

DOI 10.25741/2413-287X-2020-07-4-114

УДК 619:616.992.28/099

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ЛАБОРАТОРНЫХ МЕТОДОВ ВЫДЕЛЕНИЯ *ESCHERICHIA COLI* В КОРМАХ

Ю. СКОМОРИНА, А. КРЕМЛЕВА, В. БЕЛОУСОВ, ФГБУ «Центральная научно-методическая ветеринарная лаборатория»

О. ПОЛОСЕНКО, А. ШЕПЕЛИН, ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии Роспотребнадзора»

E-mail: vibelousov51@mail.ru

В статье представлен сравнительный анализ лабораторных методов выделения и идентификации Escherichia coli в кормах, применяемых на территории Российской Федерации и в странах Европейского союза. Установлено, что российская нормативная документация по выявлению эшерихий в кормах требует пересмотра и усовершенствования в части применения диагностических наборов, оборудования, в том числе определения патогенных свойств культур, выделенных в ходе исследований, внедрение методики выявления эпидемиологически значимых эшерихий, а также гармонизации с международными требованиями, предъявляемыми при исследовании кормов.

Ключевые слова: эшерихии, корма, питательные среды, методики исследований.

The article presents the results of laboratory methods for isolation and identification of Escherichia coli in feeds used in the territory of the Russian Federation (RF) and the countries of the European Union. The analysis of normative documentation on laboratory methods of research of forages in terms of Escherichia coli established that the currently existing methods for detecting Escherichia in Russia require revision and improvement in the use of new culture media and diagnostic kits, equipment, including determination of pathogenic properties of the crops selected in the course of the research, as well as harmonization with international requirements to test the feed.

Keywords: Escherichia, feed, nutrient media, research methods.

Корма для животных — это начало цепи пищевой безопасности в модели «от фермы до стола». При нарушении технологического процесса производства, условий хранения и транспортировки в кормах могут развиваться различные микроорганизмы, в том числе патогенные. Серьезную опасность для здоровья животных представляют эшерихии, сальмонеллы, листерии, анаэробы и прочие [1]. При потреблении кормов, контаминированных такими бактериями, в организме животных развиваются заболевания, которые приводят не только к снижению продуктивности, но и к летальному исходу, нанося огромный экономический ущерб хозяйствам [2]. Кроме того, мясо от таких животных, попадая на прилавки, может стать причиной серьезных заболеваний и/или отравлений у человека.

Среди широкого разнообразия серологических вариантов *Escherichia coli* наибольшее эпидемиологическое значение имеют энтерогеморрагические *E. coli* серотипа O157:H7 [3]. За последние десятилетия в мире увеличались случаи геморрагического колита (ГК) и гемолитико-уремического синдрома (ГУС), этиологи-

ческим фактором которых являются энтерогеморрагические (ЕНЕС) кишечные палочки, продуцирующие веротоксины (шигаподобные токсины). В связи с регистрируемыми среди людей случаями острых кишечных инфекций с гемолитико-уремическим синдромом, как вспышечных, так и спорадических, в странах Евросоюза большое внимание уделяется контролю и обнаружению веротоксигенных эшерихий.

Естественным резервуаром бактерий *E. coli* O157:H7, патогенных для человека, служат главным образом крупный рогатый скот, овцы, свиньи. Основной путь передачи — сырая говядина, особенно мясной фарш, мясные полуфабрикаты, прошедшие недостаточную термическую обработку, сырое молоко. Отмечены случаи передачи этого возбудителя через воду и зеленые растительные продукты [4]. Для эшерихий одним из путей попадания в организм является алиментарный (при потреблении кормов). Животные становятся носителями, зачастую не проявляя клинических признаков заболевания, при этом контаминируя окружающую среду и продукты, предназначенные к употреблению в пищу человеком.

Цель работы — проведение анализа различных нормативных документов, касающихся лабораторных методов исследования кормов и предназначенных для выявления и идентификации *Escherichia coli*.

Статистические данные по исследованию кормов в ветеринарных лабораториях субъектов РФ, а также по количеству патогенных сероваров *E. coli* взяты из отчетной формы 4-вет [Приказ Минсельхоза России от 02.04.2008 № 189 (ред. от 27.09.2011) «О Регламенте предоставления информации в систему государственного информационного обеспечения в сфере сельского хозяйства»] в период с 2016 по 2018 г. Анализ лабораторных методов исследования кормов, видов кормов и показателей при выявлении эшерихий и определении их количества были взяты из нормативных документов, действующих на территории РФ и в странах ЕС. Собственные исследования по испытанию различных методов обнаружения и выделения патогенных эшерихий в кормах проведены на базе московской испытательной лаборатории ФГБУ «Центральная научно-методическая ветеринарная лаборатория» (ЦНМВЛ). Для получения статистически достоверных результатов микробиологическому контролю нами было подвергнуто более 200 образцов кормов.

Результаты исследований

Анализ результатов исследований, проводимых в государственных ветеринарных лабораториях субъектов РФ и ФГБУ Россельхознадзора, показал, что среди патогенных микроорганизмов, выделяемых из кормов, ведущее место занимают сальмонеллы и эшерихии [5].

Рассмотрим, в соответствии с какими нормативными документами специалисты лабораторий субъектов РФ проводят исследования кормов на качество и безопасность по микробиологическим показателям. К таким документам относятся Правила бактериологического исследования кормов, 1975 г.; ГОСТ 25311-82 «Мука кормовая животного происхождения. Методы бактериологического анализа»; Ветеринарно-санитарные нормы и требования к качеству

кормов для непродуктивных животных № 13-7-2/1010. Данные нормативные документы (НД), помимо выделения эшерихий, предусматривают определение таких патогенных микроорганизмов, как анаэробы и сальмонеллы.

В странах ЕС действует нормативный документ ISO 7251:2005 по методу обнаружения и определения количества презумптивных бактерий *Escherichia coli*, то есть бактерий, ферментирующих при температуре 44°C лактозу с образованием газа и образующих индол из триптофана. На территории РФ действует полный аналог данного документа — ГОСТ 31708-2012 (ISO 7251:2005) «Микробиология пищевых продуктов и кормов. Метод обнаружения и определения количества презумптивных бактерий *Escherichia coli*. Метод наиболее вероятного числа (с Поправкой)». Необходимо учитывать, что при применении данного НД приготовление пробы и первичного разведения проводят согласно п. 3, 4, 5, 6 или 7 ГОСТ 26669-85 «Продукты пищевые и вкусовые. Подготовка проб для микробиологических анализов (с Изменением №1)», а учет результатов — путем расчета наиболее вероятного числа.

Основным документом, в соответствии с которым проводятся исследования по выявлению энтерогеморрагических эшерихий в кормах, является ГОСТ 32011-2013 (ISO 16654:2001) «Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Горизонтальный метод обнаружения *Escherichia coli* O157». Для выполнения данной методики, помимо основного оснащения лаборатории, необходимо иметь в наличии магнитный сепаратор и иммуномагнитные частицы, связанные с антителами к *E. coli* O157. Также следует учитывать, что подготовку проб проводят в соответствии с пунктом 1 ГОСТ 26669-85.

На территории РФ так же, как и в странах ЕС, действует ГОСТ ISO 16649-2015 «Микробиология пищевой продукции и кормов. Горизонтальный метод подсчета бета-глюкуронидаза-положительных *Escherichia coli* (кишечная палочка)» (части 1, 2 и 3), в котором описана методика подсчета колоний при температуре 44°C на плотной пита-

Таблица 1. НД на методы определения, определяемый показатель и тип корма

Нормативный документ	Определяемый показатель	Тип корма
Правила бактериологического исследования кормов, 1975 г.	Энтеропатогенные типы кишечной палочки	Корма животного и растительного происхождения, комбикорма и рыбная мука
ГОСТ 25311-82 «Мука кормовая животного происхождения. Методы бактериологического анализа»	Бактерии группы кишечной палочки	Кормовая мука животного происхождения
Ветеринарно-санитарные нормы и требования к качеству кормов для непродуктивных животных № 13-7-2/1010	Энтеробактерии	Корма для непродуктивных животных
ГОСТ 32011-2013 (ISO 16654:2001) Горизонтальный метод обнаружения <i>Escherichia coli</i> O157	<i>Escherichia coli</i> O157	Корма для животных
ГОСТ 31708-2012 (ISO 7251:2005) Метод обнаружения и определения количества презумптивных бактерий <i>Escherichia coli</i> . Метод наиболее вероятного числа	Презумптивные бактерии	Продукты, предназначенные для кормления животных

тельной среде, содержащей хромогенный компонент для обнаружения фермента бета-глюкуронидазы. Для исследований кормов по данной методике в качестве дополнительного оснащения используются мембраны стерильные и не ингибирующие, произведенные из ацетилцеллюлозы или смешанных эфиров целлюлозы, с порами размером от 0,45 до 1,2 мкм и диаметром 85 мм.

Как видно из данных таблицы 1, в нормативных документах отсутствует унифицированное обозначение *Escherichia coli*. Например, в Правилах бактериологического исследования кормов *E. coli* представлена как энтеропатогенные типы кишечной палочки, а в ГОСТ 25311-82 она именуется как бактерии группы кишечной палочки (БГКП). В Ветеринарно-санитарных нормах и требованиях к качеству кормов для непродуктивных животных (1997 г.) — как энтеробактерии. Причем в данном НД представлены лишь максимально допустимые уровни (МДУ) содержания потенциально опасных для здоровья животных веществ в кормах для непродуктивных животных, но в качестве метода определения обозначены Правила бактериологического исследования кормов, где указан иной определяемый показатель.

Несмотря на то что разработан ГОСТ 32011-2013 (ISO 16654:2001) «Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Горизонтальный метод обнаружения» *Escherichia coli* O157», ветеринарные лаборатории проводят исследования по выделению эшерихий в кормах только согласно Правилам бактериологического исследования кормов, которыми не предусмотрено выделение эпидемиологически значимых серотипов эшерихий, в частности *E. coli* O157.

Каждой методикой предусмотрено выделение эшерихий и основным методом исследования кормов по выделению *E. coli* является бактериологический с использованием различных питательных сред. В таблице 2 приведены данные о жидких и плотных дифференциально-диагностических питательных средах, предусмотренных НД для выделения эшерихий при микробиологическом анализе кормов.

Согласно российским нормативным документам основные накопительные среды — это среды Эйкмана, Кесслера, Кода, Булира, Хейфеца. В документах Евросоюза — это ЕС-бульон и триптон-соевый бульон (mTSB+N). Совокупность компонентов, входящих в состав питательных сред, обеспечивает питательные потребности для роста энтеробактерий и ингибиции отдельных видов микроорганизмов, в частности грамположительной микрофлоры. Некоторые среды обеспечивают еще и дифференциацию энтеробактерий по биохимическому признаку ферментации лактозы. В качестве дифференциально-диагностической питательной среды применяются среды Эндо, Левина, позволяющие по морфологическим характеристикам определять видовую принадлежность выделенных культур.

Необходимо особое внимание уделить методам обнаружения *Escherichia coli* O157. Особенность энтерогеморрагических кишечных палочек серотипа O157:H7 — неспособность ферментировать сорбитол, поэтому необходимы питательные среды, содержащие сорбит. Для выделения *E. coli* O157 в качестве первой селективной среды применяют среду Мак-Конки с сорбитом и суплементом СТ (цефиксим и теллурид калия) (СТ-SMAC). Кроме того, характерной биохимической особенностью энтерогеморрагических кишечных палочек серотипа O157:H7, в отличие от других

Таблица 2. Сравнительный анализ питательных сред в соответствии с НД

Нормативная документация				
Правила бактериологического исследования кормов, 1975 г.	ГОСТ 25311-82 «Мука кормовая животного происхождения. Методы бактериологического анализа»	Ветеринарно-санитарные нормы и требования к качеству кормов для непродуктивных животных № 13-7-1/1010	ГОСТ 32011-2013 (ISO 16654:2001) Горизонтальный метод обнаружения <i>Escherichia coli</i> O157	ГОСТ 31708-2012 (ISO 7251:2005) Метод обнаружения и определения количества презумптивных бактерий <i>Escherichia coli</i> . Метод наиболее вероятного числа
Жидкие питательные среды				
Эйкмана, Кесслера, Кода	Эйкмана, Кесслера, Кода, Булира, «ХБ» (хинозол-бромкрезол-пурпуровый)	В методах определения идет ссылка на Правила бактериологического исследования кормов, 1975 г.	Модифицированный триптон-соевый бульон	Бульон с лаурилсульфатом; ЕС-бульон; безиндолная пептонная вода
Дифференциально-диагностические питательные среды				
Эндо, Левина	Эндо, Левина	—	Среда Мак-Конки с сорбитом и суплементом СТ (цефиксим и теллурид калия); любая селективная среда по выбору	Не предусмотрено методикой

Таблица 3. Методы биохимической идентификации эшерихий

Нормативный документ				
Правила бактериологического исследования кормов, 1975 г.	ГОСТ 25311-82 «Мука кормовая животного происхождения. Методы бактериологического анализа»	Ветеринарно-санитарные нормы и требования к качеству кормов для непродуктивных животных № 13-7-2/1010	ГОСТ 32011-2013 (ISO 16654:2001) Горизонтальный метод обнаружения <i>Escherichia coli</i> O157	ГОСТ 31708-2012 (ISO 7251:2005) Метод обнаружения и определения количества презумптивных бактерий <i>Escherichia coli</i>
Биохимическая идентификация				
<i>Классический метод:</i> лактоза, глюкоза, сахароза, маннит, дульцит, адонит, инозит, мочевины, реакция ФП, образование индола	<i>Классический метод:</i> лактоза, индол, метилрот, реакция ФП, цитратно-аммонийные соли+	В методах определения идет ссылка на Правила бактериологического исследования кормов, 1975 г.	<i>Классический метод:</i> образование индола <i>Современные методы:</i> миниатюрные биохимические наборы для идентификации сорбит-отрицательных и индол-положительных <i>E. coli</i>	Нет
Использование дополнительных методов исследования				
Нет	Нет	Нет	Иммуномагнитная сепарация. Метод латекс-агглютинации	Нет

E. coli, является отсутствие способности продуцировать фермент D-глюкуронидазу (95% штаммов).

Анализ питательных сред, применяемых в ходе исследования кормов, показал, что основными документами, действующими на территории РФ, не предусмотрено определение *Escherichia coli* O157:H7. Однако среда Мак-Конки с сорбитом и суплементом СТ позволяет определять одновременно как бактерии серотипа O157:H7, образующие бесцветные колонии, так и другие штаммы *E. coli*, образующие розово-красные колонии с зоной преципитации.

Следующий этап исследований — определение видовой принадлежности выделенных изолятов, подозрительных на эшерихии и выросших на дифференциально-диагностических средах путем постановки биохимических тестов с использованием как классических, так и современных методов.

В таблице 3 приведены данные о методах биохимической идентификации выделенных культур эшерихий.

Большинством документов предусмотрено применение лишь классических методов идентификации эшерихий, в то время как международный ГОСТ 32011-2013 предполагает использование современных коммерческих биохимических наборов. Готовые наборы отличаются от классических питательных сред, предназначенных для биохимической идентификации микроорганизмов высокой чувствительностью и точностью.

В случае обнаружения культуры *Escherichia coli* нормативными документами, действующими на территории РФ, предусмотрена необходимость установления ее патогенных свойств. В ветеринарных лабораториях патогенные свойства кишечной палочки определяют путем постановки биологической пробы на лабораторных животных (белые мыши). С этой целью внутрибрюшинно заражают трех мышей весом 14–16 г смывом с суточных агаровых культур в дозе 500 млн микробных тел. Концентрацию бактерий устанавливают по бактериальному стандарту. Культуру при-

Таблица 4. Определение патогенных свойств бактерий *Escherichia coli*, выделенных из кормов

Нормативный документ				
Правила бактериологического исследования кормов, 1975 г.	ГОСТ 25311-82 «Мука кормовая животного происхождения. Методы бактериологического анализа»	Ветеринарно-санитарные нормы и требования к качеству кормов для непродуктивных животных № 13-7-2/1010	ГОСТ 32011-2013 (ISO 16654:2001) Горизонтальный метод обнаружения <i>Escherichia coli</i> O157	ГОСТ 31708-2012 (ISO 7251:2005) Метод обнаружения и определения количества презумптивных бактерий <i>Escherichia coli</i>
Определение патогенных свойств на белых мышах				
Да	Да	Да	Нет	Нет
Серологическая идентификация с сыворотками				
Да	Да	Да	Нет	Нет

знают патогенной в случае гибели одной или более мышей в первые четверо суток после заражения.

Из данных, представленных в таблице 4, видно, что постановка биологической пробы для определения патогенных свойств выделенных сероваров из кормов предусмотрена только российскими НД. В странах ЕС постановка биологической пробы не предусмотрена, поскольку существуют сероварианты, не вызывающие гибель белых мышей, но являющиеся патогенными для животных и человека. Помимо определения патогенных свойств, российскими документами предусмотрена серологическая типизация культур кишечной палочки по О-антигену с целью установления эпизоотических типов.

В соответствии с российскими НД учет результатов проводят согласно полученным культурально-морфологическим данным, учету серологической реакции и результатам биологической пробы. В связи с отсутствием биологической пробы в нормативных документах стран ЕС учет результатов проводят при наличии или отсутствии роста эшерихий на питательных средах.

Следует отметить, что в настоящее время, наряду с классическими методами биохимической идентификации, существует большой выбор различных диагностических наборов, тест-систем, анализаторов как ручных,

так и полностью автоматических. Данные методы обладают высокой чувствительностью, позволяют проводить видовую идентификацию микроорганизмов в короткие сроки, минимизируют риск кросс-контаминации и сокращают количество ошибок, которые могут возникать при приготовлении питательных сред. Однако в нормативных документах, действующих на территории РФ, отсутствует возможность использования современных методов биохимической идентификации.

Выводы

- Анализ нормативной документации, действующей на территории РФ и в странах ЕС, показал необходимость пересмотра и усовершенствования методики выделения и идентификации эшерихий, в том числе энтерогеморрагического штамма *E. coli* O157:H7. В данной ситуации представляется важным применение современных качественных отечественных и зарубежных питательных сред, ПЦР-диагностики, а также автоматических анализаторов для получения достоверных результатов исследований.
- Согласно способностям некоторых сероваров рода *Escherichia* вызывать тяжелые заболевания у людей и быть обитателем желудочно-кишечного тракта у животных без проявления патологических процессов необходимо пересмотреть методы определения факторов патогенности эшерихий, выделенных из кормов.
- Рекомендуем в проекте технического регламента «Обезопасности кормов и кормовых добавок» предусмотреть гармонизацию критериев по обнаружению патогенных эшерихий в кормах в соответствии с международными требованиями.

*Работа выполнена в рамках отраслевой программы
Роспотребнадзора и ФГБУ ЦНМВЛ.*

Литература

1. D'Mello, J.P.F. Microbiology of animal feeds / J.P.F. D'Mello // Assessing quality and safety of animals feeds book. — Rome, 2004. — P. 89–104.
2. Microbiological risk assessment in feeding stuffs for food-producing animals 1 Scientific Opinion of the Panel on Biological Hazards / O. Andreoletti [et al.] // The EFSA Journal. — 2008. — P. 1–84.
3. *E. coli* [Электронный ресурс] / Информационный бюллетень ВОЗ. — 2018. — Режим доступа: <https://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/e-coli>.
4. *E. coli* EHEC — USA: O26, clover sprouts : newsletter [Электронный ресурс] / European Union Reference Laboratory VTEC. — 2012. — Режим доступа: <http://old.iss.it/vtec/index.php?lang=2&id=189&tipo=20>.
5. Оценка распространенности патогенных эшерихий в кормах на территории РФ в 2014–2018 гг. / А. Кремлева [и др.] / Комбикорма. — 2020. — № 3. — С. 68–70. ■