

Васильев [и др.] // Вестник УГСХА. – 2011. - №1(13) – С. 79-84

13. Boyce T.G., Swerdlow D.L., Griffin P.M. // New Engl. J. Med., V. 333, 1995, p. 364-368.

14. <http://www.ecdc.europa.eu>.

BIOLOGICAL CHARACTERISTICS OF PHAGES *ESCHERICHIA COLI* O157 TO CREATE DIAGNOSTIC PREPARATION

Molofeeva N.I., Vasilev D.A., Zolotukhin S.N.

Key words: *Bacteria, bacteriophages, enterobacteria, lytic activity and specificity.*

The work is devoted to the allocation and study of the basic biological properties of bacteriophages of bacteria Escherichia coli O157. During the research the authors allocated 3 strain of phage and studied their biological properties.

УДК 578.81

МИКРОБИОЛОГИЧЕСКАЯ И МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА БАКТЕРИОФАГА AP22, СПЕЦИФИЧЕСКИ ИНФИЦИРУЮЩЕГО ШИРОКИЙ СПЕКТР ШТАММОВ *ACINETOBACTER BAUMANNII*

Попова А.В., кандидат биологических наук, popova_nastya86@mail.ru

Мякинина В.П.,

Богун А.Г., кандидат биологических наук, bogun62@mail.ru

Воложанцев Н.В., кандидат биологических наук, nikvol@obolensk.org

ФБУН «ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Ключевые слова: *бактериофаг, Acinetobacter baumannii, геномный анализ.*

*Данная работа посвящена микробиологической и молекулярно-генетической характеристике вирулентного бактериофага, специфически инфицирующего и лизирующего широкий спектр клинических штаммов *A. baumannii*.*

Введение. Одним из наиболее значимых возбудителей внутрибольничных инфекций во всем мире является представитель группы неферментирующих грамотрицательных аэробных бактерий – *Acinetobacter baumannii*, который характеризуется резистентностью к большинству доступных на сегодняшний день антибиотиков, дезинфектантов, устойчивостью к УФ-облучению и высушиванию, способностью к образованию биопленок на различных биотических и абиотических поверхностях. Инфекции, вызываемые *A. baumannii*, представляют серьезную терапевтическую проблему, особенно у иммунокомпрометированных больных ожоговых отделений, отделений реанимации и интенсивной терапии, где *A. baumannii* часто становится причиной развития госпитальных пневмоний, раневых инфекций, постхирургических осложнений, бактериемий, септицемий, сепсиса (Peleg et al., 2008; Towner, 2009).

В связи с этим существует острая проблема поиска и разработки новых антибактери-

альных средств, активных в отношении *A. baumannii*. Применение литических бактериофагов – один из возможных путей решения данной проблемы. Однако в настоящее время, как в нашей стране, так и за рубежом, не существует препаратов бактериофагов для контроля внутрибольничных *A. baumannii*-инфекций. Это связано, в первую очередь, с отсутствием коллекций перспективных фагов, которые могли бы быть использованы для разработки лечебных препаратов, а также с узким спектром антибактериальной активности известных литических фагов, инфицирующих *A. baumannii*.

Материалы и методы исследований.

В работе использовали 130 штаммов *A. baumannii*, выделенных из клинического материала от госпитализированных больных в стационарах различного профиля городов Челябинска (n = 89), Нижнего Новгорода (n = 20), Москвы (n = 12), Санкт-Петербурга (n = 9) в 2005-2010 гг., а также бактерии других геномовидов *Acinetobacter* (n = 18) и бактерии других родов и семейств: *Pseudomonas aeruginosa* (n = 5), *Escherichia coli* (n = 3), *Yersinia pseudotuberculosis* (n = 3), *Yersinia enterocolitica* (n = 3), *Klebsiella pneumoniae* (n = 3), *Klebsiella oxytoca* (n = 3), *Enterobacter cloacae* (n = 3), *Pasteurella multocida* (n = 3) и *Salmonella Enteritidis* (n = 3), полученные из коллекции НИИ антимикробной химиотерапии СГМА г. Смоленска и «ГКПМ-Оболенск» ФБУН ГНЦ ПМБ.

Выделение бактериофагов, лизирующих бактерии рода *Acinetobacter*, из образцов клинического материала и проб из окружающей среды, а также наработку, очистку и концентрирование фаголизата проводили, как описано ранее (Порова et al., 2012).

Для изучения спектра литической активности и биологических свойств бактериофага использовали методы, предложенные М. Adams (1959), с нашими модификациями (Попова и др., 2012, Dubrovin et al., 2012, Порова et al., 2012).

ДНК бактериофагов выделяли методом депротеинизации очищенных в градиенте хлористого цезия фаговых частиц с использованием лизирующей смеси, содержащей 0,5 % SDS,

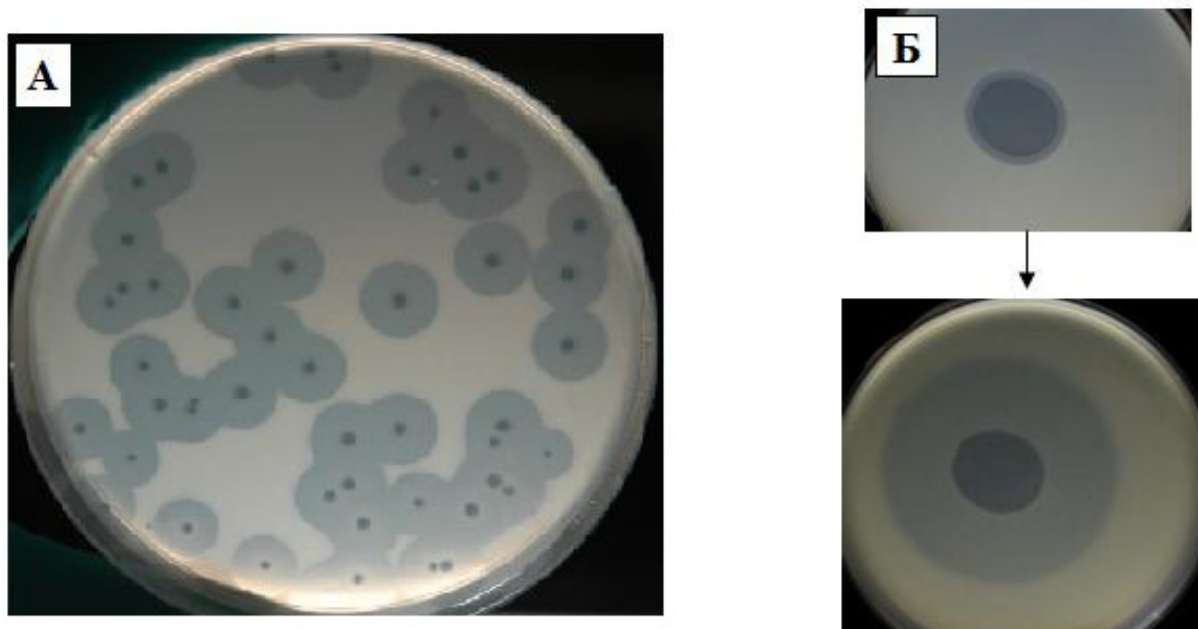


Рис. 1 – Зоны лизиса бактериального «газона» штамма *A. baumannii* 1053, формируемые фагом AP22 на плотной питательной среде: А. Морфология негативных колоний фага с ореолами; Б. Пятно лизиса бактериофага, окружённое ореолом (наверху: через 18 ч инкубации при температуре 37 °С, внизу – через 30 ч последующего хранения при температуре 4 °С)

20 мМ ЭДТА и 50 мкг/мл протеиназы К. ДНК экстрагировали смесью фенол/хлороформ (1:1) и переосаждали этиловым спиртом с ацетатом натрия.

Секвенирование ДНК проводили по методу Сэнгера на приборах ABI PRISM 310 (Applied BioSystem, США) и MegaBace (Amersham Biosciences, США) с программным обеспечением Cimagron 3.12.

Результаты исследований и их обсуждение.

В ходе анализа образцов клинического материала и проб из окружающей среды, был выделен бактериофаг, получивший авторское название AP22, обладающий широким спектром антибактериального действия по отношению к клиническим штаммам *A. baumannii*.

На культуре чувствительных бактериальных штаммов *A. baumannii* бактериофаг AP22 формирует круглые прозрачные негативные колонии с ровными краями, окружённые непрозрачными ореолами, которые увеличиваются в размере с течением времени (рис.1). В соответствии с морфологическими параметрами, согласно Международной классификации и таксономии вирусов, бактериофаг AP22 отнесен к семейству *Myoviridae*, морфотипу A1 (Popova et al., 2012).

Бактериофаг AP22 лизирует в общей сложности 68 % (89 из 130) клинических штаммов *A. baumannii* и не обладает литической активностью по отношению к представителям других геномовидов *Acinetobacter*, а также бактериям других родов и семейств (Попова и др., 2012).

В экспериментах по определению времени адсорбции и одиночного цикла размножения бактериофага AP22 показано, что более 99 % фаговых частиц адсорбируются в течение 5 мин, длительность латентного периода составляет 40 мин, средний выход фаговых частиц в расчёте на одну инфицированную бактериальную клетку составляет 240 частиц, что свидетельствует о высокой урожайности исследуемого фага (Popova et al., 2012).

При изучении динамики инфекционного процесса фага AP22, установлено, что при значениях множественности инфицирования (МОИ), составляющих 50 и пять фаговых частиц на одну бактериальную клетку, бактериофаг полностью лизирует жидкую культуру штамма-хозяина через 60 мин после начала фаговой инфекции, в то время как при МОИ=0,5 лизис происходит через 2 ч.

На сегодняшний день многие вопросы, связанные с практическим использованием бактериофагов, могут быть решены на стадии изучения фагового генома: это и тип развития фага, и наличие генов, кодирующих потенциально опасные продукты, устойчивость к антибиотикам и т.д. Поэтому одна из задач наших исследований предусматривала определение полной нуклеотидной последовательности бактериофага AP22. Секвенирование нуклеотидных последовательностей ДНК проводили с использованием метода Сэнгера. Геном бактериофага содержит 46387 п.н. с Г-Ц составом 37,74 %.

С помощью биоинформационных программ GeneMark.hmm и Soft-Berry FGENE в геноме фага AP22 было выявлено 89 открытых рамок считывания (ОРС), кодирующих предполагаемые пептиды размером не менее 35 а.о., из которых 77 ОРС располагаются на прямой, 12 – на обратной цепях ДНК.

При сравнении аминокислотных последовательностей потенциальных белков фага AP22 с известными протеинами с помощью BLASTP, определены возможные функции 25 % (22 из 89) из них; 60 % (54 из 89) ОРС кодируют гипотетические белки с неизвестными функциями, представленные в базах данных; предполагаемые продукты 15 % ОРС (13 из 89) не имеют сходства с какими-либо фаговыми или бактериальными протеинами. Показано, что 18 % (16 из 89) ОРС AP22 кодируют полипептиды, обладающие гомологией с протеинами *Acinetobacter* spp. с неизвестной функцией, 57 % (51 из 89) ОРС гомологичны фаговым протеинам.

Сравнительный геномный анализ выявил существенную гомологию между бактериофагом AP22 и фагом AB1 (Yang et al., 2010) также инфицирующим *A. baumannii*: гомология определена для 53 из 89 предполагаемых генов. Кроме того, по одному из предсказанных протеинов AP22 обладают гомологией с белками бактериофагов *Staphylococcus* 52A (ORF032), *Salmonella* E1 и *Burkholderia* ВсерС6В (gp36).

Геном бактериофага AP22 имеет модульную организацию и включает гены, кодирующие структурные протеины (белок капсида, белки хвостового отростка, базальной пластинки, хвостовых фибрилл и выростов), ферменты, ответственные за лизис бактериальной клетки-хозяина (фаговый лизоцим – эндолизин и потенциальный холин) и компоненты системы репликации ДНК и нуклеотидного обмена (рис.2).

Следует подчеркнуть, что в геноме фага AP22 не идентифицировано ни одного гена, кодирующего токсины или какие-либо известные факторы вирулентности. Кроме того, не выявлены гены, определяющие умеренный (лизогенный) путь развития бактериофага.

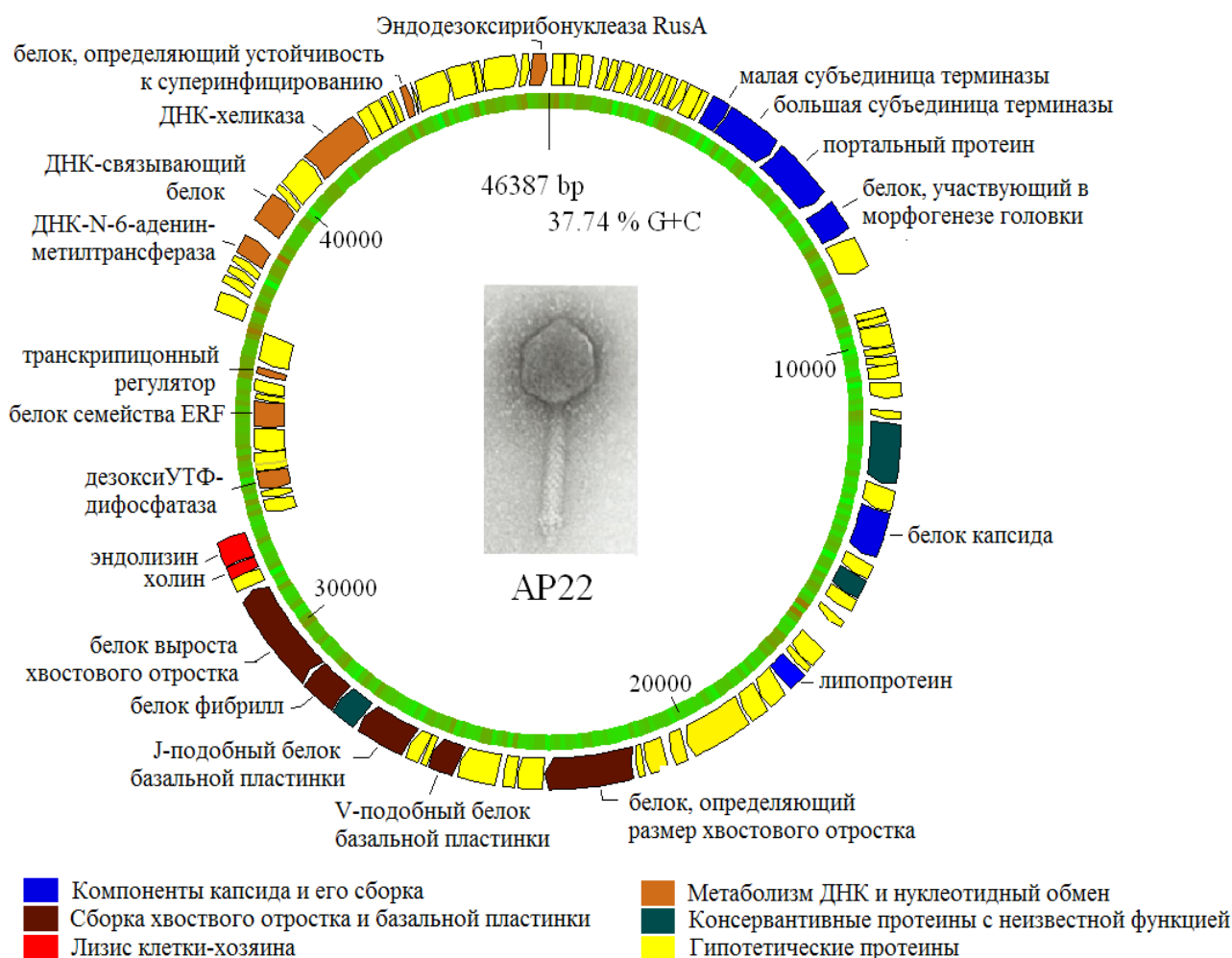


Рис. 2 – Геномная карта бактериофага AP22 с указанием функций предсказанных белковых продуктов в геноме фага

Таким образом, на основании данных микробиологического, геномного и биоинформационного анализов бактериофаг AP22 можно рассматривать в качестве потенциального компонента препарата для лечения инфекций, вызванных *A. baumannii*, и использовать для иден-

тификации бактерий данного вида при бактериологическом анализе клинического материала.

Библиографический список

1. Попова, А. В. Молекулярно-генетическая характеристика антибиотико-устойчивых штаммов *Acinetobacter baumannii* и оценка их чувствительности к бактериофагу AP22 / А. В. Попова, В. П. Мякина, М. Е. Платонов, Н. В. Воложанцев // Мол. генетика, микробиол., вирусол. – 2012. – № 4. – С. 18-22.
2. Dubrovin, E. V. Atomic force microscopy analysis of the *Acinetobacter baumannii* bacteriophage AP22 lytic cycle / E. V. Dubrovin, A. V. Popova, S. V. Kraevskiy, S. G. Ignatov, T. E. Ignatyuk, I. V. Yaminsky, N. V. Volozhantsev // PLoS ONE. – 2012. – Vol. 7. – N 10. – e47348.
3. Peleg, A. Y. *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen / A. Y. Peleg, H. Seifert, D. L. Paterson // Clin. Microbiol. Rev. – 2008. – Vol. 21. – N 3. – P. 538-582.
4. Popova, A. V. Isolation and characterization of wide host range lytic bacteriophage AP22 infecting *Acinetobacter baumannii* / A. V. Popova, E. L. Zhilenkov, V. P. Myakinina, V. M. Krasnikova, N. V. Volozhantsev // FEMS Microbiol. Lett. – 2012. – Vol. 332. – N 1. – P. 40-46.
5. Towner, K. J. *Acinetobacter*: an old friend, but a new enemy / K. J. Towner // J. Hosp. Infect. – 2009. – Vol. 73. – N 4. – P. 355-363.
6. Yang, H. Isolation and characterization of a virulent bacteriophage AB1 of *Acinetobacter baumannii* / H. Yang, L. Liang, S. Lin, S. Jia // BMC Microbiology. – 2010. – Vol. 10. – P. 131.

MICROBIOLOGICAL AND MOLECULAR GENETIC ANALYSES OF PHAGE AP22 SPECIFICALLY INFECTING A WIDE RANGE OF *ACINETOBACTER BAUMANNII* STRAINS

Popova A.V., Myakinina V.P., Bogun A.G., Volozhantsev N.V.

Key words: bacteriophage, *Acinetobacter baumannii*, genomic analysis.

The research is devoted to the microbiological and molecular genetic analyses of lytic phage AP22 specifically infecting and lysing a wide spectrum of Acinetobacter baumannii clinical strains.

УДК 619

МЕХАНИЗМЫ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ФАГА vB_EVOP_G7C И РОДСТВЕННЫХ ЕМУ КОЛИФАГОВ С КЛЕТКАМИ *ESCHERICHIA COLI* НА РАННИХ СТАДИЯХ ИНФЕКЦИИ

*Прохоров Н.С., Куликов Е.Е., Голомидова А.К., Летаров А.В.
ФГБУН «Институт микробиологии им. С. Н. Виноградского РАН»
тел. +7 (499) 135 72 64; prokhoroff@gmail.com*

Ключевые слова: N4-подобные бактериофаги, колифаги, взаимодействие вирусов с клеткой, механизмы адсорбции бактериофагов, vB_EcoP_G7C

Работа посвящена анализу механизмов взаимодействия индигенных N4-подобных колифагов, прежде всего vB_EcoP_G7C, выделенных из симбиотического сообщества лошадей,