

Т.М.Головинская, О.И.Цыганкова, А.Н.Куличенко

## РАЗРАБОТКА БИОТЕХНОЛОГИИ РЕПРОДУКЦИИ СИБИРЕЯЗВЕННЫХ БАКТЕРИОФАГОВ И СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА СТАБИЛЬНОСТИ ИХ СВОЙСТВ И ДИАГНОСТИЧЕСКОЙ ЦЕННОСТИ

ФКУЗ «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт», Ставрополь, Российская Федерация

Проведена комплексная сравнительная оценка производственных и диагностических свойств сибирезвездных бактериофагов Гамма А-26, Fah-VНИИВВиМ, R/D-Ph-6, ВА-9, К ВИЭВ, Саратов, 186. Показано, что все бактериофаги обладают свойствами, необходимыми для производства их в виде препаратов: эффективно размножаются на жидких культурах авирулентного штамма *Bacillus anthracis* СТИ, в достаточной степени сохраняют специфическую активность при хранении при оптимальных температурах в течение двух лет и при кратковременных отклонениях температур от оптимальных значений. В большей степени выражены различия в диагностических свойствах изученных бактериофагов – специфической активности и специфичности. Выявлены группы бактериофагов, оптимальные для идентификации или для фаготипирования штаммов *B. anthracis*.

*Ключевые слова:* сибирезвездные бактериофаги, условия репродукции, специфическая активность, специфичность, идентификация *B. anthracis*, фазорезистентность.

Т.М.Golovinskaya, O.I.Tsygankova, A.N.Kulichenko

### Development of Biotechnology for Anthrax Bacteriophages Reproduction, and Comparative Analysis of Their Properties Stability and Diagnostic Value

Stavropol Research Anti-Plague Institute, Stavropol, Russian Federation

Carried out has been complex comparative analysis of the production and diagnostic properties of such anthrax bacteriophages as Gamma A-26, Fah-RRIVV&M (Russian Research Institute of Veterinary Virology and Microbiology), R/D-Ph-6, BA-9, K RRIEV (Russian Research Institute of Experimental Veterinary), Saratov, and 186. It is revealed that all of the bacteriophages have the properties necessary for using them for preparation manufacturing purposes: they readily proliferate in liquid cultures of avirulent *Bacillus anthracis* strain – STI, and retain sufficient specific activity if stored at the optimum temperatures or, when exposed to short-term temperature excursions, within a period of two years. Most clearly expressed are the differences in diagnostic properties of the bacteriophages – specific activity and specificity. Put forward are the groups of bacteriophages that are the most relevant for identification or phage-typing of *B. anthracis* strains.

*Key words:* anthrax bacteriophages, reproduction terms and conditions, specific activity, specificity, *B. anthracis* identification, phage-resistance.

Лизабельность сибирезвездными бактериофагами является одним из опорных тестов, позволяющих идентифицировать штаммы *Bacillus anthracis* [2].

Известные сибирезвездные бактериофаги, выпускаемые в Российской Федерации, различаются по широте спектра лизируемых ими штаммов возбудителя сибирской язвы, а также по специфичности их действия [1, 4]. Некоторую противоречивость отдельных авторов по этому вопросу можно объяснить использованием ими различных вариантов бактериофагов, отличающихся концентрацией фаговых частиц, недостаточной представительностью использованных выборок культур *B. anthracis* и близкородственных сапрофитов, а также различиями в оценке результатов теста на фагочувствительность.

Целью исследования было определение оптимальных условий репродукции специфических сибирезвездных бактериофагов Fah-VНИИВВиМ, R/D-Ph-6, Гамма А-26, К ВИЭВ, ВА-9, Саратов и 186; изучение стабильности сохранения специфической активности при длительном хранении в регламентированных температурных условиях и при кратковременном воздействии повышенных температур; сравнение специфической активности и специфичности бактериофагов, оценка их диагностической ценности.

### Материалы и методы

В опытах применялись коммерческие препараты бактериофагов: Fah-VНИИВВиМ ( $1 \cdot 10^8$  бляшкообразующих единиц (БОЕ)/см<sup>3</sup>), R/D-Ph-6 ( $1 \cdot 10^8$  БОЕ/см<sup>3</sup>) в виде фаг-тест набора «Оболонск R1», Гамма А-26 ( $1,1 \cdot 10^9$  БОЕ/см<sup>3</sup>), а также экспериментальные серии бактериофагов 186 ( $2,3 \cdot 10^9$  БОЕ/см<sup>3</sup>), ВА-9 ( $1,6 \cdot 10^9$  БОЕ/см<sup>3</sup>), Саратов ( $8,6 \cdot 10^9$  БОЕ/см<sup>3</sup>), К ВИЭВ ( $1,2 \cdot 10^9$  БОЕ/см<sup>3</sup>), которые были получены авторами в лаборатории сибирской язвы Ставропольского противочумного института. Допустимые значения показателей концентрации фаговых частиц и диагностического рабочего титра (ДРТ): препарат бактериофага должен содержать не менее  $1,0 \cdot 10^7$  БОЕ/см<sup>3</sup>; ДРТ – наибольшее разведение бактериофага, дающее сливной лизис культур, не регламентирован для сибирезвездных бактериофагов, но позволяет объективно оценить специфическую активность конкретной серии препарата.

В работе использовали штаммы, полученные из Коллекции патогенных микроорганизмов Ставропольского НИПЧИ: 114 штаммов *B. anthracis*, имеющие фенотипические и генотипические различия, и 74 штамма сапрофитных представителей рода

*Bacillus* (*B. cereus* – 18, *B. thuringiensis* – 14, *B. subtilis* – 15, *B. megaterium* – 7, *B. mesentericus* – 1, *B. species* (*spp.*) – 19. Контролем служил вакцинный штамм *B. anthracis* СТИ.

Для определения специфической литической активности и специфичности бактериофагов использовали чашечный метод. Результат оценивали визуально по четырехкрестовой системе. Полный лизис культуры на месте нанесения бактериофага оценивали на (++++); наличие единичных колоний культуры на фоне зоны ее лизиса в месте нанесения – (+++), резкое ослабление роста – (++) , наличие единичных негативных колоний бактериофага на фоне сплошного роста культуры – (+), отсутствие лизиса – (–). Положительной считали пробу при оценке не менее чем (+++). Резистентные варианты культур получали, отбирая колонии из зон лизиса различными бактериофагами, отсеивали на агар Хоттингера и при получении хорошего роста ставили пробу на чувствительность ко всем бактериофагам.

Для оценки влияния различных факторов на эффективность репродукции бактериофагов и сохранение их специфической активности определяли ДРТ бактериофагов и концентрацию фаговых частиц методом агаровых слоев по Грациа [5] после воздействия соответствующих факторов или изменения отдельных условий и сравнивали с контрольными показателями.

### Результаты и обсуждение

Одним из требований, предъявляемых к маточным бактериофагам, является эффективность их репродукции для получения препаратов с достаточно высокой концентрацией фаговых частиц. Независимо от регламентированных условий получения коммерческих препаратов была апробирована репродукция всех бактериофагов в одинаковых условиях. В качестве питательной среды использовали бульон Хоттингера (рН 7,4) с добавлением 0,2 % дрожжевого экстракта. В 50 мл питательной среды перед засевом добавляли 0,15 мл 10 % стерильного раствора хлористого кальция. Репродукцию бактериофагов проводили на авирулентном штамме *B. anthracis* СТИ.

Используя отраслевой стандарт мутности ФГУН ГИСК им. Л.А.Тарасевича (ОСО 42-28-59-85П 10 единиц), из 20-часовой вегетативной культуры *B. anthracis* СТИ готовили взвесь, 0,5 мл которой вносили в 50 мл жидкой питательной среды. После инкубирования при температуре 37 °С в течение 3 ч на орбитальном шейкере (150 об./мин) вносили 1 мл препарата бактериофага с концентрацией  $4 \cdot 10^7$  БОЕ/мл<sup>3</sup> и продолжали инкубирование еще в течение 24 ч в тех же условиях. Стерилизацию фаголизата производили фильтрованием через мембранные фильтры «Millipore» с диаметром пор 0,22 мкм.

Этим способом были получены экспериментальные серии фагов: Fah-ВНИИВВиМ ( $3 \cdot 10^{10}$  БОЕ/см<sup>3</sup>), R/D-Ph-6 ( $1,9 \cdot 10^{10}$  БОЕ/см<sup>3</sup>), 186 ( $2,5 \cdot 10^{10}$  БОЕ/см<sup>3</sup>), ВА-9 ( $2,8 \cdot 10^9$  БОЕ/см<sup>3</sup>), Саратов ( $1,5 \cdot 10^{10}$  БОЕ/см<sup>3</sup>), К ВИЭВ ( $1,2 \cdot 10^9$  БОЕ/см<sup>3</sup>), Гамма А-26 ( $1,1 \cdot 10^9$  БОЕ/см<sup>3</sup>), что

свидетельствует о достаточно эффективной репродукции всех испытанных бактериофагов в стандартных условиях размножения на авирулентном штамме.

Важным условием в производстве диагностических бактериофагов является стабильность специфической активности, обеспечиваемая сохранением достаточной концентрации фаговых частиц на протяжении регламентированного срока годности. Хранение бактериофагов К ВИЭВ, ВА-9 в оптимальных условиях ( $4 \pm 2$ ) °С в течение двух лет практически не изменило их концентрации в отличие от фагов 186, Саратов и коммерческих препаратов бактериофагов Fah-ВНИИВВиМ, R/D-Ph-6 и Гамма А-26, у которых концентрация снизилась на порядок, но она все равно была регламентируемой. При этом все бактериофаги сохраняли специфическую литическую активность при применении в виде цельного препарата.

Изучение стабильности показателей специфической активности диагностических сибиреязвенных бактериофагов при кратковременном хранении в условиях температур, превышающих регламентированные ( $4 \pm 2$ ) °С, показало, что хранение бактериофагов Fah-ВНИИВВиМ, R/D-Ph-6, 186, Саратов, К ВИЭВ при температуре ( $25 \pm 1$ ) °С в течение 5 сут не изменило их начальную концентрацию фаговых частиц и ДРТ. Бактериофаги ВА-9 и Гамма А-26 оказались более чувствительными, и через 5 сут их концентрация понизилась до  $1 \cdot 10^8$  БОЕ/мл<sup>3</sup>, при неизменном ДРТ ( $10^{-5}$ ). Через 30 сут при указанном температурном режиме хранения у фагов Fah-ВНИИВВиМ, R/D-Ph-6 и 186 концентрация осталась прежней. Фаги Саратов, К ВИЭВ и ВА-9, Гамма А-26 снизили концентрацию до  $1 \cdot 10^8$  БОЕ/мл<sup>3</sup> и  $1 \cdot 10^7$  БОЕ/мл<sup>3</sup> соответственно. ДРТ снизился у всех бактериофагов на порядок, что не влияло на эффективность применения указанных препаратов в качественном тесте с использованием цельного препарата.

Изучение устойчивости сибиреязвенных бактериофагов 186 и R/D-Ph-6 к действию температур в диапазоне 30–100 °С, с интервалами 10 °С показало, что прогревание препаратов бактериофагов 186 и R/D-Ph-6 при температуре 30–50 °С в течение 15 мин не уменьшало концентрацию фаговых частиц в них. Оба бактериофага после воздействия температуры 60 °С снижали концентрацию на два порядка; при повышении температуры до 70 °С концентрация бактериофага 186 оставалась на том же уровне, а концентрация бактериофага R/D-Ph-6 уменьшалась еще на порядок. Оба бактериофага полностью инактивировались после нагревания до 90 °С.

При прогревании препарата бактериофага Гамма А-26 при температурах 30–50 °С концентрация фаговых частиц снижалась на порядок, а после воздействия температуры 60 °С резко падала еще на 5 порядков. В препарате, прогретом до 70 °С, определялись единичные негативные колонии фага. Таким образом, установлено, что бактериофаги 186 и R/D-Ph-6 обладают более выраженной устойчивостью к воздействию высоких температур по сравнению с

бактериофагом Гамма А-26.

Наиболее важными свойствами бактериофагов являются их специфическая активность и специфичность. Результаты исследования показали, что из 114 штаммов сибиреязвенного микроба чувствительными к литическому действию фагов Гамма А-26, ВА-9 и R/D-Ph-6 оказалось 99,1 %. Нечувствительным к бактериофагам Гамма А-26 и ВА-9 был штамм *B. anthracis* 71/12, а бактериофаг R/D-Ph-6 не лизировал бескапсульный штамм *B. anthracis* 140 П сар<sup>-</sup>.

Более узким спектром литического действия обладали фаги К ВИЭВ, Fah-ВНИИВВиМ, Саратов и 186 (рис. 1). Нечувствительными к фагу Fah-ВНИИВВиМ оказались 26 вирулентных штаммов, что составило 32,5 %, 25 штаммов – к фагу К ВИЭВ (31,3 %), 20 – к фагу Саратов (25 %) и 19 – к фагу 186 (23,7 %). Из группы атипичных по капсулообразованию штаммов отрицательный тест был у 16 штаммов (61,5 %) со всеми бактериофагами этой группы. Все 4 культуры с OSS-типом колоний [3] оказались нечувствительными к этим четырем бактериофагам.

Все исследуемые бактериофаги лизировали один атоксигенный штамм *B. anthracis* Δ Ames (pXO1<sup>-</sup> pXO2<sup>+</sup>) и три бесплазмидных штамма: *B. anthracis* Δ СТИ, *B. anthracis* Sterne tox<sup>-</sup>, *B. anthracis* 228/4. Сибиреязвенные бактериофаги 186, К ВИЭВ и Саратов из экспериментальных серий, а также коммерческие препараты бактериофагов Fah-ВНИИВВиМ, R/D-Ph-6 не вызывали лизиса штаммов спорообразующих сапрофитов рода *Bacillus* и обладали 100 % специфичностью.

Проявления неспецифического лизиса наблюдались при действии как коммерческого бактериофага Гамма А-26, так и экспериментальной серии бактериофага ВА-9, которые лизировали одни и те же штаммы близкородственных сапрофитов (*B. subtilis* 35, 37, 336; *B. megaterium* 1, 2, 3). С целью сопоставления чувствительности указанных культур и *B. anthracis* к литическому действию бактериофагов Гамма А-26 и ВА-9 были определены значения ДРТ к шести штаммам сапрофитов и в качестве контроля к *B. anthracis* СТИ. Из шести штаммов сапрофитов наибольшей чувствительностью обладали культуры *B. subtilis* 336 и *B. megaterium* 3, которые лизировались обоими бактериофагами в разведениях  $1 \cdot 10^{-3}$ , остальные четыре культуры лизировались в разв-

дениях  $1 \cdot 10^{-1} - 1 \cdot 10^{-2}$ . ДРТ обоих бактериофагов для штамма *B. anthracis* СТИ составил  $1 \cdot 10^{-5}$ , что было на два порядка выше, по сравнению со значениями этого показателя по отношению к наиболее чувствительным сапрофитам рода *Bacillus*.

Оценку результатов теста на лизабельность специфическими бактериофагами проводили визуально по характеру изменений газонного роста тестируемой культуры в месте нанесения бактериофага: от полного лизиса культуры (++++) – положительный результат) до абсолютного отсутствия следов нанесения бактериофага (-) – отрицательный результат). Однако встречаются промежуточные варианты: наличие единичных или множественных изолированных колоний в зоне лизиса, заметно очерченная зона лизиса с покрывающей ее пленкой культуры (рис. 2)

Такие варианты зоны лизиса затрудняют четкую объективную оценку результатов теста. Их причиной является наличие в популяции исследуемых штаммов в различном соотношении чувствительных и резистентных к конкретному бактериофагу бактериальных клеток. Для идентификации культур *B. anthracis* предпочтительно применение наиболее вирулентных бактериофагов, способных эффективно лизировать все культурально-морфологические типы культур *B. anthracis*.

Нами была проведена работа по выделению резистентных культур и определение их чувствительности к различным сибиреязвенным бактериофагам. По специфической литической активности к 102 выделенным фагорезистентным вариантам штаммов *B. anthracis*, отобранных по признаку устойчивости к тому или иному бактериофагу, все бактериофаги можно разделить на 3 группы.

1. Бактериофаги К ВИЭВ, Fah- ВНИИВВиМ, Саратов, 186. По отношению к ним чаще всего выделялись культуры, резистентные к бактериофагам Fah-ВНИИВВиМ (32), К ВИЭВ (23), Саратов (20), 186 (17) – всего 92 культуры. Из них 89 культур (95,7 %) были резистентны к литическому действию всех бактериофагов этой группы, но лизировались бактериофагами Гамма А-26, R/D-Ph-6, ВА-9. Только 4 из отобранных культур отличались от них по спектру фагорезистентности. При этом две культуры из них были дополнительно чувствительны к бактериофагу 186, 1 культура – к бактериофагу Fah-ВНИИВВиМ и

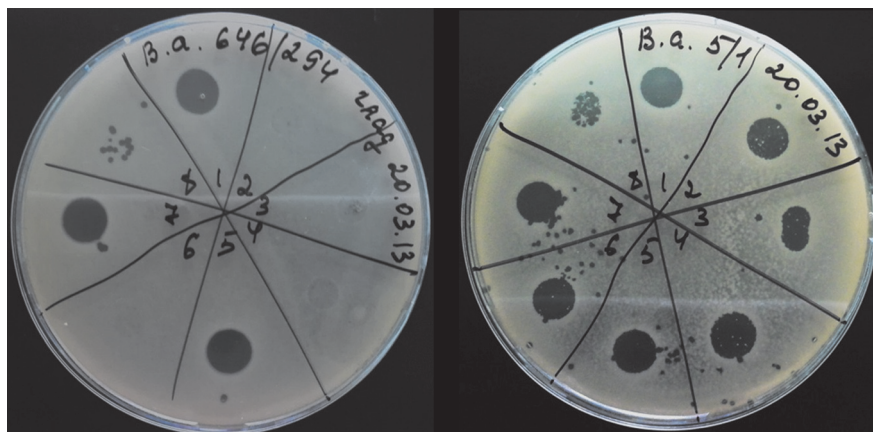


Рис. 1. Различная чувствительность штаммов *B. anthracis* к специфическому действию бактериофагов

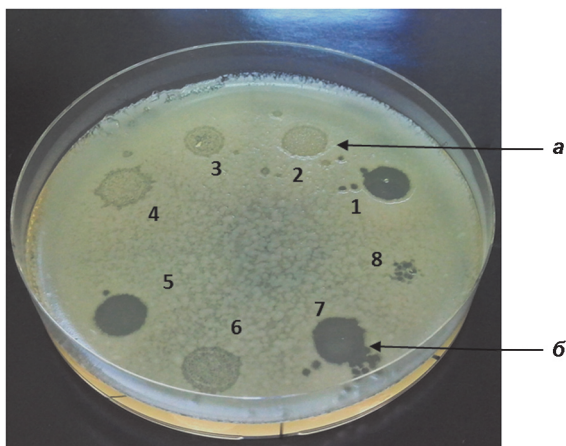


Рис. 2. Характеристика зоны лизиса штамма *B. anthracis* 1194 бактериофагами:

1 – Гамма А-26; 2 – К ВИЭВ; 3 – Fah-ВНИИВВиМ; 4 – Саратов; 5 – R/D-Ph-6; 6 – 186; 7 – ВА-9; 8 – R/D-Ph-6 в разведении  $10^{-2}$  (а – зона лизиса с пленкой; б – прозрачная зона лизиса)

1 культура резистентна к действию всех бактериофагов. Совпадение результатов определения чувствительности к бактериофагам этой группы вариантов, выделенных по признаку резистентности к отдельным из них, составляло 96,8 %.

2. Бактериофаги Гамма А-26, ВА-9, по отношению к которым было выделено 8 фагорезистентных вариантов (ВА-9 – 5, Гамма А-26 – 3). Бактериофаги второй группы по воздействию на все 102 фагорезистентных варианта давали 100 % совпадение (92 положительных, 10 отрицательных) результатов. Все культуры, отобранные по признаку резистентности к бактериофагам первой группы, лизировались бактериофагами Гамма А-26 и ВА-9.

3. Бактериофаг R/D-Ph-6 несколько отличался по спектру литической активности от бактериофагов первой и второй групп. Он так же, как и бактериофаги Гамма А-26 и ВА-9, лизировал все культуры, выделенные по признаку резистентности к бактериофагам первой группы, но лизировал 5 из 8 (62,5 %) вариантов, выделенных по признаку резистентности к бактериофагам второй группы. Применение данного бактериофага позволило выделить наименьшее количество резистентных культур (2), которые оказались нечувствительными к действию всех бактериофагов.

В результате проведенных исследований показано, что диагностические сибирезвенные бактериофаги Fah-ВНИИВВиМ, R/D-Ph-6, Гамма А-26, 186, ВА-9, Саратов, К ВИЭВ обладают следующими свойствами: эффективно размножаются в жидкой культуре авирулентного штамма *B. anthracis* СТИ; в достаточной степени сохраняют специфическую активность при хранении при  $(4 \pm 2)^\circ\text{C}$  в течение двух лет и при кратковременных отклонениях условий хранения и транспортирования от регламентированных, если температура до  $25^\circ\text{C}$ , продолжительностью до 30 сут. В большей степени были выражены различия изученных бактериофагов по специфической активности и специфичности

Таким образом, наиболее предпочтительным для идентификации культур *B. anthracis* является приме-

нение бактериофагов Гамма А-26, ВА-9 и R/D-Ph-6, которые в нашем исследовании лизировали 99,1 % штаммов *B. anthracis* с различными фенотипическими и генотипическими свойствами. Для повышения специфичности теста на фаголизательность бактериофагами Гамма А-26 и ВА-9 представляется перспективной возможность их применения в пределах значений ДРТ, обеспечивающих лизис культур *B. anthracis*, и не лизирующих близкородственные сапрофиты.

Бактериофаги К ВИЭВ, Fah-ВНИИВВиМ, Саратов и 186, на наш взгляд, представляют интерес для фаготипирования штаммов сибирезвенного микроба, так как не лизируют значительное количество диплозмидных вирулентных и атипичных по капсулообразованию и морфологии колоний штаммов *B. anthracis*, или выявляют в их популяциях фагорезистентные варианты, многие из которых обладают сходными культурально-морфологическими свойствами, что может приводить к значительному проценту ошибок при идентификации штаммов возбудителя сибирской язвы.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Головинская Т.М., Буравцева Н.П., Цыганкова О.И., Еременко Е.И. Сравнительное изучение литической активности и специфичности экспериментальных серий сибирезвенных бактериофагов Гамма А-26, К ВИЭВ, ВА-9 и Fah-ВНИИВВиМ. *Пробл. особо опасных инф.* 2011; 3(109):28–30.
2. Лабораторная диагностика и обнаружение возбудителя сибирской язвы. МУК 4.2.2413-08. М.; 2008.
3. Маринин Л.И., Дятлов И.А., Мокриевич А.Н., Бактеева И.В., Белова Е.В., Борзилов А.И., Комбарова Т.И., Кравченко Т.Б., Миронова Р.И., Попова В.М., Сомов А.Н., Титарева Г.М., Тюрин Е.А., Чекан Л.В., Шишкина О.Б., Шишкова Н.А. Методы изучения биологических свойств возбудителя сибирской язвы. М.: ЗАО МП «ГИГИЕНА»; 2009. 304 с.
4. Саяпина Л.В., Абдрашитова А.С., Касина И.В., Малахаева А.Н., Ращепкин Л.И., Осин А.В., Ляшова О.Ю., Валова Т.В., Попов Ю.А., Микшис Н.И., Буравцева Н.П., Миронова Н.П., Лобовикова О.А., Мокриевич А.Н., Гефан Н.Г. Характеристика нового бактериофага диагностического сибирезвенного Гамма А-26 жидкого. *Биопрепараты. Профилактика. Диагностика. Лечение.* 2011; 1(41):36–9.
5. Gratia A. Des relations numeriques entre bacteries lysogenes et particulers de bacteriophage. *Ann. Inst. Pasteu.* 1936; 57:652.

#### References

1. Golovinskaya T.M., Buravtseva N.P., Tsygankova O.I., Eremenko E.I. [Comparative study of lytic activity and specificity of anthrax bacteriophages Gamma A-26, K VIEV, VA-9 and Fah-VNIIIVV&M batches]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2011; 3(109):28–30.
2. [Laboratory diagnostics and detection of anthrax agent. Methodological recommendations] MR 4.2.2413-08. M.; 2008.
3. Marinin L.I., Dyatlov I.A., Mokrievich A.N., Bakhteeva I.V., Belova E.V., Borzilov A.I., Kombarova T.I., Kravchenko T.B., Mironova R.I., Popova V.M., Somov A.N., Titareva G.M., Tyurin E.A., Chekan L.V., Shishkina O.B., Shishkova N.A. [Methods of Study of Anthrax Agent Biological Properties]. M.: "Gigiena"; 2009. 304 p.
4. Sayapina L.V., Abdrashitova A.S., Kasina I.V., Malakhaeva A.N., Rashchepkin L.I., Osin A.V., Lyashova O.Yu., Valova T.V., Popov Yu.A., Mikshis N.I., Buravtseva N.P., Mironova N.P., Lobovikova O.A., Mokrievich A.N., Gefan N.G. [Characteristics of a new liquid diagnostic anthrax bacteriophage – Gamma A-26]. *Biopreparaty. Profilaktika. Diagnostika. Lechenie.* 2011; 1(41):36–9.
5. Gratia A. Des relations numeriques entre bacteries lysogenes et particulers de bacteriophage. *Ann. Inst. Pasteu.* 1936; 57:652.

#### Authors:

Golovinskaya T.M., Tsygankova O.I., Kulichenko A.N. Stavropol Research Anti-Plague Institute. 13–15, Sovetskaya St., Stavropol, 355035, Russian Federation. E-mail: snipchi@mail.stv.ru

#### Об авторах:

Головинская Т.М., Цыганкова О.И., Куличенко А.Н. Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт. Российская Федерация, 355035, Ставрополь, ул. Советская, 13–15. E-mail: snipchi@mail.stv.ru

Поступила 23.01.14.