

## ФАГИ БАКТЕРИЙ *BORDETELLA BRONCHISEPTICA*: СВОЙСТВА И ВОЗМОЖНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ

**Васильева Юлия Борисовна**, кандидат ветеринарных наук, доцент кафедры «Микробиология, вирусология, эпизоотология и ВСЭ»

ФГБОУ ВПО «Ульяновская ГСХА им. П.А. Столыпина»

432017, г. Ульяновск, Б.Новый Венец – 1, e-mail: vet\_yulia@mail.ru

**Ключевые слова:** *Bordetella bronchiseptica*, бактериофаги, индикация, идентификация, биологические свойства.

В статье представлен материал по истории изучения фагов бактерий рода *Bordetella*, а также результаты собственных исследований по выделению бактериофагов *Bordetella bronchiseptica*, изучению их биологических свойств и возможностям применения.

### Введение

С 80-х годов XX века отечественными и зарубежными исследователями предпринимаются попытки выделения фагов бактерий рода *Bordetella* [1-9].

Исследовательской группой НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи описаны бактериофаги бактерий *B.pertussis* - фТ, фК, 134, 41405, *B.parapertussis* 66<sub>2,2'</sub>, *B.bronchiseptica* - 214, американскими разработчиками - два бактериофага *B.avium* В1 и В2 и три фага *B.bronchiseptica* ВРР-1, ВМР-1 и ВІР-1. Авторами изучено строение бордетеллёзных фагов, проведен сравнительный анализ структуры их геномов, выявлены особенности лизогении и конверсии бактерий рода *Bordetella*, а также спроектирована трёхмерная модель фагов и изучен уникальный механизм доставки ДНК материала в бактериальную клетку [2-6].

На основе структурных характеристик авторы отнесли фаги *B.bronchiseptica* к семейству *Podoviridae* - короткохвостовых фагов с изометрической головкой [6, 7, 8, 9].

Все бордетеллезные фаги морфологически идентичны друг другу. Диаметр икосаэдрической головки составляет 49,5 нм [2, 6, 7, 8, 9].

Бактериофаги нередко участвуют в формировании вирулентных бактерий. Изменение патогенности может достигаться в результате прямого переноса генов, кодирующих факторы вирулентности, или являться следствием более сложных событий, напри-

мер, изменяющих поверхность бордетелл. Приобретение бактерией резистентности к бактериофагу часто приводит не только к изменению во взаимодействии бактерии с фагом, но и бактерии с макроорганизмом [3].

Вследствие этого интерес к бордетеллёзным бактериофагам, особенно в связи со сложностью регуляции вирулентности бактерий рода *Bordetella*, постоянно поддерживается.

Результаты исследований показывают, что бактерии *B.bronchiseptica* и *B.pertussis* полилизогенны и содержат два профага. Геномы одного из профагов обнаружены в хромосомах клеток-хозяев. Геномы второго профага присутствуют только в части популяции лизогенных бактерий в автономном состоянии и утрачиваются в процессе культивирования *in vitro* большей частью бактериальной популяции [3]. Ко второй группе относятся и бактериофаги ВРР-1, ВМР-1 и ВІР-1 *B.bronchiseptica*, имеющие различный тропизм к бактериям, находящимся в разных фазовых состояниях [2, 3, 9].

Развитие компьютерных технологий позволило американским исследователям в 2013 году разработать 3D-модель фага ВРР-1 *B.bronchiseptica*, изучить механизм взаимодействия фагов с клеткой-хозяином, сформулировать общие принципы организации фагового генома и провести поиск геномов профагов в секвенированных хромосомах бактерий. Полная трехмерная структура фага ВРР-1 была сконструирована автора-

ми на основании анализа многочисленных электронных 2D-снимков отдельных частиц, находящихся в угловом диапазоне от  $-70^\circ$  до  $70^\circ$ , механизм фаговой структурной адаптации к динамически изменяющимся клеткам-хозяевам состоит в строгом сохранении ДНК материала капсида и относительной мобильности и изменчивости хвостового аппарата, что обеспечивает выживание потомства фага [5].

В литературных источниках мы не нашли подробного описания методики выделения фагов бактерий рода *Bordetella*. Имеются упоминания, что в 2004 году исследователем Mingsun Liu были выделены бактериофаги *B.bronchiseptica* путем многократного облучения бактерий ультрафиолетовыми лучами [4].

В 2013 году группа американских исследователей разработала методику выделения фагов для разных фаз *B.bronchiseptica* (вирулентной  $BVG^+$  и авирулентной  $BVG^-$ ). Для получения жизнеспособного профага из бактерий *B.bronchiseptica* в вирулентной фазе 3 мл культуры выращивали 16ч при температуре  $37^\circ\text{C}$  и центрифугировали при 225 оборотах в минуту. Собранный супернатант фильтровали через поры 0,2 мкм. Процедуру проводили с использованием отфильтрованных фагов от предыдущего цикла. Пассаж способствовал увеличению титра фага. Для третьего пассажа отфильтрованные фаги были разделены на две порции для заражения вирулентных ( $BVG^+$  фаза) и авирулентных (фаза  $BVG^-$ ) бордетелл. Дальнейшее культивирование приводило к повышению титра фага и получению фагов с отличающимся набором белков. Авторы установили, что многообразие белков фага позволяет ему приспособляться к различным фазам существования динамически изменяющихся *B.bronchiseptica* [6].

По нашему мнению, необходимо разработать методику выделения фагов с испытанием их диагностической и лечебно-профилактической эффективности. По результатам этих испытаний традиционные методы диагностики бордетеллёза животных можно дополнить проведением СПОТ-теста или «метода стекающей капли» с использовани-

ем специфических бордетеллёзных бактериофагов. В этом случае после выделения чистой культуры отпадает необходимость в проведении биохимической идентификации «полевых» штаммов *B.bronchiseptica*, что значительно сокращает время постановки окончательного диагноза (минимум в 2 раза), снижает трудоёмкость и стоимость анализов. Другой возможностью использования бордетеллёзных фагов в диагностических целях является разработка реакции нарастания титра фага (РНФ). С помощью РНФ возможна ускоренная индикация штаммов *B.bronchiseptica* от животных без этапа выделения чистой культуры при наличии сопутствующей носоглоточной микрофлоры.

Мы считаем, что комплексное лечение бордетеллёза животных, включающее применение этиотропной, патогенетической и симптоматической терапии, возможно дополнить использованием специфических бордетеллёзных бактериофагов. Препараты в виде капель, крема, геля или мази для носа и глаз необходимо апробировать в лабораторных и клинических условиях на разных стадиях проявления заболевания у животных. Перспективно также исследование возможности применения специфических фагов с профилактической целью для предотвращения переноса возбудителя от больных и заражения восприимчивых животных и людей, а также для санации организма бордетеллоносителей. Интересен вопрос изучения возможности применения бордетеллёзных фагов в качестве дезинфицирующих препаратов для санации помещений и предметов окружающей среды.

Для изготовления фаговых биопрепаратов необходимо разработать схему выделения фагов, провести отбор фагов-синергистов, обладающих высокой литической активностью, спектром литического действия и высокой устойчивостью к действию физико-химических факторов. Отобранные фаги не должны подавлять активность друг друга при хранении и применении.

Исходя из анализа литературных источников, исследования в данных направлениях не ведутся, но, по нашему мнению, весьма актуальны и требуют дальнейшего

Таблица 1

Морфология негативных колоний бактериофагов *B. bronchiseptica*

№ п/п	Бактериофаг	Морфология негативных колоний		
		размер, Ø мм	форма	зона неполного лизиса
1	V.br. –100 УГСХА	1,5±0,2	округлые прозрачные	нет
2	V.br . – 107 УГСХА	3,0±0,4	округлые прозрачные	полупрозрачная, шириной 0,7±0,2 мм
3	V.br . – 110 УГСХА	1,6±0,2	округлые прозрачные в центре	нет
4	V.br . –111 УГСХА	2,0±0,4	округлые прозрачные в центре	нет
5	V.br . – 113 УГСХА	1,5±0,2	округлые прозрачные	нет
6	V.br. – 122 УГСХА	3,2±0,3	округлые прозрачные	полупрозрачная, шириной 3,5±0,5 мм
7	V.br . – 124 УГСХА	3,6±0,1	округлые, мутные	полупрозрачная, шириной 1,5±0,5 мм
8	V.br . – 183 УГСХА	1,9±0,1	округлые прозрачные	нет

Таблица 2

Литическая активность фагов *B. bronchiseptica*

№ п/п	Фаг	Индикаторная культура	Активность по Ап-пельману, степень разведения	Активность по Гра-ция, количество корпускул в 1 мл
1	V.br. –100 УГСХА	<i>B. bronchiseptica</i> № 120	10 <sup>-7</sup>	3,1×10 <sup>8</sup> ±1,2×10 <sup>8</sup>
2	V.br . – 107 УГСХА	<i>B. bronchiseptica</i> № 120	10 <sup>-8</sup>	4,3×10 <sup>9</sup> ±0,1×10 <sup>9</sup>
3	V.br . – 110 УГСХА	<i>B. bronchiseptica</i> № 120	10 <sup>-7</sup>	1,8×10 <sup>8</sup> ±1,3×10 <sup>8</sup>
4	V.br . –111 УГСХА	<i>B. bronchiseptica</i> № 120	10 <sup>-6</sup>	5,3×10 <sup>7</sup> ±2,2×10 <sup>7</sup>
5	V.br . – 113 УГСХА	<i>B. bronchiseptica</i> № 120	10 <sup>-7</sup>	3,1×10 <sup>8</sup> ±0,3×10 <sup>8</sup>
6	V.br. – 122 УГСХА	<i>B. bronchiseptica</i> № 120	10 <sup>-7</sup>	2,5×10 <sup>8</sup> ±0,2×10 <sup>8</sup>
7	V.br . – 124 УГСХА	<i>B. bronchiseptica</i> № 120	10 <sup>-8</sup>	1,4×10 <sup>9</sup> ±0,1×10 <sup>9</sup>
8	V.br . – 183 УГСХА	<i>B. bronchiseptica</i> № 120	10 <sup>-6</sup>	5,9×10 <sup>7</sup> ±1,7×10 <sup>7</sup>

изучения.

Целью нашего исследования явилась разработка методов выделения фагов *B. bronchiseptica*, изучение их основных биологических свойств и возможностей практического применения в ветеринарии.

**Объекты и методы исследований**

Объектами исследований явились референс-штаммы *B. bronchiseptica* № 1, № 7, № 214, № 22-067, № 8344, близкородственные штаммы *B. parapertussis* № 119 и *B. pertussis* № 12, 14а, 38; референс-штаммы бактерий других родов: *Yersinia pseudotuberculosis* № 0630, *Morganella morganii*, *Staphylococcus aureus* № ATCC 25923, *Escherichia coli* № 4, № ATCC 25922, *Proteus mirabilis* № 1, № 523, № 491, *Salmonella typhimurium* № 82,

*Citrobacter freundii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterococcus faecalis* № 189, *Providencia rettgeri* № 104а, № 102д, № 175, *Aeromonas hydrophila* № 01, № 02, *Pseudomonas putida* № 12633, № 901, *Enterobacter cloacae* № 1487, № 10005, *Bacillus cereus* № 2527, *Bacillus subtilis* № 6633, полученные из музея кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ветеринарно-санитарной экспертизы при ФГБОУ ВПО «Ульяновская ГСХА им. П.А. Столыпина», которые, в соответствии с паспортными данными, обладали типичными для бактерий этих видов морфологическими, культуральными и биохимическими свойствами; 52 штамма *B. bronchiseptica*, выделенных из клинических образцов биоматериала от собак и кошек (с клинически-

ми проявлениями респираторных заболеваний); 8 штаммов индуцированных фагов *B.bronchiseptica*.

Для выделения фагов использовали разработанную нами схему, включающую трёхдневное воздействие ультрафиолетовым излучением (УФЛ) на суточную культуру *B.bronchiseptica* [10]. Методы работы с фагами включали изучение их основных биологических свойств: морфологию колоний, литическую активность, спектр литического действия, специфичность, устойчивость к физическим и химическим факторам [10-15].

#### Результаты исследований

В процессе работы из 52-х «полевых» штаммов *B.bronchiseptica* нами было выделено 8 фагов.

По морфологии негативные колонии выделенных фагов разделили на два типа. К первому типу отнесли колонии круглые, прозрачные, диаметром более 3 мм, с зоной неполного лизиса по периферии 0,5 – 4 мм или без неё. Ко второму типу причислили круглые, прозрачные или полупрозрачные колонии, с ровными краями, диаметром до 2 мм (табл. 1).

Литическая активность исследуемых бактериофагов варьировала от  $10^{-6}$  до  $10^{-9}$  по методу Аппельмана и от  $5,3 \times 10^7$  до  $4,3 \times 10^9$  по методу Грациа (табл. 2).

Спектр литического действия выделенных фагов, использованный на 52 штам-

мах бактерий *B.bronchiseptica*, составил диапазон от 21,1 % до 82,7%.

Исследования показали, что изучаемые фаги характеризуются различным спектром литического действия. Бактериофаг V.br.–107 УГСХА проявил самый большой спектр литического действия, который составил 82,7%. В результате подсчетов наибольшим совместным спектром литического действия обладали бактериофаги V.br.–107 УГСХА и V.br.–110 УГСХА – 92,5 %.

Далее определили специфичность бактериофагов по отношению к референс-штаммам *B.bronchiseptica*, а также к близкородственным бордетеллам и возможным носоглоточным ассоциантам.

Выделенные бактериофаги были строго специфичны по отношению к штаммам бактерий *B.bronchiseptica*, не лизировали бактерии других видов и родов.

В результате исследований устойчивости выделенных фагов к физико-химическим факторам было установлено, что прогревание фагов при температуре 60°C в течение 30 минут не оказало влияния на активность фагов, все штаммы бордетелл погибали при данной температуре. Нагревание бактериофагов свыше 65°C приводило к потере их активности.

Бактериофаги проявили выраженную устойчивость к воздействию хлороформа в течение 30 минут, тогда как все штаммы *B.bronchiseptica* инактивировались при

Таблица 3

#### Спектр литического действия выделенных бактериофагов *B.bronchiseptica*

Штаммы бактерий <i>B.bronchiseptica</i> (n=52)	Бактериофаги							
	<i>V.br.–100</i> УГСХА	<i>V.br.–107</i> УГСХА	<i>V.br.–110</i> УГСХА	<i>V.br.–111</i> УГСХА	<i>V.br.–113</i> УГСХА	<i>V.br.–122</i> УГСХА	<i>V.br.–124</i> УГСХА	<i>V.br.–183</i> УГСХА
Количество положительных результатов	25	43	23	29	11	14	14	20
Процент лизируемых культур (%)	48,0	82,7	44,2	55,8	21,1	26,9	26,9	38,5

## Специфичность бордетеллезных фагов

<i>B. bronchiseptica</i>	Количество штаммов	Бактериофаги							
		<i>B.br.-100 УГСХА</i>	<i>B.br.-107 УГСХА</i>	<i>B.br.-110 УГСХА</i>	<i>B.br.-111 УГСХА</i>	<i>B.br.-113 УГСХА</i>	<i>B.br.-122 УГСХА</i>	<i>B.br.-124 УГСХА</i>	<i>B.br.-183 УГСХА</i>
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	5	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Bordetella parapertussis</i>	1	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Bordetella pertussis</i>	3	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	1	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Morganella morganii</i>	1	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	1	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i>	2	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Proteus mirabilis</i>	3	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Salmonella typhimurium</i>	1	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Citrobacter freundii</i>	1	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Klebsiella pneumonia</i>	1	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Enterococcus faecalis</i>	1	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Providencia rettgeri</i>	3	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Aeromonas hydrophila</i>	2	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas putida</i> 12633, 901	2	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Enterobacter cloacae</i>	2	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Bacillus cereus</i>	1	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Bacillus subtilis</i>	1	-	-	-	-	-	-	-	-

Примечание: «-» - отсутствие лизиса; «+» - лизис более 75% исследованных штаммов; «±» - лизис 50%-75% исследуемых штаммов

10-минутной обработке.

#### Выводы

В результате проведенных исследований нами изучены основные биологические свойства выделенных 8-ми фагов *B. bronchiseptica*. Литическая активность их варьировала от  $10^{-6}$  до  $10^{-9}$  по методу Аппельмана и от  $5,3 \times 10^7$  до  $4,3 \times 10^9$  по ме-

тоду Грациа, а спектр литического действия составил от 21,1 % до 82,7 %. Выделенные бактериофаги обладали специфичностью, проявляли устойчивость при обработке хлороформом (1:10) в течение 30 минут и выдерживали 30-минутное нагревание при 60°C.

Мы считаем перспективной дальней-

шую селекцию выделенных фагов с последующей разработкой диагностических и лечебно-профилактических биопрепаратов.

#### Библиографический список

1. Результаты научных исследований сотрудников кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ВСЭ Ульяновской ГСХА им. П.А. Столыпина / Под ред. Васильева Д.А., Золотухина С.Н. - Ульяновск: ГСХА, 2013. – 316 с.

2. Каратаев, Г.И. Мигрирующие генетические элементы *Bordetella pertussis*, как генетические и эпидемиологические маркеры / Г.И. Каратаев, Л.Н. Синяшина, И.Г. Сивов // Вестник РАМН. - 2000. - №1. - С.34-38.

3. Каратаев, Г.И. Мобильные генетические элементы *Bordetella pertussis* и их роль в регуляции генов вирулентности возбудителя коклюша: дис... докт. биол. наук, - М. - 2008. – 254 с.

4. Синяшина, Л.Н. Характеристика основных биологических свойств бактериофагов *Bordetella* / Л.Н. Синяшина, И.А. Лапаева, С.М. Мебель // Микробиология. -1982. - Т.8. - С.66-69.

5. Shelton, C.B. Purification and Characterization of a Temperate Transducing Bacteriophage for *Bordetella avium* / C.B. Shelton [et al.] //Journal of Bacteriol. - 2000. - V. 82. - P. 6130-6136.

6. Liu, M. Reverse Transcriptase-Mediated Tropism Switching in *Bordetella* Bacteriophage / M. Liu // Science. - 2002. - V. 295. - P. 2091- 2094.

7. Wei, D. Three-dimensional structure of tropism-switching *Bordetella* bacteriophage / D. Wei // PNAS. – 2010. - V. 107. - №. 9. – P. 4347-4352.

8. Overstreet, C.M. Self-made phage libraries with heterologous inserts in the Mtd of *Bordetella bronchiseptica* Protein Engineer-

ing / C.M. Overstreet // Design & Selection. – 2012. - V. 25. - №. 4. - P. 145–151.

9. Yuan, T.Z. Protein Engineering with Biosynthesized Libraries from *Bordetella bronchiseptica* Bacteriophage / T.Z. Yuan // PLoS ONE. – 2013. - 8(2): e55617. doi:10.1371/journal.pone.0055617.

10. Васильев, Д.А. Изучение основных биологических свойств бактериофагов *Bordetella bronchiseptica*, выделенных методом индукции / Д.А. Васильев, Е.Н. Семанина, С.Н. Золотухин, Ю.Б. Васильева // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. - 2011. - №1 (13). - С. 59–62.

11. Золотухин, С.Н. Разработка оптимальных количественных параметров соотношения культуры и фага для получения препаратов с высокой активностью / С.Н. Золотухин, Л.П. Пульчеровская, Д.А. Васильев // Вестник УГСХА. – 2004. – № 12. – С. 50-53.

12. Васильева, Ю.Б. Разработка методов детекции бактерий *Bordetella bronchiseptica* / Ю.Б. Васильева // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. - 2013. - №3 (23). – С. 46-52.

13. Васильева, Ю.Б. Сравнительная характеристика методов лабораторной диагностики бордетеллёза / Ю.Б. Васильева // Современные проблемы науки и образования. – 2013. – № 4; URL: <http://www.science-education.ru/110-9751>.

14. Васильева, Ю.Б. Конструирование биопрепаратов для лабораторной диагностики бордетеллёзной инфекции / Ю.Б. Васильева // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. - 2013. - №2 (22). – С. 25-29.

15. Каттер, Э. Бактериофаги. Биология и практическое применение / Э.Каттер, А. Сулаквелидзе. – М.: Научный мир, 2012. – С. 588-593.