© Коллектив авторов, 2016
УДК 579.852.11
DOI – <http://doi.org/10.14300/mnnc.2016.11134>
ISSN 2073-8137

ИЗУЧЕНИЕ ФАГОРЕЗИСТЕНТНОСТИ ШТАММОВ *BACILLUS ANTHRACIS* И РАЗРАБОТКА СХЕМЫ ИХ ФАГОТИПИРОВАНИЯ

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

Ставропольский противочумный институт, Россия

STUDY OF *BACILLUS ANTHRACIS* STRAINS PHAGORESISTANCE AND DEVELOPMENT OF THE PHAGOTYPING SCHEME

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

Stavropol Anti-Plague Institute, Russia

Цель исследования – определение закономерностей фагоре­зистентности сибиреязвенных культур к группам бактериофагов и разработка схемы одновременной идентификации и фаготипирования штаммов *B. anthracis*.

Определены группы сибиреязвенных бактериофагов по особенностям специфической литической активности на штаммы возбудителя сибирской язвы и их культуральные варианты, выделенные по признаку резистентности к отдельным из этих фагов. На основе результатов исследований разработана схема комплексного применения сибиреязвенных бактериофагов Гамма А-26 и 186 для идентификации и фаготипирования штаммов *B. anthracis*, спектр специфической литической активности которых включает все изученные штаммы.

Ключевые слова: *Bacillus anthracis*, идентификация, специфические сибиреязвенные бактериофаги, фагоре­зистентность, фаготипирование

The purpose of the study was to determine the laws of phagoresistance of anthrax cultures to bacteriophage groups and to develop a scheme of simultaneous identification and phagotyping of *B. anthracis* strains. Anthrax bacteriophages were divided into groups by their characteristics of specific lytic activity to anthrax strains and their cultural variants isolated by the indication of resistance to some of these phages. On the basis of the results of the study a scheme was developed for diversified use of anthrax bacteriophages Gamma A-26 and 186 for identification and phagotyping of *B. anthracis* strains the spectrum of lytic activity of which includes all the strains studied.

Keywords: *Bacillus anthracis*, identification, specific anthrax bacteriophages, phagoresistance, phagotyping

Чувствительность к литическому действию специфических сибиреязвенных бактериофагов является характерным свойством типичных культур *B. anthracis* и лежит в основе одного из основных тестов идентификации. Вместе с тем литературные данные свидетельствуют о том, что сибиреязвенные бактериофаги различаются по широте спектра литического действия [1, 4], что может быть обусловлено индивидуальными биологическими особенностями как бактериофагов, так и штаммов микроба в целом или части их микробных популяций, что может затруднять объективную оценку теста. Исходя из этого представляет интерес не только изучение чувствительности штаммов сибиреязвенного микроба к специфическим бактериофагам, но и выявление в их популяции фагоре­зистентных культуральных вариантов с последующим перекрестным изучением их чувствительности к основным специфическим бактериофагам.

Цель работы – выявление особенностей литической активности наиболее применяемых в лабораторной практике специфических сибиреязвенных бактериофагов, определение закономерностей фа­

горе­зистентности сибиреязвенных культур к группам бактериофагов и разработка схемы одновременной идентификации и фаготипирования штаммов *B. anthracis*.

Материал и методы. В опытах применялись коммерческие препараты бактериофагов: Fah-VНИИВВиМ (1×10^8 бляшкообразующих единиц (БОЕ)/см³), R/D-Ph-6 (1×10^8 БОЕ/см³) в виде фаг-тест набора «Оболонск R1», Гамма А-26 ($1,1 \times 10^9$ БОЕ/см³), а также экспериментальные серии бактериофагов 186 ($2,3 \times 10^9$ БОЕ/см³), ВА-9 ($1,6 \times 10^9$ БОЕ/см³), Саратов ($8,6 \times 10^9$ БОЕ/см³), К ВИЭВ ($1,2 \times 10^9$ БОЕ/см³), которые были получены авторами в лаборатории сибирской язвы ФКУЗ Ставропольский противочумный институт.

В работе использовали штаммы микроорганизмов, полученные из лаборатории «Коллекция патогенных микроорганизмов» ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора: 114 штаммов *B. anthracis*, имеющих фенотипические и генетические различия. Чувствительность культур к литическому действию бактериофагов определяли классическим методом в соответствии с методическими указаниями МУК 4.2.2413-08 [2].

Фагорезистентные варианты культур получали, отбирая выросшие колонии из зон лизиса штаммов *B. anthracis* отдельными бактериофагами, отсеивали на агар Хоттингера и, при получении хорошего роста, определяли чувствительность ко всем бактериофагам.

Результаты и обсуждение. По широте спектра литического действия на 114 штаммов *B. anthracis* перечисленные бактериофаги разделились на две группы: к первой группе были отнесены бактериофаги Гамма А-26, ВА-9, R/D-Ph-6, лизирующие 99,1 % штаммов *B. anthracis*, ко второй – 186, Fah-ВНИИВВиМ, К ВИЭВ, Саратов, лизирующие 59,6–65,8 % этих же штаммов.

Оценка результатов теста на лизабельность специфическими бактериофагами проводили визуально по характеру изменений газонного роста тестируемой культуры в месте нанесения бактериофага от полного лизиса культуры (++++ – безусловно положительный результат) до абсолютного отсутствия следов нанесения бактериофага (– – безусловно отрицательный результат). Однако помимо таких результатов встречаются промежуточные варианты: наличие единичных или множественных изолированных колоний в зоне лизиса, четко очерченная зона лизиса с покрывающей ее едва заметной пленкой культуры. 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. Наибольшее затруднение вызывает оценка фагочувствительности штаммов при наличии множественных сливных колоний тестируемой культуры, носящих разреженный характер по отношению к окружающему газонному росту. При оценке по 4-крестовой системе (++) это оценивается как отрицательный результат. В то же самое время очевидно, что часть популяции штамма чувствительна, что особенно важно при идентификации культуры.

Чтобы проверить это предположение, нами были отобраны 10 штаммов *B. anthracis*: 5/1, 505/628, 542/151, 592/10, 646/294, 1194, 1198, 1204, WAUm 44, у которых в зонах лизиса бактериофагами 186, Fah-ВНИИВВиМ, К ВИЭВ, Саратов наблюдался рост культуры в виде пленки. Споры этих штаммов засеивали на чашки Петри с агаром Хоттингера (рН 7,4) таким образом, чтобы получить рост культуры в виде изолированных колоний. После инкубации в течение 24 ч в посевах всех штаммов выделялись два типа колоний: 1 – колонии шероховатые, неровные, с отростками, переходящие в завитки в виде локонов волос; 2 – шероховатые, но более гладкие и выпуклые блестящие, меньшие по размерам круглые с очень

мелким завитком по краю колоний. По существующей классификации колоний *B. anthracis*, первые из них относятся к R-типу, а вторые к S- или OS-типу [3].

Культуры, отобранные из колоний выраженных R- и S-типов, проверяли на чувствительность ко всем бактериофагам. Первые из них лизировались всеми бактериофагами, а вторые – только бактериофагами Гамма А-26, ВА-9; R/D-Ph-6 (рис. – А и Б). Результаты на чувствительность к бактериофагам исходного штамма 646/294 и смеси выделенных его вариантов R и S типов (рис. – В и Г) выглядели однотипно: лизис культуры происходил только под действием бактериофагов Гамма А-26, ВА-9 и R/D-Ph-6. Аналогичная закономерность в чувствительности к бактериофагам сходных по морфологии культуральных вариантов наблюдалась и у остальных штаммов.

Рис. Различная чувствительность культуральных вариантов двух типов *B. anthracis* к бактериофагам различных групп: А – вариант I типа в R-форме; Б – вариант II типа в OSS-форме; В – вариант II типа; Г – варианты I и II типа. В надписях на чашках обозначены бактериофаги: 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 10^6

Для выявления общих закономерностей фагорезистентности культур *B. anthracis* к различным специфическим бактериофагам представлялось целесообразным сопоставить фагочувствительность к различным бактериофагам вариантов штаммов, предварительно выделенным по признаку фагорезистентности к отдельным из них.

При постановке теста на фагочувствительность штаммов сибиреязвенного микроба из зон лизиса было отобрано 102 культуральных варианта штаммов *B. anthracis* по признаку устойчивости к тому или иному бактериофагу (табл.).

Таблица

Количество выделенных фагорезистентных вариантов *B. anthracis* по отношению к бактериофагам Гамма А-26, ВА-9, R/D-Ph-6, К ВИЭВ, Fah-ВНИИВВиМ, Саратов, 186 и характеристика их чувствительности к указанным бактериофагам

Варианты культур, выделенные по признаку резистентности к бактериофагам	Количество фагорезистентных вариантов	Из общего числа чувствительны к лизирующему действию бактериофагов						
		Гамма А-26	ВА-9	R/D-Ph-6	Fah-ВНИИВВиМ	К ВИЭВ	Саратов	186
Гамма А-26	3	0/0*	0/0	2/67	2/67	2/67	3/100	2/67
ВА-9	5	0/0	0/0	4/80	3/60	4/80	4/80	4/80
Fah-ВНИИВВиМ	32	31/97	31/97	31/97	1/3	0/0	0/0	0/0
К ВИЭВ	23	23/100	23/100	23/100	0/0	0/0	0/0	0/0
Саратов	20	20/100	20/100	20/100	0/0	0/0	0/0	2/10
186	17	17/100	17/100	17/100	0/0	0/0	0/0	0/0
R/D-Ph-6	2	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
Всего	102							

* 0/0 – количество лизирующихся культур/процент лизирующихся от общего числа культур.

Чаще всего выделялись культуры, резистентные к бактериофагам Fah-ВНИИВВиМ (32), К ВИЭВ (23), Саратов (20), 186 (17) – всего 92 культуры. Из них 88 (95,7 %) культур 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. Две из них были дополнительно чувствительны к бактериофагу 186, 1 культура была чувствительна к бактериофагу Fah-ВНИИВВиМ и 1 оказалась резистентной к действию всех бактериофагов.

Значительно реже выделялись варианты по признаку резистентности к лизирующему действию бактериофагов ВА-9 (5), Гамма А-26 (3) и R/D-Ph-6 (2). Все 10 культур были нечувствительны к бактериофагам Гамма А-26 и ВА-9, но 4 из них были чувствительны к бактериофагам R/D-Ph-6, Fah-ВНИИВВиМ, К ВИЭВ, Саратов, 186 и 1 была аналогична им, за исключением резистентности к бактериофагу Fah-ВНИИВВиМ. Остальные 5 культур отличались полирезистентностью к действию специфических сибиреязвенных бактериофагов – 4 были нечувствительны ко всем бактериофагам, 1 лизировалась только бактериофагом Саратов.

На основе анализа данных, приведенных в таблице, представляется возможным выделить 3 группы фагорезистентных вариантов штаммов *B. anthracis*, имеющие общие закономерности внутри каждой группы в чувствительности к изученным бактериофагам:

- 1) культуральные варианты, выделенные по признаку резистентности к бактериофагам Гамма А-26 и ВА-9;
- 2) культуральные варианты, выделенные по признаку резистентности к бактериофагам К ВИЭВ, Fah-ВНИИВВиМ, Саратов, 186;
- 3) культуральные варианты, выделенные по признаку резистентности к бактериофагу R/D-Ph-6.

Культуральные варианты первой группы, выделенные по признаку резистентности к бактериофагам Гамма А-26 и ВА-9, составили 7,8 % от общего числа и сохраняли фагорезистентность к обоим бактериофагам, при этом резистентность к литическому действию остальных бактериофагов проявлялась лишь в 18–38 %.

Фагорезистентные варианты второй группы составляли 90,2 % и еще более четко демонстрировали различия в чувствительности к различным группам

бактериофагов. Резистентным к действию бактериофагов Гамма А-26, ВА-9 R/D-Ph-6 оказался только 1 % культур (1 вариант был резистентен к действию всех бактериофагов), тогда как 98–100 % из них были устойчивы к специфическому действию бактериофагов К ВИЭВ, Fah-ВНИИВВиМ, Саратов, 186.

Немногочисленные культуральные варианты *B. anthracis* третьей группы – 2,0 % (2) были резистентны к действию всех использованных в работе бактериофагов. В отличие от результатов воздействия на штаммы *B. anthracis* в целом, по литическому действию на их фагорезистентные варианты все изученные бактериофаги можно разделить на три группы:

- 1) Гамма А-26, ВА-9;
- 2) К ВИЭВ, Fah-ВНИИВВиМ, Саратов, 186;
- 3) R/D-Ph-6.

Бактериофаги первой группы по результатам воздействия на все 102 фагорезистентных варианта давали 100 %-ное совпадение (92 положительных, 10 отрицательных) результатов.

Бактериофаги второй группы наиболее часто выявляют резистентные по отношению к ним варианты штаммов *B. anthracis*, причем в зоне лизиса нередко находятся множественные резистентные колонии, затрудняющие учет результатов теста. Совпадение результатов определения чувствительности к бактериофагам этой группы вариантов, выделенных по признаку резистентности к отдельным из них, составляло 96,8 %.

Бактериофаг R/D-Ph-6 несколько отличается по своему спектру литической активности от бактериофагов первой и второй группы. Он, так же как и бактериофаги Гамма А-26 и ВА-9, лизировал все культуральные варианты, выделенные по признаку резистентности к бактериофагам второй группы, но, кроме того, лизировал и 62,5 % вариантов, выделенных по признаку резистентности к бактериофагам первой группы. Применение данного бактериофага позволило выделить наименьшее количество резистентных культур (2), которые оказались нечувствительны к действию всех бактериофагов. Из общего числа фагорезистентных культур (102) бактериофагом R/D-Ph-6 не лизировалось наименьшее количество культур (5). Все они были резистентны ко всем испытанным бактериофагам.

При анализе полученных результатов становится очевидным, что для выявления особенностей культур *B. anthracis* по чувствительности к специфическим бактериофагам достаточно применения двух бакте-

риофагов из различных групп по широте литического спектра. Нами были выбраны бактериофаги Гамма А-26 и 186.

Таким образом, в результате проведенных исследований были выявлены различия в чувствительности к литическому действию сибиреязвенных бактериофагов штаммов *B. anthracis* и их вариантов, имеющих различия по культурально-морфологическим свойствам. Учитывая значительную частоту встречаемости штаммов *B. anthracis* и их культуральных вариантов, нечувствительных к специфическому действию бактериофагов К ВИЭВ, Fah-ВНИИВВиМ, Саратов, 186, а также общность культурально-морфологических свойств этих культур, нами была поставлена задача разработать схему комплексного применения сибиреязвенных бактериофагов с различным спектром специфической активности с целью идентификации и фаготипирования штаммов сибиреязвенного микроба.

Наиболее различающиеся по спектру специфической активности, как в отношении штаммов *B. anthracis*, так и их различных фактрезистентных культуральных вариантов, были группы бактериофагов Гамма А-26, ВА-9 и К ВИЭВ, Fah-ВНИИВВиМ, Саратов, 186, а в совокупности они лизировали все изученные 114 штаммов. Исходя из этого нами были выбраны представители этих двух групп для их комплексного применения в целях одновременной идентификации и фаготипирования штаммов сибиреязвенного микроба. Из первой группы был выбран бактериофаг Гамма А-26 (при равной с ВА-9 специфической активности бактериофаг Гамма А-26 выпускается в виде коммерческого препарата). Из второй группы бактериофагов предпочтение в применении для фаготипирования штаммов сибиреязвенного микроба было отдано бактериофагу 186, так как он лизировал большее количество штаммов – 65,7 % и обеспечивал более четкие результаты теста по сравнению с другими бактериофагами этой группы – большой процент положительных результатов на 4+ и абсолютно отрицательных результатов.

На основании изложенного была разработана следующая схема проведения комплексного теста

для одновременной идентификации и фаготипирования штаммов сибиреязвенного микроба. В основе теста лежит параллельное определение чувствительности штаммов *B. anthracis* к бактериофагам Гамма А-26 и 186 чашечным методом. Тестирование сопровождается двумя контролями: положительным – *B. anthracis* СТИ, отрицательным – близкородственный сапрофит рода *Bacillus*, резистентный к действию сибиреязвенных бактериофагов.

При наличии у изучаемого штамма чувствительности к литическому действию хотя бы к одному из двух бактериофагов идентификационный тест можно считать положительным. В зависимости от наличия чувствительности к литическому действию обоих бактериофагов или одного из них определяется один из 3 фаготипов:

- фаготип 1 – культура чувствительна к обоим бактериофагам;
- фаготип 2 – культура чувствительна только к бактериофагу Гамма А-26;
- фаготип 3 – культура чувствительна только к бактериофагу 186.

При фаготипировании предлагаемым методом 114 штаммов *B. anthracis* идентификационный тест был положителен у всех штаммов, к фаготипу 1 принадлежали 74,6 %, к фаготипу 2 – 24,5 % и к фаготипу 3 – 0,9 % исследованных штаммов. Наиболее типичными являются штаммы, относящиеся к фаготипу 1. Штаммы фаготипов 2 и 3 представляют интерес для всестороннего изучения их биологических фенотипических и генетических свойств.

Заключение. Различия в спектре специфической активности сибиреязвенных бактериофагов обосновывают их комплексное применение, обеспечивающее идентификацию 100 % штаммов *B. anthracis*.

Помимо обеспечения проведения одного из основных тестов идентификации штаммов возбудителя сибирской язвы, специфические бактериофаги являются инструментом в изучении их индивидуальных особенностей и свойств и способны выявлять культуры различных фаготипов, представляющие интерес для изучения биологических особенностей атипичных штаммов *B. anthracis*.

Литература

1. Головинская, Т. М. Разработка биотехнологии репродукции сибиреязвенных бактериофагов и оценка стабильности их свойств и диагностической ценности / Т. М. Головинская, О. И. Цыганкова, А. Н. Куличенко // Проблемы особо опасных инфекций. – 2013. – № 4. – С. 104–107.
2. Методические указания МУК 4.2.2413-08 «Лабораторная диагностика и обнаружение возбудителя сибирской язвы» – М., 2008.

References

1. Golovinskaya T. M., Tsygankova O. I., Kulichenko A. N. *Problemy osobo opasnykh infektsij. – Problems of particularly dangerous infections.* 2013;4:104-107.
2. Metodicheskie ukazaniya MUK 4.2.2413-08 Laboratornaya diagnostika i obnaruzhenie возбуdivelja sibirskoj jazvy. М.: 2008.
3. Marinin L. I., Dyatlov I. A., Vokrievich A. N., Bakhtetva I. V., Belova E. V., Borsilov A. I., Kombarova T. I., Kravchenko T. B., Mironova R. I., Popova V. M., Somov A. N.,

3. Методы изучения биологических свойств возбудителя сибирской язвы / Л. И. Маринин, И. А. Дятлов, А. Н. Мокриевич [и др.]. – М.: ЗАО «Гигиена», 2009. – 304 с.
4. Саяпина, Л.В. Характеристика нового бактериофага диагностического сибиреязвенного Гамма А-26 жидкого / Л. В. Саяпина, А. С. Абдрашитова, И. В. Касина [и др.] // Биопрепараты. – М., 2011. – № 1 (41). – С. 36–39.

Titareva G. M., Tyurin E. A., Chekan L. V., Shishkina O. B., Shishkova N. A. *Metody izuchenija biologicheskikh svojstv возбуdivelja sibirskoj jazvy.* М.: ЗАО «Гигиена»; 2009. 304 p.

4. Sayapina L. V., Abdrashitova A. S., Kasina I. V., Malakhayeva A. N., Raschepkin L. I., Osin A. V., Lyashova O. Yu., Valova T. V., Popov Yu. A., Mikshin N. I., Buravtseva N. P., Mironova N. P., Lobovikova O. A., Mokriyevich A. N., Gefan N. G. *Biopreparaty. – Biologicals.* 2011;1(41):36-39.

Сведения об авторах:

Цыганкова Ольга Ивановна, доктор медицинских наук, ведущий научный сотрудник лаборатории сибирской язвы; тел.: (8652)260312, 89054967529; e-mail: anthraxlab.stv@mail.ru

Головинская Татьяна Михайловна, научный сотрудник; тел.: (8652)260312, 89097622520; e-mail: anthraxlab.stv@mail.ru

Буравцева Нина Павловна, доктор медицинских наук, главный научный сотрудник; тел.: (8652)260312, 89054965463; e-mail: anthraxlab.stv@mail.ru