










МРНТИ 34.27.29, 34.25.29

<https://doi.org/10.26577/eb.2021.v88.i3.04>

М.С. Алексюк* , А.П. Богоявленский , П.Г. Алексюк ,
И.А. Зайцева , Е.С. Молдаханов , К.С. Аканова ,
Н.С. Соколова , Э.С. Омиртаева , В.Э. Березин 

ТОО «Научно-производственный центр микробиологии и вирусологии», Казахстан г. Алматы

*e-mail: madina.a06@gmail.com

АКТИВНОСТЬ БАКТЕРИОФАГА CEC_KAZ_2018 ПРОТИВ ШТАММОВ *E. COLI*, ВЫЗЫВАЮЩИХ КОЛИБАКТЕРИОЗ ЦЫПЛЯТ

В соответствии с Европейским агентством по безопасности пищевых продуктов (EFSA) кампилобактериоз, сальмонеллез и эшерихиоз являются основными патогенами пищевого происхождения и как следствие серьезной проблемой для общественного здравоохранения. Из-за неконтролируемого использования антибиотиков в качестве пищевых добавок птицеводческая отрасль одной из первых столкнулась с проблемой распространения антибиотикоустойчивости среди бактериальных патогенов. Возникновение инфекций с множественной лекарственной устойчивостью и неэффективность антибиотиков является одной из основных проблем современной ветеринарии. Постепенное увеличение числа бактерий с множественной лекарственной устойчивостью привело к росту исследований по использованию бактериофагов для борьбы с бактериальными инфекциями. Фаготерапия является весьма перспективным направлением, благодаря высокой специфичности бактериофагов, их безвредности и способности размножаться непосредственно на патогене. Кроме того, бактериофаги обнаруживают в каждой экосистеме и их приблизительная численность на Земле может достигать 10^{31} , что более чем в 10 раз превышает количество охарактеризованных бактерий, которые являются практически неисчерпаемым источником для выделения новых, более эффективных штаммов.

В данном исследовании был проведен анализ распространения штаммов *E. coli* на птицеводческих хозяйствах Алматинской области, а также изучение морфологии бактериофага CEC_KAZ_2018 и его литических свойств по отношению к вновь выделенным штаммам *E. coli*.

Из органов цыплят с признаками колибактериоза было изолировано и идентифицировано 15 культур *Escherichia coli*. Анализ филогенетических групп изолятов показал, что большинство (73,4%) относились к филогруппе D. При этом было выявлено, что до 50% изолятов проявляли устойчивость к антибиотикам III поколения: цефтазидиму, азтреонаму и цефтазидим/клавуланату.

В результате изучения спектра литической активности было установлено, что бактериофаг CEC_KAZ_2018 способен лизировать 10 из 15 изолированных культур. Тем самым данный бактериофаг является весьма перспективным кандидатом для создания на его основе антибактериальных препаратов для борьбы с колибактериозом цыплят.

Ключевые слова: колибактериоз, АРЕС, антибиотикорезистентность, бактериофаг, BIOLOG®.

M.S. Alexyuk*, A.P. Bogoyavlenskiy, P.G. Alexyuk, I.A. Zaitseva, Y.S. Moldakhanov,
K.S. Akanova, N.S. Sokolova, E.S. Omirtaeva, V.E. Berezin

LLC "Research and Production Center for Microbiology and Virology", Kazakhstan, Almaty

*e-mail: madina.a06@gmail.com

Activity of CEC_KAZ_2018 bacteriophage against *E. coli* strains causing colibacillosis in chickens

According to the European Food Safety Agency (EFSA) campylobacteriosis, salmonellosis and escherichiosis are major foodborne pathogens and, as a consequence, a serious public health problem. Due to the uncontrolled use of antibiotics as food additives, the poultry industry was one of the first faced the problem of spreading antibiotic resistance among bacterial pathogens. The emergence of multidrug-resistant infections and the ineffectiveness of antibiotics is one of the main problems of modern veterinary medicine. The gradual increase in the number of multidrug-resistant bacteria has led to an increase in research on the use of bacteriophages to combat bacterial infections. Phage therapy is a very promising alternative approach, due to the high specificity of bacteriophages, their harmlessness and the ability to reproduce directly on the pathogen. In addition, bacteriophages are the most abundant organisms and

their approximate number on Earth can reach 10^{31} , and are an almost inexhaustible source for isolating new, more effective strains.

In this study, the distribution of *E. coli* strains on poultry farms in the Almaty region were analyzed, as well as studied the morphology of the CEC_KAZ_2018 bacteriophage and its lytic properties in relation to newly isolated *E. coli* strains.

From samples of internal organs of chickens with signs of colibacillosis, 15 cultures of *Escherichia coli* were isolated and identified. Analysis of the phylogenetic groups of isolates showed that the majority (73.4%) belonged to phylogroup D. It was revealed that up to 50% of the isolates showed resistance to antibiotics of the third generation: ceftazidime, aztreonam, and ceftazidime / clavulanate.

Findings of the current study on the spectrum of lytic activity showed that the bacteriophage CEC_KAZ_2018 is able to lyse 10 out of 15 isolated cultures. Thus, this bacteriophage is a very promising candidate for the creation of antibacterial agents to combat colibacillosis in chickens.

Key words: colibacillosis, APEC, antibiotic resistance, bacteriophage, BIOLOG®.

М.С. Алексюк*, А.П. Богоявленский, П.Г. Алексюк, И.А. Зайцева, Е.С. Молдаханов, К.С. Аканова, Н.С. Соколова, Э.С. Омиртаева, В.Э. Березин

«Микробиология және вирусология ғылыми-өндірістік орталығы» ЖШС, Қазақстан, Алматы қ.

*e-mail: madina.a06@gmil.com

CEC_KAZ_2018 бактериофагының тауық колибактериозын тудыратын *E. coli* штамдарына қарсы белсенділігі

Азық-түлік қауіпсіздігі жөніндегі Еуропалық агенттікке (EFSA) сәйкес қарастырғанда кампилобактериоз, сальмонеллез және эшерихиоз-тамақтанудың негізгі қоздырғыштары және нәтижесінде денсаулық сақтау үшін үлкен мәселе тудырады. Антибиотиктерді тағамдық қоспалар ретінде бақылаусыз қолданудың арқасында құс шаруашылығы алғашқылардың бірі болып бактерияларды қоздырғыштар арасында антибиотикке төзімділіктің таралу проблемасына тап болды. Көптеген дәрілерге төзімді инфекциялардың пайда болуы және антибиотиктердің тиімсіздігі қазіргі ветеринарияның негізгі проблемаларының бірі болып табылады. Көптеген дәрілерге төзімді бактериялар санының біртіндеп артуы бактериялық инф. Фаготерапия бактериофагтардың жоғары ерекшелігіне, олардың зиянсыздығына және патогенге тікелей көбейту қабілетіне байланысты өте перспективалы бағыт болып табылады. Инфекциялармен күресу үшін бактериофагтарды қолдану бойынша зерттеулердің өсуіне әкелді. Сонымен қатар, бактериофагтар әр экожүйеде кездеседі және олардың жер бетіндегі шамамен саны 10^{31} -ге жетуі мүмкін, бұл сипатталған бактериялардың санынан 10 есе көп және жаңа, тиімді штамдарды шығарудың іс жүзінде таусылмайтын көзі болып табылады.

Бұл зерттеуде біз *E. coli* штамдарының Алматы облысындағы құс фабрикаларында таралуын талдадық, сонымен қатар CEC_KAZ_2018 бактериофагының морфологиясын және оның жаңадан оқшауланған *E. coli* штамдарына қатысты литикалық қасиеттерін зерттедік.

Колибактериоз белгілері бар тауық мүшелерінен 15 *Escherichia coli* дақылдары оқшауланып анықталды. Изоляттардың филогенетикалық топтарын талдау көрсеткендей, көпшілігі (73,4%) d филогруппасына жатады. Сонымен қатар, изоляттардың 50%-ына дейін үшінші буындағы антибиотиктерге: цефтазидим, азтреонам және цефтазидим / клавуланатқа төзімділік көрсететіні анықталды.

Литикалық белсенділіктің спектрін зерттеу нәтижесінде CEC_KAZ_2018 бактериофагының 15 оқшауланған дақылдардың 10-ынан лизис алуға қабілетті екендігі анықталды. Осылайша, бұл бактериофаг тауықтардағы колибактериозбен күресу үшін оның негізінде бактерияға қарсы дәрі-дәрмектер құрудың өте перспективалы үміткері болып табылады.

Түйін сөздер: колибактериоз, APEC, антибиотикке төзімділік, бактериофаг, BIOLOG®.

Введение

E. coli является одной из составляющей нормальной микрофлоры желудочно-кишечного тракта не только млекопитающих, но и птиц [1]. Являясь комменсальным организмом, некоторые штаммы кишечной палочки могут приобретать патогенность и стать причиной развития у цыплят таких болезней как перикардит, воздуш-

ный саккулит, перигепатит, перитонит и другие внекишечные заболевания, в совокупности, называемые колибактериозом.

Патогенные штаммы *E. coli* ставшие причиной развития любой локальной или системной инфекции, получили обозначение APEC – Avian Pathogenic *E. coli*.

APEC принадлежит объединяет микроорганизмы нескольких серотипов; и остается одним

из самых распространенных бактериальных заболеваний, поражающим птицеводство во всем мире [1]. АРЕС может стать причиной массовой смертности среди поголовья цыплят на птицефабриках, что приводит к серьезным экономическим потерям, при этом выжившие цыплята, в основном имеют недостаточный вес, что делает не рентабельным их дальнейшее содержание [2, 3]. Из-за стресса, вызванного сопутствующими инфекциями и плохими условиями содержания колибактериоз может развиваться и у взрослой птицы [4]. Кроме того, АРЕС может поражать и яйца птицы вызывая перитонит яиц и инфекцию желточного мешка [5–7]. Клинические признаки колибактериоза малоспецифичны и проявляются в виде внезапной смерти, слабости, летаргии, депрессии, снижении аппетита, замедлении роста и, диареи. Тяжесть заболевания определяется возрастом, длительностью инфекции, условий ведения и существующих сопутствующих инфекций [8, 9]. АРЕС может быть охарактеризована на основе факторов вирулентности, серотипа, филогенетической группы и лекарственной устойчивости и принадлежит в основном к группе B2 и D [10, 11].

Типичная стратегия профилактики АРЕС включают строгий контроль предрасполагающих факторов, введение антибиотиков на начальных стадиях заболевания, а также вакцинацию. К сожалению, чрезмерное использование антибиотиков без определения к ним чувствительности у микроорганизмов и отсутствие комплексного подхода приводит к формированию множественной лекарственной устойчивости у *E. coli*, что в дальнейшем значительно снижает эффективность антибиотикотерапии вспышек колибактериоза [12, 13]. Кроме того, с точки зрения экологии, безопасности конечного продукта и здравоохранения, необходимо минимизировать использование антибиотиков при выращивании сельскохозяйственных животных, включая домашнюю птицу [14].

На сегодняшний день наиболее часто применяемыми антибактериальными препаратами для лечения колибактериоза являются тетрациклины, фторхинолоны и сульфаниламиды, вследствие чего регистрируют высокие показатели устойчивости к данным препаратам [15]. Например, в ходе проведенных исследований была выявлена устойчивость более чем у 80% штамма *E. coli*, выделенной из печени бройлеров 10 различных хозяйств Китая, к фторхинолонам, налидиксовой кислоте, тетрациклину и другим классам антибиотиков [16]. При исследовании

штаммов АРЕС была обнаружена 100% устойчивость к антибиотикам тетрациклину и сульфаметоксазол/триметоприму, и 79% этих же штаммов показали устойчивость к хлорамфениколу, ампициллину, ципрофлоксацину и энрофлоксацину [17].

Ранее проведенные исследования по разнообразию антигенного состава *E. coli* среди поголовья кур на некоторых предприятиях малого бизнеса, занимающихся выращиванием бройлеров на территории Республики Казахстан, показали, что частота распространения разных серогрупп *E. coli* варьировала. Группа патогенного серотипа O157 и патогенных групп так называемых не O157 серогрупп: O26, O111, O103, O145 составляла 62% среди анализируемых последовательностей, группа птичьих серогрупп (O1, O18, O78) составляла 15% последовательностей, а на долю остальных 11 групп приходилось 23% последовательностей. Также при изучении антибиотикорезистентности изолированных от погибших цыплят 12 и 19 дневного возраста с явными клиническими признаками колибактериоза штаммов *E. coli* на тест планшетах с 12 антибиотиками беталактамов и цефалоспоринов показало, что некоторых из них устойчивы не только к группе беталактамов, но и цефалоспоринов 3 и 4 поколения [18]. В поисках альтернативных стратегий профилактики и борьбы с бактериальными инфекциями одним из наиболее популярных предложений на Генеральной Ассамблеи ООН 21 сентября 2016 года являлся пересмотр практики терапии бактериофагами [19].

Бактериофагами называются вирусы, встречающиеся в окружающей среде, способные контролировать численность бактериальной популяции. Эти вирусы не имеют патогенное воздействие на животных или растения. Благодаря этой характеристике они могут быть использованы в борьбе с некоторыми бактериальными заболеваниями сельскохозяйственных животных [20]. Большим преимуществом бактериофагов является то, что они существуют в огромном количестве в природе и безопасны для использования в качестве альтернативы антибиотикам. Применение фаготерапии в пищевой и сельскохозяйственной промышленности значительно сократит глобальное использование антибиотиков. В некоторых развитых странах фаги одобрены для использования и имеются в продаже; например, ListShield™ и EcoShield™ были одобрены Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов

США (FDA) для борьбы с патогенами пищевого происхождения [21-24].

В данном исследовании был проведен анализ распространения штаммов *E. coli* на птицеводческих хозяйствах Алматинской области, а также изучение морфологии бактериофага СЕС_KAZ_2018 и его литических свойств по отношению к вновь выделенным штаммам *E. coli*.

Материалы и методы

В исследованиях использовали бактериофаг СЕС_KAZ_2018 из коллекции ТОО «НПЦ микробиологии и вирусологии». Бактериофаг был выделен на культуре *E. coli* Фаес.А1К, вызывающей колибактериоз птиц. Ранее проведенное полногеномное секвенирование данного фага позволило установить, что он принадлежит к порядку *Caudovirales*, семейству *Siphoviridae* [25].

Выделение бактериальных культур. Все культуры *E. coli* были изолированы патолого-анатомическим методом из туш бройлеров с признаками колибактериоза. Отбор туш проводили с птицефабрик алматинской области (АО «Алатау Кус», «Сорбулак»). Все бактериальные культуры были изолированы из органов погибших бройлеров с признаками колибактериоза и фекалий. Образцы желудка, почек, печени, кишечника и фекалий всех цыплят-бройлеров помещали на агар MacConkey. Инокулированные чашки Петри инкубировали в течение ночи при температуре 37 °С. После инкубирования были изолированы колонии розовато-красного цвета и бесцветные, предположительно лактозонегативные и лактозопозитивные культуры.

Идентификацию изолированных культур проводили с помощью системы определения микроорганизмов Biolog GEN III (Biolog, USA).

В микропланшетах Biolog GEN III анализировали микроорганизмы по 94 фенотипическим тестам: использования 71 источника углерода и чувствительности к 23 химическим веществам. Все необходимые питательные и биохимические вещества предварительно нанесены на микропланшет Biolog GEN III производителем. Для колориметрической индикации окислительно-восстановительной активности использовали соли тетразолия. В лунки планшета наносили суспензию тестируемой бактериальной культуры объемом 100 мкл, заранее подготовленной согласно протоколу производителя. Планшеты с нанесенной культурой инкубировали в течение 18-24 часов при температуре 33 °С. По истечении времени инкубации планшеты анализировали при помощи программного обеспечения системы идентификации OmniLog® Data Collection.

Определение филогрупп выделенных штаммов. ПЦР для определения филогрупп была проведена с использованием праймеров, нацеленных на четыре основные филогенетические группы (А, В1, В2 и D) по методу, описанному Clermont et al [26]. Вкратце, ПЦР проводили в объемах 25 мкл, содержащих 2,5 мкл реакционного буфера, 2,5 мкл 2мМ dNTP, 0,5 мкл каждого праймера, 0,4 мкл ДНК-полимеразы Taq Pol (Thermo Scientific) и 1 мкл ДНК. Условия ПЦР были следующими: денатурация 5 мин при 94 °С; 30 циклов по 30 секунд при 94 °С, 30 секунд при 55 °С и 30 секунд при 72 °С; и последняя стадия удлинения 7 мин при 72 °С. Продукты ПЦР визуализировали в ультрафиолетовом свете после электрофореза в 1% агарозном геле. Отнесение к филогенетической группе А, В1, В2 и D зависело от обнаружения генов *YjaA*, *TspE4.C2* и *ChuA* или их комбинации, как описано Clermont et al (2000). Детали использованных праймеров перечислены в Таблице 1.

Таблица 1 – Последовательности праймеров для определения филогенетических групп *E. coli* и размеры ампликонов

Ген	Последовательность праймера (5' – 3')	Размер ампликона (пн)
ChuA	F: GACGAACCAACGGTCAGGAT R: TGCCGCCAGTACCAAAGACA	279
yjaA	F: TGAAGTGTCAAGGACGCTG R: ATGGAGAATGCGTTCCTCAAC	211
TspE4.C2	F: GAGTAATGTCGGGGCATTCA R: CGCGCCAACAAAGTATTACG	152

Тестирование выделенных бактериальных культур на лекарственную устойчивость.

Определение антибиотикочувствительности изолированных культур проводили согласно протоколу производителя при помощи набора СЕНСИ-ЛА-ТЕСТ Г-II (Erba Mannheim, Чехия) для определения чувствительности бактерией сем. *Enterobacteriaceae* к антибактериальным препаратам. Выбор концентраций антибиотика и интерпретация результатов основаны на европейских стандартах EUCAST (www.eucast.org) от 05.01.2011. Набор содержал следующие антибиотики: Пиперациллин/тазобактам, Меропенем, Цефепим, Цефтазидим, Азтреонам, Тигециклин, Нетилмицин, Цефтазидим/клавуланат. Метод основан на регидратировании лунок с антибиотиками с помощью суспензионной среды и последующим внесением бактериальной суспензии. Результаты чувствительности микроорганизмов учитывали через 18-24 ч инкубации визуально.

Выделение бактериальной ДНК. Бактериальную ДНК выделяли из суточной культуры при помощи набора Pure Link Genomic DNA (Invitrogen, USA). Из полученной ДНК были сделаны аликвоты для использования в ПЦР.

Определение спектра литической активности бактериофага СЕС_KAZ_2018. Спектр литической активности бактериофага СЕС_KAZ_2018 определяли путём его совместного культивирования с изолированными бактериями в микропланшетах. В лунки микропланшета вносили 150 мкл МПБ, 50 мкл фаголизата и 50 мкл суточной бактериальной суспензии с индексом мутности 1 McF. В качестве контроля роста бактериальной тест-культуры использовали образцы, содержащие вместо бактериофага 50 мкл стерильного натрий-фосфатного буфера, pH 7,4. В качестве отрицательного контроля использовали образец, содержащий только 250 мкл стерильной питательной среды. Каждый эксперимент проводили минимум в 3 повторностях. Динамику роста бактерий оценивали по изменению оптической плотности суспензии при 600 нм. Сканирование микропланшетов проводили на многоканальном спектрофотометре Tecan Infinite 200 Pro через каждые 30 минут в течении всего срока культивирования [27].

Морфологическое исследование бактериофага с помощью электронной микроскопии. Структуру бактериофага СЕС_KAZ_2018 изуча-

ли методом трансмиссионной электронной микроскопии при инструментальном увеличении в 60 – 80 тысяч раз. Перед нанесением образца на сеточки бактериофаг концентрировали методом ультрацентрифугирования. Образцы негативно контрастировали 3% фосфорно-вольфрамовой кислотой (pH 6,8) методом флотационного или капельного окрашивания. В качестве подложки для препаратов использовали органические смолы на основе виниловых полимеров.

Результаты исследований и их обсуждение

В результате исследований и посева органов цыплят с признаками эшерихиоза методом отпечатка на селективную среду было выделено 20 культур, предварительно относящихся к лактозонегативным и лактозопозитивным представителям семейства *Enterobacteriaceae*. Родовая и видовая идентификация изолятов в системе Biolog, подтвердила, что 15 изолятов относились к семейству *Enterobacteriaceae*, роду *Escherichia*, виду *Escherichia coli* с максимальной вероятностью и сходством до 56,9% (рисунок 1, таблица 2).

ПЦР-амплификация, нацеленная на гены *ChuA*, *ujaA* и *TspE4.C2*, классифицировала 15 изолятов АРЕС на филогенетические группы В1, В2 и D. В таблице 3 представлены гены и / или их комбинации, филогенетическая группа и доля изолятов *E. coli* в каждой категории.

В результате изучения антибиотикочувствительности изолятов *E. coli* было показано, что 7 из 15 изолятов не проявляли устойчивость ни к одному из исследуемых антибиотиков. 6 изолятов проявляли устойчивость к трем антибиотикам: цефтазидиму, азтреонаму и цефтазидим/клавуланату, 1 изолят (Kid. m/l 04.06) помимо 3-х перечисленных проявлял устойчивость к комбинированному антибиотику пиперациллин/тазобактаму и к нетилмицину. 1 изолят (Sor. int. bc2) была устойчива лишь к азтреонаму. Препараты меропенем, цефепим и тигециклин подавляли рост всех изолированных культур. Резистентность минимум к трем классам противомикробных препаратов; и, следовательно, множественная лекарственная устойчивость была выявлена у одного изолята (Kid. m/l 04.06). На рисунке 2 представлен средний процент резистентных изолятов к каждому из протестированных антибиотиков.

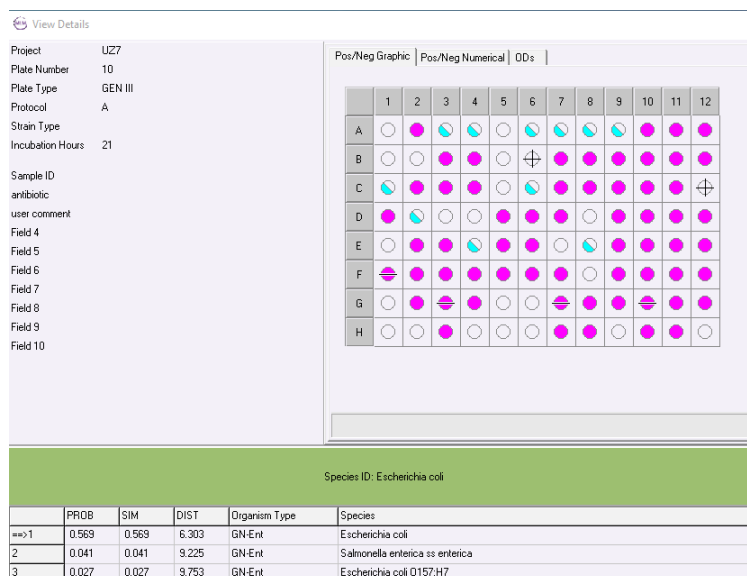


Рисунок 1 – «Метаболический отпечаток» одной из исследуемых культур в системе идентификации OmniLog® Data Collection

Таблица 2 – Биохимическая идентификация изолированных бактериальных культур по базе данных OmniLog® Data Collection

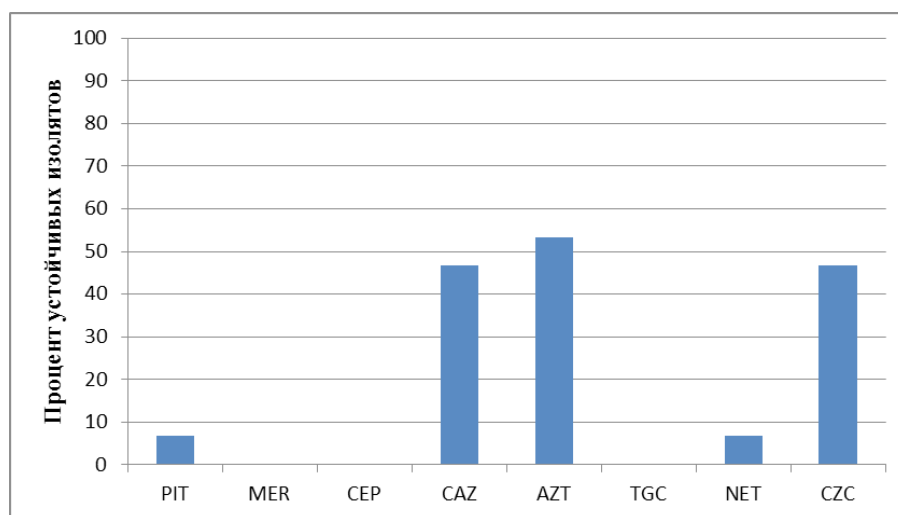
Название изолята <i>E. coli</i>	Вероятность	Сходство
Sor. stom. bc1	51%	51%
Sor. lb. sc2	56,9%	56,9%
Sor. bron. bc1	50,5%	50,5%
Sor. kid. bc1	55,0%	55,0%
Sor. bron. sc2	52,6%	52,6%
Sor. stom. sc2	52,9%	52,9%
Int. m/l 04.06	56,9%	56,9%
Liv. m/l 04.06	53%	53%
Kid. m/l 04.06	52,3%	52,3%
Faec. H. m/l Uz.	54,2%	54,2%
Sor. liv. sc2	52,9%	52,9%
Sor. kid. sc2	55,5%	55,5%
Sor. liv. bc2	51%	51%
Sor. int. bc2	50,3%	50,3%
Yun 3d pas	50,4%	50,4%

Таблица 3 – Филогенетические группы изолятов

Название изолята <i>E. coli</i>	ПЦР – продукт			Фило – группа	Частота, n =15 (100%)
	chuA	yjaA	TSPE4.C2		
Sor.stom. bc1	-	-	+	B1	13,3%
Sor.bron.bc1	-	-	+	B1	

Продолжение таблицы 3

Название изолята <i>E. coli</i>	ПЦР – продукт			Фило – группа	Частота, n =15 (100%)
	chuA	yjaA	TSPE4.C2		
Faec.H.m/1 Uz.	+	+	-	B2	13,3%
Int. m/1 04.06	+	+	+	B2	
Liv. m/1 04.06	+	-	-	D	73,4%
Kid. m/1 04.06	+	-	-	D	
Sor. liv. sc2	+	-	+	D	
Sor. kid. sc2	+	-	+	D	
Sor. liv. bc2	+	-	+	D	
Sor. int. bc2	+	-	+	D	
Sor.stom sc2	+	-	+	D	
Yun 3d pas	+	-	-	D	
Sor. kid. bc1	+	-	+	D	
Sor.bron. sc2	+	-	+	D	
Sor. lb. sc2	+	-	-	D	



По оси ординат различные антибиотики: PIT – пиперацillin/тазобактам, MER – меропенем, CEP – цефепим, CAZ – цефтазидим, AZT – азтреонам, TGC – тигециклин, NET – нетилмицин, CZC – цефтазидим/клавуланат

Рисунок 2 – Средний процент устойчивости к исследуемым антибиотикам среди всех полученных изолятов *E. coli*

Высокий уровень устойчивости АРЕС к противомикробным препаратам, продемонстрированный в этом исследовании, требует строгих правил использования антибиотиков на птицефабриках. Кроме того, из-за проблем, связанных с разработкой новых антибиотиков, высокий уровень резистентности подтверждает необходимость введения альтернативных средств, таких как фаготерапия. В связи с чем были изучены биологические свойства ранее выделенного

бактериофага CEC_KAZ_2018 и возможность его применения для лизиса выделенных изолятов *E. coli*.

Спектр литической активности бактериофага CEC_KAZ_2018 оценивали по его способности лизировать выделенные штаммы *E. coli* при совместном культивировании. Титр фаголизата по Грациа составлял не менее 10^5 - 10^6 вирусных частиц в мл, индекс мутности суточной бактериальных суспензий составлял 1

McF. Количественное определение роста бактерий при совместном культивировании с бактериофагом проводили в микропланшетах на многоканальном спектрофотометре в течении 6 часов.

В результате было установлено (таблица 4), что бактериофаг СЕС_KAZ_2018 обладал литической активностью против 10 из 15 изолированных культур. При этом полностью подавлял рост 3-х изолятов *E. coli*. Рост двух изолятов *E. coli* Фаес.Н. m/l Uz. и Int. m/l 04.06 подавлял на 76 % и 73% соответственно. Рост изолятов Kid. m/l 04.06, Sor. liv. sc2, Sor. kid. sc2, Sor. int. bc2, Sor. stom sc2 сдерживал в пределах 30%.

ческой активностью против 10 из 15 изолированных культур. При этом полностью подавлял рост 3-х изолятов *E. coli*. Рост двух изолятов *E. coli* Фаес.Н. m/l Uz. и Int. m/l 04.06 подавлял на 76 % и 73% соответственно. Рост изолятов Kid. m/l 04.06, Sor. liv. sc2, Sor. kid. sc2, Sor. int. bc2, Sor. stom sc2 сдерживал в пределах 30%.

Таблица 4 – Спектр литической активности бактериофага СЕС_KAZ_2018

Название изолята <i>E. coli</i>	Уровень литической активности фага	Название изолята <i>E. coli</i>	Уровень литической активности фага
Sor.stom. bc1	-	Sor. liv. bc2	+++
Sor.bron.bc1	-	Sor. int. bc2	+
Фаес.Н. m/l Uz.	++	Sor.stom sc2	+
Int. m/l 04.06	++	Yun 3d pas	+++
Liv. m/l 04.06	-	Sor. kid. bc1	-
Kid. m/l 04.06	+	Sor.bron. sc2	-
Sor. liv. sc2	+	Sor. lb. sc2	+++
Sor. kid. sc2	+		

* – +++ – подавление роста бактериальной культуры на 100-80%; ++ – подавление роста бактериальной культуры на 80-40%; + – подавление роста бактериальной культуры на 40-20%; -

Судя по результатам, касающихся диапазона хозяев, максимальное количество, которое лизировал бактериофаг СЕС_KAZ_2018, было 10 из 15 (около 67%). Это характеризует его как хорошего кандидата для включения в состав новых антибактериальных препаратов созданных на основе бактериофагов, которые будут использованы в качестве альтернативного терапевтического средства в птицеводстве.

Однако существует потребность в получении большего количества фагов с более широким кругом хозяев.

В результате исследования бактериофага СЕС_KAZ_2018 при помощи трансмиссионной электронной микроскопии было показано, что фаг имеет округлую головку с тонким, длинным, слегка изогнутым хвостом с ярко выраженными шипами (рисунок 3).

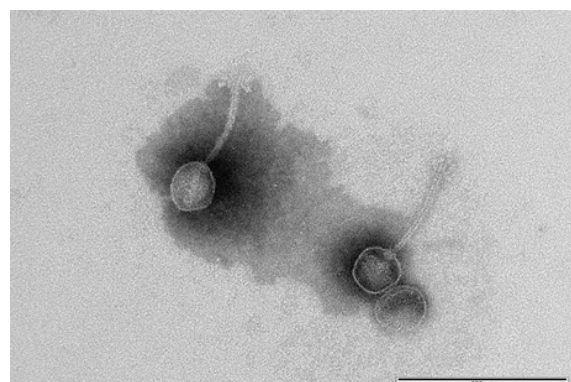
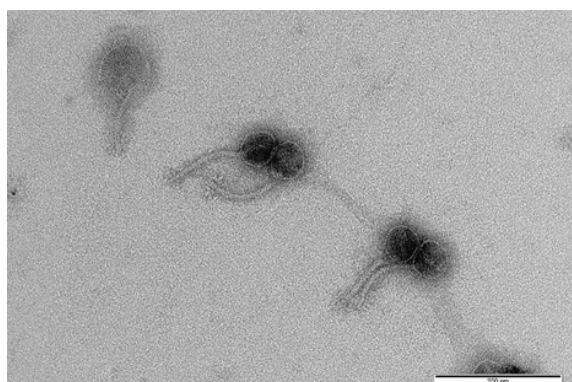


Рисунок 3 – Фотографии электронной микроскопии бактериофага СЕС_KAZ_2018

По морфологическим признакам бактериофаг СЕС_KAZ_2018 был классифицирован как представитель отряда *Caudovirales* и семейства *Siphoviridae*, что дает возможность использования данного вируса даже против капсулообразующих микроорганизмов.

Заключение

В результате проведенной работы, из органов цыплят с признаками колибактериоза, было изолировано 20 культур, относящихся к семейству *Enterobacteriaceae*, из которых 15 при помощи их «метаболического отпечатка» в системе Biolog были идентифицированы как *Escherichia coli*. Анализ филогенетических групп изолятов показал, что большинство (73,4%) относились к филогруппе D. В ходе исследования распространения антибиотикоустойчивости среди выделенных культур было выявлено, что около 50% изолятов проявляли устойчивость к трем антибиотикам: цефтазидиму, азтреонаму и цефтазидим/клавуланату. Была выявлена культура с резистентностью к трем разным классам противомикробных препаратов. В результате изучения спектра литической активности было установлено, что бактериофаг СЕС_KAZ_2018

обладал литической активностью против 10 из 15 изолированных культур.

Результаты данного исследования указывают, что фаговая терапия может быть эффективной альтернативой антибиотикам в борьбе с инфекциями АРЕС в птицеводстве. Между тем эффективность фаговой терапии во многом зависит от выявления циркулирующих бактериальных штаммов, изучения литических свойств и спектра активности выделенных фагов, их точный подбор и успешные эксперименты *in vivo*.

Конфликт интересов

Все авторы прочитали и ознакомлены с содержанием статьи и не имеют конфликта интересов.

Источник финансирования

Работа выполнена по теме проекта АР08052089 «Литические бактериофаги против эшерихиоза кур как основа новых терапевтических препаратов» выполняемому в рамках Договора от 13 мая 2020 года №61 на грантовое финансирование молодых учёных (2020-2022гг.)

Литература

- 1 Dziva F., Stevens M.P. Colibacillosis in poultry: unravelling the molecular basis of virulence of avian pathogenic *Escherichia coli* in their natural hosts // *Avian Pathol.* – 2008. – Vol. 37. – P. 355–366.
- 2 Matin M.A., Islam M.A., Khatun M.M. Prevalence of colibacillosis in chickens in greater Mymensingh district of Bangladesh // *Vet World.* – 2017. – Vol. 10. – P. 29–33.
- 3 Stacy A.K., Mitchell N.M., Maddux J.T., De La Cruz M.A., Dura'n L., Giro'n J.A., et al. Evaluation of the prevalence and production of *Escherichia coli* common pilus among avian pathogenic *E. coli* and its role in virulence // *PLoS One.* – 2014. – Vol. 9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0086565>.
- 4 Panth Y. Colibacillosis in poultry: A review // *J Agric Nat Resour.* – 2019. – Vol. 2. – P. 301–311.
- 5 Dou X., Gong J., Han X., Xu M., Shen H., Zhang D., et al. Characterization of avian pathogenic *Escherichia coli* isolated in eastern China // *Gene.* – 2015. – Vol. 576. – P. 244–248.
- 6 Paixao A.C., Ferreira A.C., Fontes M., Themudo P., Albuquerque T., Soares M.C., et al. Detection of virulence-associated genes in pathogenic and commensal avian *Escherichia coli* isolates // *Poult Sci.* – 2016. – Vol. 95. – P. 1646–1652.
- 7 Subedi M., Luitel H., Devkota B., Bhattarai R.K., Phuyal S., Panthi P., et al. Antibiotic resistance pattern and virulence genes content in avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) from broiler chickens in Chitwan, Nepal // *BMC Vet Res.* – 2018. – Vol. 14. – P. 1–6.
- 8 Abalaka S., Sani N., Idoko I., Tenuche O., Oyelowo F., Ejeh S., et al. Pathological changes associated with an outbreak of colibacillosis in a commercial broiler flock // *Sokoto J Vet Sci.* – 2017. – Vol. 15. – P. 95–102.
- 9 Kabir L.S.M. Avian colibacillosis and salmonellosis: A closer look at epidemiology, pathogenesis, diagnosis, control and public health concerns // *Int J Environ Res Public Health.* – 2010. – Vol. 7. – P. 89–114.
- 10 Johnson J.R., Stell A.L. Extended virulence genotypes of *Escherichia coli* strains from patients with urosepsis in relation to phylogeny and host compromise // *J Infect Dis.* – 2000. – Vol. 181. – P. 261–272.
- 11 Picard B., Garcia S., Gouriou S., Duriez P., Brahim N., Bingen E., et al. The Link between Phylogeny and Virulence in *Escherichia coli* Extraintestinal Infection // *Infect Immun.* – 1999. – Vol. 67. – P. 546–553.
- 12 Gregova G., et al. Antibiotic resistance of *Escherichia coli* isolated from a poultry slaughterhouse // *Ann Agric Environ Med.* – 2012. – Vol. 19. – P. 75–77.

- 13 Amara A., Ziani Z., Bouzoubaa K. Antibioresistance of E.coli strains isolated in Morocco from chickens with colibacillosis // *Veterinary microbiology.* – 1995. – Vol. 43(4). – P. 325–30.
- 14 Singer R.S., Hofacre C.L. Potential impacts of antibiotic use in poultry production // *Avian diseases.* – 2006. – Vol. 50(2). – P. 161–72.
- 15 Zhao S., Maurer J.J., Hubert S., De Villena J.F., McDermott P.F., Meng J., Ayers S., English L., White D.G. Antimicrobial susceptibility and molecular characterization of avian pathogenic Escherichia coli isolates // *Veterinary Microbiology.* – 2005. – Vol.107. – P. 215-224.
- 16 Yang H., Chen S., White D.G., Zhao S., McDermott P., Walker R., Meng J. Characterization of multiple-antimicrobial-resistant Escherichia coli isolates from diseased chickens and swine in China // *Journal of Clinical Microbiology.* – 2004. – Vol. 42. – P. 3483-3489.
- 17 Li X.S., Wang G.Q., Du X.D., Cui B.A., Zhang S.M., Shen J.Z. Antimicrobial susceptibility and molecular detection of chloramphenicol and florfenicol resistance among Escherichia coli isolates from diseased chickens // *Journal of Veterinary Science* – 2007. – Vol. 8. – P. 243-247.
- 18 Молдаханов Е.С., Алексюк М.С., Алексюк П.Г., Бияшев К.Б., Богоявленский А.П. Разнообразие антигенных свойств E.coli среди поголовья кур // *Исследования, результаты.* – 2019. – №1 (81). – С. 20-28.
- 19 Lin D.M., Koskella B., Lin H.C. Phage therapy: An alternative to antibiotics in the age of multi-drug resistance // *World Journal of Gastrointestinal Pharmacology and Therapeutics.* – 2017. – Vol. 8(3). – P. 162-173.
- 20 Huff W.E., Huff G.R., Rath N.C., Donoghue A.M. Immune interference of bacteriophage efficacy when treating colibacillosis in poultry // *Poultry Science.* – 2010. – Vol. 89. – P. 895-900.
- 21 Doffkay Z., Kovarcs T., Rarkhely G. Bacteriophage therapy against plant, animal and human pathogens // *Acta Biol Szege.* – 2015. – Vol. 59. – P. 291–302.
- 22 Miller R.W., Skinner E.J., Sulakvelidze A., Mathis G.F., Hofacre C.L. Bacteriophage therapy for control of necrotic enteritis of broiler chickens experimentally infected with Clostridium perfringens // *Avian Dis.* – 2010. – Vol. 54. – P. 33–40.
- 23 Wernicki A., Nowaczek A., Urban-chmiel R. Bacteriophage therapy to combat bacterial infections in poultry // *Virology J.* – 2017. – Vol. 14. – P.1–13.
- 24 Kazibwe G., Katami P., Alinaitwe R., Alafi S., Nanteza A., Nakavuma J.L. Bacteriophage activity against and characterisation of avian pathogenic Escherichia coli isolated from colibacillosis cases in Uganda // *PLoS ONE.* – 2020. – Vol.15. – e0239107.
- 25 Moldakhanov Y.S., Alexyuk M.S., Bogoyavlenskii A.P., Alexyuk P.G., Turmagambetova A.S., Zaitseva I.A., Sokolova N.S., Akanova K.S., Anarkulova E.I., Omirtaeva E.S., Berezin V.E. Complete genome sequence of Escherichia-infecting phage CEC_KAZ_2018, isolated from soil // *Microbiol. Resour. Announc.* – 2019. – Vol. 8. – e00540-19.
- 26 Clermont O., Bonacorsi S., Bingen E. Rapid and Simple Determination of the Escherichia coli Phylogenetic Group // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2000. – Vol. 66. – P. 4555–4558.
- 27 Alves D., Pérez Esteban P., Kot W., et al. A novel bacteriophage cocktail reduces and disperses Pseudomonas aeruginosa biofilms under static and flow conditions // *Microbial Biotechnology.* – 2016. – Vol. 9. – P. 61 – 74.

References

- 1 Abalaka S., Sani N., Idoko I., Tenuche O., Oyelowo F., Ejeh S., et al. (2017) Pathological changes associated with an outbreak of colibacillosis in a commercial broiler flock. *Sokoto J Vet Sci.*, vol. 15, pp. 95–102.
- 2 Alves D., Pérez Esteban P., Kot W., et al. (2016) A novel bacteriophage cocktail reduces and disperses Pseudomonas aeruginosa biofilms under static and flow conditions. *Microbial Biotechnology.*, vol. 9, pp. 61 – 74.
- 3 Amara A., Ziani Z., Bouzoubaa K. (1995) Antibioresistance of E.coli strains isolated in Morocco from chickens with colibacillosis. *Veterinary microbiology.*, vol. 43(4), pp. 325–30.
- 4 Clermont O., Bonacorsi S., Bingen E. (2000) Rapid and Simple Determination of the Escherichia coli Phylogenetic Group. *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 66, pp. 4555–4558.
- 5 Doffkay Z., Kovarcs T., Rarkhely G. (2015) Bacteriophage therapy against plant, animal and human pathogens. *Acta Biol Szege.*, vol. 59, pp. 291–302.
- 6 Dou X., Gong J., Han X., Xu M., Shen H., Zhang D., et al. (2015) Characterization of avian pathogenic Escherichia coli isolated in eastern China. *Gene.*, vol. 576, pp. 244–248.
- 7 Dziva F., Stevens M.P. (2008) Colibacillosis in poultry: unravelling the molecular basis of virulence of avian pathogenic Escherichia coli in their natural hosts. *Avian Pathol.*, vol. 37, p. 355–366.
- 8 Gregova G., et al. (2012). Antibiotic resistance of Escherichia coli isolated from a poultry slaughterhouse. *Ann Agric Environ Med.*, vol. 19, pp.75-77.
- 9 Huff W.E., Huff G.R., Rath N.C., Donoghue A.M. (2010) Immune interference of bacteriophage efficacy when treating colibacillosis in poultry. *Poultry Science.*, vol. 89, pp. 895-900.
- 10 Johnson J.R., Stell A.L. (2000) Extended virulence genotypes of Escherichia coli strains from patients with urosepsis in relation to phylogeny and host compromise. *J Infect Dis.*, vol. 181, pp. 261–272.
- 11 Kabir L.S.M. (2010) Avian colibacillosis and salmonellosis: A closer look at epidemiology, pathogenesis, diagnosis, control and public health concerns. *Int J Environ Res Public Health.*, vol. 7, pp. 89–114.
- 12 Kazibwe G., Katami P., Alinaitwe R., Alafi S., Nanteza A., Nakavuma J.L. (2020) Bacteriophage activity against and characterisation of avian pathogenic Escherichia coli isolated from colibacillosis cases in Uganda. *PLoS ONE.*, vol.15, e0239107.

- 13 Li X.S., Wang G.Q., Du X.D., Cui B.A., Zhang S.M., Shen J.Z. (2007) Antimicrobial susceptibility and molecular detection of chloramphenicol and florfenicol resistance among *Escherichia coli* isolates from diseased chickens. *Journal of Veterinary Science.*, vol. 8, pp. 243-247.
- 14 Lin D.M., Koskella B., Lin H.C. (2017) Phage therapy: An alternative to antibiotics in the age of multi-drug resistance. *World Journal of Gastrointestinal Pharmacology and Therapeutics.*, vol. 8(3), pp. 162-173.
- 15 Matin M.A., Islam M.A., Khatun M.M. (2017) Prevalence of colibacillosis in chickens in greater Mymensingh district of Bangladesh. *Vet World.*, vol.10, pp. 29–33.
- 16 Miller R.W., Skinner E.J., Sulakvelidze A., Mathis G.F., Hofacre C.L. (2010) Bacteriophage therapy for control of necrotic enteritis of broiler chickens experimentally infected with *Clostridium perfringens*. *Avian Dis.*, vol. 54, pp. 33–40.
- 17 Moldakhanov Y.S., Alexyuk M.S., Alexyuk P.G., Biyashev K.B., Bogoyavlenskiy A.P. (2019) Raznoobrazie antigennyh svoystv *E.coli* sredi pogolov'ya kur [Diversity of antigenic properties of *E. coli* among chickens]. *Issledovaniya, rezul'taty.*, vol. №1 (81), pp. 20-28.
- 18 Moldakhanov Y.S., Alexyuk M.S., Bogoyavlenskiy A.P., Alexyuk P.G., Turmagambetova A.S., Zaitseva I.A., Sokolova N.S., Akanova K.S., Anarkulova E.I., Omirtaeva E.S., Berezin V.E. (2019) Complete genome sequence of *Escherichia*-infecting phage CEC_KAZ_2018, isolated from soil. *Microbiol. Resour. Announc.*, vol. 8, e00540-19.
- 19 Paixao A.C., Ferreira A.C., Fontes M., Themudo P., Albuquerque T., Soares M.C., et al. (2016) Detection of virulence-associated genes in pathogenic and commensal avian *Escherichia coli* isolates. *Poult Sci.*, vol. 95, pp. 1646–1652.
- 20 Panth Y. (2019) Colibacillosis in poultry: A review. *J Agric Nat Resour.*, vol.2, pp.301–311.
- 21 Picard B., Garcia S., Gouriou S., Duriez P., Brahimi N., Bingen E., et al. (1999) The Link between Phylogeny and Virulence in *Escherichia coli* Extraintestinal Infection. *Infect Immun.*, vol. 67, pp. 546–553.
- 22 Singer R.S., Hofacre C.L. (2006) Potential impacts of antibiotic use in poultry production. *Avian diseases.*, vol. 50(2), pp. 161–72.
- 23 Stacy A.K., Mitchell N.M., Maddux J.T., De La Cruz M.A., Dura'n L., Giro'n J.A., et al. (2014) Evaluation of the prevalence and production of *Escherichia coli* common pilus among avian pathogenic *E. coli* and its role in virulence. *PLoS One.*, vol. 9, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0086565>.
- 24 Subedi M., Luitel H., Devkota B., Bhattarai R.K., Phuyal S., Panthi P., et al. (2018) Antibiotic resistance pattern and virulence genes content in avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) from broiler chickens in Chitwan, Nepal. *BMC Vet Res.*, vol. 14, pp. 1–6.
- 25 Wernicki A., Nowaczek A., Urban-chmiel R. (2017) Bacteriophage therapy to combat bacterial infections in poultry. *Virologia J.*, vol. 14, pp. 1–13.
- 26 Yang H., Chen S., White D.G., Zhao S., McDermott P., Walker R., et al. (2004) Characterization of multiple-antimicrobial-resistant *Escherichia coli* isolates from diseased chickens and swine in China. *Journal of clinical microbiology.*, vol. 42(8), pp. 3483–9.
- 27 Zhao S., Maurer J.J., Hubert S., De Villena J.F., McDermott P.F., Meng J., Ayers S., English L., White D.G. (2005) Antimicrobial susceptibility and molecular characterization of avian pathogenic *Escherichia coli* isolates. *Veterinary Microbiology.*, vol.107, pp. 215-224.