

5. Тихоненко А.С. Ультраструктура вирусов бактерий // М.: Наука, 1968. – С. 89 .
6. Феоктистова Н.А. Выделение и изучение биологических свойств фагов бактерий рода *Proteus*, конструирование на их основе биопрепарата и разработка параметров его практического применения // Автореферат дис. канд. вет. наук. - Саратов, 2006.
7. Хакешева Т.А. Фаги цитробактера // Автореферат канд. дис. – М. – 1985.
8. Murphy F.A. Virus Taxonomy. Classification and Nomenclature of Viruses // Spingerverlag Wien New York. – 1995. – P. 586.

## ELECTRON MICROSCOPY OF ALLOCATED BACTERIOPHAGES OF BACTERIA OF THE GENUS *CITROBACTER*

*Pulcherovskaya L.P., Efreytorova E.O., Zolotukhin S.N., Vasilev D.A.*

**Key words:** *bacteriophages, electronic microscopy, virion, bacteria of the genus Citrobacter, morphology of phages.*

*In accordance with the morphological parameters the studied phages of bacteria of the genus Citrobacter №1, №2 and №3 according to the International classification and nomenclature of viruses belong to the family Myoviridae, and on the classification of A.S. Tikhonenko - to V morphological group: "Phages with the outgrowth of complex structure, whose pouch is able to contract"*

УДК 578: 615.03

## ВЫДЕЛЕНИЕ, БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА И ЛЕЧЕБНАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ БАКТЕРИОФАГА ЕСД4 ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ *ESCHERICHIA COLI* O104:H4-ИНФЕКЦИИ.

*Светоч Э.А. \**, доктор ветеринарных наук, профессор,  
тел. (4967)-36-00-79; [svetoch@obolensk.org](mailto:svetoch@obolensk.org)

*Веровкин В.В. \**, кандидат медицинских наук,  
*Воложанцев Н.В. \**, кандидат биологических наук,  
тел. (4967)-36-01-47; [nikvol@obolensk.org](mailto:nikvol@obolensk.org)

*Борзилов А.И. \**, кандидат медицинских наук,  
тел. (4967) 36 01 47, [borzilov@obolensk.org](mailto:borzilov@obolensk.org)

*Борзенков В.Н. \**, кандидат медицинских наук,  
*Коробова О.В. \**, кандидат медицинских наук,  
*Комбарова Т.И. \**,

*Красильникова В.М. \**, кандидат биологических наук, *Мякинина В.П. \**,  
*Баннов В.А. \**,

*Денисенко Е.А. \**,

*Теймуразов М.Г. \**, кандидат биологических наук,

*Коровкин С.А. \*\**, доктор медицинских наук, профессор,  
тел. (495) 917-41-49, [korovkin09@mail.ru](mailto:korovkin09@mail.ru)

**Дятлов И.А. \***, чл.-корр РАН, доктор медицинских наук, профессор,  
тел. (4967) 36 00 03, [dyatlov@obolensk.org](mailto:dyatlov@obolensk.org)

\*ФБУН «ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии»  
Роспотребнадзора

\*\*НИИ вакцин и сывороток им. И.И.Мечникова РАН

**Ключевые слова:** *Escherichia coli*, шига-токсин, бактериофаг, мыши Balb/c, литическая активность фагов.

Изучены свойства бактериофага ECD4, активного против эпидемического шига-токсин продуцирующего штамма *E.coli* серотипа O104:H4, некоторых EHEC-штаммов серотипа O157:H7 и других клинически значимых эшерихий и шигелл. Установлено, что бактериофаг персистирует определенное время в организме интактных мышей линии Balb/c и в 6-8 раз снижает концентрацию *E. coli* O104:H4 в кишечнике инфицированных мышей. Обсуждаются пути повышения лечебной эффективности фагов при экспериментальной *E.coli* O104:H4-инфекции.

### **Введение**

Шига-токсин продуцирующие *Escherichia coli* (STEC) вызывают у человека потенциально летальные заболевания с широким спектром клинических проявлений: от банальной легкой формы диареи до тяжелого геморрагического колита (ГК), осложненного гемолитико-уремическим синдромом (ГУС) и тромботической тромбоцитопенической пурпурой [1 - 3].

Основными возбудителями STEC-инфекций является группа энтерогеморрагических *E.coli* (EHEC), принадлежащих к серотипу O157:H7 (ведущий патоген) и к серогруппам O26, O55, O91, O103, O111, O113, O121, O145, реже другим. 21 мая 2011 года в Германии появились сообщения об эпидемической вспышке заболевания, вызванного шига-токсин продуцирующим штаммом *E.coli* серотипа O104:H4 [4]. В течение последующих двух месяцев в странах Европейского Союза (преимущественно в Германии), а также в США, Канаде и Швейцарии было зарегистрировано более 4000 случаев заболевания, связанного с этим возбудителем, причем в 773 случаях болезнь сопровождалась симптомами гемолитико-уремического синдрома. За время STEC-эпидемии погибло 54 человека [5].

Причиной описанной STEC-вспышки во всех странах явился новый уникальный штамм *E.coli* O104:H4, сочетающий в себе факторы вирулентности энтероагрегативных (EAggEC) и энтерогеморрагических (EHEC) эшерихий. Кроме того, эпидемический штамм *E.coli* O104:H4 был устойчив к большой группе антибиотиков: ампициллину, амоксициллину/клавуланату, пиперациллину/сульбактаму, пиперациллину/тазобактаму, цефураксиму, цефураксим-аксетилу, цефокситину, цефотаксиму, цефразидиму, цефподоксиму, стрептомицину, налидиксовой кислоте, татрациклину, триметоприму/сульфаметаксозолу. Штамм *E.coli* O104:H4 является носителем плазмидных генов bla CTX-M-15 и bla TEM-1.

Высокий процент случаев ГУС, отмеченный при вспышке *E.coli* O104:H4-инфекции в Германии (22 %), а также высокая смертность среди больных с ГУС (свыше 4 %) свидетельствуют о серьезных проблемах в лечении этой инфекции, связанных с низкой эффективностью антибиотикотерапии. Более того, применение антибиотиков может усугублять течение болезни [6].

В данной ситуации остро встает вопрос о поисках альтернативных методов профилактики и антимикробной терапии *E.coli* O104:H4-инфекции. Вполне оправдано, что одним из таких подходов может стать использование специфических бактериофагов [5, 7].

Цель работы – поиск и характеристика литических бактериофагов, активных против

эпидемического штамма *E. coli* O104:H4, изучение их профилактической и лечебной эффективности на экспериментальной мышшиной модели *E. coli* O104:H4-инфекции.

### Материалы и методы исследования

Для выделения бактериофагов и характеристики их литической активности использовали индикаторные штаммы эшерихий различных серогрупп, а также штаммы *Escherichia coli* K12 C600, *E. coli* M17, *Shigella sonnei*, *Shigella flexneri* и *Shigella dysenteriae*. Штамм *Escherichia coli* O104:H12 SS513 (далее *E. coli* O104:H12), не продуцирующий шига-токсинов, получен из института им. Л.И. Тарасевича (г. Москва). Штамм *E. coli* O104:H4 №112027 Stx (далее *E. coli* O104:H4) выделен от больного ГК при пищевой вспышке в 2011 г. в Германии и любезно предоставлен д-ром Альфредо Каприоли (Европейская референс-лаборатория *E. coli*, Институт санитарии, г. Рим, Италия). Штамм продуцирует шига-токсин типа 2 и устойчив к бета-лактамам антибиотикам, стрептомицину, налидиксовой кислоте, тетрациклину, триметоприму/сульфаметоксазолу.

Бактериальные культуры выращивали при 37°C в течение 18-24 ч на плотной и жидкой питательных средах ГРМ (ФБУН ГНЦ ПМБ).

Вирулентные фаги, активные против *E. coli* O104:H4, выделяли из образцов подстилки и фекалий бройлерной птицы на птицефабриках Московской и Калужской областей. Бактериофаги идентифицировали с помощью спот-теста и последующего титрования на чувствительных штаммах *E. coli* K12 C600, *E. coli* O104:H12 и *E. coli* O104:H4. «Чистые» линии фагов получали из изолированной негативной колонии после трех последовательных пересевов на газоне чувствительного штамма. Специфичность и спектр антибактериального действия фагов определяли методом спот-тестирования и стандартным двухслойным методом с использованием индикаторных штаммов.

Фаговую ДНК выделяли из обработанного протеиназой К фаголизата на колонках фирмы QIAGEN (QIA-amp DNA Midi Kit).

Фармакокинетику – продолжительность персистенции бактериофага ECD4 изучали на мышах линии Valb/c массой 17-20 г. В эксперимент было взято 4 группы животных (по 6 особей каждая). Мышам первых двух групп натошак внутрижелудочно вводили фаг по 0,5 мл с концентрацией  $1 \times 10^7$  и  $1 \times 10^9$  БОЕ/мл, соответственно, мышам третьей группы получали бактериофаг с питьевой водой. Через 1,5; 3, 6, 9, 12, 24, 36 и 48 ч после введения фага от каждой мыши отбирали фекалии (по 0,1 г), помещали их в пробирку с 1 мл SM буфера и 20 мкл хлороформа. Компоненты интенсивно встряхивали 20 мин, взвесь центрифугировали при 16000 г в течение 10 мин и из полученного центрифугата готовили десятикратные разведения. Количество фаговых частиц в образцах определяли нанесением 10 мкл каждого разведения на газоны *E. coli* K12 C600 с последующим подсчетом негативных колоний фага ECD4.

Четвертую группу мышей через 1, 3, 9 и 12 часов (по три мыши на каждый срок) после внутригастрального введения фага ECD4 ( $\sim 2 \times 10^9$  БОЕ) умерщвляли с помощью CO<sub>2</sub>, и в крови, селезенке и печени каждой особи определяли наличие фаговых частиц.

Профилактическую и лечебную эффективность фага ECD4 оценивали на экспериментальной мышшиной модели (мышам линии Valb/c) *E. coli* O104:H4-инфекции, которая обеспечивала стабильную колонизацию кишечника животных в концентрации не менее чем  $1 \times 10^8$  КОЕ патогена на 1 г содержимого. В эксперименте использовали 24 мыши, которые были разделены на 3 группы: опытную и две контрольные. Животные всех трех групп, начиная с первого дня и на протяжении всего эксперимента, получали с питьевой водой стрептомицин (5 г/л) для подавления других, кроме *E. coli* O104:H4, представителей рода *Escherichia*. Начиная со второго дня и в течение всего срока эксперимента (7 дней) мышам опытной группы получали бактериофаг ECD4 с питьевой водой ( $\sim 2 \times 10^8$  БОЕ/мл). Мыши первой контрольной группы бактериофаг не

получали (контроль колонизации кишечника штаммом *E.coli* O104:H4). На третий день эксперимента животные опытной и первой контрольной групп интрагастрально заражали штаммом *E.coli* O104:H4 в дозе  $1 \times 10^9$  КОЕ/особь. Третья контрольная группа мышей оставалась не зараженной, но получала бактериофаг по той же схеме, что и опытная группа. На 1, 2, 3, 6 и 7 сутки после заражения у мышей всех экспериментальных групп, опытной и двух контрольных, отбирали образцы фекалий и определяли в них концентрацию бактериофага ECD4 и клеток *E.coli* O104:H4. В последнем случае высеив фекалий и подсчет колоний патогена проводили на питательном агаре и среде Эндо со стрептомицином (50 мкг/мл). Принадлежность выросших культур бактерий к серотипу *E.coli* O104:H4 подтверждали в реакции латекс-агглютинации и методом ПЦР в соответствии с Методическими указаниями [8].

### **Результаты и их обсуждение**

В результате проведенного поиска из образцов фекалий и подстилки бройлерной птицы удалось выделить семь «чистых» линий бактериофагов, обладающих литической активностью против шига-токсин продуцирующего эпидемического штамма *E.coli* O104:H4 и штамма *E.coli* O104:H12. Свойства одного из фагов – фага ECD4, как наиболее перспективного, были изучены более подробно.

Бактериофаг ECD4 способен подавлять рост бактерий штамма *E.coli* O104:H4 до восьмого десятикратного разведения при титровании по Аппельману. Кроме того, фаг обладает литической активностью по отношению к некоторым шига-токсин продуцирующим штаммам *E.coli* O157:H7, клинически значимым эшерихиям других серогрупп, а также бактериям *S.sonnei* и *S.flexneri* – возбудителям дизентерии человека. Вместе с тем, фаг не подавляет рост бактерий непатогенного для человека штамма *E.coli* M17, используемого для приготовления пробиотического препарата «Колибактерин», но может быть размножен на непатогенном штамме *E.coli* K12 C600, что значительно упрощает крупномасштабную наработку данного бактериофага.

На чувствительном бактериальном штамме бактериофаг ECD4 формирует мутные негативные колонии диаметром около 1 мм; вторичный рост клеток-хозяина в зоне лизиса отсутствует. Геном фага представлен двухнитевой ДНК размером около 60 тыс. пар оснований. ДНК не гидролизует ферментами SalG1, PstI, EcoRI, BamHI, HindIII, ApaI, KpnI, Eco1471, Eco521, Eco1301, MvaI. Эндонуклеаза SmiI расщепляет ДНК фага ECD4 на три фрагмента, два из которых имеют размер 700 и 3000 пар оснований, VcuI расщепляет ДНК на шесть фрагментов, EcoRV - на 15, XmiI - на 18, VspI - на 20 фрагментов. В фаговом геноме не выявлено генов синтеза шига-подобных токсинов и других факторов вирулентности, характерных для бактерии-хозяина.

Как показали наши исследования, фаг ECD4 способен определенное время циркулировать в организме мышей, свободном от клеток-хозяина. Продолжительность персистенции этого фага в кишечнике интактных животных после интрагастрального введения вируса в дозе  $\sim 1 \times 10^7$  БОЕ/особь составляла не менее 24 часов. При введении мышам фага в большей дозе ( $1 \times 10^9$  БОЕ) вирусные частицы у отдельных особей выделяли через 36 час. Через 48 часов фаг из фекалий изолировать не удавалось.

При доставке фага ECD4 мышам с питьевой водой ( $2 \times 10^8$  БОЕ/мл) вирус обнаруживали в фекалиях через 24 ч. после его введения, в более поздние сроки фаг не выявляли.

При интрагастральном введении мышам фага ECD4 в дозе  $\sim 1 \times 10^9$  БОЕ/особь вирусные частицы проникали из желудочно-кишечного тракта в кровь и паренхиматозные органы животных и определенное время персистировали в них. В крови и селезенке фаговые частицы у отдельных особей обнаруживали через 12 час, в печени – лишь через час после его введения.

Таким образом, фаг ECD4 обладает важным свойством лечебного фага – способно-



стью персистировать определенное время в организме животного, длительность которого зависит от дозы фага и способа его доставки в организм.

Результаты эксперимента по изучению профилактической эффективности бактериофага ECD4 показали, что предварительное, еще до заражения, выпаивание фага животным в течение суток не предотвращало колонизацию кишечника мышей линии Balb/c штаммом *E. coli* O104:H4 (мышей заражали интрагастрально на 3-ий день после начала эксперимента в дозе  $\sim 1 \times 10^9$  КОЕ/особь). Тем не менее, концентрация возбудителя в кишечном содержимом мышей опытной группы, получавших с водой фаг ECD4, была в разы ниже, чем у животных контрольной группы, которая бактериофаг не получала: на 1, 2, 3, 6 и 7 сутки после заражения количество *E. coli* O104:H4 в расчете на 1 г фекалий было ниже у опытных по сравнению с контрольными животными соответственно в 5,9; 6,5; 6,7; 8,4 и 7,8 раз. В те же сроки бактериофаг ECD4 обнаруживали в фекалиях опытной (леченой) группы мышей в значительных концентрациях: от  $\sim 1 \times 10^7$  до  $1 \times 10^8$  БОЕ/г, т.е. фаг активно репродуцировался в кишечнике зараженных животных. Напротив, у мышей контрольной группы, которая получала фаг с питьевой водой в течение 7 дней, но не заражалась *E. coli* O104:H4, концентрация фага была значительно ниже, чем в опытной группе.

Низкая профилактическая лечебная эффективность фага ECD4, полученная нами на экспериментальной мышинной модели *E. coli* O104:H4-инфекции, на фоне активного размножения его в кишечнике зараженного животного, скорее всего, объясняется образованием клетками штамма *E. coli* O104:H4 биопленки, которая, как известно, может существенно влиять на взаимоотношения фага с клеткой-хозяином.

Решение задачи повышения лечебной эффективности фаговых препаратов против *E. coli* O104:H4-инфекции, по-видимому, лежит в области поиска специфических фагов, способных разрушать биопленки в кишечнике макроорганизма, либо применение коктейля фагов с такими свойствами.

Изучение фага ECD4, способного лизировать шига-токсин продуцирующие эшерихии, другие патогенные *E. coli* и шигеллы будет продолжено. Особое внимание будет уделено вопросам использования его для деконтаминации продуктов питания и объектов внешней среды от опасного для человека патогена *E. coli* O104:H4, поскольку именно этот путь представляется на сегодня, когда еще не ясен природный резервуар и источник возбудителя, наиболее реальным и безопасным.

#### **Библиографический список**

1. Caprioli, A. Enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: emerging issues on virulence and modes of transmission / A. Caprioli, S. Morabito, H. Brugère, E. Oswald // Vet. Res. - 2005. – Vol. 36. – P. 289-311.
2. Karmali, M.A. Infection by verocytotoxin-producing *Escherichia coli* / M.A. Karmali // Clin. Microbiol. Rev. - 1989. – Vol. 2. – P. 15–38.
3. Karmali, M.A Association of genomic O island 122 of *Escherichia coli* EDL 933 with verocytotoxin-producing *Escherichia coli* serotypes that are linked to epidemic and/or serious disease / M.A. Karmali, M. Mascarenhas, S. Shen, K. Ziebell, S. Johnson, R. Reid-Smith, J. Isaac-Renton, C. Clark, K. Rahn, J.B. Kaper // J. Clin. Microbiol. - 2003. – Vol. 41. – P. 4930-4940.
4. Soon, J.M. *Escherichia coli* O104:H4 outbreak from sprouted seeds / J.M. Soon, P. Seaman, R.N. Baines // Int J Hyg Environ Health – 2012 - Aug 13. [Epub ahead of print]
5. Merabishvili, M, De Vos, D., Verbeken, G, et al. Selection and characterization of a candidate therapeutic bacteriophage that lyses the *Escherichia coli* O104:H4 strain from the 2011 outbreak in Germany // PLOS ONE.-2012.-Vol.7.- Iss.12. –P.e52709

6. Michael M, Elliott EJ, Ridley GF, Hodson EM, Craig JC. Interventions for haemolytic uraemic syndrome and thrombotic thrombocytopenic purpura. Cochrane Database Syst Rev. -2009.- CD003595.

7. Damien Maura, Eric Morello, Laurence du Merle, Perrine Bomme, Chantal Le Bougué- nec, Laurent Debarbieux. Intestinal colonization by enteroaggregative *Escherichia coli* supports long-term bacteriophage replication in mice// Environment. Microbiol. -2011.– Vol.14.-P.1844-1854

8. Методические указания по лабораторной диагностике заболеваний, вызываемых *Escherichia coli*, продуцирующих шига-токсины (STEC-культуры), и обнаружению возбудителей STEC-инфекций в пищевых продуктах// МУК 4.2.2963-11// Москва, 2011

## **BACTERIOPHAGE ECD4: ISOLATION, CHARACTERIZATION AND ESTIMATION OF THE TREATMENT EFFECT AT EXPERIMENTAL *ESCHERICHIA COLI* O104:H4-INFECTION**

*Svetoch E.A., Verevkin V.V., Volozhantsev N.V., Borzilov A.I., Borzenkov V.N., Korobova O.V., Kombarova T.I., Krasilnikova V.M., Myakinina V.P., Bannov V.A., Denisenko E.A., Teimurazov M.G., Korovkin S.A., Dyatlov I.A.*

**Key words:** *Escherichia coli*, Shiga-toxin, bacteriophage, Balb/c mice, lytic activity

*Characteristics of bacteriophage ECD4 lytic for Shiga-toxin producing Escherichia coli O104:H4, some EHEC O157:H7 strains and other clinical E. coli strains; and some Shigella strains were determined. It was shown that the phage persists for some time into the body of non-infected mice Balb/c and decreases on 6-8 times the level of the pathogen into infected mice intestinal. The way for the increasing of the bacteriophages treatment effect at experimental E. coli O104:H4 infection is discussed.*

УДК 578.81

## **ОСОБЕННОСТИ ЭКОЛОГИИ ФАГОВ ФИТОПАТОГЕННЫХ БАКТЕРИЙ, ЦИРКУЛИРУЮЩИХ В АГРОЦЕНОЗАХ УКРАИНЫ**

*Семчук Л. И., кандидат биологических наук, старший научный сотрудник, Lidia\_Semchuk@univ.kiev.ua*

*Постоечко Е.М., кандидат биологических наук, старший научный сотрудник*

*Ромашев С. А., старший инженер,*

*ОНЦ «Институт биологии» Киевский*

*национальный университет имени Тараса Шевченко, тел. +38-044- 521-35-02.*

**Ключевые слова:** Бактериофаги, экология, фитопатогенные бактерии, нуклеиновые кислоты, рекомбинанты

*Изучали экологию фагов фитопатогенных бактерий четырнадцати штаммов родов *Xanthomonas*, *Erwinia* и *Pseudomonas*. Фаги, в отдельном биоценозе, удавалось обнаружить ко всем тестовым штаммам, при проведении ряда последовательных отборов проб. В то же*