

Mikoulińskaia G.V., Zimin A.A., Stepnaya O.A.

Keywords: *endolysin, bacteriophage T5, L-alanoyl-D-glutamate peptidase, enzybiotics*

The range of antibacterial action of new bacteriophage T5 endolysin – cation-dependent L-alanoyl-D-glutamate peptidase - was investigated. It was shown that the enzyme is specific to the cell walls of the Gram-negative microorganisms, containing peptidoglycan of A1γ type. It was shown that the enzyme completely lyses live bacteria cells after polymyxin B treatment. It makes T5 peptidase a potential candidate for the use as an enzybiotic of directed action.

УДК 578.81, 578.52, 615.076.7

ПЦР-СИСТЕМА ТИПИРОВАНИЯ ТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ БАКТЕРИОФАГОВ *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

*Мирошников К.А., кандидат биологических наук, и.о. зав. лабораторией
ФГБУН «Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина
и Ю.А. Овчинникова» РАН, kmi@ibch.ru*

*Сыкилинда Н.Н., кандидат биологических наук, старший научный сотрудник
ФГБУН «Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина
и Ю.А. Овчинникова» РАН, sykilinda@mail.ru*

*Куликов Е.Е., кандидат биологических наук, старший научный сотрудник
ФГБУН «Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского» РАН, eumenius@
gmail.com*

*Дурманова З.В., ведущий инженер ФГБУ «НЦЭСМП» МЗ РФ
тел. 7(499) 241-31-05, giskfag@rambler.ru*

*Цыганова М.Р., аспирант ФГБУН «Институт биоорганической химии им.
академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова» РАН*

*Дарбеева О.С., кандидат медицинских наук, главный эксперт
ФГБУ «НЦЭСМП» МЗ РФ*

Ключевые слова: *бактериофаги, Pseudomonas aeruginosa, фаготерапия, генотипирование, полимеразная цепная реакция*

*В ходе данной работы разработана ПЦР-тестовая система определения таксономической принадлежности бактериофагов *P.aeruginosa* в контексте возможности использования фагов в терапевтических препаратах*

Введение: Для терапии синегнойных инфекций успешно применяются бактериофаги, в том числе и промышленно выпускаемые. Принципы селекции терапевтических бактериофагов в настоящее время в основном эмпирические, и не имеется строгой описательной базы, основанной на генетических данных. Некоторые из требований, предъявляемых к бактериофагам, используемым в составе терапевтических смесей, неразрывно связаны с изучением их генома. Знание полной последовательности генома фага позволяет проверить наличие генных

модулей рекомбинации или транспозиции, свойственных умеренным фагам, генов факторов вирулентности или токсинов. Однако полное секвенирование геномов остается достаточно дорогой процедурой, особенно с учетом быстро меняющихся составов фаговых препаратов при адаптации их к новым штаммам патогенных микроорганизмов. В качестве более дешевой и технологичной альтернативы предложена система быстрого типирования имеющихся и *de novo* выделяемых бактериофагов *Pseudomonas aeruginosa* на основе ПЦР-анализа, и на этом основании приведение состава терапевтических смесей фагов к оптимуму по генетическому составу. Сконструированная нами система быстрого отнесения на основе ПЦР-анализа имеющихся и *de novo* выделяемых бактериофагов синегнойной палочки *P.aeruginosa* к определенным группам позволяет определить пригодность тестируемого бактериофага к применению в составе терапевтических смесей фагов.

Результаты исследований и их обсуждение:

1. Анализ геномов бактериофагов *P. aeruginosa*.

На сегодняшний день в GenBank содержится более 60 полных геномов бактериофагов *P.aeruginosa*, что составляет 4% всех полностью секвенированных фагов. Практически исключительно в состав известных фаговых коктейлей входят бактериофаги *Caudovirales* (хвостатые). Имеющиеся в базе данных GenBank бактериофаги этого отряда можно подразделить следующим образом (табл. 1):

Таблица 1 - Свойства групп известных бактериофагов *P.aeruginosa*

№	Группа фагов	Семейство	Размер генома, т.п.о	Число геномов	Жизненный цикл
1	φKZ-подобные	<i>Myoviridae</i>	211-316	6	Литический
2	PB1- подобные	<i>Myoviridae</i>	65-66	8	Литический
3	KMV- подобные	<i>Podoviridae</i>	42-43	8	Литический
4	N4- подобные	<i>Podoviridae</i>	74	2	Литический
5	YuA- подобные	<i>Siphoviridae</i>	59-59	3	Литический
6	LUZ24- подобные	<i>Podoviridae</i>	45	2	Варьирует
7	D3- подобные	<i>Siphoviridae</i>	56-57	6	Умеренный
8	P2- подобные	<i>Myoviridae</i>	35-36	2	Умеренный
9	119X- подобные	<i>Podoviridae</i>	42-43	2	Умеренный
10	Лямбдоидные	<i>Siphoviridae</i>	43-44	2	Умеренный
11	F10- подобные	<i>Siphoviridae</i>	39-40	2	Умеренный
12	F116- подобные	<i>Siphoviridae</i>	65	1	Умеренный
13	транспозоны	<i>Siphoviridae</i>	37-39	5	Умеренный

Частичное секвенирование *de novo* выделенных из природных источников бактериофагов *P.aeruginosa* показывает, что в подавляющем большинстве случаев их можно отнести к одному из вышеописанных видов. Таким образом, можно сделать некоторые предварительные выводы по пригодности тех или иных бактериофагов для терапевтических приложений:

1. Группы фагов 1-4 с достаточно высокой степенью уверенности можно тестировать в качестве составной части фаговых коктейлей.

2. Фаги из групп 5-8 можно рассматривать как кандидатные. Однако следует учитывать генетически заложенную возможность лизогенной конверсии и проводить интенсивную проверку на проявление умеренных свойств на широком спектре штаммов.

3. Фаги групп 9-13, способные к активной интеграции-транспозиции и токсической конверсии бактерий, должны быть исключены из использования в терапевтических целях.

За исключением фагов-транспозонов группы 13, объединяемых преимущественно по типу действия, а не по формально таксономическому родству, и отчасти группы 1, имеющей широкую вариабельность геномов на нуклеотидном уровне, выделенные группы бактериофагов сохраняют весьма высокую консервативность геномов. Основные различия геномов, определяющие принадлежность фага к отдельному виду, обычно находятся в высоко-вариативной области ранних генов, определяющих взаимодействия с клеточными системами хозяина, а также в генах хвостовых фибрилл и шипов, обуславливающих опознавание рецепторов на поверхности клеток-хозяев.

2. Разработка ПЦР-системы определения генетической принадлежности бактериофагов

Анализ геномов бактериофагов показывает, что наиболее консервативными внутри каждой группы являются гены, кодирующие белковые продукты, формирующие структурные компоненты частицы фагов – икосаэдрическую головку (капсид) и хвост. Во всех случаях в качестве реперных консервативных генов были использованы гены мажорных или минорных белков капсидов. Были сконструированы и оптимизированы последовательности праймеров для всех групп литических бактериофагов, и проведены ПЦР с использованием модельных фагов для определения оптимальных условий реакции.

Во всех случаях специфических праймеров к конкретным группам фагов образование единичного продукта со сходным количественным выходом наблюдалось в диапазоне температур отжига 57-64 °С и концентрации Mg^{2+} 0,5 – 2,0 мМ. Установленная последовательным разбавлением матрицы чувствительность ПЦР-системы соответствует концентрации бактериофага 2 пг в пробе. Таким образом, минимально определяемой с помощью ПЦР тест-системы концентрацией бактериофагов в растворе примерно является 10^3 частиц бактериофага в 1 мл раствора. Внесение «искусственного загрязнения» - бактериальной ДНК *E.coli* в реакционную смесь в количестве до 200 нг заметного влияния на чувствительность реакции не оказывает. Тестирование селективности ПЦР-системы было проведено в отношении тех групп бактериофагов *P.aeruginosa*, для которых имеются репрезентативные коллекции, включающие не менее 10 бактериофагов, принадлежащих к определенной группе. В случае КМV-подобных, РВ1-подобных и YuA-подобных фагов ПЦР тест давал положительный сигнал в случае всех бактериофагов коллекции.

3. ПЦР-проверка наличия бактериофагов в коммерческих терапевтических препаратах.

Разработанные реакционные смеси для ПЦР-тестирования для всех основных известных типов литических бактериофагов, наличие которых с наибольшей вероятностью можно ожидать в промышленных терапевтических смесях фагов против псевдомонадных инфекций, были применены к промышленно производимым смесям лекарственных препаратов. Для промышленных терапевтических смесей синегнойных бактериофагов, предоставленных ГИСК им. Тарасевича, были получены следующие результаты:

№1 - Бактериофаг синегнойный, Нижний Новгород, 100 мл, партия 11.07	KMV
№2 - Бактериофаг синегнойный, Нижний Новгород, 100 мл, партия 06.08	KMV
№3 - Бактериофаг синегнойный, Нижний Новгород, 100 мл, партия 08.08	KMV
№4 - Бактериофаг синегнойный, Нижний Новгород, 100 мл, партия 11.08	KMV
№5 - Бактериофаг синегнойный, Пермь, 20 мл, партия 01.10	KMV+ φKZ
№6 - Бактериофаг синегнойный, Пермь, 20 мл, партия 02.10	KMV+ φKZ

Таким образом, во всех смесях было установлено наличие *Podoviridae* КМV-подобных бактериофагов, и в двух смесях – наличие *Myoviridae* φKZ – подобных фагов. Обе группы фагов принадлежат к вирулентным, допустимым к применению в терапевтических смесях.

4. Титрование терапевтических смесей на штаммах *P.aeruginosa* и ЭМ-анализ.

Принимая во внимание широкий штаммовый диапазон действия терапевтических смесей (больше, чем для каждого из известных индивидуальных бактериофагов), декларированное наличие в смесях нескольких типов фагов, и ограничение ПЦР-системы по чувствительности (уверенное определение фагов в концентрации $> 10^3$ бое), мы провели титрование терапевтических смесей для оценки количества негативных колоний (НК) различной морфологии. По результатам эксперимента в препаратах 1-4 достоверно подтверждается подавляющее количественное преимущество КМV-подобных фагов, что соответствует результатам исходного ПЦР-теста. Были проведены ПЦР-тесты с материалом, взятым из индивидуальных НК. Было еще раз подтверждено наличие КМV-подобных фагов во всех смесях и установлено наличие φKZ-подобных фагов в смесях №5 и 6. Поскольку титрование смесей в большинстве случаев давало несколько типов НК (бляшек) на газоне клеток *P.aeruginosa*, была проведена ЭМ-визуализация бактериофагов, входящих в состав смесей. Наблюдения подтвердили наличие во всех смесях бактериофагов семейства *Podoviridae*, относящихся к группе КМV-подобных, и крупных *Myoviridae* бактериофагов, относящихся к группе φKZ-подобных, в материале препаратов 5 и 6.

Помимо этого, как в материале терапевтических смесей, так и в материале негативных колоний наблюдалось небольшое количество бактериофагов более мелких *Myoviridae* и небольших *Siphoviridae* бактериофагов, причем в материале некоторых негативных колоний были выше и концентрация примесных бактериофагов, и их разнообразие. ПЦР-сигнала дополнительно обнаруженные бактериофаги не дают, то есть либо их концентрация составляет величину ниже предела детекции ПЦР-системы, либо эти фаги относятся к группам, на геном которых детекционная система не разрабатывалась. Мы предположили следующие причины присутствия неидентифицированных бактериофагов в терапевтических смесях:

1. Поскольку состав образцов фаговых препаратов, из которых составляется терапевтическая смесь, охарактеризован недостаточно, возможно, что в образцах содержатся фаги нескольких видов. Такие фаги менее активны, и их влияние на общую активность препарата невелико. Однако так как это тоже псевдомонадные фаги, в культуре ферментации они также размножаются. Вероятно, на некоторых штаммах активность таких минорных фагов возрастает, и в материале бляшек их пропорция более заметна.

2. Все известные геномы штаммов *P.aeruginosa* содержат в своем составе группы генов, идентифицируемые как профаги, т.е. лизогены, захваченные в ходе эволюции. В литературе обсуждается возможность активации профагов как одного из ответов бактерий на массовую инфекцию бактериофагами. Генетика умеренных фагов, а тем более профагов *P.aeruginosa* изучена плохо, поэтому детекции таких вторичных фагов системой ПЦР не происходит.

Оба этих эффекта требуют дальнейшего углубленного изучения, однако следует заметить, что и доля таких «вторичных» фагов, и их активность значительно ниже, чем литических

KMV- и фKZ-подобных фагов, составляющих основное содержание терапевтических смесей.

Заключение: На основе обобщенных геномных данных создана унифицированная ПЦР-система, которая позволяет определять групповую принадлежность бактериофагов *P. aeruginosa*, выделенных *de novo* и находящихся в плохо охарактеризованных коллекциях без проведения длительных культуральных работ, электронной микроскопии и полной расшифровки последовательностей геномов. Определение таксономической принадлежности бактериофагов *P.aeruginosa* позволяет оценить возможность использования этих фагов в терапевтических препаратах

PCR SYSTEM FOR GENOTYPING OF THERAPEUTIC *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* BACTERIOPHAGES

Miroshnikov K.A., Sykilinda N.N., Kulikov E.E., Durmanova Z.V., Tsyganova M.R., Darbeeva O.S.

Keywords: *bacteriophages, Pseudomonas aeruginosa, phage therapy, genotyping, polymerase chain reaction*

The goal of the present work is the design of PCR-testing system directed for taxonomic determination of P.aeruginosa bacteriophages for use in therapeutic preparations.

УДК 619:579

РАЗРАБОТКА ПАРАМЕТРОВ УСКОРЕННОЙ ИНДИКАЦИИ БАКТЕРИЙ *ESCHERICHIA COLI* O157 С ПОМОЩЬЮ РЕАКЦИИ НАРАСТАНИЯ ТИТРА ФАГА

Молофеева Н.И., кандидат биологических наук, доцент

Васильев Д.А., доктор биологических наук, профессор

8(8422) 55-95-47, dav_ul@mail.ru

Золотухин С.Н., доктор биологических наук, профессор

тел. 8(8422) 55-95-47, fvt.zol@yandex.ru

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

Ключевые слова: *индикация, бактерии, бактериофаги, реакция нарастания титра фага.*

*Работа посвящена разработке технологических параметров по ускоренной идентификации бактерий рода *Escherichia coli* O157 с помощью реакции нарастания титра фага.*

Введение. *Escherichia coli* являются распространенными возбудителями инфекционных заболеваний желудочно-кишечного тракта у животных и человека [5, 6].

В научной литературе имеется большое число сообщений о заболевании людей, протекающих в тяжелой форме, вызванных *E. coli* сероваром O157, который образует шиггеподобный вероцитотоксин [5, 7]. Вспышки этой инфекции, зарегистрированы во многих странах Северной и Южной Америки, Австралии, Европы, Азии, Африки и в нашей стране. Эшерихии