

# Эффективность фаготерапии экспериментальной эшерихиозной инфекции у мышей

А.И.Борзилов, О.В.Коробова, Т.И.Комбарова, Е.А.Денисенко, В.В.Верёвкин, Е.А.Ганина, Н.В.Воложанцев

ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора, Оболенск, Московская область, Российская Федерация

Длительное использование антибиотиков в медицинской практике, ветеринарии и неадекватное их применение в быту привело к широкому распространению штаммов бактерий с множественной лекарственной устойчивостью. В результате в значительной степени усложнилось лечение бактериальных инфекций у человека. Стандартные схемы антибиотикотерапии зачастую оказываются неэффективными. Кроме того, антибиотики нередко вызывают различные аллергические реакции и негативно влияют на нормальную микрофлору человека. Поэтому в настоящее время ведутся поиски альтернатив антибиотикам, среди которых большой интерес вызывают литические бактериофаги, обладающие высокой специфичностью в отношении тех или иных микроорганизмов.

В своей работе мы оценили лечебно-профилактическое действие бактериофага VЕс8 на двух моделях эшерихиозной инфекции у мышей – летальном сепсисе и кишечной инфекции. В результате проведенных исследований было установлено, что однократное внутрибрюшинное введение фага в дозе  $5 \times 10^8$  БОЕ в режимах профилактики или трехдневного лечения защищает от гибели и saniрует 100% мышей линии BALB/c, инфицированных летальной дозой *Escherichia coli* 3421E/19. Подобный лечебный эффект был получен при трехдневном курсе антибиотикотерапии цефтазидимом и ко-тримоксазолом.

Внутрижелудочное применение бактериофага VЕс8 для лечения эшерихиозной кишечной инфекции приводит к заметному снижению концентрации клеток *E. coli* 3421E/19 в фекалиях инфицированных мышей линии С57BL/6. Внутрибрюшинное введение фагового препарата менее эффективно saniрует кишечник от клеток патогенной кишечной палочки. Однократное назначение VЕс8 подопытным животным в режиме профилактики (за час до заражения) дает меньший лечебный эффект по сравнению с пятидневным лечебным курсом фаготерапии. Важно отметить, что внутрижелудочное введение мышам ко-тримоксазола в течение 5 дней оказывает меньший saniрующий эффект по сравнению с фаготерапией.

Таким образом, лечебная эффективность бактериофага VЕс8 как при профилактике, так и при лечении эшерихиозного сепсиса у мышей сопоставима с антибиотикотерапией. Фаг VЕс8 более эффективен при терапии кишечного эшерихиоза по сравнению с использованием эффективных *in vitro* антибиотиков. Бактериофаг VЕс8 может рассматриваться как перспективный препарат для профилактики и лечения эшерихиозной инфекции у людей.

**Ключевые слова:** *Escherichia coli*, экспериментальный эшерихиоз, сепсис, кишечная инфекция, мышинная модель, фаготерапия, антибиотикотерапия

**Для цитирования:** Борзилов А.И., Коробова О.В., Комбарова Т.И., Денисенко Е.А., Верёвкин В.В., Ганина Е.А., Воложанцев Н.В. Эффективность фаготерапии экспериментальной эшерихиозной инфекции у мышей. Бактериология. 2021; 6(2): 8–22. DOI: 10.20953/2500-1027-2021-2-8-22

## Phage therapy efficiency of experimental escherichiosis infection in mice

A.I.Borzilov, O.V.Korobova, T.I.Kombarova, E.A.Denisenko, V.V.Verevkin, E.A.Ganina, N.V.Volozhantsev

State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Rosпотребнадзор, Obolensk, Moscow region, Russian Federation

The long-term use of antibiotics in medical practice, veterinary medicine and their inadequate use in everyday life has led to the widespread of multidrug-resistant bacterial strains. As a result, the treatment of bacterial infections in humans has become much more difficult. Standard antibiotic treatment is often ineffective. In addition, antibiotics often cause various allergic reactions and negatively affect the normal human microflora. Therefore, at present, the search for alternatives to antibiotics is underway, among which of great interest are lytic bacteriophages, which have a high specificity in relation to certain microorganisms.

### Для корреспонденции:

Борзилов Александр Иосифович, кандидат медицинских наук, ведущий научный сотрудник лаборатории биологических испытаний ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Адрес: 142279, Московская обл., г.о. Серпухов, р.п. Оболенск, Территория «Квартал А», 24 ФБУН ГНЦ ПМБ  
Телефон: (4967) 36-0147  
E-mail: borzilov@obolensk.org

Статья поступила 03.08.2021 г., принята к печати 30.08.2021 г.

### For correspondence:

Alexander I. Borzilov, MD, PhD, Leading Researcher of Biological Testing Laboratory, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Rosпотребнадзор

Address: SRCAMB Bld. 24, "Quarter A" Territory, 142279, Obolensk, City District Serpukhov, Moscow Region, Russian Federation  
Phone: (4967) 36-0147  
E-mail: borzilov@obolensk.org

The article was received 03.08.2021, accepted for publication 30.08.2021

In our work, we evaluated the therapeutic and prophylactic effect of the bacteriophage VEc8 in two models of Escherichiosis infection in mice – lethal sepsis and intestinal infection. As a result of the studies, it was found that a single intraperitoneal injection of phage at a dose of  $5 \times 10^8$  PFU in the prophylaxis or three-day treatment regimens protects from death and sanitizes 100% of BALB/c mice infected in a lethal dose of *Escherichia coli* 3421E/19. A similar therapeutic effect was obtained with a three-day course of antibiotic therapy with ceftazidime and co-trimoxazole.

Intragastric application of bacteriophage VEc8 for the treatment of escherichiosis intestinal infection leads to a noticeable decrease in the concentration of *E. coli* 3421E/19 cells in the feces of infected C57BL/6 mice. Intraperitoneal administration of a phage preparation less effectively sanitizes the intestines from pathogenic *E. coli* cells. A single administration of VEc8 to experimental animals in a prophylactic regimen (one hour before infection) gives a lesser therapeutic effect compared to a five-day therapeutic course of phage therapy. It is important to note that intragastric administration of co-trimoxazole to mice for 5 days has a lower sanitizing effect compared to phage therapy.

Thus, the therapeutic efficacy of bacteriophage VEc8 both in the prevention and treatment of escherichiosis sepsis in mice is comparable to antibiotic therapy. Phage VEc8 is more effective in the treatment of intestinal escherichiosis in comparison with the use of effective in vitro antibiotics. Bacteriophage VEc8 can be considered as a promising drug for the prevention and treatment of escherichiosis infection in humans.

**Key words:** *Escherichia coli*, experimental escherichiosis, sepsis, intestinal infection, mouse model, phage therapy, antibiotic therapy

**For citation:** Borzilov A.I., Korobova O.V., Kombarova T.I., Denisenko E.A., Verevkin V.V., Ganina E.A., Volozhantsev N.V. Phage therapy efficiency of experimental escherichiosis infection in mice. *Bacteriology*. 2021; 6(2): 8–22. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2021-2-8-22

**E***scherichia coli* – грамотрицательные палочки средних размеров с закругленными концами, факультативные анаэробы. Они обладают подвижностью благодаря перитрихально расположенным жгутикам, многие штаммы имеют микрокапсулу. Растут на обычных питательных средах, выделяют бактерицидные вещества – колицины.

Эшерихии содержат соматические (O), капсульные (K) и жгутиковые (H) антигены. Обнаружено 173 варианта соматического O-антигена, 97 разновидностей K-антигена, 57 вариантов H-антигена. Количество возможных комбинаций этих антигенов превышает 2000 [1].

*E. coli* делятся на непатогенные (резидентные) и патогенные (экзогенного происхождения), а также на возбудителей парентеральных и энтеральных инфекций. Непатогенные кишечные палочки относятся к нормальной микрофлоре кишечника человека. К возбудителям парентеральных эшерихиозов относятся уропатогенные *E. coli* (UPEC) и *E. coli*, вызывающие менингиты новорожденных (NMEC) [1]. Диареогенные эшерихии (DEC) относятся к энтеральным патогенам. В соответствии с систематикой Всемирной организации здравоохранения DEC-штаммы делят на пять патогенетических групп: энтеропатогенные (EPEC), энтеротоксигенные (ETEC), энтерогеморрагические (EHEC), энтероинвазивные (EIEC), энтероагрегативные (EAgEC). Перечисленные группы эшерихий вызывают разные формы острой кишечной инфекции.

Среди всех патогенных кишечных палочек энтеротоксигенные *E. coli* являются наиболее распространенными возбудителями диареи человека в разных странах мира: в год регистрируется более 650 млн случаев энтеротоксигенных инфекций, среди которых 800 тыс. случаев заканчиваются смертью [2, 3].

ЕHEC чаще всего относятся к серогруппам O26, O45, O55, O91, O103, O104, O111, O113, O121, O145 и O157. В геномах ЕHEC имеются гены патогенности: *rfb*, *eae*, *stx1*, *stx2*, *ehx*, кодирующие соответственно специфические липополисахариды, основной ген адгезии – интимин, шига-токсины 1-го и/или 2-го типов и энтерогемолизин [4, 5]. *E. coli* группы ЕHEC вызывают диарею, кровавую диарею и колит, которые проходят без лечения в большинстве случаев. Однако примерно у 5–10% пациентов (в основном детей) развивается гемоли-

тико-уремический синдром (ГУС), характеризующийся тромбоцитопенией, микроангиопатической гемолитической анемией и острой почечной недостаточностью. Уровень смертности у пациентов с ГУС достигает 25% [6, 7]. Известно, что при заболеваниях, вызванных штаммами, продуцирующими токсин Stx2, осложнения в виде ГУС возникали в 7 раз чаще, чем при инфекциях, вызванных штаммами, продуцирующими токсин Stx1 или оба токсина [8].

Штаммы кишечной палочки серотипа O157:H7 вызывают большинство инфекций ЕHEC во всем мире [9]. В последние годы выявляются гибридные патотипы диареогенных эшерихий – энтероагрегативные геморрагические *E. coli* (EAHEC) и шига-токсин продуцирующие энтеротоксигенные *E. coli* (STEC/ETEC) [8, 10].

В 2011 г. в Европе произошла массовая вспышка кишечной инфекции, вызванная новым редким серотипом *E. coli* O104:H4 [11]. Этот штамм является гибридом STEC и EAgEC кишечной палочки. Он продуцирует шига-токсин 2-го типа (Stx2) и факторы адгезии эшерихий группы EAgEC [12–14]. Геномное секвенирование показало, что штамм O104:H4 приобрел ген *stx2* [15], а также имеет локус, ассоциированный с множественной резистентностью к антимикробным препаратам [16]. Усиленная адгезия этого штамма к эпителию кишечника способствует системному всасыванию шига-токсина, что, вероятно, и вызывает высокую частоту ГУС [12].

С каждым годом увеличивается количество клинических изолятов кишечной палочки, обладающих устойчивостью к различным антибиотикам [17, 18]. Показано, что штаммы *E. coli* могут продуцировать β-лактамазы с расширенным спектром действия [19]. Имеются сообщения о резистентности штаммов *E. coli* к хинолонам/фторхинолонам (налидиксовая кислота, цiproфлоксацин, левофлоксацин, моксифлоксацин, норфлоксацин) [20]. Некоторые авторы [21] обнаружили, что до 30% штаммов *E. coli*, выделенных из кишечника людей, высокоустойчивы к ампициллину, тетрациклину, стрептомицину, цiproфлоксацину и ко-тримоксазолу, но менее устойчивы к гентамицину и хлорамфениколу. В других исследованиях было показано, что среди штаммов кишечной палочки, выделенных от пациентов в отделении интенсивной терапии, 20% были устойчивы к цефазолину, 0,7% – к цефепиму, 3,7% – к цефтриаксону,

3% – к гентамицину, 21,1% – к фторхинолонам, 1,9% – к пиперациллин-тазобактаму и 24,8% – к триметоприм-сульфаметоксазолу [22].

Гены устойчивости к антибиотикам могут располагаться в транспозонах, интегронах и плаزمиде, которые способны к внутривидовой и межвидовой передаче [23, 24], в том числе и в микробиоме человека [25].

Антибактериальную терапию эшерихиозов, как правило, начинают через 2–3 дня после начала лечения энтеросорбентами и регидрантами. Наиболее часто применяемые антибиотики – нитрофураны (нифуроксазид, нифурател), аминогликозиды (гентамицин, амикацин), цефалоспорины (цефиксим, цефотаксим) и налидиксовая кислота [26–28].

Лечение инфекций, вызванных шигатоксин-продуцирующими *E. coli*, в основном поддерживающее, без этиотропной терапии [29]. В STEC гены *stx* находятся в геномах профагов, интегрированных в бактериальной хромосоме [30]. Активация фагового литического цикла может происходить с помощью широкого ряда соединений (включая некоторые антибиотики), индуцирующих выработку Stx, который выделяется при лизисе бактериальных клеток в начале литической фазы фага [31]. Лекарства, обычно используемые в клинике для лечения бактериальных инфекций, такие как антибиотики, противопоказаны и даже рассматриваются как факторы риска развития ГЧС [32].

Шигаподобный токсин Stx2a, инактивирующий рибосомы, высвобождается в везикулах наружной мембраны во время роста клеток [33–35]. Ципрофлоксацин, меропенем, фосфомицин и полимиксин В значительно увеличивают образование везикул наружных мембран в клетках *E. coli* O104:H4 и O157:H7. Ципрофлоксацин также повышает количество Stx2a, связанного с везикулами, тогда как другие антибиотики увеличивают производство везикул без токсина. Эти два эффекта могут ухудшить клинический исход инфекций, вызванных шигаподобными токсинами, продуцируемыми *E. coli*. Существуют рекомендации избегать применения антибиотиков для лечения этих инфекций [36]. Если антибиотикотерапия ЕНЕС-инфицированных пациентов неизбежна, то возможно применение препаратов, не увеличивающих токсичность штаммов-возбудителей *E. coli* O104:H4 и O157:H7, таких как гентамицин, рифаксимин, тигециклин, азитромицин и хлорамфеникол [12]. Значительное снижение токсичности у обоих штаммов было выявлено при применении хлорамфеникола [36]. Для лечения инфекций STEC перспективны применение вакцин, ингибиторы токсинов и иммунотерапия [37].

В настоящее время проводятся исследования по поиску специфических бактериофагов (автономно или в составе коктейлей) для лечения экспериментальной эшерихиозной инфекции у лабораторных животных [38, 39]. В случае энтеральной инфекции использование литических фагов позволяет элиминировать патогенные *E. coli* из кишечника без изменения профиля его микробиоты [40].

Ведутся исследования по разработке эффективных вакцин против эшерихиозов, вызываемых ЕНЕС-штаммами [41, 42].

Для оценки эффективности различных антибактериальных препаратов и вакцин необходимы охарактеризованные модели экспериментальных инфекций, в том числе и эшерихиозов.

В зависимости от целей исследования могут быть использованы летальные и нелетальные модели инвазивных и неинвазивных инфекций, вызываемых штаммами кишечной палочки.

Наиболее популярная мышинная модель кишечной инфекции, вызываемой ЕНЕС-штаммом, была предложена E.A.Wadolkowski et al. [43]. Эта колонизационная модель заключалась во внутрижелудочном заражении ( $10^{10}$  КОЕ *E. coli* O157:H7) самок мышей линии BALB/c после пятидневного назначения мышам 0,5%-го раствора стрептомицина с питьевой водой. В результате подавления нормальной кишечной микрофлоры животные становятся восприимчивыми к заражению культурой ЕНЕС. В дальнейшем ведут контроль клеток патогена в фекалиях зараженных мышей. Ранее похожую модель описал M.L.Muhal [44], но в ней были использованы самцы аутбредных мышей CD-1, а инфицирующая доза кишечной палочки O157:H7 составляла  $10^{10}$  КОЕ.

Похожую модель эшерихиозной кишечной инфекции, но с использованием мышей линии C57BL/6, применяли для изучения транскрипции белков TJ. Животным с подавленной микрофлорой кишечника вводили *E. coli* O157:H7 в меньшей дозе –  $2 \times 10^8$  КОЕ [45].

Кишечную модель эшерихиоза с длительной персистенцией *E. coli* O157:H7 моделируют также на мышах BALB/c с неизменной микрофлорой кишечника [46]. Для этого животным перорально вводят культуру ЕНЕС-штамма в количестве  $10^9$  КОЕ. В результате бактерии *E. coli* O157:H7 выделяются с фекалиями в течение недели в большом количестве ( $10^9$  КОЕ), а 30% мышей теряют в весе.

Y.Chong et al. [47] использовали мышей линии C3H/HeN для внутрижелудочного заражения различными вариантами штамма *E. coli* O157:H7 с целью выявления в них шига-токсина (Stx2), интимина и системы III типа секреции. Заражающая доза составляла  $10^9$  КОЕ. У животных отмечали изменения общего состояния, внешние признаки интоксикации и изменения в кишечнике.

Способность штаммов кишечной палочки колонизовать мочевыводящие пути оценивают на мышинной модели. Мышей линии C3H/HeN или CBA/J заражают с помощью мочевого катетера культурой кишечной палочки в дозе  $1 \times 10^4$  КОЕ или  $1 \times 10^8$  КОЕ соответственно. Через сутки оценивают обсемененность клетками патогена мочевых пузырей [48–50].

Интересный подход при изучении патогенных свойств штамма кишечной палочки, выделенной из спинномозговой жидкости ребенка, использовали Thewaini et al. [51]. Они воспроизводили менингит у мышей, вводя культуру штамма *E. coli* CSF в дозе 105 КОЕ различными путями: *per os*, внутрибрюшинно и внутривенно.

Нередко оценку вирулентности изолятов *E. coli*, вызывающих у новорожденных менингит, сепсис и инфекции мочевыводящих путей, проводят на мышах линии BALB/c, заражая их внутрибрюшинно в дозе  $10^8$  КОЕ, или на пятидневных крысках, инфицируя их внутрибрюшинно в дозе  $10^2$  КОЕ. Тяжесть инфекции оценивают по общему состоянию животных и смертности [50–52].

Разработка модели экспериментальной эшерихиозной инфекции предполагает поиск штаммов кишечной палочки, способных приживаться в органах и тканях макроорганизма,

вызывать в нем инфекционный процесс и приводить к гибели модельных животных. Кроме того, важно выбрать вид лабораторных животных, максимально чувствительных к эшерихиозной инфекции. Для моделирования летальной или нелетальной инфекции необходимо установить оптимальную заражающую дозу патогена. Использование слишком высоких заражающих доз может приводить к стремительной гибели животных от инфекции или от токсического шока в случае применения эффективных антибактериальных препаратов. Нередко для снижения заражающей дозы бактериальных агентов используют животных с индуцированным иммунодефицитом. Различные кишечные инфекции воспроизводят на животных с искусственным дисбиозом кишечника.

В наших исследованиях мы разработали модели летальной и нелетальной эшерихиозной инфекции у мышей, пригодные для оценки *in vivo* эффективности различных антимикробных препаратов. В качестве возбудителя инфекции использовали клинический штамм кишечной палочки.

**Цель работы** – изучение эффективности фаготерапии и антибиотикотерапии на примере лечения двух моделей эшерихиозной инфекции у мышей, вызываемых штаммом *E. coli* 3421E/19.

## Материалы и методы

### Бактериальные культуры

Для моделирования экспериментальной эшерихиозной инфекции использовали штамм *E. coli* 3421E/19 (кат. №В-8871) из Государственной коллекции патогенных микроорганизмов и клеточных культур «ГКПМ-Оболensk». Штамм 3421E/19 (серотип O18) принадлежит к группе NMES – возбудителей парентеральных инфекций. Используемая нами культура кишечной палочки не продуцирует шига-токсин. Бактерии *E. coli* 3421E/19 чувствительны к цефтазидиму (минимальная подавляющая концентрация (МПК) <0,25 мкг/мл), амикацину (МПК 8 мкг/мл), ко-тримоксазолу (МПК 10/2 мкг/мл), но устойчивы к тетрациклину (МПК >200 мкг/мл).

### Питательные среды, антибиотики

Плотную питательную среду №1 ГРМ производства ФБУН ГНЦ ПМБ (Россия) применяли для культивирования кишечной палочки. В качестве селективной среды для выявления клеток *E. coli* 3421E/19 в фекалиях мышей использовали агар Эндо-ГРМ (ФБУН ГНЦ ПМБ) с добавлением тетрациклина (20 мкг/мл).

В качестве антибиотиков для лечения экспериментального эшерихиоза использовали амикацин (ОАО «КРАСФАРМ», Россия), цефтазидим (Glaxo Wellcome S.p.a., Италия) и ко-тримоксазол (Biocraft, США). Тетрациклина гидрохлорид (ООО «НПК «Асконт», Россия) применяли в качестве селективной добавки для питательных сред. Клинадамицин (Hetofarm A.D., Сербия) назначали животным для провоцирования дисбиоза кишечника.

### Выделение бактериофага VЕс8

Для наработки бактериофага VЕс8 использовали штамм *E. coli* K12 С600 (r-m-), геном которого не содержит факторов патогенности и профагов. Это позволило применять для терапии фаголизат без дополнительной очистки.

Бактериальную культуру С600 выращивали в жидкой питательной среде в течение ночи при температуре 37°C без аэрации до концентрации 10<sup>9</sup> КОЕ/мл. Выросшую культуру разводили в 5 раз жидкой питательной средой LBM, содержащей 10 мМ магния сульфата (MgSO<sub>4</sub>) в среде LB, и заражали бактериофагом VЕс8 с множественностью инфицирования (МИ) 0,01–0,1 БОЕ/КОЕ. Смесь инкубировали при температуре 37°C при аэрации (качалка, скорость вращения 170 об./мин) до просветления культуры (обычно от 2 до 3,5 ч). Фаголизат стерилизовали добавлением 1% хлороформа (v/v) с последующим интенсивным перемешиванием в течение 20 мин. Клеточный дебрис удаляли низкоскоростным центрифугированием при скорости вращения 10000 об./мин в течение 10 мин, надосадочную жидкость отбирали в стерильную емкость. Количество фаговых частиц в фаголизате определяли методом Грациа, используя для этого штаммы *E. coli* С600 и вирулентный 3421E/19.

Выделенный бактериофаг не обладал токсическим действием для мышей при внутрибрюшинном введении в дозе 5 × 10<sup>8</sup> БОЕ в 0,5 мл (данные не приводятся).

### Лабораторные животные

В качестве модельных животных использовали мышей линий BALB/c и С57BL/6, выращенных в питомнике ФБУН ГНЦ ПМБ.

Эшерихиозный сепсис моделировали на мышам линии BALB/c с индуцированным иммунодефицитом. Иммуносупрессию у мышей вызывали внутрибрюшинным введением 5%-го муцина одновременно с культурой кишечной палочки.

Кишечную эшерихиозную инфекцию моделировали на мышам линии С57BL/6 с антибиотик-зависимым дисбиозом кишечника.

Модельных животных содержали в стандартных условиях в соответствии с международными нормами и требованиями. Мыши имели свободный доступ к воде и корму (ООО «Лабораторкорм», Москва).

Мышей размещали в поликарбонатных клетках Lab Products Inc. (США) группами не более шести животных в каждой и проводили за ними ежедневное ветеринарное наблюдение. Умерших в процессе эксперимента мышей удаляли из клеток по мере обнаружения.

### Моделирование дисбактериоза кишечника у мышей

Для санации кишечника подопытным мышам за сутки до заражения подкожно вводили клиндамицин в количестве 400 мг/кг. Этот антибиотик вызывает дисбиоз у лабораторных животных, критически изменяя состав нормальной микрофлоры кишечника и делая его восприимчивым к инфицированию условно-патогенными микроорганизмами [53, 54].

### Моделирование летального сепсиса

Исходную суспензию клеток *E. coli* 3421E/19 готовили из 16-часовой агаровой культуры, суспендированной в физиологическом растворе до мутности, эквивалентной 3,4 по стандарту МакФарланда, что соответствует 1 × 10<sup>9</sup> КОЕ/мл. Бактериальную взвесь для заражения мышей готовили методом серийных разведений культуры *E. coli* до концентрации 3 × 10<sup>3</sup> КОЕ/мл в 2,5%-м муцине с физиологическим

раствором. Контроль количества клеток во взвеси осуществляли путем высева по 0,1 мл из соответствующего разведения исходной взвеси на плотную питательную среду №1 ГРМ. Посевы инкубировали в течение 24 ч при температуре 37°C. 0,5 мл приготовленной взвеси вводили мышам линии BALB/c внутрибрюшинно с использованием инсулинового шприца с иглой диаметром G26-28. Заражающая доза составляла  $1,5 \times 10^3$  КОЕ (100 ЛД50).

#### *Моделирование кишечной инфекции*

Взвесь клеток *E. coli* 3421E/19 для внутрижелудочного введения готовили из агаровой культуры, суспендированной в физиологическом растворе до мутности 5,2 по стандарту МакФарланда ( $\approx 2 \times 10^9$  КОЕ/мл). Количество клеток во взвеси контролировали методом, описанном выше. 0,5 мл приготовленной взвеси ( $1 \times 10^9$  КОЕ) кишечной палочки вводили мышам с индуцированным дисбиозом кишечника внутрижелудочно с помощью металлического зонда (Stanford Equipment Company, США) соответствующего размера. За 2 ч до проведения процедуры у животных отбирали корм.

#### *Изучение динамики развития первичного эшерихиозного сепсиса*

Развитие генерализованной инфекции, вызываемой культурой штамма *E. coli* 3421E/19, изучали на мышах линии BALB/c (самцы/самки, вес 20–24 г). Животных инфицировали внутрибрюшинно дозой  $1,5 \times 10^3$  КОЕ (100 ЛД50) с муцином. Предварительно было установлено, что все зараженные этой дозой мыши умирают в течение суток. Через 1,5; 3; 6 и 12 ч после заражения по 5 животных эвтаназировали методом декапитации, а образцы крови, селезенки, печени и головного мозга исследовали количественно на содержание в них клеток патогена.

#### *Изучение динамики развития кишечной эшерихиозной инфекции*

Динамику развития кишечной формы эшерихиоза исследовали на мышах линии C57Bl/6 (самцы/самки, вес 18–24 г) с индуцированным дисбиозом кишечника. Животных заражали культурой *E. coli* 3421E/19 внутрижелудочно в дозе  $10^9$  КОЕ. На 1, 2, 3, 4, 5, 7, 9, 11 и 14-е сутки от каждой экспериментальной группы (5 голов) пулом отбирали фекалии для бактериологического анализа.

#### *Бактериологический анализ биологических образцов*

После эвтаназии мышей вскрывали для получения образцов органов и крови (из сердца). Селезенку и головной мозг перетирали в стерильных фарфоровых ступках с добавлением кварцевого песка. В гомогенаты добавляли стерильный физиологический раствор (1 мл) и перемешивали до получения однородной массы. Полученные суспензии (цельные и их десятикратные разведения) высевали на поверхность питательного агара. В качестве питательной среды для выявления культуры кишечной палочки использовали агар Эндо-ГРМ с добавлением 20 мкг/мл тетрациклина. Посевы инкубировали при температуре 37°C в течение 18–24 ч.

#### *Сбор и бактериологический анализ каловых масс от мышей*

Мышей (5 особей) из клетки содержания пересаживали в стерильные клетки без подстилки, но с кормом и водой. Через 30–40 мин после пересадки животных возвращали в клетки для содержания. По 200–300 мг фекалий растирали в ступках пестиками, затем образцы гомогенизировали в физиологическом растворе (0,85%-й хлорид натрия), титровали до необходимых разведений и высевали на поверхность плотной питательной среды Эндо-ГРМ с добавлением тетрациклина гидрохлорида. Посевы инкубировали в течение 24 ч при температуре  $36 \pm 1^\circ\text{C}$ . Использованный в работе штамм кишечной палочки устойчив к тетрациклину, в отличие от штаммов, входящих в состав нормальной микрофлоры кишечника мышей.

#### *Гистологическое исследование органов и тканей*

Гистологическое исследование проводили через 12 ч после внутрибрюшинного заражения (на пике сепсиса) мышей культурой *E. coli* 3421E/19 с муцином в дозе 100 ЛД50. В качестве контролей были использованы мыши, получавшие только муцин, только культуру и интактные животные. После эвтаназии у животных иссекали печень, селезенку и головной мозг. Полученные образцы помещали во флакон с 50 мл 4%-го раствора параформа. Через 24 ч экспозиции раствор параформа заменяли свежей порцией. Исследованию подвергали гистологические срезы органов, окрашенные гематоксилином и эозином по стандартной методике. Определяли наличие признаков воспалительно-некротических изменений в исследуемых образцах.

#### *Антибиотикотерапия летальной эшерихиозной инфекции*

Летальный сепсис воспроизводили на 30 мышах (самцы/самки) линии BALB/c весом 20–23 г. Животных инфицировали бактериальной взвесью *E. coli* 3421E/19 в дозе 100 ЛД50. Инфицированных животных случайным образом разделяли на три равноценные группы. Животные из первой группы получали ко-тримоксазол внутрижелудочно по 170 мг/кг дважды в сутки в течение 5 дней. Вторую группу мышей лечили цефтазидимом (подкожно 250 мг/кг, 2 раза в день, 5 дней). Терапию в обоих случаях начинали через 3 ч после заражения. Контрольная группа мышей оставалась без лечения. За животными наблюдали в течение 10 дней, отмечая случаи их гибели. Затем мышей эвтаназировали, а их селезенку, головной мозг и кровь исследовали на наличие клеток патогена. Эффективность лечения оценивали по количеству выживших животных и эффективности санации организма от *E. coli* 3421E/19.

#### *Фаготерапия летальной эшерихиозной инфекции*

В экспериментах по профилактике и лечению летальной эшерихиозной инфекции использовали бактериофаг VЕс8, который *in vitro* лизирует клетки штамма *E. coli* 3421E/19. Летальную форму эшерихиозной инфекции моделировали как описано выше. Лечебную эффективность бактериофага VЕс8 изучали на двух экспериментальных и одной контрольной группах животных, каждая из которых включала 10 особей. Мышей линии BALB/c (самцы, вес 19–21 г) заражали внутрибрюшинно летальной дозой кишечной па-

лочки и начинали лечить в соответствии с выбранной схемой. Препарат фага вводили внутривентриально в объеме 0,5 мл, содержащем около  $5 \times 10^8$  бляшкообразующих единиц (БОЕ). Животным из группы 1 препараты бактериофагов вводили однократно за 1 ч до заражения (режим профилактики). Фаготерапию экспериментальной группы 2 начинали через 1,5 ч после инфицирования (режим лечения). Препарат назначали 2 раза в сутки в течение 3 дней. Контрольную группу инфицированных животных (группа 3) бактериофагом не лечили. За мышами из лечебных и контрольной групп наблюдали на протяжении курса фаготерапии и последующие 7 дней, регистрируя их гибель. В конце эксперимента выживших животных эвтаназировали, вскрывали и проводили бактериологический анализ образцов селезенки, крови и головного мозга с целью выявления клеток патогена.

#### Фаго- и антибиотикотерапия кишечной инфекции

Эффективность фаго- и антибиотикотерапии кишечной эшерихиозной инфекции проводили на мышах линии C57BL/6 (самцы/самки, вес  $20,6 \pm 2$  г) с индуцированным дисбиозом кишечника. Для профилактики и лечения экспериментального эшерихиоза использовали бактериофаг VЕс8 и эффективные *in vitro* антибиотики амикацин и котримоксазол.

Подопытных животных случайным образом делили на группы по 10 особей в каждой и заражали внутрижелудочно *E. coli* 3421E/19 в дозе  $10^9$  КОЕ. В режиме профилактики бактериофаг VЕс8 вводили мышам однократно за час до заражения внутрижелудочно (группа 1) или внутривентриально (группа 2). Мышам из 3-й и 4-й экспериментальных групп фаг VЕс8 назначали 1 раз в сутки внутрижелудочно или внутривентриально соответственно, через сутки после заражения (режим лечения). Продолжительность курса фаготерапии – 5 дней. Разовая доза фага составляла  $10^9$  БОЕ. Животным из группы 5 давали внутрижелудочно ко-тримоксазол (разовая доза по сульфаметоксазолу 350 мг/кг) дважды в сутки в течение 5 дней. Антибиотикотерапию начинали через 24 ч после инфицирования. Мыши из контрольной группы 6 не получали антибактериальных препаратов.

В течение пяти дней ежедневно, а затем на 7, 9, 12 и 14-е сутки после заражения в фекалиях животных определяли количество клеток *E. coli* 3421E/19 и фаговых частиц VЕс8. Фекалии отбирали двумя пулами от 5 мышей.

#### Статистические методы

Статистическую обработку результатов (вычисление средних арифметических значений и стандартного отклонения) проводили с использованием статистических ресурсов программы Microsoft Excel 2010 и статистической программы Statistica 10.

## Результаты и обсуждение

#### Модель летального эшерихиозного сепсиса у мышей

Внутрибрюшинное введение мышам линии BALB/c культуры штамма *E. coli* 3421E/19 вызывало быструю генерализацию эшерихиозной инфекции. Через 1,5 ч после заражения бактерии кишечной палочки колонизировали селезенку

Таблица 1. Динамика колонизации клетками *E. coli* 3421E/19 организма мышей линии BALB/c после внутривентриального заражения в дозе 100 ЛД50

Время после заражения, ч	LOG <sub>10</sub> КОЕ/г (мл) <i>E. coli</i> 3421E/19			
	Среднее значение и стандартное отклонение (n = 5)			
	Селезенка	Печень	Головной мозг	Кровь
1,5	2,42 ± 0,54 (4/5)	2,32 ± 0,09 (4/5)	<1 (5/5)	1,49 ± 0,28 (4/5)
3	4,11 ± 0,16 (5/5)	3,53 ± 0,29 (5/5)	2,62 ± 0,10 (5/5)	3,09 ± 0,43 (5/5)
6	6,20 ± 0,28 (5/5)	6,04 ± 0,33 (5/5)	5,18 ± 0,69 (5/5)	4,65 ± 1,16 (5/5)
12	6,62 ± 0,14 (5/5)	6,46 ± 0,15 (5/5)	5,42 ± 0,15 (5/5)	5,82 ± 0,06 (5/5)

В скобках указано соотношение мышей с положительным бактериологическим высевом к общему количеству животных в группе.

(2,42 LOG<sub>10</sub> КОЕ/г) и печень (2,32 LOG<sub>10</sub> КОЕ/г) у 4 из 5 инфицированных животных. У мышей наблюдалась достаточно высокая бактериемия (3,4 LOG<sub>10</sub> КОЕ/мл). Следует отметить, что у всех мышей кишечная палочка отсутствовала в головном мозге (табл. 1). Через 3 ч после инфицирования эшерихиозный сепсис наблюдался у всех животных (рис. 1). Среднее количество кишечной палочки в это время в селезенке, печени и крови увеличивалось более чем на порядок. Содержание патогена в них составило 6,46; 5,42 и 3,09 LOG<sub>10</sub> КОЕ/г соответственно. Головной мозг был обсеменен клетками *E. coli* 3421E/19 у 100% животных. Концентрация кишечной палочки в тканях головного мозга достигала 2,62 LOG<sub>10</sub> КОЕ/г.

Максимальная обсемененность организма мышей кишечной палочкой была зафиксирована через 12 ч после заражения. Концентрация клеток *E. coli* 3421E/19 в селезенке, печени, головном мозге и крови мышей увеличивалась до 6,62;

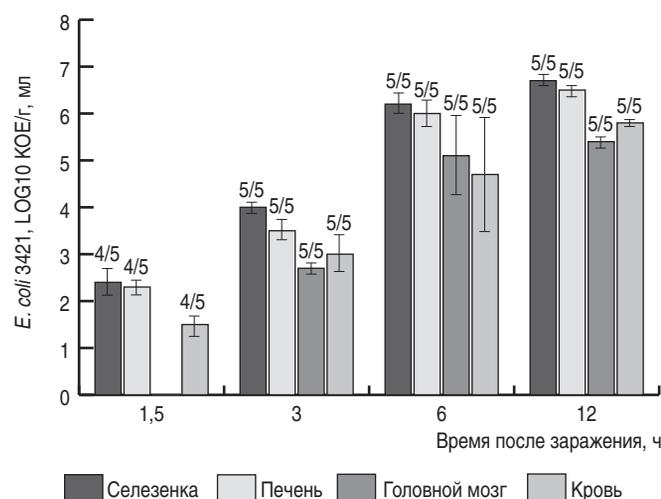


Рис. 1. Динамика колонизации клетками *E. coli* 3421E/19 селезенки, печени, головного мозга и крови иммунодепрессивных мышей линии BALB/c после внутривентриального заражения в дозе 100 ЛД50 с муцином.

На диаграмме представлены средние значения и стандартные отклонения количества клеток кишечной палочки. В дробях указано количество животных с положительным бактериологическим высевом по отношению к количеству животных в группе.

6,46; 5,42 и 5,82 LOG<sub>10</sub> КОЕ/г соответственно. Бактериemia у инфицированных мышей также нарастала и к 12 ч достигала в среднем 5,82 LOG<sub>10</sub> КОЕ/мл.

Таким образом, бактерии *E. coli* 3421E/19, введенные внутривентриально мышам линии BALB/c в дозе 100 ЛД<sub>50</sub>, быстро распространяются в организме мышей, поражая паренхиматозные органы брюшной полости и головной мозг.

Гематологический анализ крови мышей, зараженных культурой штамма *E. coli* 3421E/19, показал достоверное ( $p < 0,01$ ) снижение количества лейкоцитов (до  $2,6 \times 10^9/л$ ), а также значительное снижение относительного содержания лимфоцитов ( $1,6 \times 10^9/л$ ) и гранулоцитов ( $1,0 \times 10^9/л$ ). Подобные изменения в формуле крови говорят о развитии выраженного инфекционного процесса, связанного с эшерихиозным сепсисом. У контрольных животных содержание лейкоцитов, лимфоцитов, моноцитов и гранулоцитов составляло  $5,1 \times 10^9/л$ ,  $2,7 \times 10^9/л$ ,  $0,2 \times 10^9/мл$ ,  $2,2 \times 10^9/л$  соответственно.

В результате гистологических исследований было установлено, что муцин при внутривентриальном введении мышам линии BALB/c вызывает морфологические изменения в тканях организма, что выражается в уменьшении количества рециркулирующих лимфоцитов в лимфоидных органах (селезенке и лимфатических узлах). Внутривентриальное введение мышам культуры *E. coli* 3421E/19 с муцином вызывает резкое уменьшение площади белой пульпы селезенки, по сравнению с действием одного муцина. При этом культура кишечной палочки стимулирует появление в красной пульпе селезенки большого количества клеток, характерных для воспалительного процесса, – полиморфноядерных лейкоцитов разной степени зрелости, а также иммунокомпетентных клеток – малых и больших лимфоцитов. Через 12 ч после заражения подопытных животных происходит лизис гепатоцитов с образованием обширных очагов некроза в паренхиме.

#### Эффективность фаго- и антибиотикотерапии эшерихиозного сепсиса

Разработанная нами модель летального эшерихиозного сепсиса, вызываемого *E. coli* 3421E/19, была использована для оценки терапевтической эффективности эшерихиозного бактериофага VЕс8 и антибиотиков ко-тримоксазола и цефтазидима. Активность фага *in vivo* оценивали в экспериментах по его профилактике и лечению. Критериями эффективности фаготерапии и антибиотикотерапии служили выживаемость инфицированных животных и остаточная обсемененность органов клетками кишечной палочки на 10–14-е сутки после заражения.

В результате проведенных исследований было установлено, что бактериофаг VЕс8 обладает высокой профилактической и лечебной эффективностью при лечении летальной эшерихиозной инфекции. Все инфицированные мыши, получавшие внутривентриально фаг VЕс8 ( $5 \times 10^8$  БОЕ) однократно за 1 ч до заражения или в течение 3 суток (через 1,5 ч после заражения, два раза в сутки), оставались живыми в течение 10 дней после заражения. В крови, селезенке и головном мозге выживших животных из лечебных групп культура штамма 3421E/19 не была выявлена, что свидетельствует о полной элиминации возбудителя из организма животных.

У мышей, получавших препарат бактериофага, в течение всего срока наблюдения признаков инфекционного заболевания или интоксикации не отмечалось. Животные теряли в весе в течение первых суток инфекции, а затем их масса тела постепенно восстанавливалась.

В то же время 100% мышей из контрольной группы пали в течение суток после инфицирования. При посеве мазками-отпечатками органов павших мышей культура *E. coli* 3421E/19 высевалась в виде газона из селезенки, головного мозга и крови.

Эксперименты по антибиотикотерапии летального эшерихиоза, вызванного *E. coli* 3421E/19, показали, что пятидневный курс применения ко-тримоксазола или цефтазидима приводит к положительному лечебному результату: 100% инфицированных мышей из экспериментальных групп оставались живыми в течение 14 суток. Культура патогена отсутствовала в селезенке, головном мозге и крови всех выживших животных. В контрольной группе наблюдался падеж 100% мышей в течение первых суток инфекции. Бактерии *E. coli* 3421E/19 были выделены от всех павших мышей.

Разработанная нами модель летальной эшерихиозной генерализованной инфекции, вызываемой внутривентриальным введением 100 среднелетальных доз *E. coli* 3421E/19, поддается лечению антибиотиками, активными *in vitro* против этого патогена. Таким образом, эта модель может быть использована для оценки терапевтической эффективности других антибактериальных препаратов, направленных против кишечной палочки.

В экспериментах по профилактике и лечению генерализованной летальной эшерихиозной инфекции установлено, что бактериофаг VЕс8 по своей лечебной активности не уступает антибиотикам цефтазидиму и ко-тримоксазолу.

#### Модель кишечной эшерихиозной инфекции у мышей

Внутрижелудочное введение мышам линии С57BL/6 с антибиотик-зависимым дисбиозом кишечника культуры *E. coli* 3421E/19 приводит к устойчивой колонизации кишечника клетками патогена, но не вызывает видимых признаков инфекции и гибели модельных животных. Следует отметить, что у мышей, получавших клиндамицин для подавления нормофлоры кишечника, среднее содержание клеток *E. coli* 3421E/19 в фекалиях на 2–5 порядков превышало их содержание в фекалиях мышей с нормальной микрофлорой (табл. 2). В течение 3 суток после заражения концентрация клеток штамма 3421E/19 в фекалиях мышей с дисбиозом держалась на уровне 9,59–9,66 LOG<sub>10</sub> КОЕ/г, у контрольных мышей (без дисбиоза) – в пределах 6,62–4,98 LOG<sub>10</sub> КОЕ/г.

Более длительное (в течение 14 суток) наблюдение за мышами выявило, что у мышей, обработанных клиндамицином, обсемененность фекалий клетками штамма 3421E/19 постепенно падает с 9,45 до 5,22 LOG<sub>10</sub> КОЕ/г. В то же время у мышей с нормальной микрофлорой кишечника уже на 4-е сутки эшерихиозной инфекции культура патогена отсутствовала в мышиных фекалиях (рис. 2).

Кроме того, в ходе изучения модели эшерихиозной кишечной инфекции была выявлена способность клеток патогена к инвазии. Так, например, в течение 3 дней инфекции клетки *E. coli* 3421E/19 были выявлены у 20 и 60% мышей в селезенке и головном мозге соответственно. Бактериemia

Таблица 2. Обсемененность органов и фекалий мышей линии C57BL/6 клетками *E. coli* 3421 E/19 при внутрижелудочном заражении культурами в дозе  $10^9$  КОЕ

Штамм <i>E. coli</i>	Клиндамицин	LOG <sub>10</sub> КОЕ/г (мл) клеток <i>E. coli</i> . Среднее значение и стандартное отклонение (n = 5)			
		Селезенка	Головной мозг	Кровь	Фекалии
1-е сутки после заражения					
3421E/19	+	2,26 (1/5)	2,11 ± 1,13 (3/5)	2,69 ± 2,22 (2/5)	9,66
3421E/19	-	0 (5/5)	0 (5/5)	0 (5/5)	6,62
2-е сутки после заражения					
3421E/19	+	0 (5/5)	2,54 (1/5)	1,59 (1/5)	9,73
3421E/19	-	0 (5/5)	0 (5/5)	0 (5/5)	6,27
3-и сутки после заражения					
3421E/19	+	2,90 (1/5)	2,59 ± 1,01 (3/5)	0 (5/5)	9,59
3421E/19	-	0 (5/5)	0 (5/5)	0 (5/5)	4,98

В скобках указано соотношение мышей с положительным бактериологическим высевом к общему количеству животных в группе.

наблюдалась у 3 из 5 мышей, но только в первые 2 дня после заражения. Максимальные концентрации клеток *E. coli* 3421E/19 в селезенке, головном мозге и крови составляли 2,9 LOG<sub>10</sub> КОЕ/г, 2,59 LOG<sub>10</sub> КОЕ/г и 2,69 LOG<sub>10</sub> КОЕ/мл. Диссеминация клеток *E. coli* 3421E/19 не наблюдалась у мышей с неизменной микрофлорой кишечника.

**Эффективность фаго- и антибиотикотерапии эшерихиозной кишечной инфекции у мышей**

Модель кишечной эшерихиозной инфекции у мышей была использована в экспериментах по оценке терапевтической активности бактериофага VЕс8 в сравнении с антибиотиком ко-тримоксазолом. В качестве модельных животных использовали мышей линии C57BL/6 (самцы/самки, вес 20,6 ± 2 г) с антибиотик-обусловленным дисбиозом кишечника.

Результаты терапии экспериментальной эшерихиозной кишечной инфекции показали, что под воздействием бакте-

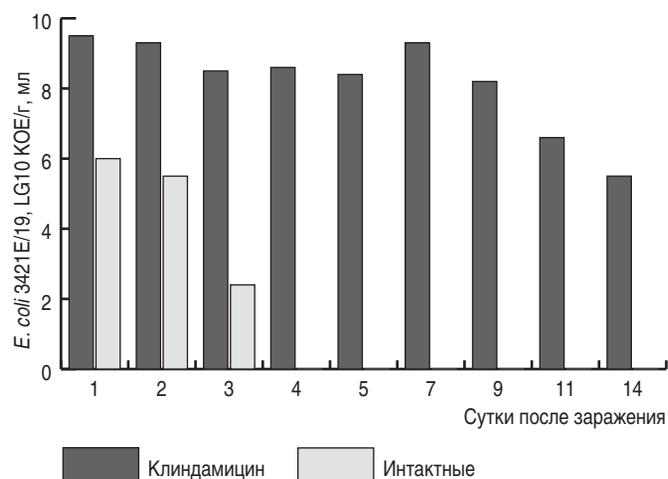


Рис. 2. Концентрация клеток *E. coli* 3421E/19 в фекалиях мышей линии BALB/c после внутрижелудочного заражения в дозе  $1 \times 10^9$  КОЕ.

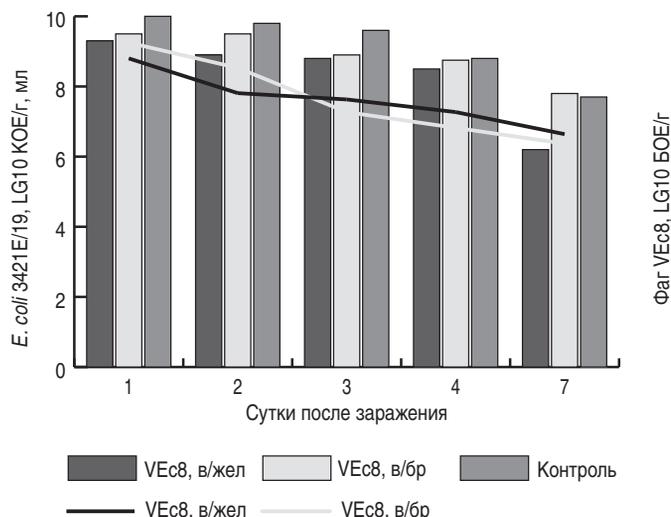


Рис. 3. Содержание клеток *E. coli* 3421E/19 в фекалиях мышей при фагопрофилактике экспериментальной кишечной инфекции.

Бактериофаг VЕс8 вводили однократно внутрижелудочно за 1 ч до заражения в количестве  $10^9$  БОЕ. Столбцы показывают количество клеток кишечной палочки. Линиями обозначено количество фаговых частиц в фекалиях.

риофага может происходить статистически значимое снижение концентрации клеток *E. coli* 3421E/19 в фекалиях. Так, например, к 7-м суткам после заражения при однократном внутрижелудочном введении бактериофага VЕс8 за 1 ч до инфицирования (профилактика) количество клеток патогена в фекалиях снижалось с 10 до 6,23 LOG<sub>10</sub> КОЕ/г (табл. 3). В то же время у контрольных животных происходило независимое снижение содержания клеток *E. coli* 3421E/19 до уровня 7,77 LOG<sub>10</sub> КОЕ/г. Внутрибрюшинное назначение бактериофага практически не влияло на обсемененность фекалий бактериями клеток *E. coli* 3421E/19 по сравнению с нелеченым контролем.

Количество фаговых частиц VЕс8 в фекалиях мышей также снижалось в течение недели с 9,4–9,8 LOG<sub>10</sub> БОЕ/г (1-е сутки) до 6,82–6,5 LOG<sub>10</sub> БОЕ/г как при внутрижелудочном, так и при внутрибрюшинном способе применения препарата бактериофага (табл. 4). Полученные данные говорят о том, что фаги эффективно проникают в просвет кишечника после внутрибрюшинного введения. С другой стороны, мы не наблюдали эффекта размножения фагов в кишечнике мышей, несмотря на наличие чувствительной культуры *E. coli* 3421E/19 (рис. 3).

При длительном (в течение 5 дней) применении бактериофага VЕс8 наблюдался более выраженный терапевтический эффект (табл. 3). К 7-м суткам после заражения концентрация клеток *E. coli* 3421E/19 в фекалиях мышей, получавших фаг внутрижелудочно, составляла 4,21 LOG<sub>10</sub> КОЕ, тогда как у контрольных животных этот показатель был более чем на три порядка выше (7,77 LOG<sub>10</sub> КОЕ). Внутрибрюшинное введение бактериофага было менее эффективным и незначительно снижало обсемененность фекалий клетками патогена – до 6,23 LOG<sub>10</sub> КОЕ.

Динамика концентрации фаговых частиц VЕс8 в фекалиях мышей на протяжении фаготерапии была отрицательной при обоих путях введения фагового препарата (рис. 4).

**Таблица 3. Обсемененность (LOG<sub>10</sub> КОЕ/г) фекалий мышей клетками *E. coli* 3421E/19 в ходе фаго- и антибиотикотерапии экспериментальной эшерихиозной кишечной инфекции у мышей линии C57BL/6**

Группы	Сутки после заражения				
	1	2	3	4	7
VEc8, в/жел, профилактика	9,30	8,99	8,95	8,41	6,16
VEc8, в/бр, профилактика	9,47	9,50	9,00	8,81	7,87
VEc8, в/жел, лечение	10,00	8,95	8,69	6,92	4,21
VEc8, в/бр, лечение	10,00	9,63	9,07	7,86	6,23
Ко-тримоксазол, в/жел	10,00	9,26	8,09	7,09	6,41
Контроль	10,00	9,71	9,50	8,86	7,77

Представлены средние значения обсемененности пула фекалий от 10 мышей.

**Таблица 4. Обсемененность фекалий фаговыми частицами VEc8 (LOG<sub>10</sub> БОЕ/г) в ходе фаготерапии экспериментальной эшерихиозной кишечной инфекции у мышей линии C57BL/6**

Группы	Сутки после заражения				
	1	2	3	4	7
VEc8, в/жел., профилактика	9,40	8,12	7,81	7,40	6,82
VEc8, в/бр, профилактика	9,80	8,81	7,50	7,04	6,50
VEc8, в/жел, лечение	–	9,08	7,23	4,81	3,10
VEc8, в/бр, лечение	–	9,40	8,41	8,12	6,69
Контроль	–	–	–	–	–

Представлены средние значения обсемененности пула фекалий от 10 мышей.

Однако при внутрижелудочном применении эшерихиозного бактериофага его количество в фекалиях через 2 суток после последнего введения составляла 6,69 LOG<sub>10</sub> КОЕ, а при внутрибрюшинном введении – только 3,1 LOG<sub>10</sub> КОЕ (табл. 4).

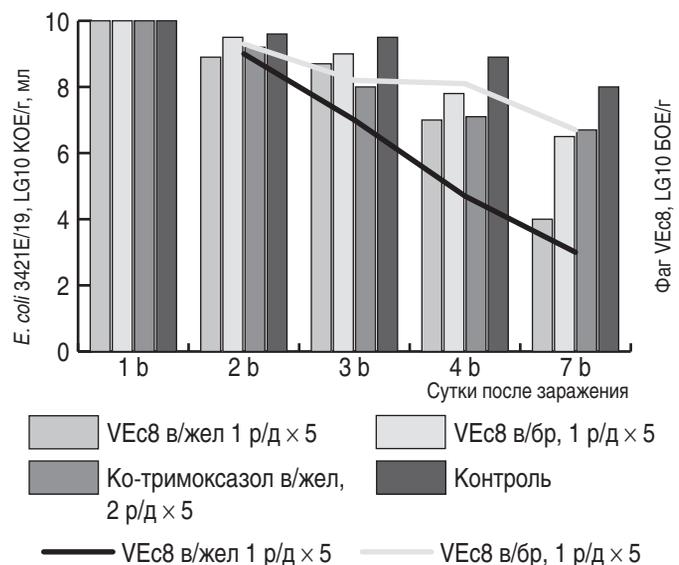
Следует отметить, что конечный результат лечения экспериментальной эшерихиозной инфекции у мышей бактериофагом VEc8 был лучше, чем при антибиотикотерпии ко-тримоксазолом. Внутрижелудочное введение ко-тримоксазола дважды в сутки в течение 5 дней давало лишь небольшое (до 6,41 LOG<sub>10</sub> КОЕ) снижение обсемененности фекалий клетками *E. coli* 3421E/19 по сравнению с нелеченым контролем (7,7 LOG<sub>10</sub> КОЕ).

В ходе фаготерапии и антибиотикотерапии экспериментального кишечного эшерихиоза у мышей линии C57BL/6 состояние животных оставалось удовлетворительным. Признаки кишечной инфекции отсутствовали как у леченых, так и у контрольных животных. Мыши из экспериментальных и контрольной групп в течение срока наблюдения (7 суток) набирали в весе. Прибавка массы тела животных в группах фагопрофилактики составила 1,4–1,5 г, в группе фаготерапии 4 – 2,1 г, в группе антибиотикотерапии – 2,3 г. Контрольные животные поправились в среднем на 1,6 г. Наименьший привес отмечался в лечебной группе 3 (внутрибрюшинное введение бактериофага VEc8 в течение 3 дней) – 0,3 г. Следует отметить, что в начале эксперимента

среднегрупповые показатели веса мышей из лечебных групп достоверно не отличались от контроля ( $p > 0,05$ ).

Для оценки лечебной эффективности литического бактериофага VEc8 были использованы две модели эшерихиозной инфекции у мышей, поскольку бактерии *E. coli* могут быть причиной различных нозологических форм инфекции у человека. Модель сепсиса, вызываемого у мышей линии BALB/c внутрибрюшинным введением культуры, приводит к быстрой генерализации инфекции и к гибели 100% животных в течение суток после заражения. Летальная модель довольно удобна при изучении антибактериальной активности препаратов *in vivo*, поскольку позволяет оценивать их эффективность по объективным показателям – выживаемости модельных животных и степени санации организма. Кишечную (нелетальную) модель эшерихиозной инфекции у мышей линии C57BL/6 мы применили для оценки эффективности внутрижелудочного применения бактериофага VEc8 и ко-тримоксазола. Исследования по изучению динамики развития кишечного эшерихиоза показало, что у мышей с антибиотик-зависимым дисбиозом кишечника возможна длительная персистенция патогена. Этот эффект позволяет изучать лечебную активность препаратов по изменению содержанию клеток модельного штамма кишечной палочки в фекалиях зараженных животных.

В качестве возбудителя эшерихиозной инфекции использовали наиболее вирулентный клинический штамм *E. coli* 3421E/19 из коллекции «ГКПМ-Оболensk». Этот штамм кишечной палочки относится к группе NMEC-эшерихий, вызывающих парентеральную инфекцию, и принадлежит к серогруппе O18. Среднелетальная доза (ЛД<sub>50</sub>) использованного штамма при внутрибрюшинном введении интактным мышам линии BALB/c составляет  $1,1 \times 10^4$  КОЕ. Для повышения вирулентности штамма мы вводили его модельным животным в растворе 2,5%-го муцина. Муцин подавляет активность



**Рис. 4. Содержание клеток *E. coli* 3421E/19 и бактериофага VEc8 в фекалиях мышей при фаготерапии и антибиотикотерапии экспериментальной кишечной инфекции.**

Бактериофаг VEc8 вводили однократно внутрижелудочно за 1 ч до заражения в количестве  $10^9$  БОЕ. Столбцы показывают количество клеток кишечной палочки в фекалиях мышей из разных групп. Линиями обозначено количество фаговых частиц в фекалиях.

перитонеальных макрофагов, препятствуя лизису бактерий в них [55]. В результате показатель ЛД50 снижался в 1000 раз (до 15 КОЕ). Для воспроизведения системного эшерихиоза мышей BALB/c заражали культурой *E. coli* 3421E/19 в количестве  $1,5 \times 10^3$  КОЕ с муцином, что составляло 100 ЛД50. Невысокая заражающая доза патогена увеличивает вероятность получить лечебный эффект антибактериальных препаратов при моделировании бактериальных инфекций [56].

Кишечную эшерихиозную инфекцию моделировали на мышцах линии C57BL/6. Эту линию мышей нередко используют для воспроизведения различных кишечных инфекций [57, 58]. С целью повышения чувствительности животных к *E. coli* 3421E/19 при внутрижелудочном заражении мы предварительно подавляли нормальную микрофлору кишечника путем введения антибиотика (клиндамицина). Благодаря этому использованный нами штамм кишечной палочки длительное время (до 14 суток) был способен персистировать в кишечнике модельных животных после интрагастрального введения в дозе  $10^9$  КОЕ. Через 2 нед. после заражения концентрация клеток *E. coli* 3421E/19 в фекалиях мышей составляет 5,2–7,7 LOG<sub>10</sub> КОЕ/г, в то время как у интактных мышей клетки патогена элиминируют из кишечника уже через 3 суток. Следует отметить, что мышей с антибиотик-ассоциированным дисбиозом довольно часто используют для моделирования гастроэнтеральных инфекций [43, 59, 60].

Для экспериментального лечения летальной генерализованной инфекции, вызываемой культурой *E. coli* 3421E/19, мы использовали литический бактериофаг VEс8, который лизирует клетки этого штамма *in vitro*. Разовая доза фага как в режиме профилактики (однократно за час до заражения), так и в режиме лечения (2 раза в сутки, 3 дня, начало лечения через 1,5 ч после заражения) составила  $5 \times 10^8$  БОЕ. В обоих случаях терапевтическая эффективность фаготерапии летального эшерихиозного сепсиса составила 100%. По эффективности фаготерапия не уступала антибиотикотерапии. Следует отметить, что использованные антибиотики цефтазидим и ко-тримоксазол активны *in vitro* в отношении *E. coli* 3421E/19: МПК составляет <0,25 и 12 мкг/мл соответственно. Подобные результаты мы получали при изучении специфической активности других бактериофагов при терапии летальной септической инфекции у мышей, вызываемой бактериями *Proteus mirabilis*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* [56, 61–63]. В результате внутрибрюшинное введение инфицированным мышам фагов SA18, KpV289, PA5, Pm3 обеспечивало выживаемость в 80–100% случаев при сходных схемах профилактики и лечения, а возбудитель инфекции полностью элиминировал из организма модельных животных. Высокую эффективность бактериофагов при лечении летального эшерихиозного сепсиса и менингита показали в своих исследованиях Pouillot F. et al. [64]. Раннее введение бактериофага EC200PP крысам-сосункам, инфицированным штаммом кишечной палочки S242 (O25:H4), защищало от гибели 100% подопытных животных при внутрибрюшинном введении фага и 50% – при подкожном. Терапевтическая доза бактериофага составляла  $10^8$  БОЕ.

Бактериофаг VEс8 не элиминирует культуру *E. coli* 3421E/19 из кишечника мышей линии C57BL/6, инфицированных внутрижелудочно. С другой стороны, он достоверно снижает ее количество (в  $4,8 \times 10^3$  раз) по сравнению с нелечеными контрольными животными. В то же время ко-тримоксазол снижает уровень обсемененности фекалий клетками патогенной кишечной палочки по сравнению с контролем только в 100 раз. Таким образом, в наших исследованиях фаготерапия кишечной инфекции у мышей линии C57BL/6, обусловленной *E. coli* 3421E/19, является более эффективной, чем антибиотикотерапия.

Отсутствие абсолютного санирующего действия бактериофага VEс8 при прямом воздействии фаговых частиц на клетки *E. coli* 3421E/19 в желудочно-кишечном тракте мышей, по всей видимости, связано с формированием субпопуляции фаг-толерантных клеток. Так, например, A.Lacqua et al. [65] показали, что при контакте со специфическим бактериофагом среди клеток *E. coli* MG1655 появляются мутантные клоны с большим количеством белка Dps внешней мембраны, способствующего образованию пилеподобных образований, формирующих матрикс биопленки. Кроме того, у этих мутантов заметно снижалось количество белков наружной мембраны OmpC и OmpF, которые являются рецепторными белками для специфических бактериофагов.

## Заключение

Две модели экспериментальной эшерихиозной инфекции были разработаны и использованы для оценки лечебно-профилактической эффективности бактериофага VEс8: летальный сепсис у мышей линии BALB/c и нелетальная кишечная инфекция у мышей линии C57BL/6. В первом случае мышей заражали культурой *E. coli* 3421E/19, суспендированной в растворе муцина, для подавления фагоцитоза. В другой модели использовали мышей с антибиотик-обусловленным дисбиозом кишечника для повышения восприимчивости к эшерихиозной инфекции.

Бактериофаг VEс8 обладает высокой активностью при профилактике и лечении генерализованной инфекции у мышей, вызванной внутрибрюшинным введением летальной дозы культуры клинического штамма *E. coli* 3421E/19. Лечебный результат показал, что фаготерапия не уступает по своей эффективности антибиотикотерапии цефтазидимом или ко-тримоксазолом. Проведенные исследования показали, что однократное внутрибрюшинное введение мышам линии BALB/c бактериофага VEс8 ( $5 \times 10^8$  БОЕ) в режиме профилактики (за 1 ч до заражения), защищает от гибели 100% животных, которые в результате терапии полностью освобождаются от патогенной кишечной палочки. Трехдневное лечение бактериофагом VEс8 летального эшерихиозного сепсиса, начатое через 1,5 ч после заражения, также защищает от гибели и санирует от патогена всех инфицированных мышей. Цефтазидим и ко-тримоксазол также дают 100% лечебный результат.

Бактериофаг VEс8 оказывает санирующее действие при лечении кишечной эшерихиозной инфекции у мышей линии C57BL/6. Внутрижелудочное применение фага в течение 5 дней в разовой дозе  $5 \times 10^8$  БОЕ значительно снижает содержание клеток *E. coli* 3421E/19 в фекалиях инфицирован-

ных животных. Внутривентриальное введение бактериофага дает худший лечебный эффект.

Пятидневная антибиотикотерапия кишечной эшерихиозной инфекции с использованием ко-тримоксазола менее эффективна по сравнению с внутривентриальной фаготерапией, но не отличается по эффективности от внутривентриального лечения фагом.

Полученные нами результаты доказывают, что бактериофаг VЕс8 является перспективным препаратом для лечения эшерихиозов в качестве альтернативы классическим антибиотикам.

#### Информация о финансировании

Работа выполнена в рамках отраслевой программы Роспотребнадзора.

#### Financial support

The work was carried out within the framework of the sectorial program of Rospotrebnadzor.

#### Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### Conflict of interests

The authors declare that there is no conflict of interest.

#### Литература

- Литусов НВ. Эшерихии. Иллюстрированное пособие. Екатеринбург: УГМА; 2016, 36 с.
- Карцев НН, Фурсова НК. Эпидемиология, свойства и лабораторная диагностика энтеротоксигенных *Escherichia coli*. Бактериология. 2018;3(1):45-49. DOI: 10.20953/2500-1027-2018-1-45-49
- Johnson TJ, Nolan LK. Pathogenomics of the virulence plasmids of *Escherichia coli*. Microbiol Mol Biol Rev. 2009 Dec;73(4):750-74. DOI: 10.1128/MMBR.00015-09. Erratum in: Microbiol Mol Biol Rev. 2010 Sep;74(3):477-8.
- Karch H, Tarr PI, Bielaszewska M. Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* in human medicine. Int J Med Microbiol. 2005 Oct;295(6-7):405-18. DOI: 10.1016/j.ijmm.2005.06.009
- Карцев НН, Светоч ЭА. Эпидемиология, свойства и лабораторная диагностика шига-токсин-продуцирующих *Escherichia coli*. Бактериология. 2018;3(1):7-12. DOI: 10.20953/2500-1027-2018-1-7-12
- Tarr PI, Gordon CA, Chandler WL. Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* and haemolytic uraemic syndrome. Lancet. 2005 Mar 19-25;365(9464):1073-86. DOI: 10.1016/S0140-6736(05)71144-2
- Noris M, Remuzzi G. Atypical hemolytic-uremic syndrome. N Engl J Med. 2009 Oct 22;361(17):1676-87. DOI: 10.1056/NEJMra0902814
- Caprioli A, Morabito S, Brugère H, Oswald E. Enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: emerging issues on virulence and modes of transmission. Vet Res. 2005 May-Jun;36(3):289-311. DOI: 10.1051/vetres:2005002
- Palmer LD, Skaara EP. Cuts Both Ways: Proteases Modulate Virulence of Enterohaemorrhagic *Escherichia coli*. mBio. 2019;10: e00115-19. DOI: 10.1128/mBio.00115-19
- Nyholm O, Heinikainen S, Pelkonen S, Hallanvuoto S, Haukka K, Siitonen A. Hybrids of Shigatoxigenic and Enterotoxigenic *Escherichia coli* (STEC/ETEC) Among Human and Animal Isolates in Finland. Zoonoses Public Health. 2015 Nov;62(7):518-24. DOI: 10.1111/zph.12177
- Frank C, Werber D, Cramer JP, Askar M, Faber M, an der Heiden M, et al; HUS Investigation Team. Epidemic profile of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* O104:H4 outbreak in Germany. N Engl J Med. 2011 Nov 10;365(19):1771-80. DOI: 10.1056/NEJMoa1106483
- Bielaszewska M, Mellmann A, Zhang W, Köck R, Fruth A, Bauwens A, Peters G, Karch H. Characterisation of the *Escherichia coli* strain associated with an outbreak of haemolytic uraemic syndrome in Germany, 2011: a microbiological study. Lancet Infect Dis. 2011 Sep;11(9):671-6. DOI: 10.1016/S1473-3099(11)70165-7
- Mellmann A, Harmsen D, Cummings CA, Zentz EB, Leopold SR, Rico A, et al. Prospective genomic characterization of the German enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O104:H4 outbreak by rapid next generation sequencing technology. PLoS One. 2011;6(7):e22751. DOI: 10.1371/journal.pone.0022751
- Buchholz U, Bernard H, Werber D, Böhmer MM, Remschmidt C, Wilking H, Deleré Y, et al. German outbreak of *Escherichia coli* O104:H4 associated with sprouts. N Engl J Med. 2011 Nov 10;365(19):1763-70. DOI: 10.1056/NEJMoa1106482
- Rasko DA, Webster DR, Sahl JW, Bashir A, Boisen N, Scheutz F, et al. Origins of the *E. coli* strain causing an outbreak of hemolytic-uremic syndrome in Germany. N Engl J Med. 2011 Aug 25;365(8):709-17. DOI: 10.1056/NEJMoa1106920
- BGI releases the complete map of the Germany *E. coli* O104 genome and attributed the strain as a category of Shiga toxin-producing enteroaggregative *Escherichia coli* (STpEAEC). URL: <http://www.bgisequence.com/eu/newsandevents/news/bgi-releases-the-complete-map-of-the-germany-e-coli-o104-genome>
- Mohammadtaheri Z, Pourpaki M, Mohammadi F, Namdar R, Masjedi MR. Surveillance of antimicrobial susceptibility among bacterial isolates from intensive care unit patients of a tertiary-care university hospital in Iran: 2006–2009. Chemotherapy. 2010;56(6):478-84. DOI: 10.1159/000321032
- Alves HC, Cruz FPN, de Assis PCP, Pessoa JDC, Trevelin LC. Antibiotic Resistance among *Escherichia coli*: Isolates and Novel Approaches to the Control of *E. coli* Infections. 2017. DOI: 10.5772/67400
- Pitout JD, Nordmann P, Laupland KB, Poirel L. Emergence of *Enterobacteriaceae* producing extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs) in the community. J Antimicrob Chemother. 2005 Jul;56(1):52-9. DOI: 10.1093/jac/dki166
- Hopkins KL, Davies RH, Threlfall EJ. Mechanisms of quinolone resistance in *Escherichia coli* and *Salmonella*: recent developments. Int J Antimicrob Agents. 2005 May;25(5):358-73. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2005.02.006
- Kmet V, Piatnicová E. Antibiotic resistance in commensal intestinal microflora. Folia Microbiol (Praha). 2010 Jul;55(4):332-5. DOI: 10.1007/s12223-010-0052-3
- Zhanell GG, DeCorby M, Laing N, Weshnoweski B, Vashisht R, Taylor F, et al; Canadian Antimicrobial Resistance Alliance (CARA), Hoban DJ. Antimicrobial-resistant pathogens in intensive care units in Canada: results of the Canadian National Intensive Care Unit (CAN-ICU) study, 2005–2006. Antimicrob Agents Chemother. 2008 Apr;52(4):1430-7. DOI: 10.1128/AAC.01538-07
- Allen HK, Donato J, Wang HH, Cloud-Hansen KA, Davies J, Handelsman J. Call of the wild: antibiotic resistance genes in natural environments. Nat Rev Microbiol. 2010 Apr;8(4):251-9. DOI: 10.1038/nrmicro2312
- Livermore DM, Woodford N. The beta-lactamase threat in *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* and *Acinetobacter*. Trends Microbiol. 2006 Sep;14(9):413-20. DOI: 10.1016/j.tim.2006.07.008
- Aarestrup FM. Veterinary drug usage and antimicrobial resistance in bacteria of animal origin. Basic Clin Pharmacol Toxicol. 2005 Apr;96(4):271-81. DOI: 10.1111/j.1742-7843.2005.pto960401.x
- Горелов АВ, Бондарева АВ. Стартовая терапия эшерихиозов у детей. Лечение и профилактика. 2016;4(20):69-73.
- Руженцова ТА, Плоскирева АА, Горелов АВ. Острая диарея бактериальной этиологии: дифференциальная диагностика и лечение. Медицинский совет. 2016;7:78-81. DOI: 10.21518/2079-701X-2016-07-78-81
- Горелов АВ, Николаева СВ, Усенко ДВ, Плоскирева АА, Руженцова ТА, Михайлова ЕВ, и др. Эффективность применения нифуроксазида при острых кишечных инфекциях бактериальной этиологии у детей. Инфекционные болезни. 2018;16(2):18-26. DOI: 10.20953/1729-9225-2018-2-18-26

29. Michael M, Elliott EJ, Craig JC, Ridley G, Hodson EM. Interventions for hemolytic uremic syndrome and thrombotic thrombocytopenic purpura: a systematic review of randomized controlled trials. *Am J Kidney Dis.* 2009 Feb;53(2):259-72. DOI: 10.1053/j.ajkd.2008.07.038
30. Johansen BK, Wasteson Y, Granum PE, Brynstad S. Mosaic structure of Shiga-toxin-2-encoding phages isolated from *Escherichia coli* O157:H7 indicates frequent gene exchange between lambdoid phage genomes. *Microbiology (Reading).* 2001 Jul;147(Pt 7):1929-1936. DOI: 10.1099/00221287-147-7-1929
31. Neely MN, Friedman DI. Functional and genetic analysis of regulatory regions of coliphage H-19B: location of shiga-like toxin and lysis genes suggest a role for phage functions in toxin release. *Mol Microbiol.* 1998 Jun;28(6):1255-67. DOI: 10.1046/j.1365-2958.1998.00890.x
32. Wong CS, Mooney JC, Brandt JR, Staples AO, Jelacic S, Boster DR, Watkins SL, Tarr PI. Risk factors for the hemolytic uremic syndrome in children infected with *Escherichia coli* O157:H7: a multivariable analysis. *Clin Infect Dis.* 2012 Jul;55(1):33-41. DOI: 10.1093/cid/cis299
33. Sandvig K, van Deurs B. Delivery into cells: lessons learned from plant and bacterial toxins. *Gene Ther.* 2005 Jun;12(11):865-72. DOI: 10.1038/sj.gt.3302525
34. Kunsmann L, Rüter C, Bauwens A, Greune L, Glüder M, Kemper B, et al. Virulence from vesicles: Novel mechanisms of host cell injury by *Escherichia coli* O104:H4 outbreak strain. *Sci Rep.* 2015 Aug 18;5:13252. DOI: 10.1038/srep13252
35. Bielaszewska M, Rüter C, Bauwens A, Greune L, Jarosch KA, Steil D, et al. Host cell interactions of outer membrane vesicle-associated virulence factors of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157: Intracellular delivery, trafficking and mechanisms of cell injury. *PLoS Pathog.* 2017 Feb 3;13(2):e1006159. DOI: 10.1371/journal.ppat.1006159
36. Bauwens A, Kunsmann L, Karch H, Mellmann A, Bielaszewska M. Antibiotic-Mediated Modulations of Outer Membrane Vesicles in Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O104:H4 and O157:H7. *Antimicrob Agents Chemother.* 2017 Aug 24;61(9):e00937-17. DOI: 10.1128/AAC.00937-17
37. Secher T, Shima A, Hinsinger K, Cintrat JC, Johannes L, Barbier J, Gillet D, Oswald E. Retrograde Trafficking Inhibitor of Shiga Toxins Reduces Morbidity and Mortality of Mice Infected with Enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015 Aug;59(8):5010-3. DOI: 10.1128/AAC.00455-15
38. Schneider G, Szentes N, Horváth M, Dorn Á, Cox A, Nagy G, et al. Kinetics of Targeted Phage Rescue in a Mouse Model of Systemic *Escherichia coli* K1. *Biomed Res Int.* 2018 Jul 11;2018:7569645. DOI: 10.1155/2018/7569645
39. Capparelli R, Ventimiglia I, Roperto S, Fenizia D, Iannelli D. Selection of an *Escherichia coli* O157:H7 bacteriophage for persistence in the circulatory system of mice infected experimentally. *Clin Microbiol Infect.* 2006 Mar;12(3):248-53. DOI: 10.1111/j.1469-0691.2005.01340.x
40. Dissanayake U, Ukhanova M, Moye ZD, Sulakvelidze A, Mai V. Bacteriophages Reduce Pathogenic *Escherichia coli* Counts in Mice Without Distorting Gut Microbiota. *Front Microbiol.* 2019 Sep 10;10:1984. DOI: 10.3389/fmicb.2019.01984
41. Cai K, Gao X, Li T. Intragastric immunization of mice with enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 bacterial ghosts reduces mortality and shedding and induces a Th2-type dominated mixed immune response. *Can J Microbiol.* 2010;56(5):389-98. DOI: 10.1139/w10-025
42. Gohar A, Abdeltawab NF, Fahmy A, Amin MA. Development of safe, effective and immunogenic vaccine candidate for diarrheagenic *Escherichia coli* main pathotypes in a mouse model. *BMC Research Notes.* 2016;9:Article 80. DOI: 10.1186/s13104-016-1891-z
43. Wadolkovsky EA, Barris JA, O'Brien AD. Model of mice for colonization and diseases caused by enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H. *Infection and Immunity.* 1990;58(8):2438-2445.
44. Myhal ML, Laux DC, Cohen PS. Relative Colonizing Abilities of Human Feces and K12 *Escherichia coli* Strains in the Colon of Streptomycin Mice. *European Journal of Clinical Microbiology.* 1982;1(3):186-192.
45. Roxas JL, Koutsouris A, Bellmeyer A, Tesfay S, Royan S, Falzari K, et al. Enterohemorrhagic *E. coli* alters murine intestinal epithelial tight junction protein expression and barrier function in a Shiga toxin independent manner. *Lab Invest.* 2010 Aug;90(8):1152-68. DOI: 10.1038/labinvest.2010.91
46. Mohawk KL, Melton-Celsa AR, Zangari T, Carroll EE, O'Brien AD. Pathogenesis of *Escherichia coli* O157:H7 strain 86-24 following oral infection of BALB/c mice with an intact commensal flora. *Microb Pathog.* 2010 Mar-Apr;48(3-4):131-42. DOI: 10.1016/j.micpath.2010.01.003
47. Chong Y, Fitzhenry R, Heuschkel R, Torrente F, Frankel G, Phillips AD. Human intestinal tissue tropism in *Escherichia coli* O157:H7--initial colonization of terminal ileum and Peyer's patches and minimal colonic adhesion *ex vivo*. *Microbiology (Reading).* 2007 Mar;153(Pt 3):794-802. DOI: 10.1099/mic.0.2006/003178-0
48. Schreiber HL 4<sup>th</sup>, Conover MS, Chou WC, Hibbing ME, Manson AL, Dodson KW, et al. Bacterial virulence phenotypes of *Escherichia coli* and host susceptibility determine risk for urinary tract infections. *Sci Transl Med.* 2017 Mar 22;9(382):eaaf1283. DOI: 10.1126/scitranslmed.aaf1283
49. Thai KH, Thathireddy A, Hsieh MH. Transurethral induction of mouse urinary tract infection. *J Vis Exp.* 2010;5(42):2070. DOI: 10.3791/2070
50. Stromberg ZR, Johnson JR, Fairbrother JM, Kilbourne J, Van Goor A, Curtiss RRd, Mellata M. Evaluation of *Escherichia coli* isolates from healthy chickens to determine their potential risk to poultry and human health. *PLoS One.* 2017 Jul 3;12(7):e0180599. DOI: 10.1371/journal.pone.0180599
51. Thewaini QNO, Jabuk SIA, Ishwalyia DMM. Experimental mammalian *Escherichia coli* K1 meningitis. *Pharmacy and Biological Sciences (IOSR-JPBS).* 2014;9(4):21-25.
52. Ribes S, Meister T, Ott M, Redlich S, Janova H, Hanisch UK, Nessler S, Nau R. Intraperitoneal prophylaxis with CpG oligodeoxynucleotides protects neutropenic mice against intracerebral *Escherichia coli* K1 infection. *J Neuroinflammation.* 2014 Jan 23;11:14. DOI: 10.1186/1742-2094-11-14
53. Freeman J, Baines SD, Jabes D, Wilcox MH. Comparison of the efficacy of ramoplanin and vancomycin in both *in vitro* and *in vivo* models of clindamycin-induced *Clostridium difficile* infection. *J Antimicrob Chemother.* 2005 Oct;56(4):717-25. DOI: 10.1093/jac/dki321
54. Bartlett JG. Antimicrobial agents implicated in *Clostridium difficile* toxin-associated diarrhea and colitis. *Johns Hopkins Med J.* 1981;149(1):6-9.
55. Sein J, Cachicas V, Becker MI, de Ioannes AE. Mucin allows survival of *Salmonella typhi* within mouse peritoneal macrophages. *Biol Res.* 1993;26:371-380.
56. Борзилов АИ, Коробова ОВ, Комбарова ТИ, Мякинина ВП, Красильникова ВМ, Верёвкин ВВ, и др. Эффективность бактериофага Рm3 и ципрофлоксацина при лечении экспериментальной протейной инфекции у мышей. *Бактериология.* 2020;5(1):14-24. DOI: 10.20953/2500-1027-2020-1-14-24
57. Nilsson OR, Kari L, Steele-Mortimer O. Foodborne infection of mice with *Salmonella Typhimurium*. *PLoS One.* 2019 Aug 8;14(8):e0215190. DOI: 10.1371/journal.pone.0215190
58. Savkovic SD, Villanueva J, Turner JR, Matkowskyj KA, and Hecht G. Mouse Model of Enteropathogenic *Escherichia coli* Infection. *Infection and Immunity.* 2005; 73(2):1161-117. DOI: 10.1128/IAI.73.2.1161-1170.2005
59. Larson HE, Borriello SP. Quantitative study of antibiotic-induced susceptibility to *Clostridium difficile* enterococitis in hamsters. *Antimicrob Agents Chemother.* 1990;34(7):1348-1353. DOI: 10.1128/aac.34.7.1348
60. Gries DM, Pultz NJ, Donskey CJ. Growth in cecal mucus facilitates colonization of the mouse intestinal tract by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Infect Dis.* 2005;192:1621-1627. DOI: 10.1086/491737
61. Борзилов АИ, Коробова ОВ, Комбарова ТИ, Абаев ИВ. Эффективность бактериофага SA18 при лечении экспериментальной стафилококковой инфекции у мышей линии BALB/c. *Инфекция и иммунитет.* 2017;S:906.
62. Борзилов АИ, Мякинина ВП, Коробова ОВ, Комбарова ТИ, Красильникова ВМ, Верёвкин ВВ, Воложанцев НВ. Оценка лечебно-профилактической эффективности бактериофага *Klebsiella pneumoniae* vB\_Kpnp\_KpV289 на модели

- острого сепсиса у мышей. Бактериология. 2017;2(1):73-77. DOI: 10.20953/2500-1027-2017-1-73-77
63. Борзилов АИ, Коробова ОВ, Комбарова ТИ, Мякина ВП, Красильникова ВМ, Верёвкин ВВ, Воложанцев НВ. Сравнительное изучение антибактериальной активности бактериофага PA5 и полимиксина на модели летальной синегнойной инфекции у мышей. Бактериология. 2019;4(1):34-43. DOI: 10.20953/2500-1027-2019-1-34-43
64. Pouillot F, Chomton M, Blois H, Courroux C, Noelig J, Bidet Ph, Bingen E, Bonacorsia S. Efficacy of Bacteriophage Therapy in Experimental Sepsis and Meningitis Caused by a Clone O25b:H4-ST131 *Escherichia coli* Strain Producing CTX-M-15. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2012;56(7): 3568-3575.
65. Lacqua A, Wanner O, Colangelo T, Martinotti MG, Landini P. Emergence of Biofilm-Forming Subpopulations upon Exposure of *Escherichia coli* to Environmental Bacteriophages. Applied and Environmental Microbiology. 2006;72(1):956-959. DOI: 10.1128/AEM.72.1.956-959.2006
14. Buchholz U, Bernard H, Werber D, Böhmer MM, Remschmidt C, Wilking H, Deleré Y, et al. German outbreak of *Escherichia coli* O104:H4 associated with sprouts. N Engl J Med. 2011 Nov 10;365(19):1763-70. DOI: 10.1056/NEJMoa1106482
15. Rasko DA, Webster DR, Sahl JW, Bashir A, Boisen N, Scheutz F, et al. Origins of the *E. coli* strain causing an outbreak of hemolytic-uremic syndrome in Germany. N Engl J Med. 2011 Aug 25;365(8):709-17. DOI: 10.1056/NEJMoa1106920
16. BGI releases the complete map of the Germany *E. coli* O104 genome and attributed the strain as a category of Shiga toxin-producing enteroaggregative *Escherichia coli* (STpEAEC). URL: <http://www.bgisequence.com/eu/newsandevents/news/bgi-releasesthe-complete-map-of-the-germany-e-coli-o104-genome>
17. Mohammadtaheri Z, Pourpaki M, Mohammadi F, Namdar R, Masjedi MR. Surveillance of antimicrobial susceptibility among bacterial isolates from intensive care unit patients of a tertiary-care university hospital in Iran: 2006–2009. Chemotherapy. 2010;56(6):478-84. DOI: 10.1159/000321032
18. Alves HC, Cruz FPN, de Assis PCP, Pessoa JDC, Trevelin LC. Antibiotic Resistance among *Escherichia coli*: Isolates and Novel Approaches to the Control of *E. coli* Infections. 2017. DOI: 10.5772/67400
19. Pitout JD, Nordmann P, Laupland KB, Poirel L. Emergence of *Enterobacteriaceae* producing extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs) in the community. J Antimicrob Chemother. 2005 Jul;56(1):52-9. DOI: 10.1093/jac/dki166
20. Hopkins KL, Davies RH, Threlfall EJ. Mechanisms of quinolone resistance in *Escherichia coli* and *Salmonella*: recent developments. Int J Antimicrob Agents. 2005 May;25(5):358-73. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2005.02.006
21. Kmet V, Piatnicová E. Antibiotic resistance in commensal intestinal microflora. Folia Microbiol (Praha). 2010 Jul;55(4):332-5. DOI: 10.1007/s12223-010-0052-3
22. Zhanel GG, DeCorby M, Laing N, Weshnoweski B, Vashisht R, Taylor F, et al; Canadian Antimicrobial Resistance Alliance (CARA), Hoban DJ. Antimicrobial-resistant pathogens in intensive care units in Canada: results of the Canadian National Intensive Care Unit (CAN-ICU) study, 2005–2006. Antimicrob Agents Chemother. 2008 Apr;52(4):1430-7. DOI: 10.1128/AAC.01538-07
23. Allen HK, Donato J, Wang HH, Cloud-Hansen KA, Davies J, Handelsman J. Call of the wild: antibiotic resistance genes in natural environments. Nat Rev Microbiol. 2010 Apr;8(4):251-9. DOI: 10.1038/nrmicro2312
24. Livermore DM, Woodford N. The beta-lactamase threat in *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* and *Acinetobacter*. Trends Microbiol. 2006 Sep;14(9):413-20. DOI: 10.1016/j.tim.2006.07.008
25. Aarestrup FM. Veterinary drug usage and antimicrobial resistance in bacteria of animal origin. Basic Clin Pharmacol Toxicol. 2005 Apr;96(4):271-81. DOI: 10.1111/j.1742-7843.2005.pto960401.x
26. Gorelov AV, Bondareva AV. The starting therapy of colibacillosis in children. Treatment and Prevention. 2016;4(20):69-73. (In Russian).
27. Ruzhentsova TA, Ploskireva AA, Gorelov AV. Acute diarrhea of bacterial etiology: differential diagnosis and treatment. Medical Council (Meditsinskiy sovet). 2016;7:78-81. DOI: 10.21518/2079-701X-2016-07-78-81 (In Russian).
28. Gorelov AV, Nikolaeva SV, Usenko DV, Ploskireva AA, Ruzhentsova TA, Mikhaylova EV, et al. The effectiveness of using nifuroxazide in acute intestinal infections of bacterial etiology in children. Infekc. bolezni (Infectious diseases). 2018;16(1):18-26. DOI: 10.20953/1729-9225-2018-2-18-26 (In Russian).
29. Michael M, Elliott EJ, Craig JC, Ridley G, Hodson EM. Interventions for hemolytic uremic syndrome and thrombotic thrombocytopenic purpura: a systematic review of randomized controlled trials. Am J Kidney Dis. 2009 Feb;53(2):259-72. DOI: 10.1053/j.ajkd.2008.07.038
30. Johansen BK, Wasteson Y, Granum PE, Brynstad S. Mosaic structure of Shiga-toxin-2-encoding phages isolated from *Escherichia coli* O157:H7 indicates frequent gene exchange between lambdoid phage genomes. Microbiology (Reading). 2001 Jul;147(Pt 7):1929-1936. DOI: 10.1099/00221287-147-7-1929

## References

1. Litusov NV. *Escherichia*. Yekaterinburg, 2016, 36 p. (In Russian).
2. Kartsev NN, Fursova NK. Epidemiology, properties and laboratory diagnostics of enterotoxigenic *Escherichia coli*. Bacteriology. 2018;3(1):45-49. DOI: 10.20953/2500-1027-2018-1-45-49 (In Russian).
3. Johnson TJ, Nolan LK. Pathogenomics of the virulence plasmids of *Escherichia coli*. Microbiol Mol Biol Rev. 2009 Dec;73(4):750-74. DOI: 10.1128/MMBR.00015-09. Erratum in: Microbiol Mol Biol Rev. 2010 Sep;74(3):477-8
4. Karch H, Tarr PI, Bielaszewska M. Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* in human medicine. Int J Med Microbiol. 2005 Oct;295(6-7):405-18. DOI: 10.1016/j.ijmm.2005.06.009
5. Kartsev NN, Svetoch EA. Epidemiology, properties and laboratory diagnostics of *E.coli*-producing shiga-toxins. Bacteriology. 2018;3(1):7-12. DOI: 10.20953/2500-1027-2018-1-7-12 (In Russian).
6. Tarr PI, Gordon CA, Chandler WL. Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* and haemolytic uraemic syndrome. Lancet. 2005 Mar 19-25;365(9464):1073-86. DOI: 10.1016/S0140-6736(05)71144-2
7. Noris M, Remuzzi G. Atypical hemolytic-uremic syndrome. N Engl J Med. 2009 Oct 22;361(17):1676-87. DOI: 10.1056/NEJMra0902814
8. Caprioli A, Morabito S, Brugère H, Oswald E. Enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: emerging issues on virulence and modes of transmission. Vet Res. 2005 May-Jun;36(3):289-311. DOI: 10.1051/vetres:2005002
9. Palmer LD, Skaara EP. Cuts Both Ways: Proteases Modulate Virulence of Enterohemorrhagic *Escherichia coli*. mBio. 2019;10: e00115-19. DOI: 10.1128/mBio.00115-19
10. Nyholm O, Heinikainen S, Pelkonen S, Hallanvuo S, Haukka K, Siitonen A. Hybrids of Shigatoxigenic and Enterotoxigenic *Escherichia coli* (STEC/ETEC) Among Human and Animal Isolates in Finland. Zoonoses Public Health. 2015 Nov;62(7):518-24. DOI: 10.1111/zph.12177
11. Frank C, Werber D, Cramer JP, Askar M, Faber M, an der Heiden M, et al; HUS Investigation Team. Epidemic profile of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* O104:H4 outbreak in Germany. N Engl J Med. 2011 Nov 10;365(19):1771-80. DOI: 10.1056/NEJMoa1106483
12. Bielaszewska M, Mellmann A, Zhang W, Köck R, Fruth A, Bauwens A, Peters G, Karch H. Characterisation of the *Escherichia coli* strain associated with an outbreak of haemolytic uraemic syndrome in Germany, 2011: a microbiological study. Lancet Infect Dis. 2011 Sep;11(9):671-6. DOI: 10.1016/S1473-3099(11)70165-7
13. Mellmann A, Harmsen D, Cummings CA, Zentz EB, Leopold SR, Rico A, et al. Prospective genomic characterization of the German enterohemorrhagic *Escherichia coli* O104:H4 outbreak by rapid next generation sequencing technology. PLoS One. 2011;6(7):e22751. DOI: 10.1371/journal.pone.0022751

31. Neely MN, Friedman DI. Functional and genetic analysis of regulatory regions of coliphage H-19B: location of shiga-like toxin and lysis genes suggest a role for phage functions in toxin release. *Mol Microbiol*. 1998 Jun;28(6):1255-67. DOI: 10.1046/j.1365-2958.1998.00890.x
32. Wong CS, Mooney JC, Brandt JR, Staples AO, Jelacic S, Boster DR, Watkins SL, Tarr PI. Risk factors for the hemolytic uremic syndrome in children infected with *Escherichia coli* O157:H7: a multivariable analysis. *Clin Infect Dis*. 2012 Jul;55(1):33-41. DOI: 10.1093/cid/cis299
33. Sandvig K, van Deurs B. Delivery into cells: lessons learned from plant and bacterial toxins. *Gene Ther*. 2005 Jun;12(11):865-72. DOI: 10.1038/sj.gt.3302525
34. Kunsmann L, Rüter C, Bauwens A, Greune L, Glüder M, Kemper B, et al. Virulence from vesicles: Novel mechanisms of host cell injury by *Escherichia coli* O104:H4 outbreak strain. *Sci Rep*. 2015 Aug 18;5:13252. DOI: 10.1038/srep13252
35. Bielaszewska M, Rüter C, Bauwens A, Greune L, Jarosch KA, Steil D, et al. Host cell interactions of outer membrane vesicle-associated virulence factors of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157: Intracellular delivery, trafficking and mechanisms of cell injury. *PLoS Pathog*. 2017 Feb 3;13(2):e1006159. DOI: 10.1371/journal.ppat.1006159
36. Bauwens A, Kunsmann L, Karch H, Mellmann A, Bielaszewska M. Antibiotic-Mediated Modulations of Outer Membrane Vesicles in Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O104:H4 and O157:H7. *Antimicrob Agents Chemother*. 2017 Aug 24;61(9):e00937-17. DOI: 10.1128/AAC.00937-17
37. Secher T, Shima A, Hinsinger K, Cintrat JC, Johannes L, Barbier J, Gillet D, Oswald E. Retrograde Trafficking Inhibitor of Shiga Toxins Reduces Morbidity and Mortality of Mice Infected with Enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015 Aug;59(8):5010-3. DOI: 10.1128/AAC.00455-15
38. Schneider G, Szentes N, Horváth M, Dorn Á, Cox A, Nagy G, et al. Kinetics of Targeted Phage Rescue in a Mouse Model of Systemic *Escherichia coli* K1. *Biomed Res Int*. 2018 Jul 11;2018:7569645. DOI: 10.1155/2018/7569645
39. Capparelli R, Ventimiglia I, Roperto S, Fenizia D, Iannelli D. Selection of an *Escherichia coli* O157:H7 bacteriophage for persistence in the circulatory system of mice infected experimentally. *Clin Microbiol Infect*. 2006 Mar;12(3):248-53. DOI: 10.1111/j.1469-0691.2005.01340.x
40. Dissanayake U, Ukhanova M, Moye ZD, Sulakvelidze A, Mai V. Bacteriophages Reduce Pathogenic *Escherichia coli* Counts in Mice Without Distorting Gut Microbiota. *Front Microbiol*. 2019 Sep 10;10:1984. DOI: 10.3389/fmicb.2019.01984
41. Cai K, Gao X, Li T. Intra-gastric immunization of mice with enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 bacterial ghosts reduces mortality and shedding and induces a Th2-type dominated mixed immune response. *Can J Microbiol*. 2010;56(5):389-98. DOI: 10.1139/w10-025
42. Gohar A, Abdeltawab NF, Fahmy A, Amin MA. Development of safe, effective and immunogenic vaccine candidate for diarrheagenic *Escherichia coli* main pathotypes in a mouse model. *BMC Research Notes*. 2016;9:Article 80. DOI: 10.1186/s13104-016-1891-z
43. Wadolkovsky EA, Barris JA, O'Brien AD. Model of mice for colonization and diseases caused by enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H. *Infection and Immunity*. 1990;58(8):2438-2445.
44. Myhal ML, Laux DC, Cohen PS. Relative Colonizing Abilities of Human Feces and K12 *Escherichia coli* Strains in the Colon of Streptomycin Mice. *European Journal of Clinical Microbiology*. 1982;1(3):186-192.
45. Roxas JL, Koutsouris A, Bellmeyer A, Tesfay S, Royan S, Falzari K, et al. Enterohemorrhagic *E. coli* alters murine intestinal epithelial tight junction protein expression and barrier function in a Shiga toxin independent manner. *Lab Invest*. 2010 Aug;90(8):1152-68. DOI: 10.1038/labinvest.2010.91
46. Mohawk KL, Melton-Celsa AR, Zangari T, Carroll EE, O'Brien AD. Pathogenesis of *Escherichia coli* O157:H7 strain 86-24 following oral infection of BALB/c mice with an intact commensal flora. *Microb Pathog*. 2010 Mar-Apr;48(3-4):131-42. DOI: 10.1016/j.micpath.2010.01.003
47. Chong Y, Fitzhenry R, Heuschkel R, Torrente F, Frankel G, Phillips AD. Human intestinal tissue tropism in *Escherichia coli* O157:H7--initial colonization of terminal ileum and Peyer's patches and minimal colonic adhesion *ex vivo*. *Microbiology (Reading)*. 2007 Mar;153(Pt 3):794-802. DOI: 10.1099/mic.0.2006/003178-0
48. Schreiber HL 4<sup>th</sup>, Conover MS, Chou WC, Hibbing ME, Manson AL, Dodson KW, et al. Bacterial virulence phenotypes of *Escherichia coli* and host susceptibility determine risk for urinary tract infections. *Sci Transl Med*. 2017 Mar 22;9(382):eaaf1283. DOI: 10.1126/scitranslmed.aaf1283
49. Thai KH, Thathireddy A, Hsieh MH. Transurethral induction of mouse urinary tract infection. *J Vis Exp*. 2010;5(42):2070. DOI: 10.3791/2070
50. Stromberg ZR, Johnson JR, Fairbrother JM, Kilbourne J, Van Goor A, Curtiss RRd, Mellata M. Evaluation of *Escherichia coli* isolates from healthy chickens to determine their potential risk to poultry and human health. *PLoS One*. 2017 Jul 3;12(7):e0180599. DOI: 10.1371/journal.pone.0180599
51. Thewaini QNO, Jabuk SIA, Ishwalyia DMM. Experimental mammalian *Escherichia coli* K1 meningitis. *Pharmacy and Biological Sciences (IOSR-JPBS)*. 2014;9(4):21-25.
52. Ribes S, Meister T, Ott M, Redlich S, Janova H, Hanisch UK, Nessler S, Nau R. Intraperitoneal prophylaxis with CpG oligodeoxynucleotides protects neutropenic mice against intracerebral *Escherichia coli* K1 infection. *J Neuroinflammation*. 2014 Jan 23;11:14. DOI: 10.1186/1742-2094-11-14
53. Freeman J, Baines SD, Jabes D, Wilcox MH. Comparison of the efficacy of ramoplanin and vancomycin in both *in vitro* and *in vivo* models of clindamycin-induced *Clostridium difficile* infection. *J Antimicrob Chemother*. 2005 Oct;56(4):717-25. DOI: 10.1093/jac/dki321
54. Bartlett JG. Antimicrobial agents implicated in *Clostridium difficile* toxin-associated diarrhea and colitis. *Johns Hopkins Med J*. 1981;149(1):6-9.
55. Sein J, Cachicas V, Becker MI, de Ioannes AE. Mucin allows survival of *Salmonella typhi* within mouse peritoneal macrophages. *Biol Res*. 1993;26:371-380.
56. Borzilov AI, Korobova OV, Kombarova TI, Myakinina VP, Krasilnikova VM, Verevkin VV, et al. Effectiveness of bacteriophage Pm3 and ciprofloxacin in treating experimental proteus infections in mice. *Bacteriology*. 2020;5(1):14-24. (In Russian).
57. Nilsson OR, Kari L, Steele-Mortimer O. Foodborne infection of mice with *Salmonella Typhimurium*. *PLoS One*. 2019 Aug 8;14(8):e0215190. DOI: 10.1371/journal.pone.0215190
58. Savkovic SD, Villanueva J, Turner JR, Matkowskyj KA, and Hecht G. Mouse Model of Enteropathogenic *Escherichia coli* Infection. *Infection and Immunity*. 2005; 73(2):1161-117. DOI: 10.1128/IAI.73.2.1161-1170.2005
59. Larson HE, Borriello SP. Quantitative study of antibiotic-induced susceptibility to *Clostridium difficile* enterocolitis in hamsters. *Antimicrob Agents Chemother*. 1990;34(7):1348-1353. DOI: 10.1128/aac.34.7.1348
60. Gries DM, Pultz NJ, Donskey CJ. Growth in cecal mucus facilitates colonization of the mouse intestinal tract by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Infect Dis*. 2005;192:1621-1627. DOI: 10.1086/491737
61. Borzilov AI, Korobova OV, Kombarova TI, Abaev IV. Effektivnost' bakteriofaga SA18 pri lechenii eksperimental'noi stafilokokkovoi infektsii u myshei linii BALB/s. *Infektsiya i immunitet (Russian Journal of Infection and Immunity)*. 2017;S:906. (In Russian).
62. Borzilov AI, Myakinina VP, Korobova OV, Kombarova TI, Krasilnikova VM, Verevkin VV, Volozhantsev NV. Evaluation of preventive and therapeutic efficacy of *Klebsiella pneumoniae* bacteriophage vB\_Kpnp\_KpV289 on the model of acute sepsis in mice. *Bacteriology*. 2017;2(1):73-77. DOI: 10.20953/2500-1027-2017-1-73-77 (In Russian).
63. Borzilov AI, Korobova OV, Kombarova TI, Myakinina VP, Krasilnikova VM, Verevkin VV, Volozhantsev NV. Comparative study of antibacterial activities of

- bacteriophage PA5 and polymyxin on the model of lethal pseudomonas infection in mice. *Bacteriology*. 2019;4(1):34-43. (In Russian).
64. Pouillot F, Chomton M, Blois H, Courroux C, Noelig J, Bidet Ph, Bingen E, Bonacorsia S. Efficacy of Bacteriophage Therapy in Experimental Sepsis and Meningitis Caused by a Clone O25b:H4-ST131 *Escherichia coli* Strain Producing CTX-M-15. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2012;56(7):3568-3575.
65. Lacqua A, Wanner O, Colangelo T, Martinotti MG, Landini P. Emergence of Biofilm-Forming Subpopulations upon Exposure of *Escherichia coli* to Environmental Bacteriophages. *Applied and Environmental Microbiology*. 2006;72(1):956-959. DOI: 10.1128/AEM.72.1.956-959.2006

#### Информация об авторах:

Коробова Ольга Васильевна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории биологических испытаний ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора  
Адрес: 142279, Московская обл., г.о. Серпухов, р.п. Оболенск, Территория «Квартал А», 24 ФБУН ГНЦ ПМБ  
Телефон: (4967) 36-0147  
E-mail: korobova@obolensk.org

Комбарова Татьяна Ивановна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории биологических испытаний ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора  
Адрес: 142279, Московская обл., г.о. Серпухов, р.п. Оболенск, Территория «Квартал А», 24 ФБУН ГНЦ ПМБ  
Телефон: (4967) 36-0147  
E-mail: kombarova@obolensk.org

Денисенко Егор Алексеевич, научный сотрудник лаборатории молекулярной диагностики и генно-инженерных препаратов ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора  
Адрес: 142279, Московская обл., г.о. Серпухов, р.п. Оболенск, Территория «Квартал А», 24 ФБУН ГНЦ ПМБ  
Телефон: (4967) 36-0147  
E-mail: egord1988@gmail.com

Верёвкин Владимир Васильевич, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории молекулярной диагностики и генно-инженерных препаратов ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора  
Адрес: 142279, Московская обл., г.о. Серпухов, р.п. Оболенск, Территория «Квартал А», 24 ФБУН ГНЦ ПМБ  
Телефон: (4967) 36-0147  
E-mail: verevkin@obolensk.org

Ганина Елена Анатольевна, научный сотрудник лаборатории нанобиотехнологии ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора  
Адрес: 142279, Московская обл., г.о. Серпухов, р.п. Оболенск, Территория «Квартал А», 24 ФБУН ГНЦ ПМБ  
Телефон: (4967) 36-0147  
E-mail: ganin43@yandex.ru

Воложанцев Николай Валентинович, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной диагностики и генно-инженерных препаратов ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора  
Адрес: 142279, Московская обл., г.о. Серпухов, р.п. Оболенск, Территория «Квартал А», 24 ФБУН ГНЦ ПМБ  
Телефон: (4967) 36-0147  
E-mail: nikvol@obolensk.org

#### Information about authors:

Olga V. Korobova, PhD (Biological Sciences), Senior Researcher of Biological Testing Laboratory, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Rosпотребнадзор  
Address: SRCAMB Bld. 24, "Quarter A" Territory, 142279, Obolensk, City District Serpukhov, Moscow Region, Russian Federation  
Phone: (4967) 36-0147  
E-mail: korobova@obolensk.org

Tatyana I. Kombarova, PhD (Biological Sciences), Senior Researcher of Biological testing laboratory, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Rosпотребнадзор  
Address: SRCAMB Bld. 24, "Quarter A" Territory, 142279, Obolensk, City District Serpukhov, Moscow Region, Russian Federation  
Phone: (4967) 36-0147  
E-mail: kombarova@obolensk.org

Egor A. Denisenko, Researcher of Laboratory of Molecular Diagnostics and Genetically Engineered Drugs, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Rosпотребнадзор  
Address: SRCAMB Bld. 24, "Quarter A" Territory, 142279, Obolensk, City District Serpukhov, Moscow Region, Russian Federation  
Phone: (4967) 36-0147  
E-mail: egord1988@gmail.com

Vladimir V. Verevkin, PhD (Biological Sciences), Senior Researcher of Laboratory of Molecular Diagnostics and Genetically Engineered Drugs, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Rosпотребнадзор  
Address: SRCAMB Bld. 24, "Quarter A" Territory, 142279, Obolensk, City District Serpukhov, Moscow Region, Russian Federation  
Phone: (4967) 36-0147  
E-mail: verevkin@obolensk.org

Elena A. Ganina, Researcher of Laboratory of Nanobiotechnology, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Rosпотребнадзор  
Address: SRCAMB Bld. 24, "Quarter A" Territory, 142279, Obolensk, City District Serpukhov, Moscow Region, Russian Federation  
Phone: (4967) 36-0147  
E-mail: ganin43@yandex.ru

Nikolay V. Volozhantsev, PhD (Biological Sciences), Leading Researcher of Laboratory of Molecular Diagnostics and Genetically Engineered Drugs, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Rosпотребнадзор  
Address: SRCAMB Bld. 24, "Quarter A" Territory, 142279, Obolensk, City District Serpukhov, Moscow Region, Russian Federation  
Phone: (4967) 36-0147  
E-mail: nikvol@obolensk.org

## НОВЫЕ КНИГИ

Автору удалось найти беспрецедентно большое количество данных по сибирской язве в Российской империи. Выяснилось, что имперская ветеринарная и медицинская информация (изумительного качества!) практически не использовалась для научных целей в СССР. Появились принципиально новые возможности строго научной реконструкции сибиреязвенного процесса за период 1860–1914 гг. Обрывочный, хотя и вполне большой массив новых данных найден по более раннему и позднему периодам (до конца 1920-х годов). Рассмотрен ряд вопросов теоретического и методологического характера по обработке палеоинфекционных данных и их введению в научный оборот. Дается детальное описание феномена неиспользования знания по сибирской язве, накопленного в Российской империи. Работа выполнена в духе инфекционной экологии. Новый, волнующий научный подход.

Д. НИКОЛАЕНКО

## СИБИРСКАЯ ЯЗВА В РОССИЙСКОЙ ИМПЕРИИ ПЕРВАЯ КНИГА

Электронная версия книги доступна по адресу: [https://www.researchgate.net/publication/350525201\\_Anthrax\\_in-Russian-Empire\\_First\\_book\\_2nd\\_edition\\_Environmental\\_Epidemiology\\_2021\\_15\\_2-3\\_4\\_-411](https://www.researchgate.net/publication/350525201_Anthrax_in-Russian-Empire_First_book_2nd_edition_Environmental_Epidemiology_2021_15_2-3_4_-411)