## КЛИНИЧЕСКИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2019

Светоч Э. А.[1], Воложанцев Н. В.[1], Верёвкин В. В.[1], Мякинина В. П.[1], Алёшкин А. В.[2], Киселёва И. А.[2], Баннов В. А.[1], Красильникова В. М.[1], Борзенков В. Н.[1], Карцев Н. Н.[1], Дятлов И. А.[1]

# ДИАГНОСТИЧЕСКИЙ БАКТЕРИОФАГ V32 КАК ИНСТРУМЕНТ ДЛЯ БЫСТРОЙ ИДЕНТИФИКАЦИИ *ESCHERICHIA COLI* СЕРОГРУППЫ $O_{157}$

[1]ФБУН Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии Роспотребнадзора, 142279, п.Оболенск, Московская область, Россия;
[2]ФБУН Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора, 125212, Москва, Россия

*Для быстрого поиска и идентификации Escherichia coli серогруппы $O_{157}$, включая шига-токсин продуцирующие E. coli $O_{157}$:$H_7$ (STEC $O_{157}$:$H_7$), среди культур энтеробактерий из первичного посева исследуемого материала предложен эшерихиозный бактериофаг V32 – представитель вирусов бактерий семейства Myoviridae, подсемейства Ounavirinae. Геном фага представлен линейной двунитевой ДНК размером 87875 пар оснований (содержание G/C-пар - 38,9%) и включает 132 открытые рамки считывания (ORF). В геноме отсутствуют детерминанты устойчивости к антибиотикам, гены вирулентности STEC и других известных патогрупп E. coli. Фаг V32 обладает литической активностью в отношении всех исследуемых культур серогруппы E. coli $O_{157}$ (n=183), выделенных от людей и сельскохозяйственных животных в различных регионах Российской Федерации, Японии, Италии. Фаг лизирует лишь 6 из 182 штаммов (3,3%) E. coli, не относящихся к серогруппе $O_{157}$, не активен в отношении штаммов других видов энтеробактерий, что свидетельствует о его высокой специфичности.*

*Использование бактериофага V32 в качестве диагностического инструмента является высокоэффективным, быстрым, дешёвым и простым в исполнении методом, позволяющим идентифировать E. coli серогруппы $O_{157}$, включая серовар E. coli $O_{157}$:$H_7$, в любой бактериологической лаборатории без специального оборудования и специальной подготовки исполнителей.*

Ключевые слова: *шига-токсин продуцирующие Escherichia coli $O_{157}$:$H_7$; бактериофаг; литическая активность фага; гены вирулентности; идентификация E. coli $O_{157}$*

**Для цитирования**: *Светоч Э. А., Воложанцев Н. В., Верёвкин В. В., Мякинина В. П., Алёшкин А. В., Киселева И. А., Баннов В. А., Красильникова В. М., Борзенков В. Н., Карцев Н. Н., Дятлов И. А. Диагностический бактериофаг V32 как инструмент для быстрой идентификации Escherichia coli серогруппы $O_{157}$. Клиническая лабораторная диагностика. 2019; 64 (1): 57-64. DOI: http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-1-57-64*

*Svetoch E. A.[1], Volozhantsev N. V.[1], Verevkin V. V.[1], Myakinina V. P.[1], Aleshkin A. V.[2], Kiseleva I. A.[2], Bannov V. A.[1], Krasilnikova V. M.[1], Borzenkov V. N.[1], Kartsev N. N.[1], Dyatlov I. A.[1]*

DIAGNOSTIC BACTERIOPHAGE V32 AS A TOOL FOR THE RAPID IDENTIFICATION OF *ESCHERICHIA COLI* SEROGROUP $O_{157}$

[1]State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of the Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing, Obolensk, 142279, Russia;

[2]G.N. Gabrichevsky Moscow Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology of the Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing, Moscow, 125212, Russia

*Bacteriophage V32, a representative of bacterial viruses of the Myoviridae family Ounavirinae subfamily, is proposed for search and identification of E. coli $O_{157}$ serogroup, including Shiga-toxin producing E. coli $O_{157}$:$H_7$ (STEC $O_{157}$:$H_7$), among cultures of enterobacteria from the primary seeding of the material studied. Phage genome containes a linear double-stranded DNA of 87875 base pairs with G/C-content of 38.9% and includes 132 open reading frames (ORF). In the genome, there are no determinants of antibiotic resistance, virulence genes of STEC and other well-known pathogroups of E. coli. It has been established that phage V32 has lytic activity against all studied cultures of E. coli $O_{157}$ serogroup (n=183) isolated from people and farm animals in various regions of the Russian Federation, as well as in Japan and Italy. At the same time, the phage lyses only 6 of 182 strains (3.3%) of E. coli not belonging to the $O_{157}$ serogroup and is not active against strains of other enterobacteria. That is, the phage has a high specificity.*

*The use of bacteriophage V32 as a diagnostic tool is a highly efficient, fast, cheap and simple method for identifying E. coli serogroup $O_{157}$, including the serotype E. coli $O_{157}$: $H_7$, in any bacteriological laboratory without special equipment and special training of performers.*

Key words: *Shiga-toxin producing Escherichia coli O157: H7; bacteriophage; phage lytic activity; virulence genes; E. coli O157 identification.*

**For citation:** *Svetoch E.A., Volozhantsev N.V., Verevkin V.V., Myakinina V.P., Aleshkin A.V., Kiseleva I.A., Bannov V.A., Krasilnikova V.M. , Borzenkov V.N., Kartsev N.N., Dyatlov I.A. Diagnostic bacteriophage V32 as a tool for the rapid identification of Escherichia coli serogroup $O_{157}$. Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics). 2019; 64 (1): 57-64. (in Russ.) DOI: http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-1-57-64*

**Для корреспонденции**: *Светоч Эдуард Арсеньевич*, д-р вет. наук, гл. науч. сотр. отдела мол. микробиологии; e-mail: svetoch@obolensk.org

DOI: http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-1-57-64



**For correspondence***: Svetoch E.A.,* Chief Researcher, Department of Molecular Microbiology; e.mail: svetoch@obolensk.org

**Conflict of interests.** *The authors declare absence of conflict of interest.*

**Acknowledgment.** *The work was supported by the Sectoral Scientific Program of the Russian Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing.*

Received 23.11.2018
Accepted 30.11.2018

*Введение. Escherichia coli* серогруппы $O_{157}$ играют важную роль в патологии человека и сельскохозяйственных животных. Представитель этой группы, шига-токсин продуцирующий серовар *E. coli* $O_{157}$:$H_7$ (STEC $O_{157}$:$H_7$), является основным возбудителем тяжёлой пищевой инфекции – геморрагического колита (ГК), нередко ассоциированного с гемолитико-уремическим синдромом (ГУС), потенциально опасным для жизни больного. При ГК и ГУС у больных развиваются микроангиопатия, гемолитическая анемия, тромбоцитопения, которые проявляются поражением толстого кишечника, острой почечной недостаточностью, нарушением функций центральной нервной системы [1; 2]. У пациентов развивается диарея, иногда с кровью. Особенно опасны ГК и ГУС для детей первых лет жизни и пожилых людей, смертность при ГУС может достигать 5% и более [3]. Геморрагический колит, вызываемый *E. coli* $O_{157}$:$H_7$, регистрируется во многих странах, включая Российскую Федерацию [4–6]. Протекает инфекция в виде спорадических случаев и эпидемических вспышек, поражая десятки, сотни, тысячи человек [4]. До настоящего времени эффективных средств лечения ГК не разработано, поскольку использование этиотропных препаратов при этой инфекции ограничено, их применение лишь усугубляет тяжесть течения болезни и увеличивает число случаев ГУС у больных ГК [5]. Трудности лечения ГК и ГУС, вызываемые STEC, ярко проявились при вспышке пищевой инфекции в Германии в 2011 г., когда заболело около 4000 человек, из которых 54 умерло [7]. С учётом высоких рисков заражения и потенциальной опасности для общественного здравоохранения STEC, особенно STEC $O_{157}$:$H_7$ и $O_{104}$:$H_4$, эта группа патогенов в 2011 г. в РФ отнесена к микроорганизмам I-II групп патогенности (опасности).

Основным естественным резервуаром и источником STEC $O_{157}$ являются сельскохозяйственные животные [8], с фекальными массами которых возбудитель попадает во внешнюю среду, контаминируя почву, воду, сельскохозяйственные растения, пищевое сырье и продукты питания. Заболевают люди ГК, как правило, после употребления контаминированных STEC $O_{157}$:$H_7$ продуктов питания или воды [4; 8].

При подозрении на ГК чрезвычайно важным для подтверждения диагноза и выбора тактики лечения является раннее выявление возбудителя у больного, установление источника патогена с тем, чтобы предотвратить распространение инфекции. В том и в другом случаях необходимо выделить чистую культуру возбудителя и её идентифицировать. Для быстрой детекции *E. coli* $O_{157}$ среди колоний *E. coli*, полученных после первичного посева исследуемого материала, используют реакцию латексной агглютинации (РАЛ), реже реакцию агглютинации (РА) со специфическими диагностикумами. РАЛ и РА позволяют проанализировать большое количество выделенных культур *E. coli* $O_{157}$. На конечной стадии идентификации STEC $O_{157}$:$H_7$ используют ПЦР, ПЦР-РВ, ИХ-тест, позволяющие идентифицировать гены патогенности (*$rfb_{O157}$, eae, stx1, stx2, ehx, fliC*) или способность культуры продуцировать шига-токсины.

Цель работы – выделить, охарактеризовать и предложить в качестве диагностического теста для быстрого поиска и первичной идентификации культур *E. coli* серогруппы $O_{157}$, в том числе STEC $O_{157}$:$H_7$ - основного возбудителя ГК у человека, специфический литический бактериофаг.

*Материал и методы.* Для оценки спектра литической активности эшерихиозного бактериофага V32 использовали референс-штаммы *E. coli* $O_{157}$:$H_7$, изоляты *E. coli* $O_{157}$:$H_7$, *E. coli* других серогрупп и серологически нетипированные эшерихии, выделенные авторами в период с 1998 по 2018 г. от людей, больных ГК, ГУС, острыми кишечными инфекциями (ОКИ), и от сельскохозяйственных животных в различных регионах Российской Федерации. Также использованы штаммы *E. coli* $O_{157}$:$H_7$, любезно предоставленные профессором Харуо Ватанабе, директором Департамента бактериологии Национального института здоровья (Токио, Япония). Часть исследований по изучению литической активности бактериофага V32 выполнена на STEC $O_{157}$:$H_7$ и STEC штаммах других серогрупп в референс-лаборатории Европейского Союза (ЕС) по изучению веротоксин-продуцирующих *E. coli,* VTEC (Рим, Италия). Штаммы микроорганизмов других видов получены из Государственной коллекции патогенных микроорганизмов и клеточных культур «ГКПМ-Оболенск».

Индикаторные культуры выращивали на ГРМ-агаре, сорбитол *E. coli* $O_{157}$:$H_7$-агаре, агаре Эндо (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск) при температуре 37° С. Для подтверждения принадлежности *E. coli* к серогруппе $O_{157}$, для детекции генов патогенности STEC (*$rfb_{O157}$, eae, stx1, stx2, ehx, fliC*) применяли РАЛ и ПЦР тест-систему (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск) согласно МУК 4.2.2963-11.4.2. от 19.08.2011.

Бактериофаги, специфически лизирующие *E. coli* $O_{157}$:$H_7$, выделяли из образцов городских сточных вод, сточных вод животноводческих ферм, речной воды, фекалий больных диареей детей. Жидкие образцы фильтровали через марлевые салфетки и осветляли центрифугированием при 10 тыс. g в течение 10 мин, твёрдые - предварительно суспендировали в фаговом SM-буфере (50 мМ NaCl, 10 мМ Tris-HCl, 10 мМ $MgSO_4$), затем центрифугировали при 10 тыс. g в течение 10 мин. Супернатанты стерилизовали добавлением 1% хлороформа с последующим интенсивным перемешиванием в течение 20 мин, либо фильтрованием через фильтр с порами 0,22 мкм (Millex, Ирландия). Наличие бактериофагов в приготовленных образцах определяли в спот-тесте: капли образца наносили на свежеприготовленный газон бактериальной культуры *E. coli* $O_{157}$:$H_7$ с последующим выращиванием её в течение 18 час при температуре 37° С. При появлении на газоне индикаторного штамма стерильного пятна на месте нанесения капли исследуемого образца, материал из него отбирали с помощью бактериологической петли, суспендировали в 1 мл SM-буфера, добавляли в полученную суспензию 20 мкл хлороформа, смесь перемешивали в течение 20 мин и анализировали на присутствие бактериофага методом агаровых слоев (метод Грациа). Наличие бляшек (негативных колоний) в верхнем слое агара указывало на фаговую природу лизиса. Препараты бактериофагов нарабатывали после двух последовательных перекалываний отдельных бляшек на культуре чувствительного штамма *E. coli* $O_{157}$:$H_7$.

Для приготовления фаголизата бактериальную культуру штамма *E. coli* $O_{157}$:$H_7$ 3705 выращивали на питательном бульоне Лурия-Бертани (LB) в течение 18 час при температуре 37° С без аэрации до концентрации ~$10^9$ КОЕ/мл. Выросшую культуру разводили в 5 раз средой LBM (LB, содержащей 10 мМ $MgSO_4$), заражали бактериофагом с множественно-

Таблица 1

**Чувствительность штаммов *Escherichia coli* серогруппы $O_{157}$, выделенных от людей, к бактериофагу V32**

| № | Регион и год выделения культур *E. coli* | Источник | Количество штаммов | Генотип штаммов | | | | | Чувствительность к бактериофагу V32 (спот-тест) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | $rfb_{O157}$ | *eae* | *stx1* | *stx2* | $fliC_{H7}$ | |
| 1 | Тульская обл., г. Тула, 1997-2000 гг. | Дети, ГК | 18 | + | + | + | + | + | + |
| 2 | | Дети, ГК | 3 | + | + | - | + | + | + |
| 3 | | Дети, ГК | 3 | + | + | + | + | - | + |
| 4 | | Дети, ГК | 3 | + | + | + | + | - | + |
| 5 | | Контакт | 2 | + | + | + | + | + | + |
| 6 | | Контакт | 4 | + | + | - | + | + | + |
| 7 | | Контакт | 3 | + | + | + | + | - | + |
| 8 | г. Санкт-Петербург, 2013 г. | Дети, ГК | 3 | + | + | - | + | + | + |
| 9 | Московская обл., г. Протвино, 2002 г. | Дети, ОКИ | 6* | + | - | - | - | - | + |
| 10 | г. Вологда, 2018 г. | Ребенок, ОКИ | 1 | + | + | + | + | + | + |
| 11 | г. Ярославль, 2017 г. | Ребенок, ОКИ | 1 | + | + | | + | + | + |
| 12 | Япония, 1998 г. | Дети, ГК | 14 | + | + | + | + | + | + |
| 13 | | Пищевые продукты | 1 | + | + | - | + | + | + |
| 14 | Референс лаборатория ЕС, Рим, Италия | Больные ГК, пищевые продукты | 10 | + | + | + | + | + | + |
| 15 | | Больные ГК, пищевые продукты | 10 | + | + | - | + | + | + |
| 16 | «ГКПМ-Оболенск» | EDL933 | 1 | + | + | | + | + | + |
| 17 | | 904 | 1 | + | + | | + | + | + |
| 18 | | ATCC35150 | 1 | + | + | | + | + | + |
| 19 | | ATCC51659 | 1 | + | + | | + | + | + |
| 20 | | ATCC51568 | 1 | + | + | | + | + | + |
| 21 | | ATCC51567 | 1 | + | + | | + | + | + |
| 22 | | KS | 1 | + | + | | + | + | + |
| | | ИТОГО | 89 | | | | | | |

Примечание. ГК – геморрагический колит; ОКИ – острая кишечная инфекция; $rfb_{O157}$ – ген синтеза антигена $O_{157}$; *eae* - ген синтеза адгезина интимина; *stx1* и *stx2* – гены синтеза шига-токсинов типов 1 и 2; $fliC_{H7}$ – гены синтеза жгутикового антигена H7.«+» - ген или признак присутствует; «-» - ген или признак отсутствует; * - штаммы продуцировали термолабильный (Lt) и термостабильный (Est) энтеротоксины.

стью инфицирования (МИ) 0,01-0,1 БОЕ/КОЕ. Смесь инкубировали при температуре 37°С на качалке (скорость вращения 170 об/мин) до просветления культуральной жидкости. Фаголизат стерилизовали добавлением 1% хлороформа с последующим интенсивным перемешиванием в течение 20 мин., после чего из фаголизата удаляли клеточный дебрис путём центрифугирования при 10 тыс. g в течение 10 мин и определяли в нём количество фаговых частиц методом Грациа.

Литическую активность бактериофага V32 в отношении индикаторных культур изучали методом спот-теста и методом фаговой дорожки [9].

Полногеномное секвенирование бактериофага V32 осуществляли в системе Ion Torrent PGM (Life Technologies, США) согласно инструкции фирмы-производителя (http://ioncommunity.lifetechnologies.com). Для секвенирования использовали наборы реагентов Ion PGM Reagents 200 Kit и Ion 318 Chip Kit (Life Technologies, США). Индивидуальные прочтения собирали в контиги с помощью программы Newbler 2.9 (Roche, Швейцария) и редактировали с использованием программного обеспечения SeqMan NGen (DNAStar, Madison, WI, США) и Vector NTI Advance 10.0.1 (Invitrogen, США). Кодирующие последовательности ДНК выявляли и анализировали, используя программные ресурсы RAST [10] и BLAST [11].

*Результаты.* При исследовании 17 образцов материала, отобранного из различных источников, выделено 29 штаммов бактериофагов, проявлявших литическую активность в отношении *E. coli* $O_{157}$:$H_7$. После предварительной оценки спектра и специфичности литической активности выделенных бактериофагов для дальнейшего изучения отобран бактериофаг V32, как наиболее перспективный. Бактериофаг V32 депонирован в Государственную коллекцию патогенных микроорганизмов и клеточных культур «ГКПМ-Оболенск» под номером Ph25.

Бактериофаг V32 выделен в 2008 г. из сточных вод одной из ферм крупного рогатого скота в Московской области. На штаммах *E. coli* $O_{157}$:$H_7$ фаг V32 формирует мелкие негативные прозрачные колонии с чёткими краями (рис. 1, см. обложку). Вторичный рост клеток бактерий в области негативных зон отсутствует. При выращивании на среде LB смеси фага V32 и чувствительного к нему штамма *E. coli* $O_{157}$:$H_7$ 3705 стабильно удается нарабатывать фаголизаты с концентрацией более $10^9$ БОЕ/мл.

На основании данных секвенирования ДНК и сравнительного геномного анализа бактериофаг V32 отнесён к вирусам семейства *Myoviridae*, подсемейства *Ounavirinae*. Геном фага V32 представлен линейной двунитевой ДНК размером 87875 пар оснований (содержание G/C-пар - 38,9%), включает 132 открытые рамки считывания (ORF), кодирующие 20% белков с предсказанными функциями и 80% гипотетических пептидов с неустановленными функциями. В дополнение к основным генам структурных белков капсида и хвостового аппарата, в геноме фага выявлены гены, кодирующие набор ферментов, связанных с репликацией, рекомбинацией, модификацией, метаболизмом ДНК, гены, определяющие лизис бактериальной клетки-хозяина. В геноме фага выявлено 20 генов транспортной РНК (рис. 2, см. обложку). В геноме фага не выявлены гены резистентности к антибиотикам, детерми-

Таблица 2

**Чувствительность штаммов *Escherichia coli* серогруппы $O_{157}$, выделенных от сельскохозяйственных животных, к бактериофагу V32**

| № | Регион и год выделения культур *E. coli* | Источник | Количество штаммов | Генотип штаммов | | | | | Чувствительность к бактериофагу V32 (спот-тест) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | $rfb_{O157}$ | *eae* | *stx1* | *stx2* | $fliC_{H7}$ | |
| 1 | Рязанская обл., 2000 г. | Телята 10-дневные | 6 | + | + | - | + | + | + |
| 2 | Воронежская обл., 1999 г. | Телята 2-х месячные | 2 | + | + | + | + | + | + |
| 3 | | Коровы | 3 | + | + | + | + | + | + |
| 4 | Тульская обл., 1999-2000 гг. | Корова | 1 | + | + | + | + | + | + |
| 5 | | Коровы | 7 | + | + | - | + | + | + |
| 6 | | Молоко сырое | 3 | + | + | + | + | + | + |
| 7 | Орловская обл., 2000 г. | Телята 5- месячные | 3 | + | + | + | + | + | + |
| 8 | Орловская обл., 2000 г. | Поросята 5- месячные | 15 | + | + | - | + | + | + |
| 9 | | Поросята 1-2-месячные | 7 | + | - | - | - | - | + |
| 10 | Рязанская обл., 2000 г. | Поросята 1-месячные | 5* | + | + | - | - | - | + |
| 11 | Белгородская обл., 2001 г. | Поросята 2-месячные | 8* | + | - | - | - | + | + |
| 12 | Московская обл., 2001 г. | Куры бройлерные, 38-дневные | 14* | + | - | - | - | - | + |
| | | ИТОГО | 74 | | | | | | |

Примечание. $rfb_{O157}$ – ген синтеза антигена $O_{157}$; *eae* – ген синтеза адгезина интимина; *stx1* и *stx2* – гены синтеза шига-токсинов типов 1 и 2; $fliC_{H7}$ – гены синтеза жгутикового антигена H7. «+» – ген или признак присутствует; «-» – ген или признак отсутствует; * – штаммы *E. coli* $O_{157}$ не несли генов шига-токсинов типов 1 и 2.

нанты вирулентности, характерные для STEC *E. coli* $O_{157}$:$H_7$ ($rfb_{O157}$, *eae, stx1, stx2, ehx,* $fliC_{H7}$), гены термолабильного (*lt*) и термостабильного (*est*) энтеротоксинов.

Спектр литической активности бактериофага V32 в отношении штаммов серогруппы *E. coli* $O_{157}$ представлен в табл. 1 и 2.

Все шига-токсин продуцирующие штаммы серотипа *E. coli* $O_{157}$:$H_7$, выделенные в разные годы в городах Туле, Санкт-Петербурге, Ярославле, Вологде от больных ГК, ГУС или ОКИ, чувствительны к бактериофагу V32, т. е. все они лизировались фагом V32 при испытании в спот-тесте. Высокая литическая активность фага V32 установлена и в отношении 15 шига-токсин продуцирующих штаммов *E. coli* $O_{157}$:$H_7$, вызвавших в 1996 г. в г. Сакаи (Япония) самую крупную (из известных на сегодняшний день) вспышку пищевой инфекции среди школьников. Тогда инфекция поразила более 10 тыс. человек [12]. Чувствительность к фагу V32 проявляли 20 штаммов STEC $O_{157}$:$H_7$ из коллекции референс-лаборатории ЕС по изучению STEC, семь шига-токсин продуцирующих референс-штаммов *E. coli* $O_{157}$:$H_7$ из «ГКПМ-Оболенск». Чувствительными к бактериофагу V32 оказались шесть энтеротоксигенных (ETEC) штаммов серогруппы *E. coli* $O_{157}$, изолированных от детей при ОКИ в г. Протвино Московской обл.

К фагу V32 чувствительны 74 штамма *E. coli* серогруппы $O_{157}$, выделенные в 1999-2001 гг. в семи регионах РФ от сельскохозяйственных животных и промышленной птицы (табл. 2). Из 74 изученных штаммов 52 принадлежали к серотипу STEC $O_{157}$:$H_7$, возбудителю ГК и ГУС у человека. Остальные 22 штамма, выделенные от поросят и птицы, не несли генов патогенности STEC и были не патогенными для человека.

Все 163 штамма серогруппы $O_{157}$, включая 130 штаммов STEC $O_{157}$:$H_7$, выделенные от людей и сельскохозяйственных животных (табл. 1 и 2), при испытании в спот-тесте чувствительны к бактериофагу V32. Штаммы *E. coli* $O_{157}$ лизировались фагом независимо от источника, региона, страны, года их выделения, их генотипа (наличия детерминант патогенности), принадлежности к патотипу эшерихий (энтерогеморрагическому или энтеротоксигенному). Полученные данные свидетельствуют о широком спектре литического действия бактериофага V32 в отношении эшерихий серогруппы $O_{157}$, в том числе *E. coli* $O_{157}$:$H_7$ – ведущего возбудителя ГК и ГУС.

Для оценки возможности использования фага V32 в качестве диагностического с целью детекции культур *E. coli* серогруппы $O_{157}$ недостаточно, чтобы фаг проявлял лишь 100% литическую активность в отношении целевого микроорганизма, необходимо, чтобы он обладал ещё и высокой специфичностью, т. е. не лизировал другие (не принадлежащие к серогруппе *E. coli* $O_{157}$) микроорганизмы. Для определения специфичности литического действия фага V32 использовали *E. coli* других серогрупп, в том числе шига-токсин продуцирующие, выделенные от людей (табл. 3), серологически нетипированные, изолированные от людей и сельскохозяйственных животных культуры *E. coli* (табл. 4). С этой же целью использованы другие виды микроорганизмов (табл. 4). Из 20 штаммов *E. coli* серогрупп $O_{26}$, $O_{111}$, $O_{127}$, $O_{128}$, выделенных от детей с диагнозом ОКИ в г. Ярославле, только один изолят серогруппы *E. coli* $O_{26}$, принадлежащий к патотипу энтеропатогенных эшерихий (EPEC), чувствителен к фагу V32, т. е. фаг V32 в данном случае вызвал лизис клеток изолята, что можно расценивать, как ложноположительный результат (табл. 3). Среди 31 серологически типированного шига-токсин продуцирующего штамма *E. coli* из референс-лаборатории ЕС по изучению STEC только один штамм серогруппы $O_{55}$ оказался чувствительным к фагу V32, остальные 30 были резистентными. Устойчивыми к фагу V32 оказались все 15 штаммов 14 серогрупп *E. coli* из коллекции «ГКПМ-Оболенск». Следовательно, из 66 штаммов *E. coli* , принадлежащих к 26 О-серологическим группам ($O_1$, $O_2$, $O_4$, $O_{15}$, $O_{20}$, $O_{25}$, $O_{26}$, $O_{28}$, $O_{55}$, $O_{79}$, $O_{78}$, $O_{103}$, $O_{104}$, $O_{110}$, $O_{114}$, $O_{121}$, $O_{126}$, $O_{127}$, $O_{128}$, $O_{130}$, $O_{125}$, $O_{144}$, $O_{154}$, $O_{156}$) только два штамма (~3%) из серогрупп *E. coli* $O_{26}$ и *E. coli* $O_{55}$ чувствительны к фагу V32, остальные 64 (97%) резистентны к литическому действию этого фага.

О высокой специфичности литической активности фага V32 свидетельствуют данные, полученные при испытании его на серологически нетипированной группе эшерихий, выделенных в 17 регионах РФ от людей и сельскохозяйственных животных: из 116 культур четыре (3,4%) (две от людей и две от птицы) оказались чувствительны к фагу V32 (табл. 4). Ни одна из 87 культур 15 гетерологичных *E. coli* видов не чувствительна к фагу V32, т. е. в этом случае специфичность

Таблица 3

**Чувствительность штаммов *Escherichia coli* других (не $O_{157}$) серогрупп, выделенных от людей, к бактериофагу V32**

| Регион и год выделения культур *E. coli* | Серогруппа *E. coli* , источник выделения | Количество штаммов | Генотип штаммов | Чувствитель-ность к фагу V32 (спот-тест) |
|---|---|---|---|---|
| Ярославская обл., г. Ярославль, 2015, 2016, 2017 гг. | *E. coli* $O_{26}$, клинические изоляты, ОКИ | 12 | *eae; eae, ehxA; eae, stx1, ehxA* | - |
| | *E. coli* $O_{26}$, клинический изолят, ОКИ | 1 | *eae* | + |
| | *E. coli* $O_{111}$, клинические изоляты, ОКИ | 4 | *eae; eae, ehxA; lt/est* | - |
| | *E. coli* $O_{127}$, клинические изоляты, ОКИ | 2 | *eae, stx1; eae* | - |
| | *E. coli* $O_{128}$, клинический изолят, ОКИ | 1 | *eae* | - |
| Референс-лаборатория ЕС (Рим, Италия) 2014 г. | *E. coli* $O_{126}$ | 1 | *stx1* | - |
| | *E. coli* $O_{121}$ | 3 | *eae, stx2* | - |
| | *E. coli* $O_{103}$ | 3 | *eae, stx1* | - |
| | *E. coli* $O_{55}$ | 2 | *eae, stx2* | - |
| | *E. coli* $O_{55}$ | 1 | *eae, stx2* | + |
| | *E. coli* $O_{145}$ | 3 | *eae, stx2* | - |
| | *E. coli* $O_{111}$ | 3 | *eae, stx1, stx2* | - |
| | *E. coli* $O_{156}$ | 1 | *eae, stx1* | - |
| | *E. coli* $O_{128}$ | 3 | *stx2* | - |
| | *E. coli* $O_{15}$ | 1 | *stx2* | - |
| | *E. coli* $O_{146}$ | 1 | *stx1, stx2* | - |
| | *E. coli* $O_{28}$ | 3 | *eae, stx2* | - |
| | *E. coli* $O_{114}$ | 1 | *eae, stx2* | - |
| | *E. coli* $O_{125}$ | 1 | *eae, stx2* | - |
| | *E. coli* $O_{127}$ | 1 | *aggR stx2* | - |
| | *E. coli* $O_{104}$:$H_4$ | 3 | *aggR stx2* | - |
| «ГКПМ- Оболенск» | *E. coli* серогрупп: $O_1$, $O_2$, $O_4$, $O_{154}$, $O_{20}$, $O_{25}$, $O_{28}$, $O_{79}$, $O_{127}$, $O_{141}$, $O_{78}$, $O_{110}$, $O_{130}$, $O_{104}$:$H_{12}$, $O_{104}$:$H_4$ (по одному штамму) | 15 | *н/о* | - |
| | Итого: | 66 | | |

Примечание . ОКИ – острая кишечная инфекция; *eae* - ген синтеза адгезина интимина; *stx1* и *stx2* – гены синтеза шига-токсинов типов 1 и 2; *lt* – ген синтеза термолабильного энтеротоксина; *est* – ген синтеза термостабильного энтеротоксина; *ehxA* – ген синтеза энотерогемолизина, aggR – ген синтеза адгезина энтероагрегативных эшерихий (*EAggEC*).

литического действия фага абсолютна (табл. 4). Специфичность литической активности фага оценена на 269 индикаторных культурах (табл. 3 и 4), из которых 263 (97,8%) резистентны и только 6 (2,2%) чувствительны к фагу V32.

*Обсуждение*. Контроль за STEC O157:H7 инфекцией весьма сложная задача и предполагает проведение комплекса мероприятий: мониторинг и профилактику носительства *E. coli* $O_{157}$:$H_7$ у крупного рогатого скота и других жвачных, соблюдение санитарно-гигиенических правил по предотвращению распространения патогена с фекалиями животных на продукты питания, воду и почву, деконтаминацию *E. coli* $O_{157}$:$H_7$ в потенциально опасных для человека продуктах питания, а также совершенствование диагностики и лечения ГК и ГУС. При реализации перечисленных мероприятий по контролю за STEC $O_{157}$:$H_7$ инфекцией важное место отводится использованию вирулентных бактериофагов, специфически лизирующих *E. coli* $O_{157}$:$H_7$. Так, широкое признание у исследователей получило фаготипирование штаммов *E. coli* $O_{157}$:$H_7$ с целью эпидемиологического анализа STEC-инфекции. Благодаря фаготипированию удалось показать, что за вспышечные и спорадические случаи ГК и ГУС у человека отвечает ограниченное число определенных фаготипов STEC $O_{157}$:$H_7$. Фаготипирование позволило выявить эпидемически значимые доминирующие фаготипы STEC $O_{157}$:$H_7$, циркулирующие на отдельных географических территориях, а также установить связь между носительством этого патогена у животных и заболеваемостью человека ГК. Фаготип штамма *E. coli* $O_{157}$:$H_7$ оказался хорошей фенотипической меткой, используемой при эпидемиологическом анализе вспышечных случаев ГК для установления источника инфекции [13–15].

Специфические бактериофаги, лизирующие STEC $O_{157}$:$H_7$, рассматриваются как одно из перспективных и эффективных антимикробных средств для борьбы с носительством этого патогена у сельскохозяйственных животных – основного природного резервуара и источника возбудителя ГК человека [16; 17]. Проводятся исследования и дискутируется вопрос о применении специфических бактериофагов для профилактики ГК у человека [18-20]. Нами на основе коктейля бактериофагов, в том числе лизирующих *E. coli* $O_{157}$:$H_7$, разработана и зарегистрирована в РФ пищевая добавка, способная снижать риски заболевания ГК [21].

Мощным инструментом для контроля за STEC $O_{157}$:$H_7$ инфекцией, как свидетельствуют результаты многочисленных исследований, является использование литических бактериофагов для деконтаминации культур *E. coli* $O_{157}$:$H_7$ из животноводческих (мясо, молоко) и зеленных растительных продуктов (салаты, укроп, сельдерей и др.), овощей, фруктов, соков и др. [22-24].

Мы предлагаем использовать специфический вирулентный бактериофаг в диагностических целях: для быстрой идентификации культур *E. coli* серогруппы $O_{157}$, включая STEC $O_{157}$:$H_7$, как эффективный, дешёвый, легко выполнимый в любой бактериологической лаборатории диагностический тест. Основные требования к бактериофагам, используемым в практике - литическая активность (широкая или узкая), специфичность действия, безопасность для человека [17, 22,

Таблица 4

**Чувствительность серологически нетипированных штаммов *Escherichia coli* и других видов микроорганизмов к бактериофагу V32**

| Регион и год выделения микроорганизмов | Вид микроорганизмов, источник выделения | Кол-во штаммов | Генотип | Чувствительность к фагу |
|---|---|---|---|---|
| Вологодская обл., г. Череповец, 2011 г. | *E. coli* , клинические изоляты, вспышка ОКИ | 11 | - | - |
| | | 1 | - | + |
| Приморский край, г. Владивосток, 2012 г. | *E. coli* , клинические изоляты, вспышка ОКИ | 4 | - | - |
| Московская обл., г. Протвино, 2012 г. | *E. coli* , клинические изоляты, хирургические больные | 3 | - | - |
| Челябинская обл., г. Челябинск, 2009 г. | *E. coli* , клинический изолят, ОКИ | 1 | *stx2, hly* | + |
| | | 1 | *hly* | - |
| г. Москва, МНИИЭМ им. Габричевского, 2012 г. | *E. coli* , клинические изоляты, ОКИ | 3 | *hly* | - |
| г. Москва, ЦКБ № 1, 2016 г. | *E. coli* , клинические изоляты, ОКИ | 15 | - | - |
| Тюменская обл., г. Тюмень, 2014 г. | *E. coli* , клинические изоляты, ОКИ | 24 | - | - |
| г. Санкт-Петербург, 2013 г. | *E. coli* , клинические изоляты, ОКИ | 3 | - | - |
| Тульская обл., г. Тула, 1997 г. | *E. coli* , клинические изоляты, ОКИ | 2 | *stx1, stx2,* | - |
| Ярославская обл., г. Ярославль, 2015 | *E. coli* , клинические изоляты, ОКИ | 3 | *eae; ehxA* | - |
| Белгородская, Калужская, Московская, Псковская, Орловская обл., 1999-2002 г.г. | *E. coli* , свиньи, крупный рогатый скот | 34 | - | - |
| Волгоградская обл., 2002 г. | *E. coli* , птица | 9 | - | - |
| | *E. coli* , птица | 2 | - | + |
| г.г. Архангельск, Якутск, Тюмень | *Shigella flexneri,* клинические изоляты | 17 | | - |
| Краснодарский край, Хакасия, Ленинградская и Московская обл., 2005-2017 г.г. | *Salmonella Enteritidis,* птица | 8 | | - |
| «ГКПМ-Оболенск» | *Salmonella Choleraesuis* | 15 | | - |
| | *Salmonella Typhimurium* | 2 | | - |
| | *Salmonella Gallinarum-Pullorum* | 9 | | - |
| | *Shigella dysenteriae* | 1 | | - |
| | *Morganella morganii* | 2 | | - |
| | *Klebsiella pneumoniae* | 10 | | - |
| | *Proteus mirabilis* | 2 | | - |
| | *Pseudomonas aeruginosa* | 1 | | - |
| | *Acinetobacter baumannii* | 10 | | - |
| | *Listeria monocytogenes* | 2 | | - |
| | *Shigella sonnei* | 1 | | - |
| | *Yersinia enterocolitica* | 3 | | - |
| | *Yersinia pseudotuberculosis* | 4 | | - |
| | Итого: | 203 | | |

Примечание. *eae* - ген синтеза адгезина интимина; *stx1* и *stx2* – гены синтеза шига-токсинов типов 1 и 2; *hly* - ген синтеза гемолизина; *ehxA* – ген синтеза энтерогемолизина.

25]. Последнее предполагает отсутствие в геноме фага детерминант патогенности и антибиотикорезистентности, потенциально опасных для человека, генов, ответственных за лизогенное состояние бактериофага. Анализ работ, посвящённых поиску бактериофагов, активных против STEC $O_{157}$:$H_7$, показывает, что выделение фагов со 100% литической активностью в отношении культур *E. coli* серогруппы $O_{157}$ - вполне разрешимая задача, хотя и требует значительных усилий [26; 27]. Выделяемые анти- *E. coli* $O_{157}$:$H_7$ фаги далеко не всегда обладают высокой специфичностью: нередко они лизируют культуры *E. coli*, не относящиеся к серогруппе $O_{157}$, и культуры гетерологичных видов энтеробактерий [17, 28].

При анализе 29 штаммов бактериофагов, лизирующих *E. coli* серогруппы $O_{157}$, удалось отобрать один бактериофаг, V32, отвечающий всем требованиям, предъявляемым к диагностическим фагам. Фаг V32 в 100% случаев лизировал все испытанные культуры *E. coli* серогруппы $O_{157}$, в том числе 130 шига-токсин продуцирующих штаммов серотипа *E. coli* $O_{157}$:$H_7$, выделенных из различных источников: от больных ГК и ГУС людей, из продуктов, от сельскохозяйственных животных – крупного рогатого скота, свиней, птицы. Среди индикаторных штаммов *E. coli* $O_{157}$ были культуры другого (не энтерогеморрагического) патотипа – энтеротоксигенные (ETEC) штаммы, носители отдельных генов STEC. Иинди-каторные культуры *E. coli* $O_{157}$ эпидемически и эпизоотически не связаны между собой, поскольку выделены в девяти разных регионах РФ, Японии и Италии. Полученные данные свидетельствуют об уникально широком спектре литического действия фага V32 в отношении *E. coli* серогруппы $O_{157}$. Литическая активность обеспечивается взаимодействием фагов с рецепторами, расположенными на поверхности наружной мембраны клетки хозяина. Предполагают, что широкий спектр литической активности у фага связан с наличием у него двух и более специфических протеинов (локализованных на хвосте вируса), которые обеспечивают взаимодействие фага с липополисахаридом, главным рецептором для фагов у грамотрицательных бактерий, и белками наружной мембраны клетки хозяина [28].

Второе важное свойство диагностического фага V32 – его специфичность, т. е. способность фага *in vitro* лизировать только эшерихии серогруппы $O_{157}$ и не лизировать другие, не относящиеся к этой серогруппе, а также микроорганизмы других видов и родов. Специфичность литической активности фага выражают в процентах устойчивых к фагу нецелевых (не *E. coli* $O_{157}$) микроорганизмов, взятых в эксперимент. Как показали исследования, проведенные на 182 штаммах *E. coli*, не относящихся к серогруппе $O_{157}$, специфичность фага V32 была высокой и составляла 96,7 %, т. е. только 6 штаммов *E. coli* из 182 неспецифически лизировались фагом. К фагу V32 устойчивы штаммы видов *Shigella flexneri, Shigella sonnei*, *Shigella dysenteriae, Salmonella Enteritidis*, *Salmonella Choleraesuis*, *Salmonella Gallinarum-Pullorum*, *Morganella morganii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Yersinia enterocolitica*, *Yersinia pseudotuberculosis*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Listeria monocytogenes.* Другие свойства фага V32, подтверждающие его уникальность и диагностическую ценность, получены в результате полногеномного секвенирования вируса. Биоинформационный анализ структуры генома фага V32 показал отсутствие в нём генов вирулентности, характерных для всех известных патогрупп *E. coli*, и отсутствие детерминант антибиотикорезистентности. Следует отметить ещё одно важное для диагностики ГК свойство фага V32: лизис культур серогруппы *E. coli* $O_{157}$ под действием фага наступает очень быстро и может быть учтён в спот-тесте через 2-3 часа после нанесения фага на свежезасеянную культуру *E. coli* .

100% чувствительность эшерихий серогруппы $O_{157}$ к литическому действию фага V32, его высокая специфичность, безопасность для человека и возможность получения быстрого результата свидетельствуют об уникальности фага и пригодности для использования в лабораторной практике для идентификации *E. coli* серогруппы $O_{157}$, включая шига-токсин продуцирующие серотипы *E. coli* $O_{157}$:$H_7$ и *E. coli* $O_{157}$:$_{NM}$. Если идентифицированные фагом V32 *E. coli* серогруппы $O_{157}$ выделены от больного с клиникой диареи (простой водянистой или с кровью), то с большой долей вероятности можно ставить предварительный диагноз «геморрагический колит, вызванный *E. coli* $O_{157}$» и принимать соответствующие этому диагнозу лечебные мероприятия. Для постановки окончательного диагноза необходимо подтвердить способность штаммов *E. coli* $O_{157}$ продуцировать шига-токсины.

Уникальные свойства фага V32 открывают большие перспективы для использования его не только в диагностических целях, но и для профилактики ГК в период крупных вспышек пищевой инфекции, вызванной *E. coli* $O_{157}$:$H_7$, для борьбы с носительством эшерихий серогруппы $O_{157}$ у сельскохозяйственных животных. Фаг V32 может использоваться в пищевой промышленности для деконтаминации пищевого сырья, в первую очередь, говядины, от *E. coli* $O_{157}$:$H_7$. Уникальность фага V32 в качестве диагностического теста подтверждена получением на него патента [9].

*Заключение.* Получен диагностический бактериофаг, который может быть использован в медицинских и ветеринарных диагностических лабораториях для идентификации эшерихий серогруппы $O_{157}$, в том числе шига-токсин продуцирующих серотипов *E. coli* $O_{157}$:$H_7$ и *E. coli* $O_{157}$:$_{NM}$, основных возбудителей ГК и ГУС человека. Фаг V32 обладает 100% литической активностью в отношении *E. coli* серогруппы $O_{157}$ и высокой специфичностью (не менее 97%); в его геноме отсутствуют детерминанты устойчивости к антибиотикам, гены вирулентности STEC и других известных патогрупп *E. coli* , т. е. фаг V32 безопасен для человека. Использование бактериофага V32 в качестве диагностического инструмента является высокоэффективным, быстрым, дешевым, простым в исполнении методом, позволяющим идентифицировать *E. coli* серогруппы $O_{157}$, включая серовар *E. coli* $O_{157}$:$H_7$ в любой бактериологической лаборатории без специального оборудования и специальной подготовки исполнителей.

**Финансирование.** *Работа выполнена в рамках отраслевой программы Роспотребнадзора.*

**Конфликт интересов.** *Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов*.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 1-4, 7, 8, 10-28 см. REFERENCES)

5. Подколзин А.Т., Коновалова Т.А., Веселова О.А.. Оценка эффективности схем диагностики энтерогеморрагического эшерихиоза. Этиологическая верификация гемолитико-уремического синдрома в Российской Федерации. *Терапевтический архив.* 2014; 11: 66-9.
6. Онищенко Г.Г., Дятлов И.А., Светоч Э.А., Воложанцев Н.Н., Баннов В.А., Карцев, Н.Н.. Молекулярно-генетическая характеристика шига-токсин продуцирующих *Escherichia coli*, выделенных при вспышке пищевой инфекции в Санкт-Петербурге в 2013 году. *Вестник Российской академии медицинских наук.* 2015; 1: 70-81.
9. Веревкин В.В., Воложанцев В.В., Степаншин Ю.Г., Светоч Э.А., Мякинина В.П. Штамм бактериофага *Escherichia coli* V32 для идентификации бактерий *Escherichia coli* серогруппы О157. Патент РФ № 2425877; 2011.

REFERENCES

1. Griffin P.M., Ostoff S.M., Tauxe R,V., Greene K.D., Wells J.G., Lewis J.H. et all. Illnesses associated with *Escherichia coli* $O_{157}$:$H_7$ infection. A broad clinical spectrum. *Ann. Intern. Med*. 1988; 109: 705-12.
2. Tarr P.I., Gordon C.A., Chandler W.L. Shiga A toxin-producing *Escherichia coli* and hemolytic uraemic syndrome. *Lancet.* 2005; 365 (9464): 1073-86.
3. Karch H., Tarr P.I., Bielazewsca. M. Enterohaemorragic *Escherichia coli* in human medicine. *Int. J. Med. Microbiol.* 2005; 295(6-7): 405-18.
4. Yang S.C., Lin C.H., Aljuffali J.A., Fang J.Y. Current pathogenic *Escherichia coli* footborne outbreak cases and therapy development. *Arch. Microbiol*. 2017; 199(6): 811-25.
5. Podkolzin A.T., Konovalova T.A., Veselova O.A. Evaluation of the efficiency of diagnostic regiments for enterohemorrhagic escherichiosis. Etiological verification of hemolytic uremic syndrome in the Russian Federation. *Terapevticheskiy arkhiv*. 2014; 11: 66 – 9. (in Russian)
6. Onishenko G.G., Dyatlov I.A., Svetoch E.A., Volozhantsev N.V., Bannov V.A., Kartsev, N.N. et al. Molecular-genetic characterization of shiga-toxin producing Escherichia coli isolated during a foodborne outbreak in St. Petersburg in 2013. *Vestnik Rossiyskoy akademii meditsinskikh nauk*. 2015; 70(10): 70-81. (in Russian)
7. Soon J.M., Seaman P., Baines R.N. *Escherichia coli* $O_{104}$:$H_4$ outbreak from sprouted seeds. *Int. J. Hyg. Environ. Health.* 2013; 216(3): 346-54.
8. Ferens W.A., Hovde C.J. *Escherichia coli* $O_{157}$:$H_7$: animal reservoir and sours of human infection. *Foodborne pathog. Dis*. 2011; 8(4): 465-80.
9. Verevkin V.V., Volozhantsev V.V., Stepanshin Yu.G., Svetoch E.A., Myakinina V.P. The strain of bacteriophage *Escherichia coli* V32 for the identification of bacteria *Escherichia coli* serogroup $O_{157}$. Patent RF № 2425877; 2011. (in Russian)
10. Aziz R.K. Bartels D., Best A.A., De Jongh M., Disz T., Edwards R.A. et al. The RAST server: rapid annotations using subsystems technology. *BMC Genomics*. 2008; 9: 75.
11. Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W., Lipman D.J. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol*. 1990; 215: 403-10.
12. Michino H., Araki K., Minami S., Tayaka S., Sakai N., Miyazaki M. et al. Massive outbreak of *Escherichia coli* $O_{157}$:$H_7$ infection in school children in Sakai City, Japan, associated with consumption of white radish sprouts. *Am.. J Epidemiol.* 1999; 150(8): 787-96.

DOI: http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-1-57-64



13. Khakhria R., Duck D., Lior H. Extended phage-typing scheme for *Escherichia coli* O157:H7. *Epidemiol. Infect*. 1990; 105(3): 511-20.
14. Mora A., Blanco M., Blanco J.E., Alonso M.P., Dhabi G., Thomson-Carter F. et al. Phage types and genotypes of shiga toxin – producing *Escherichia coli* $O_{157}$:$H_7$ isolates from humans and animals in spain: identification and characterization of two predominating phage types (PT2 and PT8). *J.Clin. Microbiol*. 2004; 42(9): 4007-15.
15. Tozzoli R., Grande L., Michelacci V., Fioravanti R., Gally D., Xu X. et al. Identification and characterization of a peculiar *vtx2*-converting phage frequently present in verocytotoxin-producing *Escherichia coli* $O_{157}$:$H_7$ isolated from human infections. Infect. *Immun.* 2014; 82(7): 3023-32.
16. Sheng H., Knecht H.J., Kudva I.T., Hovde C.J. Application of bacteriophages to control intestinal *Escherichia coli* $O_{157}$:$H_7$ levels in ruminants. *Appl. Environ. Microbiol*. 2006; 72(8): 5359-66.
17. Dini C., De Urraza P.J. Isolation and selection of coliphages as potential biocontrol agents of enterohemorragic and shiga toxin-producing *E. coli* (EHEC and STEC) in cattle. *J. Appl. Microbiol*. 2010; 109(3): 873-87.
18. Xu Y., Liu Y., Pei J., Yao S., Cheng, C. bacteriophage therapy against enterobacteriaceae. *Virol. Sin*. 2015; 30(1): 11-8.
19. Brüssow H. Phage therapy: the Escherichia coli experience. *Microbiology*. 2005; 151(7): 2133-40.
20. Yang S.C., Aljuffali I.A., Fang J.Y. Current pathogenic Escherichia coli foodborne outbreak cases and therapy development. *Arch. Microbiol*. 2017; 199(6): 811-25.
21. Aleshkin A.V., Volozhantsev N.V., Svetoch E.A., Verevkin V.V., Krasilnikova V.M., Bannov V.A. et al. Bacteriophage cocktail in prophylaxis against food-borne infections. *Worldwide Research Efforts in the Fighting against Microbial Pathogens: From Basic Research to Technological Developments. Edited A.Mendez-Vilas. Brown-Walker Press*. 2013; 100-4.
22. Tomat D., Migliore L., Aquili V., Quiberoni A., Balagué C.. Phage biocontrol of enteropathogenic and shiga toxin-producing *Escherichia coli* in meat products. *Front Cell Infect Microbiol*. 2013; 3: 20.
23. Goodridge L.D., Bisha B. Phage-based biocontrol strategies to reduce foodborne pathogens in foods. *Bacteriophage*. 2011;1(3): 130-7.
24. Żaczek M., Weber-Dąbrowska B., Górski A.. Phages in the global fruit and vegetable industry. *J. Appl. Microbiol*. 2015; 118(3): 537-56.
25. Greer G.G. Bacteriophage control of foodborne bacteria. *J. Food Prot.* 2005; 68(5): 1102-11.
26. Nui Y.D., Stanford K., Kropinski A.M., Ackermann H.-W., Johnson R.P., She Y.-M. et al. Genomic, proteomic and physiological characterization of a T5-like bacteriophage for control of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* $O_{157}$:$H_7$. *PLoS One*. 2012; 7(4): e34585.
27. Nui Y.D., Stanford K., Ackermann H.-W., McAllister T.A. Characterization of 4 T1-like lytic bacteriophages that lyse Shiga-toxin Escherichia coli $O_{157}$:$H_7$. *Can. J. Microbiol.* 2012; 58(7): 923-7.
28. Niu Y.D., Johnson R.P., Xu Y., McAllister T.A., Sharma R., Louie M., et al. Host range and lytic capability of four bacteriophages against bovine and clinical human isolates of Shiga toxin-producing Escherichia coli $O_{157}$:$H_7$. *J. Appl. Microbiol.* 2009; 107(2): 646-56.

Поступила 23.11.18
Принята к печати 30.11.18

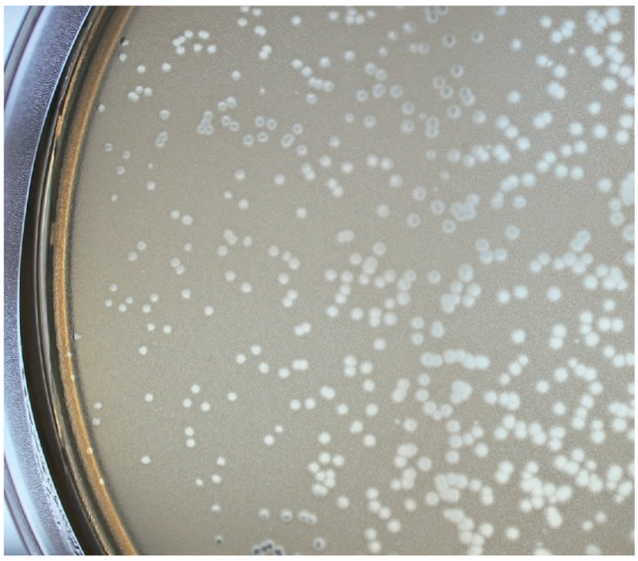

Рис. 1. Негативные колонии бактериофага V32 на газоне *E. coli* $O_{157}$:$H_7$.

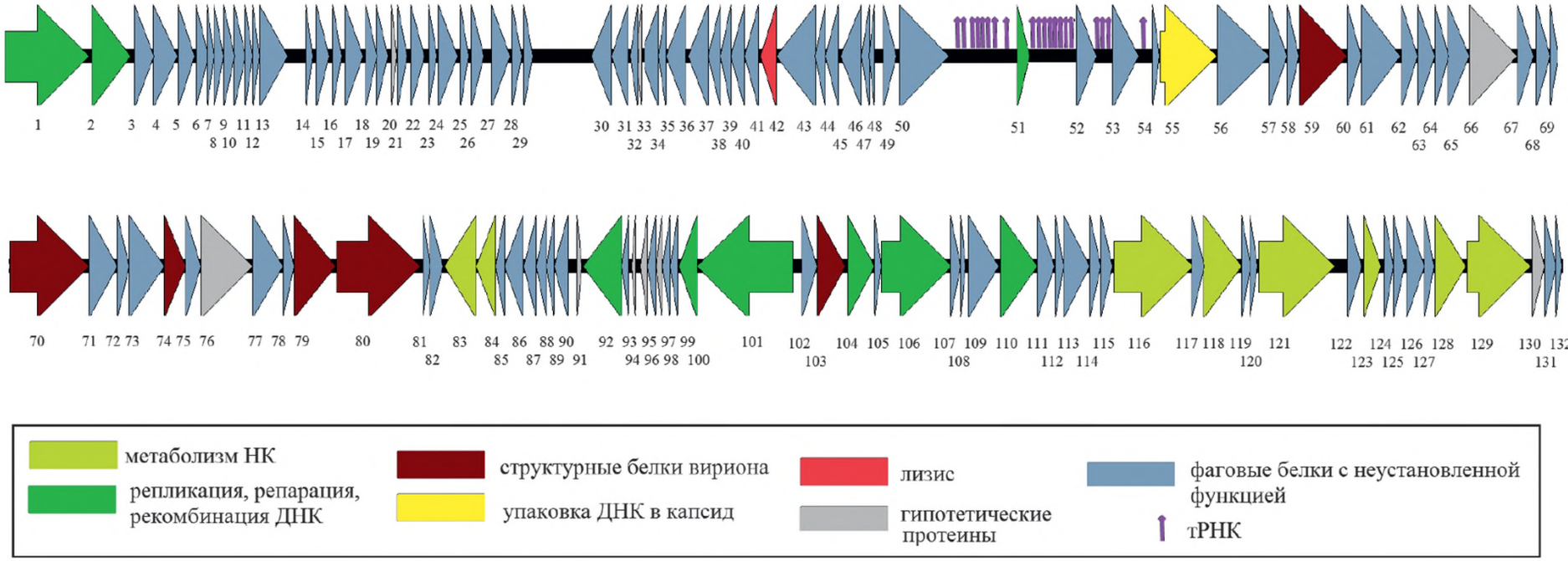


Рис. 2. Организация генома бактериофага V32.