

Т.М.Головинская, Н.П.Буравцева, О.И.Цыганкова, Е.И.Еременко

**СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ ЛИТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ
И СПЕЦИФИЧНОСТИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ СЕРИЙ
СИБИРЕЯЗВЕННЫХ БАКТЕРИОФАГОВ ГАММА А-26, К ВИЭВ, ВА-9 И FАH-ВНИИВВИМ**

Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт, Ставрополь

Изучены диагностические свойства 4 сибиреязвенных бактериофагов. Выявлены различные спектры специфической литической активности и специфичности бактериофагов К ВИЭВ, ВА-9, Гамма А-26 и Fаh-ВНИИВВИМ. Обладающие широким спектром специфической активности бактериофаги К ВИЭВ и ВА-9 имели относительно низкую специфичность. Напротив, бактериофаг Fаh-ВНИИВВИМ, проявивший абсолютную специфичность, обладал недостаточно широким спектром специфической литической активности.

Ключевые слова: сибиреязвенные бактериофаги, литическая активность, специфичность, *Bacillus anthracis*, сапрофиты.

T.M.Golovinskaya, N.P.Buravtseva, O.I.Tsygankova, E.I.Eremenko

Comparative Study of Lytic Activity and Specificity of Anthrax Bacteriophages Gamma A-26, K VIEV, VA-9 and Fah-VNIIVV&M Batches

Stavropol Research Anti-Plague Institute, Stavropol

Studied are diagnostic properties of four anthrax bacteriophages. Indicated are various spectra of specific lytic activity and specificity of bacteriophages Gamma A-26, K VIEV, VA-9 and Fah-VNIIVV&M. K VIEV, VA-9 bacteriophages with wide spectrum of specific activity possess relatively low specificity. On the contrary, Fah-VNIIVV&M bacteriophage with high specificity exhibited narrow spectrum of specific lytic activity. Gamma A-26 bacteriophage is proposed for application as a diagnostic one, as it lyses *B. anthracis* strains of all types, its specificity being equal to 90 %.

Key words: anthrax bacteriophages, lytic activity, specificity, *Bacillus anthracis*, saprophytes.

Несмотря на очевидный прогресс в развитии новых методов лабораторной диагностики, использование традиционных методов для идентификации возбудителей особо опасных инфекций, в частности, сибирской язвы, не утратило своего значения и в настоящее время. Сведения о применении сибиреязвенного бактериофага для диагностики можно найти не только в отечественной, но и в зарубежной литературе [4, 5, 6, 7]. Определение лизабельности выделенных культур специфическим бактериофагом некоторые исследователи считают одним из наиболее надежных, быстрых и простых методов идентификации *Bacillus anthracis*. В связи с этим тест с бактериофагом является одним из трех опорных тестов, по которым сибиреязвенный микроб можно отличить от близкородственных бацилл.

Сибиреязвенные бактериофаги известны достаточно давно. В 1951 г. McCloy получила высокоактивный специфический фаг, применив оригинальную методику выделения его из лизогенных культур *Bacillus cereus* и использовав в качестве индикаторного штамма аспорогенную культуру сибиреязвенного микроба. С тех пор в разных странах мира авторы, используя методику McCloy и ее штаммы, а также собственные штаммы культур, получали сибиреязвенные фаги как из лизогенных культур, так и из почвы [1]. Для лабораторной диагностики сибирской

язвы предложено несколько бактериофагов. Они отличаются спектром литической активности и специфичностью, характеристиками, которые определяют их диагностическую ценность.

Целью настоящей работы была сравнительная оценка спектра литической активности и специфичности сибиреязвенных бактериофагов, имевшихся в нашей коллекции.

Материалы и методы

Были изучены диагностические свойства 4 сибиреязвенных бактериофагов: Fаh-ВНИИВВИМ (коммерческий препарат, получен в 2008 г. из ГНУ ВНИИ ветеринарной вирусологии и микробиологии, г. Покров, в 2008 г.), ВА-9 (получен из Молдавского института эпидемиологии и гигиены в 1969 г.), К ВИЭВ (коммерческий препарат производства биофабрики г. Сумы Украинской ССР, получен в 1989 г.), бактериофаг Гамма А-26 (получен из ГИСК им. Л.А.Тарасевича в 1973 г.). Бактериофаги ВА-9 и К ВИЭВ в течение нескольких лет хранились в запаянных ампулах при температуре от 4 до 6 °С. В 2009 г. после нескольких пассажей на бульонной культуре вакцинного штамма *B. anthracis* СТИ-1 фильтраты были использованы для определения их литического действия. В работе использовали бактериофаг Гамма

А-26, произведенный в экспериментальных сериях, в 2002 г. (серия 1-02, лиофильно высушенный) [3] и в 2009 г. (серия 1-09, жидкий) в лаборатории сибирской язвы Ставропольского научно-исследовательского противочумного института.

Для определения спектра литической активности бактериофагов использовали 39 типичных вирулентных и 10 атипичных штаммов *B. anthracis*, выделенных в разные сроки из патологического материала от больных людей, животных и трупов, а также из разных источников внешней среды, и 7 вакцинных штаммов. Спектр литической активности выражали процентным отношением количества лизировавшихся бактериофагом штаммов *B. anthracis* к общему количеству штаммов сибиреязвенного микроба. Оценку специфичности проводили с 74 штаммами представителей рода *Bacillus*, не относящихся к виду *B. anthracis*. Использовали 18 штаммов *B. cereus*, 14 штаммов *Bacillus thuringiensis*, 14 штаммов *Bacillus subtilis*, 7 штаммов *Bacillus megaterium*, 1 штамм *Bacillus mesentericus*, 20 штаммов *Bacillus species (spp.)*. Специфичность выражали процентным отношением количества не лизировавшихся штаммов бацилл, не относящихся к виду *B. anthracis*, к общему количеству несибиреязвенных бацилл.

Все штаммы микроорганизмов были из коллекции лаборатории сибирской язвы СтавНИПЧИ (табл. 1).

Чувствительность испытуемой культуры к бактериофагу оценивали чашечным методом (спот-тест) [2]. В 3–5 мл бульона Хоттингера засеивали бактериологической петлей 18-часовую вегетативную культуру исследуемого штамма и культивировали в течение 5–6 ч, после чего в объеме одной капли наносили на подсушенную поверхность пластин агара

Хоттингера. После полного впитывания жидкости в центр участка, засеянного культурой, наносили каплю цельного препарата бактериофага. После впитывания жидкости чашки переворачивали и инкубировали при 37 °С в течение 20 ч. Результат оценивали визуально. Посевы просматривали невооруженным глазом. Лизис оценивали по четырехкрестовой системе. Полный лизис культуры на месте нанесения бактериофага оценивали на «++++»; наличие единичных колоний культуры на фоне зоны ее лизиса в месте нанесения бактериофага – на «+++»; резкое ослабление роста – на «++»; наличие единичных негативных колоний бактериофага на фоне сплошного роста культуры – на «+», отсутствие лизиса – «–». Положительной считали пробу при оценке не менее чем на «+++».

Результаты и обсуждение

Определение спектра литической активности. Бактериофаг Fah-ВНИИВВиМ вызывал лизис 41 штамма *B. anthracis*, что составляло 73,2 %. Бактериофагом Fah-ВНИИВВиМ не лизировались типичные вирулентные штаммы *B. anthracis* 1194; 1198; 1199; 300/31; 644/268; 531/17 603/39; 1056/1; 646/294; 213/10; 12/71 и атипичные штаммы 304/137-2; 592/10 и 595/40. Бактериофаги К ВИЭВ, ВА-9 и Гамма А-26 серии 1-09 лизировали все 56 штаммов сибиреязвенного микроба, что составляло 100 %. Бактериофаг Гамма А-26 серии 1-02 лизировал 55 штаммов или 98,2 % от всех взятых в опыт, им не лизировалась только одна культура вирулентного штамма *B. anthracis* 73/42. Эти данные позволяют сделать вывод о более узком спектре литической активности бактериофага Fah-ВНИИВВиМ по сравнению с другими бактериофагами. Бактериофаги К ВИЭВ, ВА-9 и Гамма А-26 обладали практически идентичным спектром литической активности.

Определение специфичности сибиреязвенных бактериофагов. Результаты исследования показали, что только бактериофаг Fah-ВНИИВВиМ не вызывал лизиса изученных штаммов и обладал 100 % специфичностью (табл. 2). Бактериофаг К ВИЭВ лизировал 14 штаммов, фаг ВА-9 – 13 штаммов, бактериофаг Гамма А-26 серии 1-09 – 7 штаммов, а фаг Гамма А-26 серии 1-02 – 6 штаммов из всех взятых в опыт штаммов несибиреязвенных бацилл. При этом бактериофаг К ВИЭВ лизировал 4 из 18 штаммов *B. cereus*, 2 из 14 штаммов *B. thuringiensis*, 4 из 14 штаммов *B. subtilis*, 2 из 7 штаммов *B. megaterium*, единственный штамм *B. mesentericus* и один из 20 неидентифицированных штаммов бацилл (*Bacillus spp*). Его специфичность составляла 81 % и была наименьшей среди всех бактериофагов. Незначительно выше была специфичность фага ВА-9 (82,4 %). Более высокой специфичностью обладал бактериофаг Гамма, ее показатель укладывался в требования, предъявляемые к диагностическим препаратам (не менее 90 %).

Известно, что наиболее близкими сибиреязвен-

Таблица 1

Штаммы бацилл, использованные в работе

Вид микроорганизмов	№ или названия штаммов
<i>Bacillus anthracis</i>	603/39; 68/12; 566/762; 1190; 1194; 18/29; 1056/1; 73/42; 11/73; 658/543; 1191; 880/372; 1186; 914/213; 14/41; 860/25; 1198; 5/1; 1199; 592/10; 594/37; 645/29; 941/21; 14/41-1; 300/31; R 140 П; 940/16; 81/1; 646/294; 596/9; 304/137-2; 1; 12/64; 644/268; 12/16; 1 (CO) S; 513/1; 542/15; 228; 12/16 S; 303/137-1; 213/10; 643/267; 519/644; 15/47; 595/40; 1265; 12/71; 531/17; 228/8; 55; СТИ-1; СТИ-ПР; 71/12; Ichtiman; Sterne 34 F ₂
<i>Bacillus cereus</i>	8; 183; 4/43; 2527; 45; 569RM-1; 569 RK-36; ATCC 6464 CP-53 (25); ATCC 6464 CP-53 (26); NRL 569; NRL 569 CP-51; 569 RM 20 S; 8035; 111; 16; 96; 104; GP-7 Tc BA
<i>Bacillus thuringiensis</i>	Ser. 1; Ser. 2; Ser. 3; Ser. 4; Ser. 5; Ser. 6; Ser. 7; Ser. 8; Ser. 9; Ser. 10; Ser. 11; Ser. 12; Var. Pasteur; Var. Finitimus
<i>Bacillus spp.</i>	96; 583; 689; 374; 197; 27; 430; 242 R; 242 SM; 449; T1; T2; 360; 1312; 80; T3; 250; B ₁ -1024; 565; 146
<i>Bacillus subtilis</i>	11774; 6633; 168; 168 pBC16; 3; 35; 37; 36; 38; J2; PY 313; 83; 336; 6346
<i>Bacillus megaterium</i>	1; 2; 3; 5; 6; 89; 654
<i>Bacillus mesentericus</i>	B-1 1024

Специфичность сибирезвенных бактериофагов

Бактериофаг	Кол-во штаммов бацилл отдельных видов, лизирующихся бактериофагом						Всего	Специфичность, %
	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Bacillus megaterium</i>	<i>Bacillus mesentericus</i>	<i>Bacillus species</i>		
К ВИЭМ	4/18*	2/14	4/14	2/7	1/1	1/20	14/74	81
ВА-9	4/18	1/14	4/14	2/7	1/1	1/20	13/74	82,4
Fah-ВНИИВВиМ	0/18	0/14	0/14	0/7	0/1	0/20	0/74	100
Гамма А-26 (с 1-02)	0/18	0/14	4/14	2/7	0/1	0/20	6/74	91,9
Гамма А-26 (с 1-09)	0/18	0/14	4/14	2/7	0/1	1/20	7/74	90,5

*Количество лизирующихся штаммов/общее количество штаммов.

ному микробу по всем свойствам являются *B. cereus* и *B. thuringiensis*, об этом свидетельствует и тот факт, что предшественник сибирезвенного бактериофага Гамма был выделен из штамма *B. cereus* W. Поэтому следовало ожидать, что именно эти виды достаточно часто будут неспецифически лизироваться сибирезвенными бактериофагами. Действительно, из 14 штаммов несибирезвенных бацилл, лизирующихся бактериофагом К, 6 были представлены *B. cereus* и *B. thuringiensis*. Почти такой же характер неспецифического лизиса имел и бактериофаг ВА-9. Однако эти бактериофаги лизировали столько же штаммов *B. subtilis* и *B. megaterium*, а бактериофаг Гамма лизировал только те же штаммы этих двух видов, не проявляя неспецифической активности в отношении *B. cereus* и *B. thuringiensis*.

Таким образом, проведенное сравнительное исследование выявило разные спектры специфической литической активности и специфичности сибирезвенных бактериофагов К ВИЭВ, ВА-9, Гамма А-26 и Fah-ВНИИВВиМ. Обладающие широким спектром специфической активности бактериофаги К и ВА-9 имели относительно низкую специфичность. Напротив, бактериофаг Fah, проявивший абсолютную специфичность, обладал недостаточно широким спектром специфической литической активности. Наиболее приемлемыми эти два показателя были у бактериофага Гамма А-26.

Полученные результаты позволяют сделать некоторые выводы. Изученные бактериофаги различаются по своему литическому спектру и доля неспецифических результатов теста с бактериофагами составляет от 0 до 18,6 % для разных фагов. В диагностических целях представляется целесообразным использование бактериофага Гамма А-26. Специфичность действия этого бактериофага со-

ставляет более 90 %, он способен лизировать штаммы *B. anthracis* всех типов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Левина Е.Н., Архипова В.Р. Сравнительное изучение сибирезвенных бактериофагов. Журн. микробиол., эпидемиол и иммунобиол. 1967; 9:24–8.
2. Маринин Л.И., Дятлов И.А., Мокриевич А.Н. и др. Методы изучения биологических свойств возбудителя сибирской язвы. М.: ЗАО МП «ГИГИЕНА»; 2009. 304 с.
3. Цыганкова О.И., Солодовников Б.В. Способ выращивания сибирезвенного бактериофага Гамма. Патент РФ 2133273, опубл. 20.07.1999. Бюл. № 20.
4. Ezzell J.W., Abshire T., Ibrahim S., Teska J. et al. Identification of *Bacillus anthracis*: an overview. 3rd International Conference on Anthrax. Plymouth, England, 7–10 September, 1998. P. 47.
5. Kiel J.L., Parker J.E., Holwit E.A. et al. A selective growth medium for the rapid environmental recovery and identification of *Bacillus anthracis*. 3rd International Conference on Anthrax. Plymouth, England, 7–10 September, 1998. P. 54.
6. Redmon C., Henderson I., Turnbull P.C.B., Bowen J. Phage from different strains of *Bacillus anthracis*. Salisbury Med. Bull. Spec. Suppl. 1996; 87:60–3.
7. Turnbull P.C.B. Definitive identification of *Bacillus anthracis*. 3rd International Conference on Anthrax. Plymouth, England, 7–10 September, 1998. P. 12.

References (Presented are the Russian sources in the order of citation in the original article)

1. Levina E.N., Arkhipova V.R. [Comparative study of anthrax bacteriophages]. Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol. 1967; 9:24–8.
2. Marinin L.I., Dyatlov I.A., Mokrievich A.N. et al. [Methods of study of *Bacillus anthracis* biological properties]. Moscow: ЗАО МП "Gigiena", 2009. 304 p.
3. Tsygankova O.I., Solodovnikov B.V. [Method of Anthrax Gamma Bacteriophage Growing]. RF Patent 2133273. 20 Jul 1999.

Authors:

Golovinskaya T.M., Buravtseva N.P., Tsygankova O.I., Eremanko E.I. Stavropol Research Anti-Plague Institute. Sovetskaya St., 13–15, Stavropol, 355035, Russia. E-mail: snipchi@mail.stv.ru

Об авторах:

Головинская Т.М., Буравцева Н.П., Цыганкова О.И., Еременко Е.И. Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт. 355035, Ставрополь, ул. Советская, 13–15. E-mail: snipchi@mail.stv.ru

Поступила 11.10.10.