

EXPERIMENTAL DETERMINATION OF PHAGORESISTANT MUTANTS BY THE EXAMPLE OF BACTERIA OF THE GENUS PSEUDOMONAS

*Viktorov D.A., Grineva T.A., Vasilev D.A., Artamonov A.M., Vorotnikov A.P.,
Antoshkin P.A., Zolotukhin S.N.*

Key words: bacteriophage, phage resistance, fagorezistentnost, Pseudomonas, lysogens.

Experimental getting of phagoresistant variants of the bacterial strains was conducted. The mechanism of phagoresistance in the case under consideration is in lysogenic state of bacterial cells, caused by the reductive infection by strains of temperate phages. However, in a number of researches the sign of phagoresistance was not motivated by lysogenic. Experiments were carried out by the example of bacteria of Pseudomonas putida and homologous temperate phages of series Psp-USAA.

УДК 578.81

БАКТЕРИОФАГИ *CLOSTRIDIUM PERFRINGENS*: ВЫДЕЛЕНИЕ, БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА, ГЕНОМНЫЙ АНАЛИЗ И ПЕРСПЕКТИВЫ ПРАКТИЧЕСКОГО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ

*Воложанцев Н.В., кандидат биологических наук,
тел. 7-4967-36-01-47; nikvol@obolensk.org*

Баннов В.А.,

Веревкин В.В., кандидат биологических наук

Красильникова В.М., кандидат биологических наук,

Мякинина В.П., Левчук В.П.,

Светоч Э.А., доктор ветеринарных наук, профессор,

тел. 7-4967-36-00-79; svetoch@obolensk.org

Дятлов И.А., чл. корр. РАМН, доктор медицинских наук, профессор;

тел. 7-4967-36-00-03; dyatlov@obolensk.org

ФБУН ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии Роспотребнадзора

*B.S. Seal, PhD, Poultry Microbiological Safety Research Unit, R.B. Russell Agricultural
Research Center, Agricultural Research Service, USDA*

Phone: 1-706-546-3549; bruce.seal@ars.usda.gov

Ключевые слова: бактериофаги, *Clostridium perfringens*, геномный анализ, амидаза

*Представлены результаты изучения биологических и молекулярно-генетических свойств бактериофагов, лизирующих бактериальные клетки *Clostridium perfringens*. Обсуждаются перспективы использования бактериофагов и их литических ферментов для контроля *C. perfringens* - инфекций*

Введение.

Clostridium perfringens - одна из основных причин заболеваний людей, передающихся с продуктами питания [1, 2]. Кроме того, эти грамположительные анаэробные бактерии вы-

зывают некротический энтерит птиц – болезнь широко распространённую во многих странах мира, занимающихся интенсивным птицеводством [3]. Существенное сокращение, а в последующем и полное исключение применения антибиотиков - стимуляторов роста при производстве птицы требуют от исследователей поиска новых научных подходов для разработки средств, позволяющих эффективно бороться с такими патогенами человека и животных, как *C. perfringens*.

Использование литических бактериофагов и их литических ферментов для контроля *C. perfringens* – один из возможных подходов в борьбе с этим патогеном на птицеводческих фермах и на перерабатывающих предприятиях.

Материалы и методы исследований.

Бактериофаги идентифицировали с помощью спот-теста и последующего титрования на чувствительных штаммах *C. perfringens*. «Чистые» препараты фагов получали из изолированной негативной колонии после трёх последовательных пересевов на газоне чувствительного штамма. Специфичность и спектр антибактериального действия фагов определяли методом спот-тестирования и стандартным двуслойным методом с использованием 50 штаммов *C. perfringens*.

Оценку эффективности препарата бактериофага CpV1 в экспериментах *in vivo* проводили на четырнадцатидневных бройлерных цыплятах, которых инфицировали *per os* суспензией двух штаммов *C. perfringens*, содержащих маркер устойчивости к рифампицину и чувствительных к фагу, в объеме 0,2 мл (3×10^7 - 1×10^8 КОЕ) на 19, 20, 21 и 22 дни жизни. Препарат фага в объеме 0,2 мл вводили птице *per os* дважды в день в те же сроки.

Фаговую ДНК выделяли из обработанного протеиназой К фаголизата на колонках фирмы QIAGEN (QIAamp DNA Midi Kit). Эксперименты по клонированию гена амидазы бактериофагов *C. perfringens* в клетках *E. coli* проводили по стандартным протоколам [4]. Полноразмерный ген амидазы нарабатывали в ПЦР с использованием специфических праймеров, в состав которых вводили сайты узнавания эндонуклеаз рестрикции.

Для оценки антибактериальной активности продуктов клонированных генов использовали белковую фракцию, выделенную из клеток штамма *E. coli*, содержащих рекомбинантную плазмиду. В качестве контроля использовали белковый препарат, выделенный из изогенного штамма *E. coli* с нативной плазмидой. Активность препаратов оценивали методом спот-теста на газоне живой культуры *C. perfringens* (культивирование 18 час. при температуре 37°C в анаэробных условиях).

Результаты исследований и их обсуждение.

При анализе материала, отобранного на птицефабриках Московской и Калужской областей России, выделено 30 бактериофагов, обладающих литической активностью против бактерий *C. perfringens*.

На основании рестрикционного анализа ДНК бактериофаги были разделены на шесть групп. Наиболее многочисленными оказались группы CpV1- и CpV4-подобных короткохвостых фагов, отнесенных к семейству *Podoviridae*. Установлено, что все фаги имеют высокую специфичность и способны размножаться не более чем на одном–шести штаммах *C. perfringens*. Однако при множественности инфицирования более 100 БОЕ/КОЕ фаги способны задерживать рост бактерий в питательном бульоне и формировать негативные пятна роста на газонах около 30 % штаммов.

С целью выбора оптимальной схемы применения бактериофагов для предотвращения *C. perfringens* инфекций у птицы провели серию экспериментов по изучению персистенции одного из литических фагов, CpV1, в желудочно-кишечном тракте бройлерных цыплят (при однократном введении фага *per os* в дозе 6×10^8 БОЕ/особь). Полученные результаты показали,

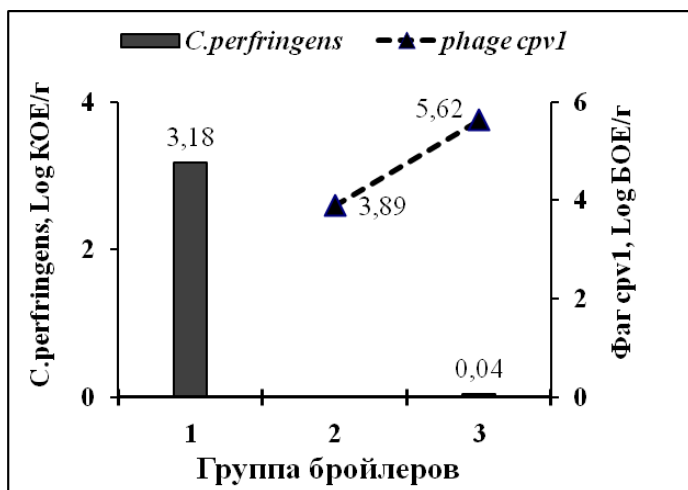


Рис. 1 - Титры *Clostridium perfringens* и фага CpV1 в нижних отделах ЖКТ бройлерных цыплят. Группы 1 и 3 – бройлеры, инфицированные культурой двух Rif^R-штаммов *C. perfringens* (1 раз в день, в течение 4-х дней); группы 2 и 3 - бройлеры, получающие бактериофаг CpV1 (дважды в день в течение 4-х дней).

титра фага (рис. 2). В тоже время, эксперименты по фаготерапии бройлеров, естественно инфицированных *C. perfringens*, с использованием коктейля фагов не увенчались успехом (данные не представлены), что, очевидно, связано с узким спектром литической активности фагов. Естественные изоляты *C. perfringens*, выделенные из бройлеров, оказались резистентными к фагам, которые использовали в экспериментах.

Одним из научных направлений, которое, возможно, позволит преодолеть трудности в практике применения бактериофагов в борьбе с *C. perfringens*, является изучение геномов бактериофагов с помощью секвенирования фаговой ДНК и идентификации генов, ответственных за синтез литических ферментов, которые могут иметь самостоятельное терапевтическое значение и оказаться более перспективными, чем препараты нативных фагов. В связи с этим были проведены эксперименты, позволившие более детально изучить геномы трех выделенных нами бактериофагов семейства *Podoviridae* CpV1, CpV4 и ZP2 [5, 6]. Результаты полногеномного анализа показали, что геномы этих бактериофагов представлены двунитевой линейной ДНК, содержащей соответственно 16747, 17972 и 18078 пар нуклеотидов (п.н.) с короткими концевыми инвертированными повторами (25, 28 и 30 п.н., соответственно) и кодируют от 22 до 28 потенциальных генов. Бактериофаги CpV4 и ZP2 по структуре генома оказались наиболее близкими (88 % гомологии на уровне ДНК). Интересно отметить, что еще более высокий процент идентичности (95 %) выявлен между фагами CpV4 и CP7R, последний из которых выделен в лаборатории из Richard B. Russell Agricultural Research Center, т.е. гомологичные фаги выявлены в двух существенно отдаленных географических регионах, России и США [6].

В геноме исследованных фагов идентифицированы, по крайней мере, четыре геномных кластера, ответственные за репликацию фаговой ДНК, ее упаковку, синтез структурных компонентов фага и литические свойства. К последним отнесены предполагаемые пептиды, имеющие гомологию с N-acetylmuramoyl-L-alanine амидазой и lysozyme-эндопептидазой.

Гены фагов CpV1 и CpV4, кодирующие N-acetylmuramoyl-L-alanine амидазу, были клонированы и экспрессированы в клетках *E. coli*. Показано, что белковый препарат из рекомбинантного штамма *E. coli* (pUC19-4H3) с геном амидазы фага CpV4 обладает выраженной литической активностью по отношению к тестируемым штаммам *C. perfringens* (рис.2). При-

что через час после обработки фаг выявлялся в зобе в концентрации 7×10^7 БОЕ/г. В железистом желудке его концентрация колебалась от 2×10^3 до 3×10^5 БОЕ/г. В период между 3 и 12 час. после обработки концентрация фага достигала 10^7 БОЕ/г в слепом отростке и в подвздошной кишке. Присутствие фага в этих отделах ЖКТ в высоких концентрациях – чрезвычайно важный фактор с точки зрения фаготерапии *C. perfringens*-ассоциированных инфекций, поскольку, подвздошная кишка и слепой отросток являются основными участками колонизации и размножения этого возбудителя.

Модельные эксперименты по оценке терапевтического действия препаратов бактериофагов показали, что обработка фагом CpV1 приводит к снижению уровня колонизации кишечника бройлерных цыплят культурой *C. perfringens*, чувствительной к этому фагу, на фоне роста

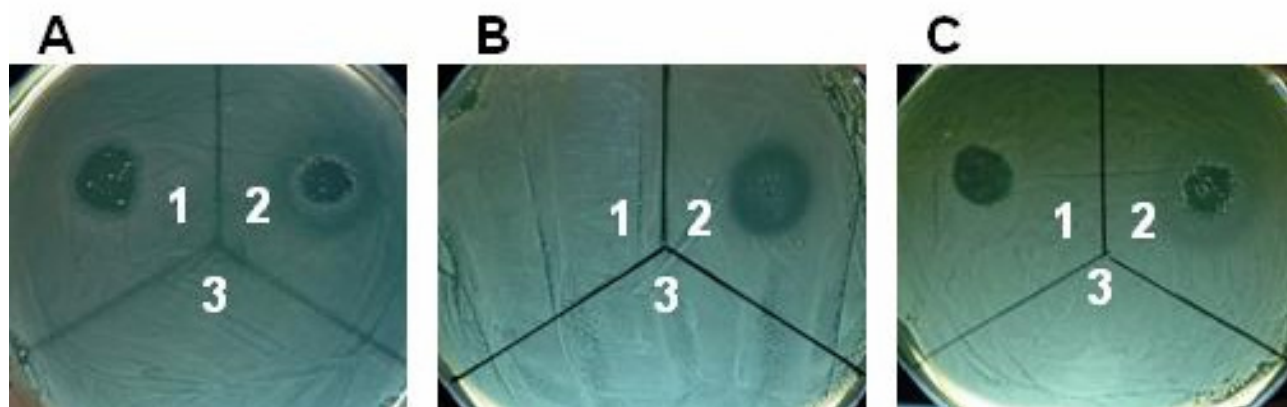


Рис. 2 - Литическая активность амидазы фага CpV4 по отношению к бактериям *C. perfringens* ATCC3624 (А), cp0650 (В) и ATCC13124 (С).

1 – бактериофаг CpV4 (10^{10} БОЕ/мл); 2 – белковый препарат из рекомбинантного штамма *E.coli* DH5 α (pUC19-4H3) с геном амидазы фага CpV4; 3 – белковый препарат из штамма *E.coli* DH5 α с нативной плазмидой pUC19.

чем, препарат лизирует как чувствительные, так и устойчивые к фагу CpV4 штаммы (табл. 1).

Таблица 1 - Сравнение литической активности препарата амидазы и бактериофага CpV4

Штамм <i>C. perfringens</i>	Белковый препарат из штамма		Бактериофаг CpV4 (10^{10} БОЕ/мл)
	<i>E.coli</i> DH5a (pUC19-4H3)	<i>E.coli</i> DH5a (pUC19)	
Штаммы, на которых фаг CpV4 способен размножаться			
ATCC3624	+	-	+
ATCC 10543	+	-	+
ATCC 13124	+	-	+
CP-25	+	-	+
CP-26	+	-	+
CP-27	+	-	+
Штаммы, устойчивые к фагу CpV4			
CP-13	+	-	-
Д 5	+	-	-
cp0183	+	-	-
cp0650	+	-	-
cp1030	+	-	-
cp1036	+	-	-
“+” – выраженное пятно лизиса; “-” – отсутствие лизиса			

Заключение. Бактериофаги являются потенциальными средствами лечения бактериальных инфекций. Однако узкая специфичность фагов, возможное развитие устойчивости бактерий к своим вирусам - все это указывает на необходимость постоянного поиска новых

изолятов фагов для использования их в терапевтических целях. Еще в 1959 г. Н.В.Смит обратил внимание на отсутствие чувствительности многих штаммов *C. perfringens* к выделенным бактериофагам [7]. То же самое мы наблюдали в наших исследованиях, где большинство литических бактериофагов *C. perfringens* имели ограниченный диапазон хозяев. В связи с этим, кажется маловероятным, что какой-либо «коктейль» бактериофагов окажется эффективным против всех бактериальных изолятов *C. perfringens*, которые существуют в окружающей среде. В этом отношении, кажется более перспективным использование фаговых литических ферментов для контроля *C. perfringens*-инфекций. Полученные нами данные свидетельствуют о том, что ген амидазы фага CpV4, клонированный в рекомбинантном штамме *E. coli*, детерминирует синтез продукта, обладающего литической активностью против бактерий *C. perfringens*. Причем, этот продукт лизирует не только бактериальные штаммы, чувствительные к фагу CpV4, но и штаммы устойчивые к этому фагу.

Таким образом, амидазы фагов, осуществляющие расщепление пептидогликана бактериальной клеточной стенки, могут рассматриваться как потенциальные терапевтические средства против *C. perfringens*.

Библиографический список

1. Brynstad S. *Clostridium perfringens* and foodborne infections / Brynstad S., Granum P.E. // Int. J. Food Microbiol. – 2002. – Vol. 74(3). – P.195-202.
2. Lindström M. Novel insights into the epidemiology of *Clostridium perfringens* type A food poisoning / Lindström M., Heikinheimo A., Lahti P., Korkeala H. // Food Microbiol. – 2011. – Vol.28(2). – P.192-198.
3. Van Immerseel F. *Clostridium perfringens* in poultry: an emerging threat for animal and public health / Van Immerseel F., De Buck J., Pasmans F., Huyghebaert G., Haesebrouck F., Ducatelle R. // Avian Pathol. – 2004. – Vol.33 (6). – P. 537-549.
4. Sambrook J., Fritsch EF, Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Lab, Cold Spring Harbor, NY.1989
5. Volozhantsev N.V. The genome sequence and proteome of bacteriophage ΦCPV1 virulent for *Clostridium perfringens* / Volozhantsev N.V., Verevkin V.V., Bannov V.A., Krasilnikova V.M., Myakinina V.P., Zhilenkov E.L., Svetoch E.A., Stern N.J., Oakley B.B., Seal B.S. // Virus Res. – 2011. – Vol. 155. – P. 433–439.
6. Volozhantsev N.V. Molecular Characterization of Podoviral Bacteriophages Virulent for *Clostridium perfringens* and Their Comparison with Members of the *Picovirinae* / Volozhantsev N.V., Oakley B.B., Morales C.A., Verevkin V.V., Bannov V.A., Krasilnikova V.M., Popova A.V., Zhilenkov E.L., Garrish J.K., Schegg K.M., Woolsey R, Quilici D.R, Line J.E, Hiett K.L, Siragusa G.R, Svetoch E.A, Seal B.S. // PLoS ONE – 2012. – 7(5): e38283.
7. Smith H.W. The bacteriophages of *Clostridium perfringens* // J Gen Microbiol. – 1959. – Vol.21. – P. 622-630

BACTERIOPHAGES OF *CLOSTRIDIUM PERFRINGENS*: ISOLATION, BIOLOGICAL PROPERTIES, GENOMIC ANALYSIS AND POTENTIALITY OF PRACTICAL USE

Volozhantsev N.V., Bannov V.A., Verevkin V.V., Myakinina V.P., Levchuk V.P., Svetoch E.A., Dyatlov I.A., Seal B.S.

Key words: bacteriophage, *Clostridium perfringens*, genome analysis, amidase

Results from studying of biological and genomic properties of bacteriophages lytic for Clostridium perfringens are presented. Potential use of bacteriophages and their lytic enzymes to control C.perfringens infections is discussed