

## Генетический потенциал токсигенных *Escherichia coli*, выделенных от телят и поросят

А. С. Тищенко<sup>✉</sup>, А. Г. Кошчаев<sup>1</sup>, А. В. Милованов<sup>1</sup>, А. В. Елисютикова<sup>1</sup>, В. И. Терехов<sup>2</sup>, Т. В. Малышева<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Кубанский государственный аграрный университет имени И. Т. Трубилина, г. Краснодар, Россия

<sup>2</sup> Пашковский сельскохозяйственный колледж, Краснодар, Россия

<sup>3</sup> Кубанский государственный медицинский университет Министерства здравоохранения Российской Федерации, Краснодар, Россия

✉ E-mail: [tishhenko.a@edu.kubsau.ru](mailto:tishhenko.a@edu.kubsau.ru)

**Аннотация.** Исследование направлено на генетическую характеристику диареогенных *Escherichia coli*, выделенных от крупного рогатого скота и свиней. **Цель** – изучение генетического потенциала, ответственного за выработку экзотоксинов у патогенных кишечных палочек, – возбудителей эшерихиоза у телят и поросят. **Научная новизна** работы заключается в расшифровке геномов диареогенных *E. coli* с наличием нуклеотидных последовательностей нескольких экзотоксинов, включая термолабильный, термостабильный и шигаподобный, а также колицинов, гемолизина и цикломодулина, имеющих патогенетическое значение в развитии эшерихиозной инфекции у телят и поросят. Работа выполнялась с использованием микробиологических и молекулярно-генетических методов исследований и масс спектрометрического анализа. В результате генетическому скринингу с помощью полимеразной цепной реакции в агарозном геле было подвергнуто 135 изолятов кишечной палочки. Установлено, что 68 (50,36 %) эшерихий обладали маркерами токсигенности, при этом ген термолабильного экзотоксина регистрировали чаще других (48,5 %), и большинство было зафиксировано у *E. coli*, выделяемых от поросят (29,4 %). У 19 (27,9 %) изолятов установили наличие генов, кодирующих выработку нескольких экзотоксинов. По результатам полимеразной цепной реакции 4 изолята кишечной палочки с разным набором нуклеотидных последовательностей, отвечающих за продукцию двух и более экзотоксинов одновременно, были подвергнуты полногеномному секвенированию. Проведены сборка и аннотация геномов эшерихий и их депонирование базу данных NCBI Prokaryotic Genome Annotation Pipeline под общим номером BioProject PRJNA887444. Необходимы дальнейшие исследования генов кишечных палочек и их роль в патогенном потенциале возбудителей эшерихиоза для последующих разработок эффективных средств профилактики и контроля инфекции.

**Ключевые слова:** *Escherichia coli*, генетическое разнообразие, полногеномное секвенирование, экзотоксины, патогенность, токсигенность, телята, поросята

**Для цитирования:** Тищенко А. С., Кошчаев А. Г., Милованов А. В., Елисютикова А. В., Терехов В. И., Малышева Т. В. Генетический потенциал токсигенных *Escherichia coli*, выделенных от телят и поросят // Аграрный вестник Урала. 2024. Т. 24, № 08. С. 1071–1081. <https://doi.org/10.32417/1997-4868-2024-24-08-1071-1081>.

**Дата поступления статьи:** 06.02.2024, **дата рецензирования:** 13.06.2024, **дата принятия:** 21.06.2024.

## The genetic potential of toxigenic *Escherichia coli* isolated from calves and piglets

A. S. Tishchenko<sup>1</sup>✉, A. G. Koshchayev<sup>1</sup>, A. V. Milovanov<sup>1</sup>, A. V. Elisyutikova<sup>1</sup>, V. I. Terekhov<sup>2</sup>, T. V. Malysheva<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Kuban State Agrarian University named after I. T. Trubilin, Krasnodar, Russia

<sup>2</sup> Pashkovsky Agricultural College, Krasnodar, Russia

<sup>3</sup> Kuban State Medical University of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Krasnodar, Russia

✉ E-mail: tishhenko.a@edu.kubsau.ru

**Abstract.** The study aims to genetically characterize diarrhoeagenic *Escherichia coli* isolated from cattle and pigs. The main **purpose** is genetic potential responsible for the production of exotoxins in pathogenic *E. coli*, the causative agents of escherichiosis in calves and piglets. The **scientific novelty** of the work consists in deciphering the genomes of diarrhoeagenic *E. coli* with the presence of nucleotide sequences of several exotoxins, including thermolabile, thermostable and shigap-like, as well as colicins, hemolysins and cyclomodulins, which have pathogenic significance in the development of escherichia infection in calves and piglets. The study was carried out using microbiological and molecular genetic **methods** of research and mass spectrometric analysis. As a **result**, 135 *E. coli* isolates were subjected to genetic screening by polymerase chain reaction in agarose gel. It was found that 68 (50.36 %) escherichia had toxigenicity markers, while the thermolabile exotoxin gene was recorded more often than others (48.5 %), and the majority was recorded in *E. coli* isolated from piglets (29.4 %). In 19 (27.9 %) isolates, the presence of genes encoding the production of several exotoxins was established. According to the results of the polymerase-chain reaction, 4 *E. coli* isolates with a different set of nucleotide sequences responsible for the production of two or more exotoxins at the same time were subjected to genome-wide sequencing. The *Escherichia* genomes were assembled and annotated and deposited in the NCBI Prokaryotic Genome Annotation Pipeline database under the general number BioProject PRJNA887444. Further studies of *E. coli* genes and their role in the pathogenic potential of escherichiosis pathogens are needed for the subsequent development of effective means of preventing and controlling infection.

**Keywords:** *Escherichia coli*, genetic diversity, whole-genome sequencing, exotoxins, pathogenicity, toxigenicity, calves, piglets

**For citation:** Tishchenko A. S., Koshchayev A. G., Milovanov A. V., Elisyutikova A.V., Terekhov V. I., Malysheva T. V. The genetic potential of toxigenic *Escherichia coli* isolated from calves and piglets. *Agrarian Bulletin of the Urals*. 2024; 24 (08): 1071–1081. <https://doi.org/10.32417/1997-4868-2024-24-08-1071-1081>. (In Russ.)

**Date of paper submission:** 06.02.2024, **date of review:** 13.06.2024, **date of acceptance:** 21.06.2024.

### Постановка проблемы (Introduction)

Кишечная палочка (*Escherichia coli*) – это бактерия, которая является постоянным обитателем желудочно-кишечного тракта людей и многих животных. Хотя большинство штаммов *E. coli* безвредны, существуют некоторые патогенные штаммы, которые могут вызывать у людей болезни пищеварительной системы, инфекции мочевыводящих путей и даже опасные для жизни состояния, такие как гемолитико-уремический синдром [1].

Одним из наиболее известных патогенных штаммов кишечных палочек является *E. coli* O157:H7. Этот штамм ответствен за многие вспышки болезней пищевого происхождения и известен тем, что вырабатывает шигаподобный токсин, который может вызвать серьезное повреждение сли-

зистой оболочки кишечника и привести к почечной недостаточности [2; 3].

Патогенная кишечная палочка может представлять серьезную проблему для здоровья телят и поросят, поскольку эти животные особенно восприимчивы к инфекциям, вызываемым определенными штаммами кишечной палочки [4; 5].

Существует несколько ключевых моментов о важности патогенной кишечной палочки для этих молодых животных. У телят и поросят может развиться диарея в результате заражения определенными штаммами патогенной кишечной палочки, что способно вызвать значительное обезвоживание и привести к снижению темпов роста. Патогенная кишечная палочка является частой причиной неонатальной диареи у телят и поросят. Это может произойти вскоре после рождения и способно при-

вести к летальному исходу при несвоевременном лечении. Патогенные инфекции *E. coli* способны оказать значительное экономическое воздействие на животноводческую отрасль, поскольку больным животным может потребоваться ветеринарная помощь, и в результате инфекции могут снизиться темпы роста или даже погибнуть. Некоторые штаммы патогенной кишечной палочки, которые заражают телят и поросят, также могут передаваться людям, потенциально вызывая заболевания пищевого происхождения [6; 7].

Существует множество патогенных штаммов *E. coli*, включая энтеропатогенную *E. coli* (EPEC), энтеротоксигенную *E. coli* (ETEC), энтероагрегативную *E. coli* (EAEC) и другие. Каждый из этих штаммов обладает собственной уникальной комбинацией факторов вирулентности, и это отражает их генетическое разнообразие [8].

Генетические исследования патогенных штаммов *E. coli* показали, что многие из них приобрели факторы вирулентности посредством горизонтального переноса генов, процесса, посредством которого бактерии могут приобретать новые гены от других бактерий. Это может произойти с помощью таких процессов, как конъюгация, трансформация или трансдукция [9; 10].

Генетическое разнообразие патогенных штаммов *E. coli* весьма значительно. Патогенные штаммы *E. coli* обычно классифицируются на различные категории в зависимости от сочетания факторов вирулентности, которыми они обладают. Факторы вирулентности инфекционного агента – это молекулы или белки, которые позволяют бактериям вызывать заболевание. У *E. coli* некоторые факторы вирулентности патогенных штаммов включают в себя такие распространенные токсины, как адгезины и фимбрии [11; 12].

В связи с этим понимание генетического разнообразия патогенных штаммов *E. coli* важно для разработки эффективных стратегий контроля и профилактики инфекций, вызываемых этими бактериями.

Целью работы явилось изучение генетического разнообразия токсигенных свойств кишечных палочек, выделенных от больных эшерихиозом телят и поросят.

### Методология и методы исследования (Methods)

#### Отбор изолятов кишечной палочки

В работе использовались 135 изолятов кишечной палочки, выделенных от больных эшерихиозом телят и поросят из животноводческих хозяйств Краснодарского края. Четыре изолята *E. coli* (KubGAU B-533, KubGAU B-546, KubGAU B-923, выделенные от поросят, и KubGAU B-933, изолированный от теленка) были подвергнуты полногеномному секвенированию по Сэнгеру.

Родовую идентификацию проводили с использованием бактериологического и серологического ме-

тодов диагностики с использованием коммерческих питательных сред (ГМФ-агар, ГМФ-бульон, бульон Хоттингера, агар Эндо) и коагглютинирующих и адгезивных сывороток производства ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» (г. Оболенск) и ФКП «Армавирская биофабрика» (г. Армавир). Видовую идентификацию патогенных кишечных палочек проводили с использованием метода MALDI-TOF MS на спектрометре VastoSCREEN при помощи прилагающегося программного обеспечения («Литех», РФ).

#### Выделение ДНК бактерий

Для подготовки к выделению ДНК образцы бактерий суспендировали в 0,5 мл ТЕ-буфера и центрифугировали 2 минуты при 14 000 об/мин. Надосадочную жидкость удалили, из осадка выделяли ДНК с помощью DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN, Германия) по протоколу, входящему в набор. Количество выделенной ДНК оценивали с помощью флуориметра Qubit (Thermo Fisher, США).

#### ПЦР-анализ исследуемых образцов

Молекулярно-генетическую характеристику изолятов *E. coli* на определение генов экзотоксинов и патотипов эшерихий с выявлением специфических участков ДНК устанавливали в полимеразно-цепной реакции с использованием тест-систем АмплиСенс® Эшерихиозы-FL диареегенные *E. coli* (Москва).

Также при помощи метода ПЦР исследовали образцы на продуцирование следующих токсинов: термолабильный энтеротоксин, термостабильные токсины (ST-I и ST-II), шига-токсин I и II типов. Проводили анализ с помощью следующих праймеров, синтезированных компанией ЗАО «Евроген» (Москва):

LT\_F (5'-CTGCCATCGATTCCGTATATGAT-3'),  
 LT\_R (5'-CAGAACTATGTTCCGGAATATCGCA-3'),  
 ST-I\_F (5'-TACCTCCCGTCATGTTGTTTTCAC-3'),  
 ST-I\_R (5'-CCTCGACATATAACATGATGCAACTC-3'),  
 ST-II\_F (5'-GTTTCTATTGCTACAATGCGCAATGC-3'),  
 ST-II\_R (5'-AACCTTTTTTACAACCTTCCCTTGGC-3'),  
 Stx1\_F (5'-TCCCCAGTTCAATGTAAGATCAAC-3'),  
 Stx1\_R (5'-TTTCGTACAACACTGGATGATCTCA-3'),  
 Stx2\_F (5'-GAGTGACGACTGATTTGCATTC-3'),  
 Stx2\_R (5'-CCATGACAACGGACAGCAGTT-3').

ПЦР-смесь включала в себя 12,6 мкл воды, 2,5 мкл буфера, 0,5 мкл dNTP (10 mM каждого), 8 мкл праймера (концентрация – 3 mM), 0,4 мкл полимеразы Taq I (ЗАО «Евроген», Россия), 5–20 нг ДНК. Полимеразная цепная реакция проводилась в амплификаторе C1000 Touch 96 (Bio-Rad, США) при следующих параметрах: начальная денатурация – 10 мин. при 95 °C; далее 40 циклов, включающих в себя денатурацию при 95 °C в течение 30 с, отжиг праймеров в течение 30 с при 60 °C и синтез 30 с при 72 °C; после чего проводилась финальная элонгация при 72 °C в течение 5 мин. [13].

Продукты ПЦР разделяли с помощью горизонтального электрофореза в однопроцентном агарозном геле в ТАЕ-буфере при 100 А и 100 В в течение 1 ч. Результат визуализировали с помощью GelDoc Go Gel Imaging System (Bio-Rad, США).

#### Полногеномное секвенирование

Для определения нуклеотидной последовательности геномов исследуемых образцов *E. coli* были подготовлены библиотеки с помощью набора DNA Preparation (M) Tagmentation Kit (Illumina Inc., США). Необходимую концентрацию библиотек подбирали в соответствии с показателями флуориметра Qubit. Полногеномное секвенирование проводили при помощи аппарата MiSeq (Illumina Inc., США). Полученные файлы формата fastq были использованы для сборки геномов *de novo* при помощи алгоритмов SPAdes v.3.15.3 [14] в программе UGENE [15]. Качество сборки геномов было оценено с помощью QUAST v.5.0.2 [16]. Полученные контиги были депонированы в NCBI как архивы прочтений и геномы, после чего их кодирующие последовательности ДНК (CDS) были автоматически аннотированы при помощи NCBI Prokaryotic Genome Annotation Pipeline (PGAP) [17].

Полученные данные оформляли в табличный материал с помощью программ Microsoft Office Word и Excel 2010.

#### Результаты (Results)

Результаты проведенных исследований с использованием ПЦР показали, что из 135 изолятов способностью вырабатывать экзотоксины обладали 68, что составило 50,36 %. У остальных 67 изолятов (49,64 %) маркеров токсигенности выявлено не было.

Как видно из таблицы 1, из 68 эшерихий на долю выделенных от поросят приходилось 40 (58,8 %), а телят – 28 (41,2 %).

Наиболее часто регистрировали *E. coli* с геном LT (48,5 %), из них в 29,4 % случаях выделялись от поросят, 19,1 % – от телят. Кроме того, в 17,6 % исследований зафиксировали наличие гена LT в комбинации с другими генами экзотоксинов.

Наличие генов, отвечающих за продукцию ST-I и ST-II, выявили лишь у 4 изолятов (5,8 %), выделенных от телят и поросят в равной степени. Стоит отметить, что гены ST-II регистрировали еще у 3 изолятов маркерами LT и Stx2.

У 16 изолятов (23,6 %) были выявлены генетические детерминанты только к Stx2, из них 12 (17,7 %) – от поросят, 4 (5,9 %) – от телят. В целом гены шигаподобных экзотоксинов II типа регистрировали у 42,6 % эшерихий и чаще фиксировались у поросят, чем у телят: 16 и 13 изолятов соответственно.

Гены, отвечающие за выработку Stx1, были установлены у 9 изолятов *E. coli*, что составило 13,2 % (1 от поросенка и 8 от телят). Эшерихии, у которых

присутствовал бы только ген шигаподобного экзотоксина I типа, не регистрировали.

У 2 (2,9 %) изолятов, выделенных от поросят, были установлены гены экзотоксинов, отвечающие за продукцию одновременно LT и ST-II. Специфические маркеры, контролирующие выработку сразу LT, Stx1 и 2, выявили у 6 (8,9 %) изолятов (1 от поросенка и 5 от телят). Кроме того, у 4,4 % выделенных эшерихий (у 2 поросят и 1 теленка) было зафиксировано наличие генетических маркеров одновременно к LT, ST-I и Stx2. Один изолят (1,5 %) *E. coli*, выделенный от теленка, обладал генами сразу четырех экзотоксинов: LT, ST-I, ST-II, Stx2.

В результате первичного анализа геномов *E. coli* отобрали 4 кандидатных штамма (KubGAU B-533, KubGAU B-546, KubGAU B-923, KubGAU B-933) – потенциальных стабильных продуцентов экзотоксинов (LT, ST, Stx типов 1, 2), выделенных из химуса кишечника телят и поросят. По итогам проведения ПЦР с имеющимися праймерами и визуализации в агарозном геле получились результаты, регистрирующие наличие маркеров токсигенности у всех четырех образцов *E. coli*, за исключением образца № 1 (KubGAU B-533), на предмет наличия гена, отвечающего за продуцирование термостабильного токсина ST-I. Результаты ПЦР свидетельствуют о том, что все исследуемые штаммы бактерий имеют гены, отвечающие за продуцирование термолабильного токсина, термостабильного токсина ST-II, шига-токсинов 1 и 2. Однако ген, отвечающий за синтез термостабильного токсина ST-I, присутствует у всех образцов, кроме штамма бактерий KubGAU B-533.

#### Сборка и аннотация геномов

В результате секвенирования, сборки и аннотации геномов образцов *E. coli* были получены данные, отраженные в таблице 2. Наибольшее значение прочтений у штамма KubGAU B-546 (811 581), наименьшее – у штамма KubGAU B-923 (192 647). Размер генома у четырех образцов варьирует от 5 109 654 (KubGAU B-546) до 5 276 368 п.н. (KubGAU B-933), что примерно совпадает с ожидаемым размером генома-референса из базы данных NCBI – 5 498 578 п. н. (номер в GenBank – GCA\_000008865.2). Содержание G + C у всех образцов приблизительно одинаковое – варьирует от 50,0 до 50,5 %. Число контигов наибольшее у KubGAU B-923 – 1 113, наименьшее – у KubGAU B-546 (326). Число последовательностей, кодирующих белок (CDSs), примерно в одинаковом диапазоне у всех образцов – от 5 087 (KubGAU B-546) до 5 704 (KubGAU B-533). Число рПНК варьирует от 84 (KubGAU B-533) до 97 (KubGAU B-923). Интересно, что для штамма KubGAU B-546 было выявлено наименьшее количество кодирующих последовательностей и меньший размер генома, в то время как его расчетное покрытие было самым высоким.

Таблица 1

Наличие регистрируемых маркеров токсигенности у патогенных кишечных палочек, выделенных от телят и поросят

Генетический маркер токсигенности	Выделено всего токсигенных эшерихий / %	Из числа изолятов, выделенных от поросят / %	Из числа изолятов, выделенных от телят / %
LT	33 / 48,5	20 / 29,4	13 / 19,1
ST-I, ST-II	4 / 5,8	2 / 2,9	2 / 2,9
Stx2	16 / 23,6	12 / 17,7	4 / 5,9
Stx1, 2	3 / 4,4	–	3 / 4,4
LT, ST-II	2 / 2,9	2 / 2,9	–
LT, Stx1, 2	6 / 8,9	1 / 1,5	5 / 7,4
LT, ST-I, Stx2	3 / 4,4	2 / 2,9	1 / 1,5
LT, ST-I, ST-II, Stx2	1 / 1,5	1 / 1,5	–
Всего	68/100	40/58,8	28/41,2

Table 1

The presence of detectable toxigenic markers in pathogenic *E. coli* isolated from calves and piglets

A genetic marker of toxigenicity	A total of toxigenic <i>E. coli</i> has been isolated / %	From the number of isolates isolated from piglets / %	From the number of isolates isolated from calves / %
LT	33 / 48.5	20 / 29.4	13 / 19.1
ST-I, ST-II	4 / 5.8	2 / 2.9	2 / 2.9
Stx2	16 / 23.6	12 / 17.7	4 / 5.9
Stx1, 2	3 / 4.4	–	3 / 4.4
LT, ST-II	2 / 2.9	2 / 2.9	–
LT, Stx1, 2	6 / 8.9	1 / 1.5	5 / 7.4
LT, ST-I, Stx2	3 / 4.4	2 / 2.9	1 / 1.5
LT, ST-I, ST-II, Stx2	1 / 1.5	1 / 1.5	–
Total	68/100	40/58.8	28/41.2

Таблица 2

Данные, полученные после сборки и аннотации геномов *E. coli*

Характеристика / номер образца	Изоляты кишечной палочки, подвергнувшиеся полногеномному секвенированию			
	KubGAU B-533	KubGAU B-546	KubGAU B-923	KubGAU B-933
Число прочтений	211 196	811 581	192 647	235 624
Размер генома	5 274 955	5 109 654	5 271 013	5 276 368
Содержание G + C (%)	50,5	50,5	50,0	50,0
Контиги N50	15 686	89 082	21 611	29 504
Контиги L50	102	18	77	50
Число контигов	1 006	326	1 113	740
Число последовательностей, кодирующих белок (CDSs)	5 704	5 087	5 696	5 510
Число рРНК	84	90	97	86
Число тРНК	67	71	78	70

Table 2

Data obtained after the assembly and annotation of *E. coli* genomes

Characteristic / sample number	<i>E. coli</i> isolates that have undergone genome-wide sequencing			
	KubGAU B-533	KubGAU B-546	KubGAU B-923	KubGAU B-933
Number of reads	211 196	811 581	192 647	235 624
Genome size	5 274 955	5 109 654	5 271 013	5 276 368
Content of G + C (%)	50,5	50,5	50,0	50,0
Contigs N50	15 686	89 082	21 611	29 504
Contigs L50	102	18	77	50
Number of contigs	1 006	326	1 113	740
CDSs	5 704	5 087	5 696	5 510
rRNAs	84	90	97	86
tRNAs	67	71	78	70

Таблица 3

**Внутривидовое разнообразие генов, кодирующих продукцию различных видов экзотоксинов у патогенных эшерихий**

Биология и биотехнологии

Вид экзотоксина	Название гена	Изоляты кишечной палочки, подвергнувшиеся полногеномному секвенированию			
		KubGAU B-533	KubGAU B-546	KubGAU B-923	KubGAU B-933
Термолабильный токсин, субъединица В	<i>eltB</i>	+	+	–	–
Термолабильный токсин, субъединица А	<i>eltA</i>	+	+	–	–
Термостабильный токсин ST-II	<i>stb</i>	+	+	–	–
Шигаподобный токсин (Stx) Stx2e, субъединица А Stx2e, субъединица В	<i>stx2eA</i>	–	–	+	+
Цикломодулины субъединица, связывающая токсин семейства субтилаз AB5	<i>subAB</i>	–	–	+	+
Порообразующий бактериоцин колицин E1	<i>cea</i>	+	–	–	–
Порообразующий бактериоцин колицин В	<i>cba</i>	–	+	–	–
Белок, вырабатывающий колицин V	<i>cvpA</i>	+	+	+	+
Токсин RTX гемолизин HlyA	<i>hlyA</i>	–	+	+	+
Гемолизин HlyE	<i>hlyE</i>	+	+	+	+

Table 3

**Intraspecific diversity of genes encoding the production of various types of exotoxins in pathogenic *E. coli***

Type of exotoxin	The name of the gene	<i>E. coli</i> isolates that have undergone genome-wide sequencing			
		KubGAU B-533	KubGAU B-546	KubGAU B-923	KubGAU B-933
Heat-labile enterotoxin LT subunit B	<i>eltB</i>	+	+	–	–
Heat-labile enterotoxin LT subunit A	<i>eltA</i>	+	+	–	–
Heat-stable enterotoxin ST-II	<i>stb</i>	+	+	–	–
Shiga toxin (Stx) Stx2e, subunit A Stx2e, subunit B	<i>stx2eA</i>	–	–	+	+
Cyclomodulins A subunit binding a toxin of the subtilase family AB5	<i>subAB</i>	–	–	+	+
Pore-forming bacteriocin colicin E1	<i>cea</i>	+	–	–	–
Pore-forming bacteriocin colicin B	<i>cba</i>	–	+	–	–
Colicin V	<i>cvpA</i>	+	+	+	+
Toxin RTX hemolysin HlyA	<i>hlyA</i>	–	+	+	+
Hemolysin HlyE	<i>hlyE</i>	+	+	+	+

Проекты геномов по результатам секвенирования были депонированы в базу данных NCBI.

Результаты аннотации прокариотических геномов показали наличие в геномах бактерий последовательностей, кодирующих продуцирование следующих токсинов: KubGAU B-923 и KubGAU B-933 – шига-токсин Stx2e видов А и В, KubGAU B-533 и KubGAU B-546 – термолабильный энтеротоксин LT видов А и В, термостабильный энтеротоксин ST-II. Сравнение данных, полученных после аннотации PGAP, с результатами ПЦП-анализа показало, что только 3 из 5 аминокислотных последовательностей и кодирующих ДНК-последовательностей были выявлены. Такие результаты могут являться последствием наличия изменений в геноме, затронувших значимую часть гена, в то время как места присоединения праймеров остались неизменными.

При анализе результатов полногеномного секвенирования изучаемых изолятов *E. coli* было установлено, что наряду с общеизвестными маркерами токсигенности в виде LT, ST и Stx токсинов они обладали генами цикломодулинов (субтилазный токсин) и пороформирующих токсинов: колицинов, α-гемолизина и гемолизина E (таблица 3).

Так, изолят KubGAU B-533, помимо нуклеотидных последовательностей, отвечающих за выработку LT и ST-II, имел гены порообразующего бактериоцина колицина E1, белка, вырабатывающего колицин V и гемолизина E. Изолят KubGAU B-546 обладал схожими генетическими токсигенными свойствами с предыдущим изолятом, за исключением отсутствия гена, кодирующего колицин E1, и наличия токсина RTX α-гемолизина.

В свою очередь, изоляты KubGAU B-923 и KubGAU B-933 были идентичны по генетическому набору экзотоксинов, несмотря на то что были выделены из разных биологических моделей (поросенок и теленок соответственно). Эти штаммы обладали генами, отвечающими за выработку токсина Stx2e, субтилазного токсина AB5, колицина V, токсина RTX  $\alpha$ -гемолизина и гемолизина E.

В результате секвенирования и сборки геномов были получены проекты геномов с размерами 5 274 955 (KubGAU B-533), 5 109 654 (KubGAU B-546), 5 271 013 (KubGAU B-923), 5 276 368 п. н. (KubGAU B-933). Образцы были депонированы в базу данных NCBI под общим номером BioProject PRJNA887444 [18]. Также каждый штамм бактерий был зарегистрирован под индивидуальными номерами: *E. coli* KubGAU B-533 – под номерами: BioSample – SAMN31169425, GenBank – ASM2566039v1, Sequence Read Archive (SRA) – SRS15925162; *E. coli* KubGAU B-546 – под номерами: BioSample – SAMN31181481, GenBank – ASM2581757v1, SRA – SRS15925163; *E. coli* KubGAU B-923: BioSample – SAMN31181488, GenBank – ASM2581758v1, SRA – SRS15925164; *E. coli* KubGAU B-933: BioSample – SAMN31185483, GenBank – ASM2567444v1, SRA – SRS15925165.

#### Обсуждение и выводы (Discussion and Conclusion)

Токсигенные свойства диареогенных кишечных палочек являются одним из важнейших факторов патогенности эшерихий и активно изучаются. Среди экзотоксинов *E. coli* наиболее изученными являются термолабильный и термостабильный токсины, термостабильный токсин I энтероадгезивной кишечной палочки, шигаподобный токсин, цикломодулины (колибактин, цитонекротический фактор, цитолетальный и субтилазный токсины) и пороформирующие токсины (колицины, гемолизин E и  $\alpha$ -гемолизин) [1; 5; 9; 19–24].

Некоторые экзотоксины, помимо токсического воздействия на организм, участвуют в адгезии и инвазии клетки, вызывают воспалительные реакции и апоптоз клеток [5; 8].

Значение LT, ST и Stx экзотоксинов в патогенезе эшерихиоза телят и поросят подтверждается многочисленными исследованиями зарубежных и отечественных авторов. Гены, кодирующие LT (*eltAB*), посредством плазмиды могут передаваться непатогенным *E. coli*, превращая их в патогенные [8]. Рядом исследований было установлено, что, помимо основного своего свойства – нарушения внутриклеточного обмена натрия и хлора, ведущих к развитию водянистой диареи, LT улучшает первоначальную бактериальную адгезию и последующую колонизацию слизистой оболочки кишечника, а также проявляет адьювантную активность в отношении различных бактериальных, вирусных и грибных антигенов [20].

Считается, что ST является одним из главных секреторных экзотоксинов *E. coli*, вызывающих диарею, как у человека, так и у животных [11]. Под действием токсина ST-II наблюдается снижение всасывающей способности слизистой оболочки кишечника по причине гибели поглощающих клеток и уменьшения высоты их ворсинок [4; 10]. Также было установлено, что при одновременном присутствии LT и ST происходит увеличение поступления воды в просвет кишечника сверх уровней, наблюдаемых под воздействием только одного из токсинов.

Семейство шигаподобных токсинов включает два типа белков: Stx1 и Stx2, при этом Stx1 имеет 3 подтипа (a, c, d), а Stx2 – 9 подтипов (a, b, c, d, e, f, g, h, i), определяющиеся нуклеотидными различиями, биологической активностью и серологической неоднородностью [2]. При этом от крупного рогатого скота и свиней чаще всего выделяются штаммы *E. coli*, продуцирующие Stx1c, Stx1d, Stx2d, Stx2e, Stx2f [12].

Помимо диареогенных свойств, LT, ST и Stx влияют на факторы врожденного иммунитета [4; 10]. Выработка цитокинов и хемокинов эукариотическими клетками под действием Stx способствует повреждению тканей толстой кишки, развитию осложнений в виде гемолитико-уремического синдрома, поражению центральной нервной системы, повреждению тканей в различных органах [2].

В наших исследованиях по результатам ПЦР-анализа было выявлено наличие генов, отвечающих за синтез всех четырех групп токсинов у изолятов эшерихий KubGAU B-533, KubGAU B-546, KubGAU B-923, KubGAU B-933 – термолабильного токсина LT, термостабильных токсинов ST-I и ST-II, шига-токсинов Stx1 и Stx2. В случае с образцом бактерий KubGAU B-533 были проявлены ДНК-маркеры только на наличие последовательностей, отвечающих за продуцирование токсинов LT и ST-II, а также шига-токсинов типа Stx1 и Stx2. Исследования, подтверждающие, что от одного животного могут быть выделены изоляты кишечной палочки, обладающие сразу несколькими генами токсинов, отражают в своих работах и другие авторы [1; 9; 10].

В свою очередь, аннотация генома при помощи NCBI PGAP показала наличие последовательностей в последовательностях ДНК, отвечающих за продуцирование токсинов: KubGAU B-923 и KubGAU B-933 – шига-токсин Stx2e видов A и B, KubGAU B-533 и KubGAU B-546 – термолабильный энтеротоксин LT видов A и B, термостабильный энтеротоксин ST-II.

Кроме того, полногеномное секвенирование показало, что выявленные на сегодняшний день диареогенные патотипы *E. coli* не являются статическими, вполне вероятно, они пребывают в стадии динамического и продолжающегося смешивания генов вирулентности, а следовательно, появления новых патогенных вариантов бактерии [1; 5]. Этот

довод согласуется с проведенными нами исследованиями, установившими генетическое разнообразие изучаемых штаммов эшерихий, с наличием в их геноме цикломодулинов и ряда пороформирующих экзотоксинов, играющих важную роль в патогенезе эшерихиоза.

Так, субтилаза АВ, или субтилазный токсин (SubAB), представляет собой токсин типа АВ5, который вырабатывается шигатоксинпродуцирующей *E.coli*. До сих пор неизвестно, действуют ли Stx и SubAB в синергизме или они противостоят друг другу. Эффекты SubAB были изучены на мышах, при этом было установлено, что он вызывает повреждение микрососудов, тромбоз и некроз в мозге и печени. Кроме того, у мышей выявляли микроангиопатическую гемолитическую анемию, тромбоцитопению и нарушение функции почек, характерные для гемолитико-уремического синдрома у людей [2; 9; 12].

Порообразующие токсины (Pore-Forming Toxins; PFT) – это белки-мономеры, представляющие собой растворимые в воде молекулы, которые олигомеризуются на поверхности клетки-хозяина после связывания со специфическим рецептором (сахаром, липидом или белком). У патогенных *E. coli* было выявлено три вида порообразующих токсинов – колицины (E1, B), гемолизин А (HlyA,  $\alpha$ -гемолизин, RTX-токсин) и гемолизин Е [19; 22–24].

Колицины являются типичными  $\alpha$ -PFT и обычно представляют собой крупные белки с высокой молекулярной массой (40–80 кДа) [22]. В настоящее время идентифицировано 25 различных представителей колицина, среди которых только колицины E1, A, B, N, Ia, Ib, K, S, 10 являются порообразующими и используются своими продуцентами для избирательного уничтожения других бактерий в микробном сообществе путем формирования отверстий в их внутренних мембранах. Наиболее изученными пороформирующими колицинами являются колицины E1, A, B, N и Ia. Колицины вырабатываются штаммами *E. coli*, которые содержат одну колициногенную плазмиду pCol. Такие штаммы широко распространены в природе и особенно многочисленны в кишечнике животных [21].

Гемолизин А (HlyA, RTX) принадлежит к классу  $\alpha$ -PFT и входит в семейство RTX-токсинов. Продукт гена *hlyA* представляет собой белок, являющийся предшественником зрелого гемолизина

А. М. Schwidder с соавторами [24] приводят сведения о распространении гена *hlyA* у различных изолятов *E. coli*. Как оказалось, частота регистрации *hlyA*-позитивных *E. coli* среди клинических изолятов, выделенных от человека и продуктивных животных, а также пищевых продуктов колеблется в диапазоне от 12 до 96 %. При введения HlyA в кровяное русло сосудов брыжейки лабораторным животным у них отмечались временное повышение артериального давления, падение кислорода, повышение уровня гемоглобина, а в слизистой оболочке кишечника наблюдались отек и разрушение [19].

Гемолизин Е является представителем семейства цитолизина А класса  $\alpha$ -PFT, вызывает гемолиз эритроцитов и влияет на передачу сигналов  $Ca^{2+}$  у эпителиальных клеток кишечника. Установлено, что полноценным геном гемолизина Е обладают до 80 % *E. coli* и присутствует он только у патогенных штаммов, проявляя цитотоксическую активность, опосредуя апоптоз макрофагов и способствуя бактериальной инвазии [24].

Ряд исследований подтверждает, что эшерихии, которые способны одновременно продуцировать более одного токсина, повышают вирулентность возбудителя и будут влиять на патогенез и клиническое проявление болезни [1; 3; 5; 8; 9].

Таким образом, в ходе анализа генетических профилей изолятов *E. coli*, выделенных от телят и поросят с диареей, было обнаружено, что наиболее распространенные гены вирулентности относятся к термолабильному энтеротоксину (48,5 %) и шигаподобному токсину II типа (23,6 %). Четыре штамма эшерихий демонстрировали высокое генетическое разнообразие, обладая генами термолабильного токсина, термостабильного токсина ST-I, ST-II и шигаподобных токсинов 2. При изучении профилей генов вирулентности этих изолятов с использованием методов полногеномного секвенирования было установлено, что их патогенный потенциал также связан с наличием нуклеотидных детерминант субтилазного токсина АВ5, колицина B, E1, V, токсина RTX  $\alpha$ -гемолизина и гемолизина Е, что демонстрирует их высокое генетическое разнообразие. Полученные результаты позволяют их предлагать в качестве перспективных кандидатных штаммов для производства иммунобиологических препаратов с целью профилактики энтеротоксигенного эшерихиоза у телят и поросят.

#### Библиографический список

1. Fleckenstein J. M., Kuhlmann F. M. Enterotoxigenic Escherichia coli Infections // Current Infectious Disease Reports. 2020. No. 21 (3). Article number 9. DOI: 10.1007/s11908-019-0665-x.
2. Lee M. S, Tesh V. L. Roles of Shiga Toxins in Immunopathology // Toxins. 2019. No. 11 (4). Article number 212. DOI: 10.3390/toxins11040212.
3. Carlini F., Maroccia Z., Fiorentini C., Travaglione S., Fabbri A. Effects of the Escherichia coli Bacterial Toxin Cytotoxic Necrotizing Factor 1 on Different Human and Animal Cells: A Systematic Review // International Journal of Molecular Sciences. 2021. No. 22. Article number 12610. DOI: 10.3390/ijms22212610.



4. Zegeye E. D., Govasli M. L., Sommerfelt H., Puntervoll P. Development of an enterotoxigenic *Escherichia coli* vaccine based on the heat-stable toxin // *Human Vaccines & Immunotherapeutics*. 2019. No. 15 (6). Pp. 1379–1388. DOI: 10.1080/21645515.2018.1496768.
5. Тищенко А. С. Степаненко А. В., Терехов В. И. Экзотоксины патогенных *Escherichia coli* // *Ветеринария Кубани*. 2020. № 5. С. 3–7. DOI: 10.33861/2071-8020-2020-5-3-7.
6. Коццаев А. Г., Черных О. Ю., Тищенко А. С. [и др.] Распространенность острых кишечных инфекций телят и поросят в Краснодарском крае // *Ветеринария, зоотехния и биотехнология*. 2023. № 10. С. 65–75. DOI: 10.36871/vet.zoo.bio.202310008.
7. Medrano-Galarza C., LeBlanc S. J., Jones-Bitton A., et al. Associations between management practices and within-pen prevalence of calf diarrhea and respiratory disease on dairy farms using automated milk feeders // *Journal of Dairy Science*. 2018. No. 101 (3). Pp. 2293–2308. DOI: 10.3168/jds.2017-13733.
8. Dubreuil J. D. EAST1 toxin: An enigmatic molecule associated with sporadic episodes of diarrhea in humans and animals // *Journal of Microbiology*. 2019. No. 57 (7). Pp. 541–549. DOI: 10.1007/s12275-019-8651-4.
9. Pakbin B., Brück W. M., Rossen J. W. A. Virulence Factors of Enteric Pathogenic *Escherichia coli*: A Review // *International Journal of Molecular Sciences*. 2021. No. 22 (18). Article number 9922. DOI: 10.3390/ijms22189922.
10. Wang H., Zhong Z., Luo Yu, Cox E., Devriendt B. Heat-Stable Enterotoxins of Enterotoxigenic *Escherichia coli* and Their Impact on Host Immunity // *Toxins*. 2019. No. 11 (1). Article number 24. DOI: 10.3390/toxins11010024.
11. Govasli M. L., Diaz Y., Zegeye E. D., Darbakk C. et al. Purification and Characterization of Native and Vaccine Candidate Mutant Enterotoxigenic *Escherichia coli* Heat-Stable Toxins // *Toxins*. 2018. No. 10 (7). Article number 274. DOI: 10.3390/toxins10070274.
12. Menge C. Molecular Biology of *Escherichia coli* Shiga Toxins Effects on Mammalian Cells // *Toxins*. 2020. No. 12 (5). Article number 345. DOI: 10.3390/toxins12050345.
13. Feuerstein A., Scuda N., Klose C., Hoffmann A., Melchner A., Boll K., Riehm J. M. Antimicrobial Resistance, Serologic and Molecular Characterization of *E. coli* Isolated from Calves with Severe or Fatal Enteritis in Bavaria, Germany // *Antibiotics*. 2021. Vol. 11. No. 1. Article number 23. DOI: 10.3390/antibiotics11010023.
14. Prjibelski A., Antipov D., Meleshko D., Lapidus A., Korobeynikov A. Using SPAdes de novo assembler // *Current Protocols in Bioinformatics*. 2020. No. 70 (1). Article number 102. DOI: 10.1002/cpbi.102.
15. Rose R., Golosova O., Sukhomlinov D., Tiunov A., Prospero M. Flexible design of multiple metagenomics classification pipelines with UGENE // *Bioinformatics*. 2019. No. 35 (11). Pp. 1963–1965. DOI: 10.1093/bioinformatics/bty901.
16. Mikheenko A., Prjibelski A., Saveliev V., Antipov D., Gurevich A. Versatile genome assembly evaluation with QUAST-LG // *Bioinformatics*. 2018. No. 34 (13). Pp. i142–i150. DOI: 10.1093/bioinformatics/bty266.
17. Li W., O'Neill K. R., Haft D. H., et al. RefSeq: expanding the Prokaryotic Genome Annotation Pipeline reach with protein family model curation // *Nucleic Acids Research*. 2021. No. 49 (1). Pp. 1020–1028. DOI: 10.1093/nar/gkaa1105.
18. *Escherichia coli* strain:533 [Электронный ресурс]. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/PRJNA887444> (дата обращения: 26.01.2024).
19. Frey J. RTX Toxins of Animal Pathogens and Their Role as Antigens in Vaccines and Diagnostics // *Toxins*. 2019. No. 11. Article number 719. DOI: 10.3390/toxins11120719.
20. Duan Q., Xia P., Nandre R., Zhang W., Zhu G. Review of Newly Identified Functions Associated With the Heat-Labile Toxin of Enterotoxigenic *Escherichia coli* // *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2019. No. 9. Article number 292. DOI: 10.3389/fcimb.2019.00292.
21. Li Ya., Li Yu., Mengist H. M., et al. Structural Basis of the Pore-Forming Toxin/Membrane Interaction // *Toxins*. 2021. No. 13. Article number 128. DOI: 10.3390/toxins13020128.
22. Cameron A., Zaheer R., Adator E. H., Barbieri R. Bacteriocin Occurrence and Activity in *Escherichia coli* Isolated from Bovines and Wastewater // *Toxins*. 2019. No. 11. Article number 475. DOI: 10.3390/toxins11080475.
23. Murase K. Cytolysin A (ClyA): A Bacterial Virulence Factor with Potential Applications in Nanopore Technology, Vaccine Development, and Tumor Therapy // *Toxins*. 2022. No. 14 (2). Article number 78. DOI: 10.3390/toxins14020078.
24. Schwidder M., Heinisch L. and Schmidt H. Genetics, Toxicity, and Distribution of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* Hemolysin // *Toxins*. 2019. No. 11. Article number 502. DOI: 10.3390/toxins11090502.

**Об авторах:**

**Александр Сергеевич Тищенко**, кандидат ветеринарных наук, заведующий лабораторией микробиологии центра биотехнологий, доцент кафедры микробиологии, эпизоотологии и вирусологии факультета

ветеринарной медицины, Кубанский государственный аграрный университет имени И. Т. Трубилина, Краснодар, Россия; ORCID 0000-0003-0942-120X, AuthorID 785293. *E-mail: tishhenko.a@edu.kubsau.ru*

**Андрей Георгиевич Коцаев**, доктор биологических наук, профессор, проректор по научной работе, Кубанский государственный аграрный университет имени И. Т. Трубилина, Краснодар, Россия; ORCID 0000-0002-2629-2334, AuthorID 138537. *E-mail: koshhaev.a@kubsau.ru*

**Александр Валериевич Милованов**, кандидат биологических наук, ведущий специалист отдела науки и инноваций, Кубанский государственный аграрный университет имени И. Т. Трубилина, Краснодар, Россия; ORCID 0000-0002-6312-1147, AuthorID 694432. *E-mail: milovanov1991@mail.ru*

**Анастасия Васильевна Елисютикова**, лаборант лаборатории молекулярно-генетических исследований растений и животных, Кубанский государственный аграрный университет имени И. Т. Трубилина, Краснодар, Россия; ORCID 0009-0008-8941-1506, AuthorID 1207475. *E-mail: nas-elisyutikova@yandex.ru*

**Владимир Иванович Терехов**, доктор биологических наук, профессор, Пашковский сельскохозяйственный колледж, Краснодар, Россия; ORCID 0000-0003-0392-9133, AuthorID 192043. *E-mail: vtterekhov@list.ru*

**Татьяна Вячеславовна Мальшева**, кандидат медицинских наук, доцент кафедры микробиологии, Кубанский государственный медицинский университет Министерства здравоохранения Российской Федерации, Краснодар, Россия; ORCID 0000-0003-1354-4317, AuthorID 1012472. *E-mail: mvn-46@mail.ru*

### References

1. Fleckenstein J. M., Kuhlmann F. M. Enterotoxigenic Escherichia coli Infections. *Current Infectious Disease Reports*. 2020; 21 (3): 9. DOI: 10.1007/s11908-019-0665-x.
2. Lee M. S, Tesh V. L. Roles of Shiga Toxins in Immunopathology. *Toxins*. 2019; 11 (4): 212. DOI: 10.3390/toxins11040212.
3. Carlini F., Maroccia Z., Fiorentini C., Travaglione S., Fabbri A. Effects of the Escherichia coli Bacterial Toxin Cytotoxic Necrotizing Factor 1 on Different Human and Animal Cells: A Systematic Review. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021; 22: 12610. DOI: 10.3390/ijms222212610.
4. Zegeye E. D., Govasli M. L., Sommerfelt H., Puntervoll P. Development of an enterotoxigenic Escherichia coli vaccine based on the heat-stable toxin. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*. 2019; 15 (6): 1379–1388. DOI: 10.1080/21645515.2018.1496768.
5. Tishchenko A. S. Stepanenko A. V., Terekhov V. I. Exotoxins of pathogenic Escherichia coli. *Veterinaria Kubani*. 2020; 5: 3–7. DOI: 10.33861/2071-8020-2020-5-3-7. (In Russ.)
6. Koshchaev A. G., Chernykh O. Yu., Tishchenko A. S., et al. Prevalence of acute intestinal infections in calves and pigs in the Krasnodar region. *Veterinary, Zootechnics and Biotechnology*. 2023; 10: 65–75. DOI: 10.36871/vet.zoo.bio.202310008. (In Russ.)
7. Medrano-Galarza C., LeBlanc S. J., Jones-Bitton A. Associations between management practices and within-pen prevalence of calf diarrhea and respiratory disease on dairy farms using automated milk feeders. *Journal of Dairy Science*. 2018; 101 (3): 2293–2308. DOI: 10.3168/jds.2017-13733.
8. Dubreuil J. D. EAST1 toxin: An enigmatic molecule associated with sporadic episodes of diarrhea in humans and animals. *Journal of Microbiology*. 2019; 57 (7): 541–549. DOI: 10.1007/s12275-019-8651-4.
9. Pakbin B., Brück W. M., Rossen J. W. A. Virulence Factors of Enteric Pathogenic Escherichia coli: A Review. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021; 22 (18): 9922. DOI: 10.3390/ijms22189922.
10. Wang H., Zhong Z., Luo Yu, Cox E., Devriendt B. Heat-Stable Enterotoxins of Enterotoxigenic Escherichia coli and Their Impact on Host Immunity. *Toxins*. 2019; 11 (1): 24. DOI: 10.3390/toxins11010024.
11. Govasli M. L., Diaz Y., Zegeye E. D., Darbakk C. et al. Purification and Characterization of Native and Vaccine Candidate Mutant Enterotoxigenic Escherichia coli Heat-Stable Toxins. *Toxins*. 2018; 10 (7): 274. DOI: 10.3390/toxins10070274.
12. Menge C. Molecular Biology of Escherichia coli Shiga Toxins Effects on Mammalian Cells. *Toxins*. 2020; 12 (5): 345. DOI: 10.3390/toxins12050345.
13. Feuerstein A., Scuda N., Klose C., Hoffmann A., Melchner A., Boll K., Riehm J. M. Antimicrobial Resistance, Serologic and Molecular Characterization of E. coli Isolated from Calves with Severe or Fatal Enteritis in Bavaria, Germany. *Antibiotics*. 2021; 11 (1): 23. DOI: 10.3390/antibiotics11010023.
14. Prjibelski A., Antipov D., Meleshko D., Lapidus A., Korobeynikov A. Using SPAdes de novo assembler. *Current Protocols in Bioinformatics*. 2020; 70 (1): 102. DOI: 10.1002/cpbi.102.
15. Rose R., Golosova O., Sukhomlinov D., Tiunov A., Prospero M. Flexible design of multiple metagenomics classification pipelines with UGENE. *Bioinformatics*. 2019; 35 (11): 1963–1965. DOI: 10.1093/bioinformatics/bty901.
16. Mikheenko A., Prjibelski A., Saveliev V., Antipov D., Gurevich A. Versatile genome assembly evaluation with QUAST-LG. *Bioinformatics*. 2018; 34 (13): i142–i150. DOI: 10.1093/bioinformatics/bty266.

17. Li W., O'Neill K. R., Haft D. H., et al. RefSeq: expanding the Prokaryotic Genome Annotation Pipeline reach with protein family model curation. *Nucleic Acids Research*. 2021; 49 (1): 1020–1028. DOI: 10.1093/nar/gkaa1105.
18. Escherichia coli strain:533 [Internet] [cited 2024 Jan 26]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/PRJNA887444>.
19. Frey J. RTX Toxins of Animal Pathogens and Their Role as Antigens in Vaccines and Diagnostics. *Toxins*. 2019; 11: 719. DOI: 10.3390/toxins11120719.
20. Duan Q., Xia P., Nandre R., Zhang W., Zhu G. Review of Newly Identified Functions Associated With the Heat-Labile Toxin of Enterotoxigenic Escherichia coli. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2019; 9: 292. DOI: 10.3389/fcimb.2019.00292.
21. Li Ya., Li Yu., Mengist H. M., et al. Structural Basis of the Pore-Forming Toxin/Membrane Interaction. *Toxins*. 2021; 13: 128. DOI: 10.3390/toxins13020128.
22. Cameron A., Zaheer R., Adator E. H., Barbieri R. Bacteriocin Occurrence and Activity in Escherichia coli Isolated from Bovines and Wastewater. *Toxins*. 2019; 11: 475. DOI: 10.3390/toxins11080475.
23. Murase K. Cytolysin A (ClyA): A Bacterial Virulence Factor with Potential Applications in Nanopore Technology, Vaccine Development, and Tumor Therapy. *Toxins*. 2022; 14 (2): 78. DOI: 10.3390/toxins14020078.
24. Schwidder M., Heinisch L. and Schmidt H. Genetics, Toxicity, and Distribution of Enterohemorrhagic Escherichia coli Hemolysin. *Toxins*. 2019; 11: 502. DOI: 10.3390/toxins11090502.

#### **Authors' information:**

**Aleksandr S. Tishchenko**, candidate of veterinary sciences, head of microbiology laboratory of biotechnology center, associate professor of the department of microbiology, epizootology and virology, faculty of veterinary medicine, Kuban State Agrarian University named after I. T. Trubilin, Krasnodar, Russia;

ORCID 0000-0003-0942-120X, AuthorID 785293. *E-mail: tishhenko.a@edu.kubsau.ru*

**Andrey G. Koshchaev**, doctor of biological sciences, professor, vice-rector for research, Kuban State Agrarian University named after I. T. Trubilin, Krasnodar, Russia; ORCID 0000-0002-2629-2334, AuthorID 138537.

*E-mail: koshhaev.a@kubsau.ru*

**Aleksandr V. Milovanov**, candidate of biological sciences, leading specialist of the department of science and innovation, Kuban State Agrarian University named after I. T. Trubilin, Krasnodar, Russia;

ORCID 0000-0002-6312-1147, AuthorID 694432. *E-mail: milovanov1991@mail.ru*

**Anastasiya V. Elisyutikova**, laboratory assistant of laboratory of molecular genetic research of plants and animals, Kuban State Agrarian University named after I. T. Trubilin, Krasnodar, Russia;

ORCID 0009-0008-8941-1506, AuthorID 1207475. *E-mail: nas-elisyutikova@yandex.ru*

**Vladimir I. Terekhov**, doctor of biological sciences, professor, Pashkovsky Agricultural College, Krasnodar, Russia; ORCID 0000-0003-0392-9133, AuthorID 192043. *E-mail: vterekhov@list.ru*

**Tatyana V. Malysheva**, candidate of medical sciences, associate professor of the department of microbiology, Kuban State Medical University of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Krasnodar, Russia;

ORCID 0000-0003-1354-4317, AuthorID 1012472. *E-mail: mvn-46@mail.ru*