 хвилини, коли праймери ДНК приєднуються до 3'-кінця ланцюгів ДНК.

Елонгація – ДНК-полімераза Таq зв'язується з праймером і робить копію ланцюга, цикл триває приблизно при 72°C протягом 2 хвилин. Таq-полімераза є термостійким ферментом, здатним витримувати цикли ПЛР при високих температурах.

Кожен цикл ПЛР подвоює кількість ДНК, тому 30 циклів ПЛР можуть створити приблизно 1 мільярд копій ланцюга ДНК. Після створення великої кількості ДНК лабораторії можуть виділити та виявити послідовність.

**Хід полімеразної ланцюгової реакції, температура і час при яких
проводиться реакція**

Цикл	Назва циклу	Температура	Час
1.	Початкова денатурація	94 °C	3 хв
2.	Денатурація	94 °C	30 с
3.	Відпал	65 – 57 °C	30 с
4.	Елонгація	72 °C	30 с
Цикли 2 – 4 повторюються 16 разів			
5.	Денатурація	94 °C	30 с
6.	Відпал	57 °C	30 с
7.	Елонгація	72 °C	30 с
Цикли 5 – 7 повторюються 9 разів			
8.	Остання елонгація	72 °C	7 хв
9.	Температура зберігання	4 °C	30 с

Існує два основні методи візуалізації продуктів ПЛР: фарбування ампліфікованої ДНК хімічним барвником, таким як бромід етидію або мічення праймерів або нуклеотидів ПЛР флуоресцентними барвниками перед ампліфікацією. Останній метод дозволяє безпосередньо включати мітки в продукт ПЛР. Найпоширенішим методом аналізу продуктів ПЛР є електрофорез в агарозному гелі, який розділяє ДНК-продукти за їх розміром та зарядом. Електрофорез в агарозному гелі є найпростішим способом візуалізації та аналізу продуктів ПЛР, що дозволяє визначити їх наявність і розмір. Одночасно з продуктами ДНК на гель наносять набір зразків із відомими розмірами, що допомагають визначити розмір продукту.

2.5 Електрофорез ДНК в агарозному гелі. Метод для розділення та визначення розміру ампліфікованих фрагментів ДНК.

Електрофорез у агарозному гелі є одним із кількох фізичних методів визначення розміру ДНК. У цьому методі ДНК змушена мігрувати через сильно зшиту агарозну матрицю у відповідь на електричний струм. У розчині фосфати ДНК заряджені негативно, тому молекула буде мігрувати до позитивного (червоного) полюса. Існує три фактори, які впливають на швидкість міграції через гель: розмір ДНК, конформація ДНК та іонна сила робочого буфера.

Електрофорез у агарозному гелі дозволяє відокремити ДНК-фрагменти розміром -100 п. о. до 50000 п. о. для додавання до агарозного гелю в електричному полі. Завдяки негативно зарядженим фосфатним групам ДНК рухається через пори гелю до анода; дрібні фрагменти рухаються швидше, ніж більші, через менший опір (швидкість логарифмічно зменшується зі збільшенням кількості пар основ). Після міграції через агарозний гель фрагменти ДНК можна зробити видимими за допомогою флуоресцентного барвника.

Буфер TAE є одним з найпоширеніших буферів, що використовуються при електрофорезі ДНК. Він складається з трьох компонентів: трис-базований буфер, оцтова кислота, етилендіамінтетраоцтова кислота. Трис-базований буфер це буферний компонент, який підтримує стає значення рН розчину. Оцтова кислота: додає ще один стабілізуючий компонент для підтримання стабільного рН, також допомагає забезпечити оптимальні умови для електрофорезу, особливо при високих напругах. Етилендіамінтетраоцтова кислота: цей компонент додається для зменшення впливу катіонів металів на ДНК під час електрофорезу.

Приготування агарозних гелів

1. Розрахунок маси агарози для підготовки агарозного гелю в колбі Ерленмейера передбачає врахування концентрації агарози у гелі, а також обсягу буфера, щоб забезпечити оптимальні умови для електрофорезу.

2. Залежно від очікуваного розміру ПЛР-продукту (фрагменту ДНК), агарозний гель повинен мати різну концентрацію:

Рекомендовані концентрації агарози в гелі для поділу ДНК

Довжина розділювальних фрагментів ДНК, kb	Концентрація агарози, %
50-1500	2
300-3000	1,5
400-6000	1,2
500-10000	1
800-10000	0,7
1000-20000	0,5

3. Для розчинення агарози в ТАЕ розчин нагрівають протягом 1 хв при максимальній активності в мікрохвильовій печі. Агароза має бути повністю розчинена.

4. Перед заливанням агарози в камеру закріплюють гребінець, щоб отримати лунки в гелі, в які потім піпетують зразки ДНК і маркери. Після того, як розчин агарози трохи охолоне, його виливають у ковзаючий шар гелю, де він застигає.

5. Потім ковзаючий шар гелю з готовим гелем поміщають у камеру для електрофорезу таким чином, щоб відкриті кінці були в напрямку катода (-) та анода (+). Потім гель повинен бути повністю залитий буфером 1xТАЕ.

6. Обережно та без утворення бульбашок вносяться зразки ДНК та маркери (4,5 мкл кожен), які були попередньо змішані з 2 мкл буфера в лунки.

7. Після внесення зразків в гель, відбувається підключення до джерела живлення, при цьому обрана напруга залежить від розміру гелю. Розмір гелю для зразку потребує напруги 130В при 500 мА і 150 Вт.

8. Через 45 хв зразки ДНК відокремлюють і електрику можна вимкнути.

9. Перевірка гелю під УФ-світлом і фотографування гелю цифровою камерою для документування результату.

10. Гель виймається з ємності для гелю та піддається ультрафіолетовому світлу. Найчастіше це робиться за допомогою системи документування гелю. Смуги ДНК мають виглядати як помаранчеві флуоресцентні смуги.

Визначення розмірів ДНК проводиться шляхом порівняння зразків з комерційними фрагментами ДНК відомої довжини (DNA сходи, маркери ДНК). У таких маркерах часто вказується вміст окремих фрагментів, що дозволяє зіставити інтенсивність смуг і швидко оцінити концентрацію ДНК у досліджуваних зразках.

РОЗДІЛ III

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

3.1 Кількість інфікованих на ентерогеморагічну *Escherichia coli* протягом 2014-2023 років в Німеччині.

Деякі штами кишкової бактерії *Escherichia coli* утворюють так звані шига-токсини і можуть викликати сильну криваву діарею. Ці штами називають ентерогеморагічної кишковою паличкою (ЕНЕС). Інфекції ЕНЕС зустрічаються по всьому світу, передача людині відбувається фекально-оральним шляхом, також через заражену їжу або воду. Жуйні тварини, такі як велика рогата худоба, вівці, кози та дикі жуйні (наприклад, олені), є важливими резервуарами та основними джерелами інфекції ентерогеморагічної *E. coli* (ЕНЕС) у людей. Відомо, що інші сільськогосподарські та домашні тварини також можуть виділяти ЕНЕС, хоча значення нежуйних тварин у поширенні збудника та виникненні інфекцій серед людей вважається незначною. Згідно з цими даними, прямий контакт із жуйними тваринами (великою рогатою худобою, вівцями або козами) представляє найбільший ризик зараження для дітей до трьох років, які є найбільш уразливою групою до інфекцій ЕНЕС. Іншими факторами ризику є споживання сирого молока та наявність діареї у членів родини. У дітей старше дев'яти років і дорослих зараження, ймовірно, найчастіше відбувається через їжу, зокрема, споживання м'яса ягняти та сирих ковбас підвищує ризик захворювання.

Найважливішою у світі серогрупою ЕНЕС є O157, це стосується і Німеччини. Іншими часто виділеними серогрупами є O26, O91, O103 і O145.

Шига-токсини зв'язуються зі спеціальними рецепторами клітинних мембран, особливо в ендотелії капілярів, блокують там синтез білка і

призводять до швидкої загибелі клітин. Крім того, багато ЕНЕС мають так званий острівець патогенності, який відповідає за секретійний апарат III типу. З його допомогою ЕНЕС може вводити клітинно-токсичні або інгібуючі або модулюючі білки - у вигляді ін'єкційної голки - безпосередньо в клітину-мішень. Це може призвести до подальших клініко-патогенних ефектів і тим самим збільшити вірулентність ЕНЕС. Ключовою особливістю цього апарату секреції III типу є ген *eae*. Його генний продукт, білок інтимін, дозволяє патогену, серед іншого, тісно прилипати до епітеліальних клітин кишечника. ЕНЕС мають відносно високу екологічну стабільність і хорошу здатність виживати в кислому середовищі. Інфекції ЕНЕС зустрічаються по всьому світу. Частота перенесеного захворювання ЕНЕС є найвищою у дітей віком до 5 років.

Інфекції ЕНЕС можуть залишатися непоміченими через неявні клінічні симптоми. Більшість випадків проявляються у вигляді безкровної, зазвичай водянистої діареї. Супутніми симптомами є нудота, блювання та наростаючий біль у животі, рідше підвищення температури. У багатьох хворих розвивається важка форма геморагічного коліту зі спазмоподібними болями в животі, кривавими випорожненням і іноді лихоманкою. Немовлята, маленькі діти, люди похилого віку та особи з ослабленою імунною системою частіше страждають від серйозних ускладнень. Існує ризик розвитку гемолітико-уремічного синдрому (ГУС), який переважно ураження дітей і характеризується гемолітичною анемією, тромбоцитопенією та ниркової недостатності аж до анурії.

Захворювання на ентерогеморагічну *Escherichia coli* протягом 2014-2023 років в Німеччині завжди коливалося від невеликої кількості випадків до збільшення майже в два рази порівняно з попередніми роками.

Найбільше захворюваності у 2014 році припадає на землі Мекленбург-Передня Померанія, Саксонія, Саксонія-Ангальт і Гамбург. Іншими

федеральними землями зі значним відносним зростанням порівняно з попередніми роками був Берлін і Бранденбург.

Для 1183 випадків захворювання з 1189 було надано інформацію про можливу країну зараження. Німеччина була згадана 1037 разів (87%). Більшість згадок про країну за межами Німеччини становили Туреччина (3%) і на Єгипет, Італію та Намібію (по 1%).

У 2015 році найбільша кількість зареєстрованих випадків була в Саксонії, Мекленбург-Передня Померанія, Саксонія-Ангальт та Рейнланд-Пфальц. Гамбург, Шлезвіг-Гольштейн та Бремен продемонстрували тенденцію до зниження порівняно з попереднім роком.

Найнижчий рівень захворюваності спостерігався у Гамбурзі та Бремені. Зареєстровано 1 випадок смерті, померлою особою виявилася 96-річна жінка.

Кількість випадків у 2016 році зросла на 11% порівняно з попередніми трьома роками. Найвищий показник захворюваності населення було досягнуто в Саксонії-Ангальт, Мекленбург-Передня Померанія, Берлін та Рейнланд-Пфальц. Саксонія, Мекленбург-Передня Померанія, Гамбург, Саар, Бремен і Гессен продемонстрували тенденцію до зниження порівняно з попередніми роками.

У 2017 році найвищий загальнонаціональний показник захворюваності населення було досягнуто в Саксонії-Ангальт, Саксонії, Берліні, Нижній Саксонії, Мекленбург-Передня Померанія, Рейнланд-Пфальц, Шлезвіг-Гольштейн, Гамбург і Тюрінгія. Найнижчий рівень захворюваності був зафіксований у Саар, Гессен та Бремен. За винятком 4 федеральних земель (Саар, Гамбург, Рейнланд-Пфальц і Мекленбург-Передня Померанія), рівень захворюваності був вищим за відповідну медіану попередніх років. Найсильніше відносне зростання захворюваності порівняно з попередніми роками зафіксовано в Бремені, Баден-Вюртемберзі та Саксонії-Ангальт. Найчастіше траплялася діарея, біль у животі, блювота та лихоманка. У 2017

році було зареєстровано 2 (2016: 0) летальні випадки через інфекцію, спричинену ЕНЕС. Це були 2 чоловіки у віці 76 та 89 років.

Найвищий загальнонаціональний показник захворюваності населення у 2018 році зафіксовано в Саксонії-Ангальт, Саксонії, Рейнланд-Пфальц, Бранденбурзі, Тюрингії, Нижній Саксонії, Шлезвіг-Гольштейні, Берліні та Гамбурзі і були перевищені, в деяких випадках значно.

Найнижчі показники захворюваності були зафіксовані в Гессені, Саар, Бремени, Північний Рейн-Вестфалія, Баден-Вюртемберг, Мекленбург-Передня Померанія та Баварія. За винятком Гамбурга та Мекленбурга-Передньої Померанії, захворюваність у всіх федеральних землях була вище середнього значення за 5 попередніх років. Найсильніше відносне зростання захворюваності було зафіксовано в Гамбурзі та Мекленбурга-Передньої Померанії. Різке відносне зростання захворюваності було зафіксовано в Бремени, Тюрингії, Баден-Вюртемберзі та Бранденбурзі. У 2018 році було зареєстровано 2 (2017: 2) летальні випадки внаслідок інфекцій, спричинених ЕНЕС. Це були чоловік та жінка у віці 74 та 82 років.

У 2019 році найвищий показник захворюваності було досягнуто в Саксонії-Ангальт, Рейнланд-Пфальц, Саксонії, Гамбурзі, Мекленбурзі-Передній Померанії, Нижній Саксонії, Шлезвіг-Гольштейні, Тюрингії та Берліні. Найнижчі показники захворюваності були зафіксовані в Бремени, Гессені, Саарі, Баварії, Північний Рейн-Вестфалії, Баден-Вюртемберзі та Бранденбург. Найсильніше відносне зниження захворюваності зафіксовано в Саксонії, Баварії. Зафіксований один летальний випадок внаслідок інфікування ЕНЕС. (Додаток 1)

У 2020 році домінуючою інфекційною хворобою, що підлягає повідомленню, була коронавірусна хвороба 2019 року (COVID-19). Пандемія COVID-19 призвела до величезного навантаження на Службу громадського здоров'я і мала різноманітні наслідки для виникнення та реєстрації інших

інфекційних захворювань, що підлягають повідомленню. У 2020 році спостерігалось значне зниження кількості інфікованих по всіх федеральних землях Німеччини, що може характеризуватися початком пандемії COVID-19 і введенням карантинних заходів.

У 2021 році найвищі показники були Рейнланд-Пфальц, Баварії та Нижній Саксонії. Найнижчі показники були в Берліні і Бремені.

2022 рік характерний зростанням кількості інфікованих, найвищий показник захворюваності в Баден-Вюртемберзі, Північний Рейн-Вестфалії і Саксонії.

У 2023 році можна спостерігати різке зростання кількості інфікованих майже вдвічі порівняно з минулим роком. Найвищий рівень інфікування зосереджений у Баден-Вюртемберзі, Баварії, Нижній Саксонії, Північний Рейн-Вестфалії.

Загальна кількість випадків ЕНЕС в Німеччині мала тенденцію до зменшення протягом 2014-2020 років, зі зростанням у 2016-2018 роках та подальшим зменшенням у 2019-2020 роках і різким зростанням у 2023 році (Рис. 6). З 2014 по 2018 рік кількість випадків ЕНЕС збільшувалася з 1652 у 2014 році до 2228 у 2018 році. Це може вказувати на збільшення уваги до проблем інфекції або покращення системи звітності та діагностики. У 2019 та 2020 роках спостерігалось зменшення кількості випадків, з 1877 у 2019 році до 1370 у 2020 році. 2014-2020 роки: Протягом цього періоду спостерігається певна стабільність у кількості інфікованих, хоча є деякі коливання. У 2021-2023 роках відбувається значне збільшення кількості інфікованих. Наприклад, у 2023 році кількість інфікованих сягнула рекордних 3358 випадків.

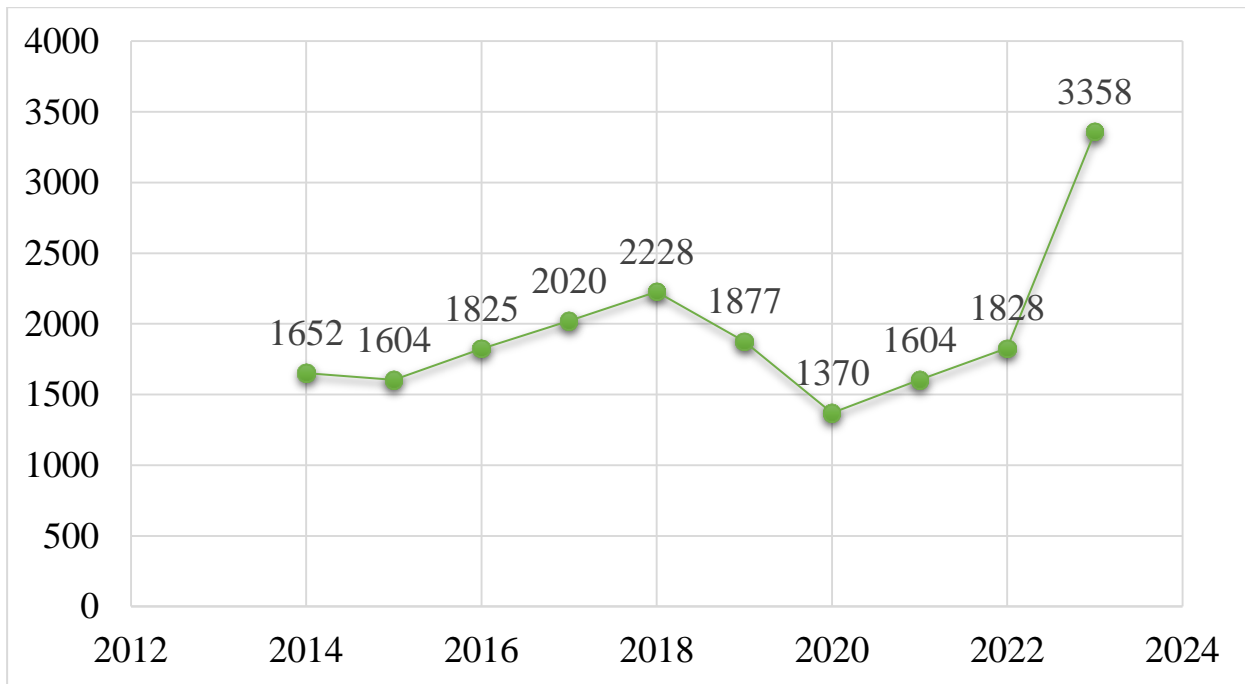


Рис. 6. Кількість інфікованих на ентерогеморагічну *Escherichia coli* протягом 2014-2020 років в Німеччині.

Загалом можна помітити тенденцію зростання кількості інфікованих протягом останніх років, з особливо вираженим зростанням у 2023 році.

Незважаючи на загальну тенденцію, кількість випадків ЕНЕС коливалася протягом років. Це може бути пов'язано з різними факторами, такими як погодні умови, харчові вибори населення, щільність населення. Карантинні заходи, введені у багатьох країнах у зв'язку з COVID-19, могли сприяти зменшенню ризику інфікування ЕНЕС у 2019-2020 році через такі фактори, як зменшення контактів між людьми, строгіші гігієнічні заходи, обмеження відвідування громадських місць та зміни у харчових звичках населення. Покращення гігієнічних стандартів та превентивних заходів також можуть бути чинниками, що сприяють зменшенню поширення ЕНЕС.

Загальною тенденцією є зростання кількості випадків ЕНЕС протягом досліджуваного періоду, з деякими коливаннями в різних землях та в різні роки (Рис. 7). Однак у 2019-2020 роках спостерігалось загальне зменшення кількості випадків.

Баден-Вюртемберг: кількість інфікованих варіювала від 104 до 306 протягом досліджуваного періоду. Найвища кількість інфікованих була зафіксована у 2023 році (306).

Баварія: кількість інфікованих у Баварії також коливалася, з найнижчим показником у 2020 (186) році та найвищим у 2018 році (321).

Гессен залишався на середньому рівні протягом періоду, зі значним зростанням у 2023 році (113).

Нижня Саксонія також спостерігала коливання кількості інфікованих, з найвищим показником у 2023 році (588).

Кількість інфікованих у Північному Рейні-Вестфалії зростала протягом більшості років, з найвищим показником у 2023 році (1107).

У Рейнланд-Пфальц також спостерігалися коливання кількості інфікованих, з найбільшим показником у 2018 році (151).

У Саксонії кількість інфікованих також змінювалася, з найбільшим показником у 2014 році (209).

Баден-Вюртемберг, Баварія, Північний Рейн-Вестфалія – ці землі мають найвищі показники кількості випадків ЕНЕС протягом більшості років. Найбільша кількість випадків спостерігалася у Північному Рейн-Вестфалії, з особливо високими значеннями у 2016 та 2018 роках (Табл.7). Через найбільшу кількість і густоту населення в Північному Рейн-Вестфалії (17 млн) можна припустити високий рівень показників поширенню ЕНЕС. Цей регіон має значну промислову і сільськогосподарську діяльність, що може бути пов'язане з більшим ризиком інфікування через потенційне забруднення навколишнього середовища. Також Північний Рейн-Вестфалія є важливим транспортним вузлом, через який проходить багато міжнародних та національних маршрутів. Це може призводити до поширення інфекції через переміщення людей та товарів.

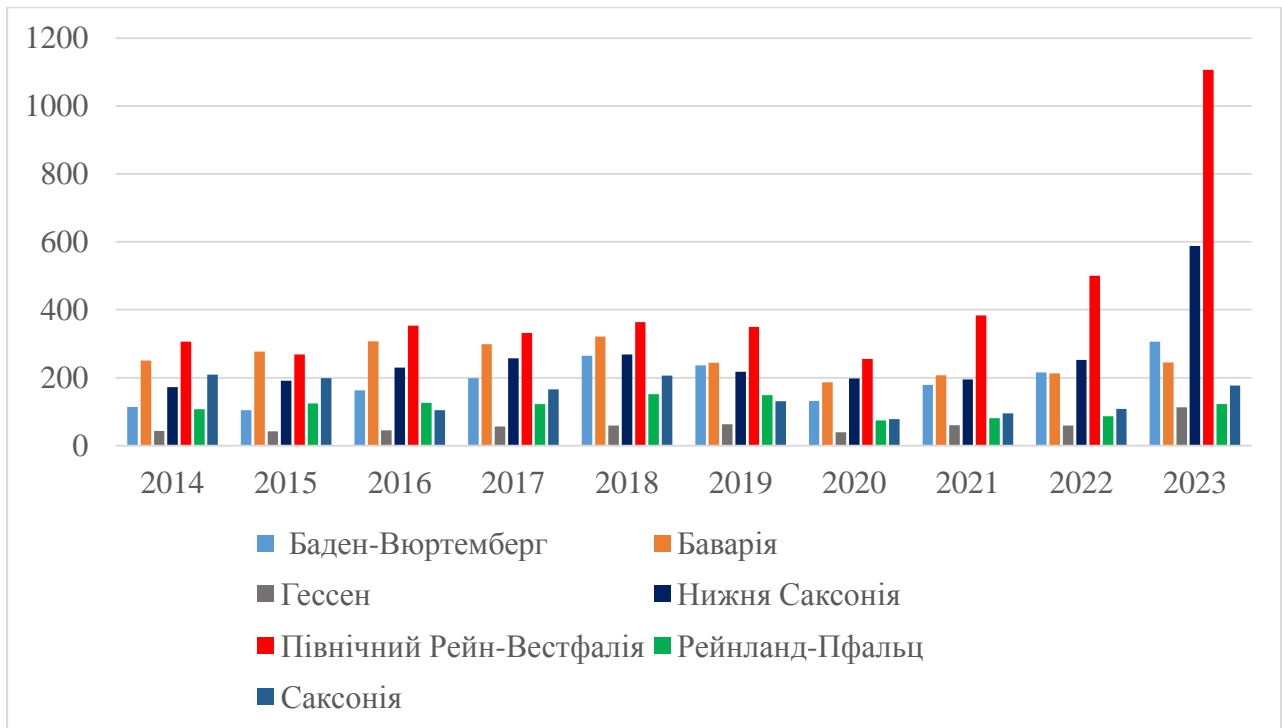


Рис. 7. Кількість інфікованих на ентерогеморагічну *Escherichia coli* в найбільш населених землях Німеччини протягом 2014-2023 років

За даними за 2019 та 2023 роки, кількість інфікованих на ентерогеморагічну *Escherichia coli* (ЕНЕС) на 100 тис. населення на території Німеччини була різноманітною по різних федеральних землях (Рис. 8). У 2019 році розпочалася пандемія COVID-19, і протягом 2019-2022 років були поширені карантинні заходи. Після остаточного завершення карантинних обмежень у більшості земель спостерігалось збільшення кількості випадків на 100 тис. осіб з 2019 роком. Значний ріст відбувся в Мекленбург-Передній Померанії, Саксонії та Бремені. Міграційні шляхи та центри, такі як Берлін, Бремен, Гамбург, можуть відображати високі рівні захворюваності, що може бути пов'язане зі збільшеним потоком мігрантів та біженців у ці регіони. Мігранти та біженці часто знаходяться у групах з низьким соціально-економічним статусом, що може призвести до погіршення умов проживання та доступу до медичних послуг.

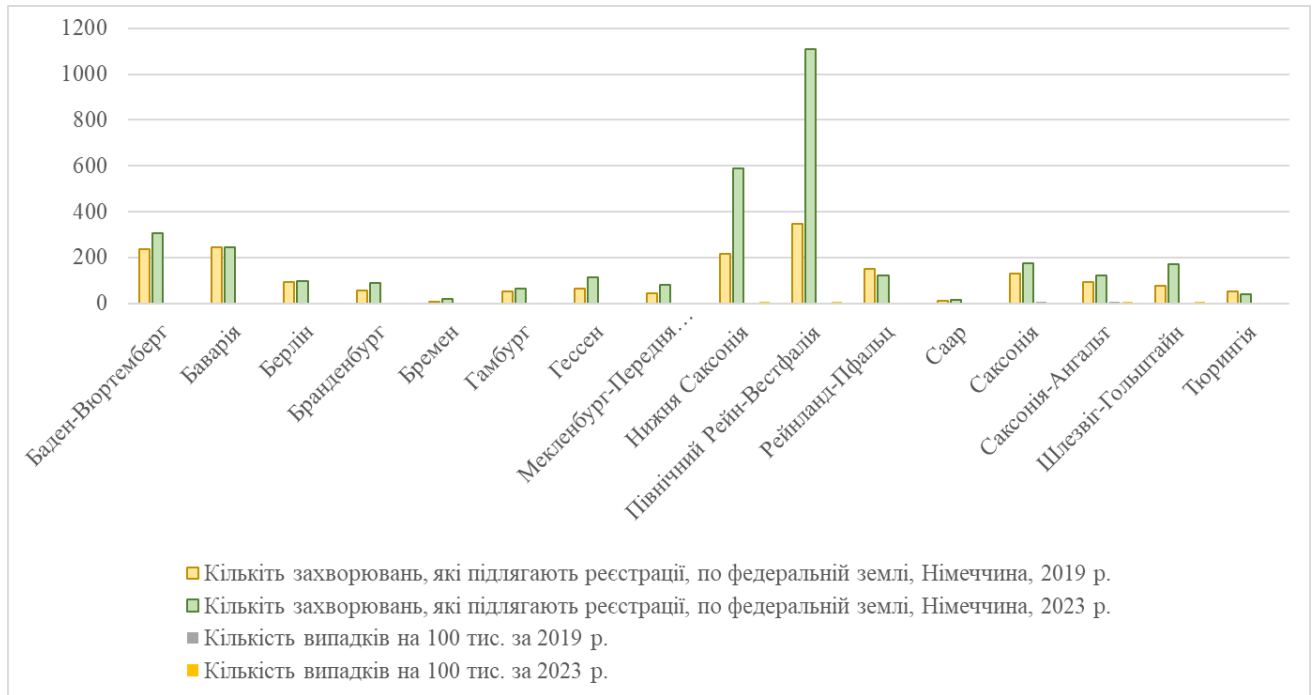


Рис. 8. Кількість інфікованих на ентерогеморагічну *Escherichia coli* на 100 тис. населення за 2019 та 2023 роки на території Німеччини

Кількість випадків інфікування ентерогеморагічною *Escherichia coli* та гемолітико-уремічним синдромом у Німеччині виявляє коливання протягом років 2014-2020 (Рис. 9). Можна спостерігати певну зміну кількості випадків ентерогеморагічної *Escherichia coli* (ЕНЕС) та гемолітико-уремічного синдрому (ГУС) з 2014 по 2020 роки. У 2017 році було зафіксовано високу кількість випадків ЕНЕС (2020) та найвищу кількість випадків ГУС (97), тоді як у 2020 році було зафіксовано найнижчу кількість випадків як ЕНЕС (1370), так і ГУС (49). Це може бути відображенням впливу пандемії COVID-19 на здоров'я громадян та вжитих превентивних заходів.

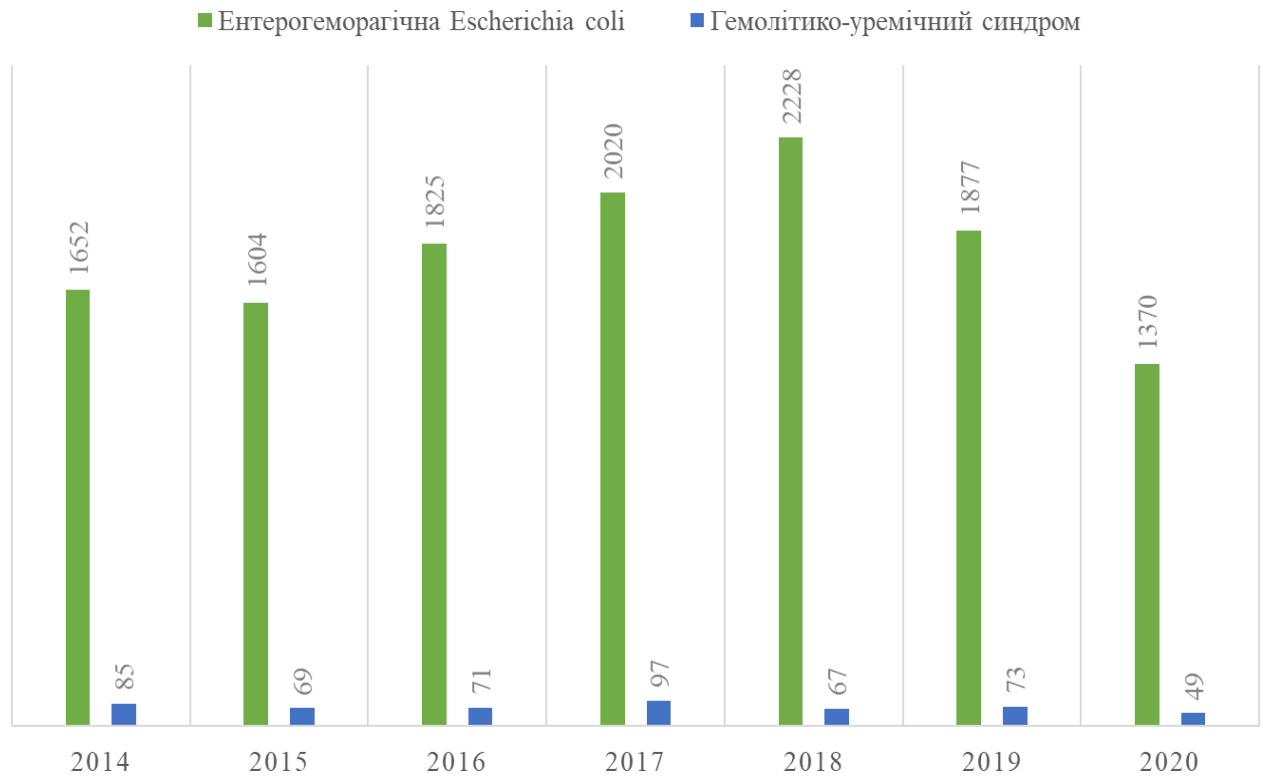


Рис. 9. Кількість щорічно зареєстрованих на ентерогеморагічну *Escherichia coli* та гемолітико-уремічний синдром у Німеччині з 2014 по 2020 роки

Існують кілька можливих причин для зміни тенденцій поширення цих інфекційних захворювань, включаючи епідеміологічні фактори, використання та обробку харчових продуктів, гігієну, а також зміни в діагностичних методах та в усвідомленості населення.

3.2 Сезонні коливання інфікованих на ентерогеморагічну *Escherichia coli*

Інфікування бактерією спостерігається в усі сезони, проте чисельність значно варіюється. Найвищі значення випадків інфікування зафіксовані влітку та восени, а найнижчі - взимку та навесні. Ця тенденція може бути пов'язана з різними факторами, такими як температура, погода, споживання їжі та гігієнічні звички. Для багатьох штамів *E. coli* оптимальна температура для росту знаходиться в діапазоні від приблизно 37 до 42 градусів Цельсія.

Вища температура і вологість, характерні для літніх та осінніх місяців, можуть створювати сприятливе середовище для розмноження бактерій,

включаючи ЕНЕС. У спекотну погоду люди частіше відвідують публічні місця, такі як пляжі та парки, де може бути менше можливостей для дотримання гігієнічних стандартів, що також може сприяти поширенню інфекції. У літні місяці люди частіше віддають перевагу сирій їжі, такій як салати з овочів та фруктів. Якщо ці продукти не належним чином миті та оброблені, це може призвести до інфікування ЕНЕС. Висока вологість і тепло сприяють швидшому розмноженню бактерій у навколишньому середовищі, що може збільшувати ризик контакту з ЕНЕС.

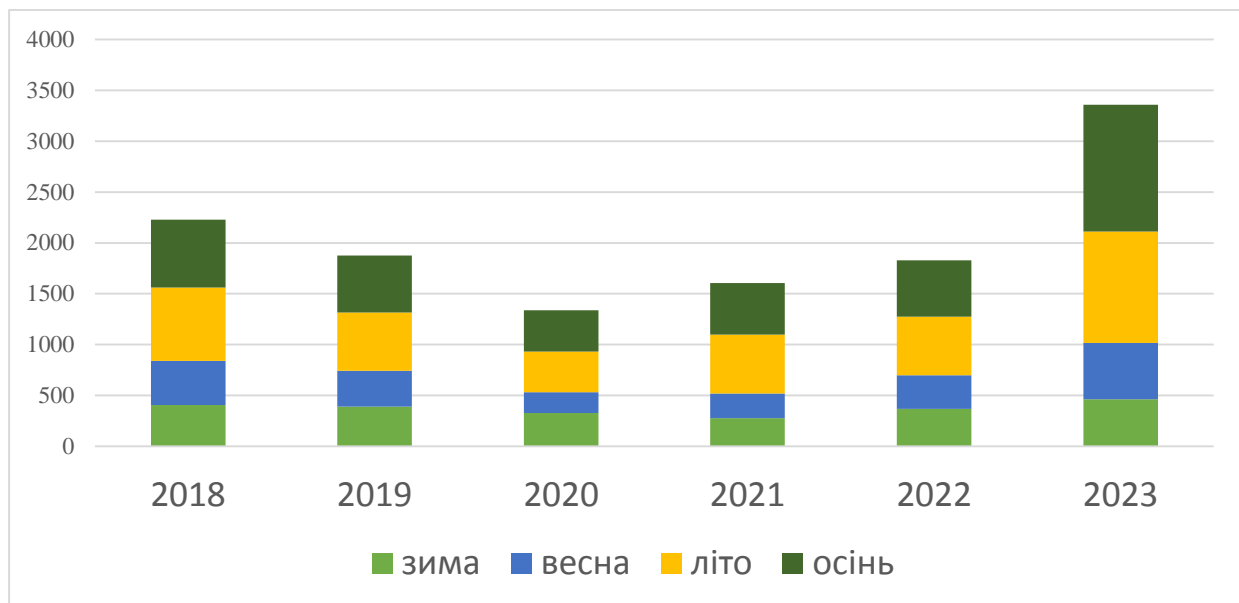


Рис. 10. Сезонні коливання інфекції викликані ентерогеморагічну *Escherichia coli*

Для зменшення ризику зараження ЕНЕС включають належну термічну обробку харчових продуктів, дотримання правил гігієни, обмеження споживання непастеризованих молочних продуктів та належне миття фруктів і овочів. Важливо також уникати купання в потенційно забруднених водоймах та забезпечити чистоту води, яка використовується для пиття та приготування їжі.

3.3 Виявлення *Escherichia coli* за допомогою методу ПЛР і електрофорезу ДНК в агарозному гелі.

У результаті застосування методу ПЛР та електрофорезу ДНК в агарозному гелі для виявлення *Escherichia coli* було успішно підтверджено наявність цієї бактерії у досліджуваному зразку. Використання специфічних праймерів, призначених для розпізнавання генетичних послідовностей *E. coli*, дозволило ампліфікувати цільову ДНК під час реакції ПЛР. Після завершення реакції та вироблення копій цільової ДНК, отримані фрагменти були розділені за допомогою електрофорезу у агарозному гелі.

Під час електрофорезу виявлено наявність характерного розмірного фрагмента ДНК *Escherichia coli*. Цей фрагмент був ідентифікований за допомогою порівняння зі стандартними фрагментами ДНК. Таким чином, наявність *Escherichia coli* у досліджуваному зразку була успішно підтверджена.

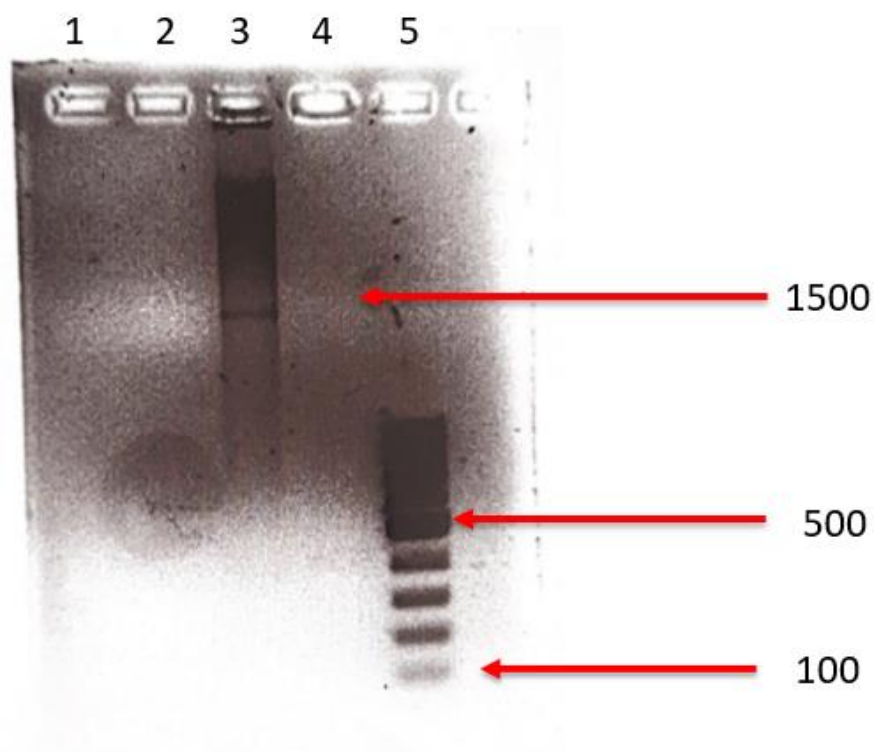


Рис. 11. Агарозний гель після електрофорезу ДНК (доріжка 1: сліпий контроль; доріжки 3: фрагменти ДНК відомої довжини *Escherichia coli* (1500); доріжка 5: маркер довжини)

Електрофорез у агарозному гелі виявився ефективним та надійним способом розділення нуклеїнових кислот. Висока міцність гелю агарози дозволяє працювати з гелями з низьким відсотком для розділення великих фрагментів ДНК.

Полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР) має безліч переваг. По-перше, вона є простою технікою, яку легко вивчити та використовувати, і вона швидко дозволяє отримати результати. Це дуже чутлива методика, яка може створювати від мільйонів до мільярдів копій певного продукту для подальшого секвенування, клонування та аналізу. ПЛР дозволяє ампліфікувати конкретні фрагменти ДНК, що дозволяє проводити аналізи вибіркової ДНК з мінімальною кількістю загальної ДНК. Це робить її ідеальним інструментом для виявлення конкретних генетичних властивостей або патогенів. ПЛР може бути виконана за декілька годин. Це значно швидше, ніж альтернативні методи аналізу ДНК, такі як клонування та секвенування.

Незважаючи на вищезазначені переваги, ПЛР має свої обмеження. Завдяки великій чутливості, навіть найменші домішки ДНК у зразку можуть спричинити неточні результати. Крім того, для розробки праймерів для ПЛР потрібні попередні дані щодо послідовності, що обмежує використання методу лише для виявлення відомих збудників або генів. Іншим обмеженням є можливість неспецифічного зв'язування праймерів з подібними, але не повністю ідентичними послідовностями ДНК. Крім того, ДНК-полімераза може вводити помилкові нуклеотиди у послідовність ПЛР, хоча це відбувається дуже рідко.

ЗАГАЛЬНІ ВИСНОВКИ

1. Полімерна ланцюгова реакція є ефективним методом для діагностики інфекцій, викликаних *Escherichia coli*, завдяки своїй високій чутливості та специфічності. ПЛР є надзвичайно дієвим методом для ампліфікації специфічних послідовностей ДНК, що дозволяє швидко і точно ідентифікувати присутність *Escherichia coli*. ПЛР є високочутливим методом, що дозволяє виявляти навіть мінімальні кількості бактеріальної ДНК. Після проведення ПЛР продукти ампліфікації були проаналізовані за допомогою електрофорезу в агарозному гелі, що дозволило візуалізувати результати реакції та визначити довжину фрагменту ДНК.

2. Кількість випадків щорічно коливається залежно від таких факторів, як заходи охорони здоров'я та методи обробки харчових продуктів; зокрема у 2018 році спостерігалось значне збільшення кількості інфікованих на ентерогеморагічну *Escherichia coli* (2228), а у 2020 році – зниження кількості випадків захворюваності (1370), що може бути пов'язано з карантинними обмеженнями, викликаними пандемією коронавірусної хвороби. Різке

збільшення інфікованих (3358) у 2023 році, може бути викликане остаточним зняттям обмежень COVID-19 і високим рівнем внутрішніх і міжнародних міграцій населення.

3. Аналіз епідеміологічних даних показав, що інтенсивність зараження ентерогеморагічною *Escherichia coli* в Німеччині варіюється за регіонами. Продемонстровано, що у землях Північний Рейн-Вестфалія, Баварія, Нижня Саксонія, Баден-Вюртемберг зосереджена найвища кількість інфікованих на ентерогеморагічну *Escherichia coli*, Ці регіони мають високий рівень урбанізації, з великими містами, такими як Кельн, Мюнхен, Ганновер та Штутгарт, де висока щільність населення, підвищена мобільність і велика кількість громадських місць, що сприяє швидшому поширенню інфекцій. Особливо високі показники були у 2023 році в Північний Рейн-Вестфалія (1107) та Нижня Саксонія (588).

4. У зимовий і весняні періоди спостерігається зниження кількості випадків порівняно з літом і осінню. Влітку спостерігається більше випадків інфікування ЕНЕС, що може бути пояснено такими факторами: високі температури сприяють швидшому розмноженню бактерій, особливо в ґрунті та воді, інтенсивніше відвідування місць, де можливе контактування з тваринами, які є носіями ЕНЕС, частіші подорожі в країни з високою поширеністю ЕНЕС.

СПИСОК ВИКОРИСАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. В.В. Мінухін, Н.І. Коваленко, Т.М. Замазій Методичні вказівки з дисципліни "Мікробіологія, вірусологія та імунологія з мікробіологічною діагностикою до практичних занять для студентів-бакалаврів III–IV курсу за спеціальністю "Лабораторна діагностика" – Харків: ХНМУ, 2014. – 44 с.
2. П'яткін К.Д. Мікробіологія з вірусологією та імунологією, 1992. – 431 с
3. Сайт Інституту Роберта Коха
https://www.rki.de/SiteGlobals/Forms/Suche/serviceSucheForm.html?nn=2374622&resourceId=2390936&input_=16679042&pageLocale=de&searchEngineQueryString=Infektionsepidemiologisches+Jahrbuch+meldepflichtiger+Krankheiten+f%20C3%BCr+2021&submit.x=0&submit.y=0
4. Сайт Федерального інституту оцінки ризиків (BfR)
https://www.bfr.bund.de/de/az_index/ehc_enterohaemorrhagische_escherichia_coli-5233.html

5. Abramoff, P., La Via, M.F. *Biology of the Immune Response*. McGraw-Hill, 1970.
6. *Agarose Gel Electrophoresis for the Separation of DNA Fragments*, 2012
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4846332/>
7. *Antimicrobial Resistance in Escherichia coli*, 2018
<https://journals.asm.org/doi/10.1128/microbiolspec.arba-0026-2017>
8. Bai, X., Fu, S., Zhang, J., Fan, R., Xu, Y., Sun, H., et al. Identification and pathogenomic analysis of an *Escherichia coli* strain producing a novel Shiga toxin 2 subtype, 2018.
9. Bao, L., Peng, R., Ren, X., Ma, R., Li, J., Wang, Y. Analysis of some common pathogens and their drug resistance to antibiotics, 2013, 135–139.
10. Bockemühl J, Karch H, Tschäpe H: Infektionen des Menschen durch enterohämorrhagische *Escherichia coli* (EHEC) in Deutschland; 1996, 194–197.
11. Bruce Alberts, Alexander Johnson, Julian Lewis, Martin Raff, Keith Roberts, and Peter Walter. *Molecular Biology of the Cell*, 4th edition.
12. C.A. Hart, R.M. Batt, J.R. Saunders. Diarrhoea caused by *Escherichia coli* *Annals of Tropical Paediatrics*, 1993; 121-131.
13. Christina Welinder-Olsson, Bertil Kaijser. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC), 2009; 405-416.
14. *Detection of Escherichia coli in Food Samples Using Culture and Polymerase Chain Reaction Methods*, 2022
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9860202/>
15. *Diarrheogenic Escherichia coli*
<https://journals.asm.org/doi/full/10.1128/cmr.11.1.142>
16. EHEC (enterohämorrhagische *Escherichia coli*-Bakterien)
https://www.lgl.bayern.de/gesundheit/infektionsschutz/infektionskrankheiten_a_z/ehec/index.htm

17. Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* in human medicine, 2005
https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1438422105000901?casa_token=mFfNQkw6A8MAAAAAA
18. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* and Other *E. coli* Causing Hemolytic Uremic Syndrome, 2016
https://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/e_coli.pdf#:~=URL%3A%20https%3A%2F%2Fwww.cfsph.iastate.edu%2FFactsheets%2Fpdfs%2Fe_coli.pdf%0AVisible%3
19. Erick Denamur, Olivier Clermont, Stéphane Bonacorsi & David Gordon. The population genetics of pathogenic *Escherichia coli*, 2021
<https://www.nature.com/articles/s41579-020-0416-x>
20. Genomics and pathotypes of the many faces of *Escherichia coli*. PubMed Central (PMC)
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9629502/>
21. Growth rate of *Escherichia coli*, 1991
<https://journals.asm.org/doi/abs/10.1128/mr.55.2.316-333.1991>
22. Hemolytic Uremic Syndrome, 2023
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK556038/>
23. Identification and characterization of Shiga Toxin (Verocytotoxin)-producing *Escherichia coli* (STEC/VTEC) by Real Time PCR amplification of the main virulence genes and the genes associated with the serogroups mainly associated with severe human infections. Laboratory for *E. Coli*. Department of Food Safety, Nutrition and Veterinary Public Health Microbiological Food safety and Food-borne Diseases Unit Istituto Superiore di Sanità.
24. Identification of the subtypes of Shigatoxin encoding genes (stx) of *Escherichia coli* by conventional PCR. Laboratory for *E. Coli*. Department of Food Safety, Nutrition and Veterinary Public Health Microbiological Food safety and Food-borne Diseases Unit Istituto Superiore di Sanità.

25. Improved detection of Escherichia coli and coliform bacteria by multiplex PCR, 2015 <https://bmcbiotechnol.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12896-015-0168-2>
26. Infektionsepidemiologisches Jahrbuch meldepflichtiger Krankheiten für 2014, 2015
https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/Jahrbuch/Jahresstatistik_2014.pdf?__blob=publicationFile
27. Infektionsepidemiologisches Jahrbuch meldepflichtiger Krankheiten für 2015, 2016
https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/Jahrbuch/Jahresstatistik_2015.pdf?__blob=publicationFile
28. Infektionsepidemiologisches Jahrbuch meldepflichtiger Krankheiten für 2016, 2017.
https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/Jahrbuch/Jahresstatistik_2016.pdf?__blob=publicationFile
29. Infektionsepidemiologisches Jahrbuch meldepflichtiger Krankheiten für 2017, 2018
https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/Jahrbuch/Jahresstatistik_2017.pdf?__blob=publicationFile
30. Infektionsepidemiologisches Jahrbuch meldepflichtiger Krankheiten für 2018, 2019
https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/Jahrbuch/Jahresstatistik_2018.pdf?__blob=publicationFile
31. Infektionsepidemiologisches Jahrbuch meldepflichtiger Krankheiten für 2019, 2020
https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/Jahrbuch/Jahresstatistik_2019.pdf?__blob=publicationFile
32. Infektionsepidemiologisches Jahrbuch meldepflichtiger Krankheiten für 2020, 2021

https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/Jahrbuch/Jahrbuch_2020.pdf?__blob=publicationFile

33. James B. Kaper, James P. Nataro & Harry L. T. Mobley. Pathogenic *Escherichia coli*.
34. J.P. Nataro, J.B. Kaper Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews*, 1998; 142-201.
35. M. Adhikari, Y. Coovadia, J. Hewitt. Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) and enterotoxigenic (ETEC) related diarrhoeal disease in a neonatal unit *Annals of Tropical Paediatrics*, 1985; 19-22.
36. M. Hartung und A. Käsbohrer. Erreger von Zoonosen in Deutschland im Jahr 2011
<https://repository.publisso.de/resource/fri:5199466-1/data>
37. National Research Council (US) Subcommittee on Microbiological Criteria. An Evaluation of the Role of Microbiological Criteria for Foods and Food Ingredients.
38. Patel, Isha; Mammel, Mark; Gangiredla, Jayanthi. Detection of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* from Ready-to-Eat Romaine Lettuce Using Targeted Amplicon Sequencing Approach
39. Philips G. B., R. S. Runkle. *Laboratory design for microbiological safety*, 196. 378–389.
40. *Research Techniques Made Simple: Polymerase Chain Reaction (PCR)*, 2013
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4102308/>
41. Role of the Laboratory in the Diagnosis of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* Infections, 2002
<https://journals.asm.org/doi/full/10.1128/jcm.40.8.2711-2715.2002>
42. Samuel Baron. *Medical Microbiology*, 4th edition.
43. Sarah A. Ison, Sabine Delannoy, Marie Bugarel, a Tiruvoor G. Nagaraja, David G. Renter, Henk C. den Bakker, Kendra K. Nightingale, Patrick Fach, Guy H. Loneragan. Targeted Amplicon Sequencing for Single-Nucleotide-Polymorphism Genotyping of Attaching and Effacing *Escherichia coli* O26

44. Cattle Strains via a High-Throughput Library Preparation Technique, 2016.
45. Shigatoxin-bildende E. coli in Lebensmitteln: Vorhersage des krankmachenden Potenzials der verschiedenen Stämme noch nicht möglich, 2020
<https://www.bfr.bund.de/de/start.html>
46. Simultaneous detection of various pathogenic Escherichia coli in water by sequencing multiplex PCR amplicons, 2022
<https://journals.asm.org/doi/full/10.1128/jcm.40.8.2711-2715.2002>
47. The Diversity of Escherichia coli Pathotypes and Vaccination Strategies against This Versatile Bacterial Pathogen, 2023 <https://www.mdpi.com/2076-2607/11/2/344>
48. Yoshihiro Suzuki , Hiroki Shimizu, Shouichiro Tamai, Yuki Hoshiko, Toshinari Maeda, Kei Nukazawa, Atsushi Iguchi, Yoshifumi Masago, Satoshi Ishii. Simultaneous detection of various pathogenic Escherichia coli in water by sequencing multiplex PCR amplicons, 2022.
49. Samuel Baron. Medical Microbiology, 4th edition.
50. The Diversity of Escherichia coli Pathotypes and Vaccination Strategies against This Versatile Bacterial Pathogen, 2023 <https://www.mdpi.com/2076-2607/11/2/344>

ДОДАТОК А

Кількості випадків інфікування ентерогеморагічною *Escherichia coli* (ЕНЕС) протягом 2014-2023 років на різних федеральних землях Німеччини.

	Баден-Вюртемберг	Баварія	Берлін	Бранденбург	Бремен	Гамбург	Гессен	Мекленбург-Передня Померанія	Нижня Саксонія	Північний Рейн-Вестфалія	Рейнланд-Пфальц	Саар	Саксонія	Саксонія-Ангальт	Шлезвіг-Гольштайн	Тюрингія	Разом
Кількість захворювань, які підлягають реєстрації, по федеральній землі, Німеччина, 2014 р.	114	250	85	41	3	53	43	99	172	306	107	4	209	92	39	35	1652
Кількість захворювань, які підлягають реєстрації, по федеральній землі, Німеччина, 2015 р.	104	277	95	48	3	34	42	62	191	268	124	10	199	84	27	36	1604
Кількість захворювань, які підлягають реєстрації, по федеральній землі, Німеччина, 2016 р.	163	307	115	57	2	54	45	55	230	353	126	9	104	92	77	36	1825
Кількість захворювань, які підлягають реєстрації, по федеральній землі, Німеччина, 2017 р.	199	299	134	57	9	49	56	52	257	332	122	6	166	142	83	56	2020

Кількість захворювань, які підлягають реєстрації, по федеральній землі, Німеччина, 2018 р.	265	321	109	87	12	52	59	39	268	364	151	10	206	120	91	74	2228
Кількість захворювань, які підлягають реєстрації, по федеральній землі, Німеччина, 2019 р.	236	244	94	57	6	52	63	45	217	349	149	12	131	92	75	54	1877
Кількість захворювань, які підлягають реєстрації, по федеральній землі, Німеччина, 2020 р.	132	186	75	39	7	39	39	76	198	255	74	9	78	64	65	28	1370
Кількість захворювань, які підлягають реєстрації, по федеральній землі, Німеччина, 2021 р.	180	208	67	49	5	33	60	52	195	385	81	9	97	80	65	38	1604
Кількість захворювань, які підлягають реєстрації, по федеральній землі, Німеччина, 2022 р.	216	213	64	57	11	34	59	42	252	500	86	13	108	59	84	39	1828

Кількість захворювань, які підлягають реєстрації, по федеральній землі, Німеччина, 2023 р.	306	245	97	88	18	66	113	79	588	1107	122	17	177	123	171	41	3358
--	-----	-----	----	----	----	----	-----	----	-----	------	-----	----	-----	-----	-----	----	------

Порівняння методів діагности

Методи	Серологічні методи	Полімеразна ланцюгова реакція	Метод ДНК-зондів
Принцип методу	Засновані на взаємодії антитіл з антигенами	Ампліфікація та виявлення конкретної послідовності ДНК	Визначення наявності або кількості конкретної ДНК-послідовності
Ціль дослідження	Детектування антитіл, що утворюються в організмі під час імунної відповіді на певний антиген	Визначення наявності або кількості конкретної ДНК-послідовності	Визначення наявності або кількості конкретної ДНК-послідовності
Чутливість	Обмежена чутливістю та специфічністю	Дуже висока чутливість, можливе виявлення навіть невеликих кількостей ДНК	Дуже висока чутливість, можливе виявлення навіть невеликих кількостей ДНК
Час виконання	Може займати кілька годин або навіть днів	Швидкий, результати можуть бути отримані за декілька годин	Швидкий, результати можуть бути отримані за декілька годин

Вартість	Серотипування є трудомістким і дорогим процесом і надійно виконується лише невеликою кількістю референс-лабораторій	Вартість може бути відносно високою, залежно від кількості та складності досліджень	Вартість може бути високою, особливо при використанні спеціалізованих проб та реагентів
-----------------	---	---	---

ДОДАТОК В

Кількість інфікованих на найбільш населених землях Німеччини

Роки	Баден-Вюртемберг	Баварія	Гессен	Нижня Саксонія	Північний Рейн-Вестфалія	Рейнланд-Пфальц	Саксонія
2014	114	250	43	172	306	107	209
2015	104	277	42	191	268	124	199
2016	163	307	45	230	353	126	104
2017	199	299	56	257	332	122	166
2018	265	321	59	268	364	151	206
2019	236	244	63	217	349	149	131
2020	132	186	39	198	255	74	78
2021	179	207	60	195	383	81	95
2022	216	213	59	252	500	86	108
2023	306	245	113	588	1107	122	177