

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА БАКТЕРИОФАГОВ СПЕЦИФИЧНЫХ В ОТНОШЕНИИ *BACILLUS ANTHRACIS*, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ОБРАЗЦОВ ВНЕШНЕЙ СРЕДЫ ГРУЗИИ. 2-ОЙ ОТЧЕТ. *B. ANTHRACIS*, СПЕЦИФИЧЕСКАЯ ФАЗА ВЫДЕЛЕНАЯ В 2010-2011 гг.

¹Лия.Губеладзе,²Дали Гогиашвилиб, ³Серго Ригвава, ⁴Мераб Натидзе, ⁵Гиа Церцвадзе,
⁶Георгий Камкамидзе, ⁷Марина Тедиашвили
^{1,2,3,4,5,6}Институт Бактериофагии, Микробиологии и Вирусологии им. Г.Елиава
⁷Клиника НеоЛаб, Тбилиси, Грузия.

ABSTRACT

Anthrax is a potentially fatal infectious disease naturally occurring in different regions of the world. The causing agent, the spore-forming microorganism *B. anthracis*, can be used as a bioweapon. Multi drug resistant anthrax strains can be considered as the most significant biothreat agents. Thus, countermeasures to neutralize this threat are highly demanded. This paper describes isolation techniques and characterization of new bacteriophages active against *B. anthracis*.

The series of experiments aiming isolation of new phage clones specific to *B. anthracis* have been carried out during warm season 2010-11. Five types of bacteriophages active against *B. anthracis*— Ba PAT, Ba ActIV, Ba ActV, Ba InsL and Ba InsZ have been isolated from environmental sources in Georgia. Initially, the phages were isolated on *B. anthracis* vaccine strains STI-1 and 34F2, using standard enrichment technique. TEM studies of newly isolated Ba phages have shown that the virion morphologies consistent with the Siphoviridae family of tailed bacteriophages (with isometric head and long noncontractile tail), although phages differ from each other by the size. The *B. anthracis* phages have been comparatively characterized based on phenotypic and genotypic properties, such as virion and negative plaque morphology. The newly isolated Baphages showed also diverse serologic characteristics, with BaActIV and BaActV phages more closely related to phage Gamma. The Ba phages demonstrated broad lytic spectrum within the species, which indicates to their potential for identification and biocontrol of *B. anthracis*.

Keywords: Anthrax, *Bacillus anthracis*, bacteriophages, lytic spectrum, virion morphology, phage neutralisation.

აბსტრაქტული

ჯილეხი წარმოადგენს სწრაფად მიმდინარე ზოონოზურ დაავადებას, რომელიც ცხოველიდან გადადის ადამიანზე. ჯილეხის სპორების ბუნებრივმა ან ხელოვნურმა აეროზოლიზაციამ შესაძლოა გამოიწვიოს ეპიდემია მაღალი ლეთალური გამოსავლით. განსაკუთრებულ ბიოლოგიურ საფრთხეს წარმოადგენს *B. anthracis* –ის შტამები, რომელთაც აქვთ შექმნილი ანტიბიოტიკებისადმი მრავლობითი რეზისტენტობა. *B. anthracis* -ით ინფიცირების და დაავადების განვითარების რისკის შემცირებისათვის დიდ მნიშვნელობა აქვს გამომწვევის დროულ გამოვლენას, ასევე ინფექციის წყაროს დადგენას და სანაციის/დეკონტამინაციის ღონისძიებების ჩატარებას.

ზემოთ თქმულიდან გამომდინარე, მეტად აქტუალურია *B. anthracis* მიმართ სპეციფიკური ბაქტერიოფაგების გამოყოფა და დახასიათება მათი შემდგომი გამოყენების მიზნით ჯილეხის დიაგნოსტიკაში, გამოწვევის დეტექციასა და ბიო-დეკონტამინაციაში.

ჩვენს მიერ 2010-11 წლებში საქართველოს სხვადასხვა რეგიონიდან მოპოვებული მასალებიდან გამოყოფილი იქნა *B. anthracis* მიმართ სპეციფიკური 5 ბაქტერიოფაგი - Ba PAT, Ba ActIV, Ba ActV, Ba InsL და Ba InsZ.

ფაგების კონცენტრატებისგან მომზადებული პრეპარატები (შეღებილი 2% ურანილ აცეტატით) გაისინჯა ელექტრონულ ტრანსმისიულ მიკროსკოპში JEOL SX100. გამოვლინდა რომ ყველა ფაგი მიეკუთვნება *Siphoviridae* ოჯახს (იზომეტრული თავითა და გრძელი უკუმშველი კუდით). ისინი განსხვავდებიან ერთმანეთისგან ზომით და ფორმით, შეიძლება იყოს სხვადასხვა სუბმორფოტიპებიც.

შევისწავლეთ მათი ფიზიკო- ქიმიური და ბიოლოგიური თვისებები. მოხდა ფაგების ნეგატიური კოლონიების და ლიტიური სპექტრის შესწავლა. აღმოჩნდა რომ სახეობის შიგნით ისინი ხასიათდებიან მაღალი ლიზისური აქტივობით. ამიტომ ისინი შეიძლება ეფექტურად გამოვიყენოთ *B. anthracis* იდენტიფიკაციისა და მასთან მონათესავე სახეობების სადიფერენციაციოდ.

საკვანძო სიტყვები: ანთრაქსი, ბაკილიუს ანტრაჯი, ბაქტერიოფაგი, ლითიკული სპექტრი, ვირუსის მორფოლოგია, ფლავენ ნეიტრალიზაცია.

Сибирская язва представляет собой зооантропонозное заболевание, известное с античного периода и до сегодняшних дней сохраняет статус особо опасной инфекции. Вспышки этого заболевания ежегодно регистрируются как в Грузии и в Закавказском регионе, так и в других странах мира (1-4). Сибирская язва - эндемичное заболевание на Кавказе. За последние годы отмечается тенденция к увеличению случаев заболевания. По частоте вспышек сибирской язвы, включая заболевания людей, Грузия считается одной из неблагоприятных стран в регионе (2,4).

Возбудителем заболевания является грамположительная, спорообразующая палочка *B.anthraxis*, которая после попадания в организм быстро размножается в крови и достигает высоких концентраций (1,2). Опасность сибирской язвы обусловлена тем, что споровые формы микроба способны длительное время пребывать в почве и изменять свои свойства в естественных условиях, что ведет к возникновению аберантных штаммов и развитию антибиотикорезистентных вариантов. Последние представляют серьезную проблему в лечении больных сибирской язвой (1,3,5).

Возбудитель сибирской язвы может использоваться в качестве биологического оружия, поскольку он легко размножается и распространяется в виде аэрозоля (1,5,7). Поэтому особенно важным является создание эффективного средства для предотвращения этой опасности. Бактериофаги, которые представляют собой естественные внутриклеточные паразиты бактерий, могут успешно использоваться для предотвращения и уменьшения вреда в случае террористического акта с применением бактериального оружия. *B.anthraxis*. Бактериофаги, специфичные в отношении *B.anthraxis*, могут быть применены как альтернативное средство также для лечения сибирской язвы, и обезвреживания поверхностей, загрязненных антибиотикорезистентными штаммами *B.anthraxis* (6,7).

Целью представленного исследования было выделение специфических сибиреязвенных фагов из образцов внешней среды, собранных в различных географических зонах Грузии, и изучение их основных биологических свойств.

Бактериальные штаммы и бактериофаги

В работе использованы: стандартные сибиреязвенные вакцинные штаммы – 34/F₂ (Sterne), STI-1, и „55“; и референс-бактериофаги – Gamma, IM и Fah из коллекции Института Бактериофагии, Микробиологии и Вирусологии имени Георгия Элиава (Тбилиси, Грузия), также бактериофаги специфические к *B.anthraxis* (5 фагов), выделенные в ходе работы из различных образцов внешней среды.

Микробиологические среды и буферные растворы

триптиксовый бульон и агар (TSB и TSA), сердечно-мозговая вытяжка – бульон и агар (ВНІВНІА); физиологический раствор приготовленный на фосфатном буфере (PBS), pH-7,4.

Методы выделения и изучения бактериофагов.

Выделение, клонирование и концентрирование бактериофагов, также характеристику негативных колоний и определение литического спектра, проводилина штаммах *B.anthraxis* 34/F₂ (Sterne) и STI-1 с использованием стандартных методов (8,9,11), как это описано в предыдущем сообщении (12).

Для изучения ультраструктуры вирионов фагов были получены концентраты с высоким титром и осветлены высокоскоростным центрифугированием. Морфологию нуклеокапсида исследовали с использованием негативно контрастированных фаговых препаратов (10) с помощью трансмиссивной электронной микроскопии (ТЭМ), с применением электронного микроскопа JEOL 100 SX (Япония).

Фазы взаимодействия с клеткой хозяина, в частности, время и интенсивность адсорбции изучали на вакцинном штамме *B.anthraxis* 34F₂ в соответствии с методом с использованием хлороформа (8,9,11).

Серологические характеристики и родство фагов изучали в перекрестных реакциях нейтрализации (8,9) с помощью приготовленной нами ранее (12) гамма-антифаговой сыворотки (Gamma АФС). Константу нейтрализации определяли в гомологичной системе в условиях 90-99% -ой нейтрализации.

Результаты исследования и их обсуждение

Первая серия работ по выделению фагов активных к *B.anthraxis* было проведена в 2008-09 гг. (12). Вторая серия работ, описанная в данной работе, началась весной в 2010 года и завершилась осенью 2011 года. С целью выделения сибиреязвенных фагов тёплое время года (май-октябрь) были собраны материалы и из внешней среды в различных районах Грузии: Самцхе-Джавახети, Марнеули, Квемо Картли и окрестностях Тбилиси. Всего было собрано 24 образцов воды и почвы.

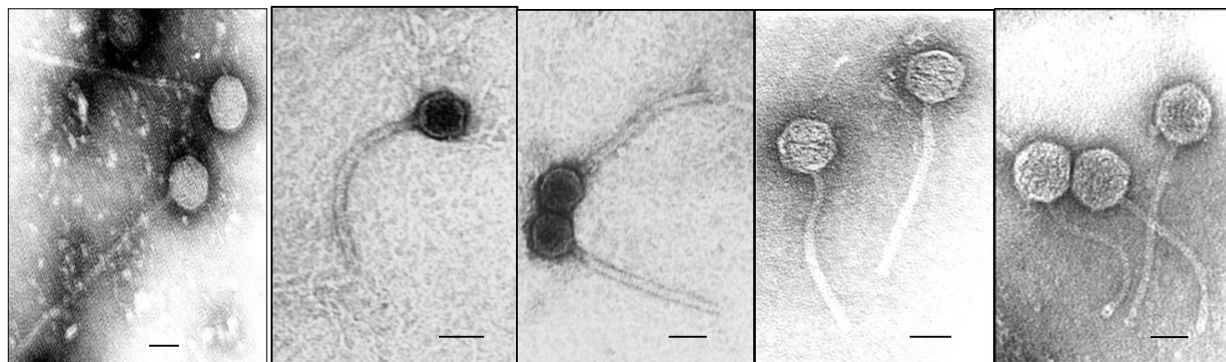
Бактериофаги были выделены методом обогащения образцов с использованием *B.anthraxis* штамма 34 F2 (Sterne). При проверке первичных фаголизатов литическая активность была выявлена в 3-х образцах, при клонировании которых были получены 5 чистых фаговых линий – BaActIV, BaActV, BaPAT, BaInsZ и BaInsL. Морфология негативных колоний нововыделенных фагов была изучена на газоне штамма хозяина *B. anthracis* 34F2 на плотной питательной среде. Негативные колонии изучаемых 5 бактериофагов отличались друг от друга по морфологии и размеру (Таблица №1).

При изучении морфологии вириона выделенных *B.anthraxis*- специфических фагов с помощью ТЭМ было установлено, что все фаги относятся к семейству Siphoviridae, имея головку формы икосаэдра и длинный несокращающийся отросток, хотя отдельные фаги определенно отличаются друг от друга по форме и размеру компонентов вириона (Таблица №1, рисунок №1).

Таблица #1. Морфологические показатели негативной колонии и вириона нововыделенных фагов *B. anthracis*

Фаги <i>B.anthraxis</i>	Морфология негативной колонии	Морфология вириона			Семейство*
		Размер головки нм	Толщина нм	Длина хвоста нм	
PAT	Прозрачные с блеклым ореолом, D=1,6мм	80x80	10	380	Siphoviridae
InsL	Прозрачные с кружевообразным ореолом, D=1,8мм	68x68	10	250	Siphoviridae
InsZ	Прозрачные с ровными краями, D=1,5 мм	72x72	10	295	Siphoviridae
ActIV	С узким прозрачным центром и ореолом, D=1,8мм	50x50	10	240	Siphoviridae
Act V	С прозрачным центром и ореолом, D=2,0мм	50x50	10	220	Siphoviridae

*Соответственно Н.Аскерманн(10)



PatActVActIVInsLInsZ

Рисунок 1. Морфология вириона фагов BaPat, BaActV, Ba ActIV, Ba InsL, Ba InsZ (JEOL 100 SX). Инструментальное увеличение 40 000; масштабная линия соответствует 50 нм.

Для изучения литической активности бактериофагов *B. anthracis*, мы провели скрининг на 18 вирулентных Грузинских штаммах *B. anthracis* из коллекции института Г.Элиава. Эти штаммы были выделены и генотипированы ранее (13). Работа проведена в лабораториях Национального центра по контролю за заболеваниями и общественного здравоохранения (NCDC) Грузии, где депонированы указанные штаммы. Для сравнения использовали 3 референс фага- Gamma, FahiIM. Полученные результаты представлены в таблице 2.

Полученные данные показали, что новые фаги характеризуются высокой антибактериальной эффективностью в отношении *B. anthracis*, однако, в степени литической активности отмечается определенная разница между отдельными фагами. Самую высокую литическую активность проявил фаг InsL, который проанализировал все вирулентные штаммы (100%). Фаги ActIV, ActV и PAT оказались активными в отношении

94,4% штаммов, тогда как Фаг InsZ характеризуется относительно низкой литической активностью (70% штаммов). Надо отметить, что референс фаги Gamma, Fah и IM пролизируют соответственно 88,9%, 95% и 94% вирулентных штаммов.

При изучении литической активности нововыделенных сибиреязвенных фагов в отношении других видов *Bacillus* (Таблица#3) выяснилось, что они довольно специфичны в пределах вида *B.anthraxis* и не лизируют культуры родственных видов (*B.subtilis*, *B. pumilus*, *B. thuringiensis* и *B. megaterium*). Хотя фаги InsL, InsZ и также gamma проявили активность некоторым штаммам *B.cereus* (Таблица #3). Только два фага - PAT и ActV характеризуются строгой видовой специфичностью.

Начальные фазы взаимодействия новых Ba фагов с хозяином клетки, в частности, интенсивность и время адсорбции, были изучены на штамме *B.anthraxis* 34F2 (Sterne). Адсорбционные способности 5 изучаемых фагов сравнивались с аналогичными параметрами фага Gamma. Выяснилось, что эти показатели для Gamma фага и 5 -ти новых фагов довольно схожи. Максимальная адсорбция (от 80% до 90%) достигается в интервале 15-20 минут для всех фагов.

Таблица №2. Литическая активность нововыделенных и референс фагов *B.anthraxis* в отношении вирулентных штаммов *B.anthraxis*, выделенных из внешней среды Грузии.

Штаммы <i>B.anthraxis</i>	Фаги							
	<i>Ba InsL</i>	<i>Ba InsZ</i>	<i>Ba Pat</i>	<i>Ba Act4</i>	<i>Ba Act5</i>	<i>Ba gamma</i>	<i>Ba Fah</i>	<i>Ba Im</i>
L-40	cl	cl	cl	cl	cl	cl	cl	cl
L-42	cl	ol	cl	cl	cl	cl	cl	cl
A-83	cl	scl	cl	cl	cl	cl	cl	cl
A-95	cl	-	cl	ol	ol	-	cl	cl
A-96	cl	scl	cl	cl	cl	cl	cl	cl
K-187	scl	-	-	-	-	-	-	-
K-189	cl	scl	cl	cl	cl	cl	cl	cl
K-197	cl	scl	cl	cl	cl	cl	cl	cl
K-199	cl	scl	cl	ol	ol	scl	cl	scl
K-200	cl	ol	cl	cl	cl	cl	cl	cl
Z-296	scl	-	cl	scl	scl	-	scl	ol
Z-313	cl	scl	cl	cl	cl	ol	cl	cl
G-319	cl	-	cl	cl	cl	cl	cl	cl
G-321	cl	-	cl	cl	cl	cl	cl	cl
G-325	cl	-	cl	cl	cl	cl	cl	cl
Sch-343	cl	scl	cl	cl	cl	cl	cl	cl
ZR-347	cl	scl	cl	cl	cl	cl	cl	cl
S-377	cl	scl	cl	cl	cl	cl	cl	cl
STI-1	cl	-	cl	cl	cl	cl	cl	cl
34F2	cl	scl	cl	cl	cl	scl	cl	cl

cl - полный лизис; ol- полный лизис с ростом отдельных бактериальных колоний;
scl - полупрозрачный лизис.

Таблица 3. Литическая активность вновь выделенных фагов *B.anthraxis* в отношении других видов **Bacillus.N**

Бактерии рода <i>Bacillus</i>	Литическая активность фаги <i>B.anthraxis</i> *					
	PAT	Act IV	ActV	INSL	INSZ	gamma
<i>B.subtilis</i>	1/0	1/0	1/0	1/0	1/0	1/0
<i>B.megaterium</i>	1/0	1/0	1/0	1/0	1/0	1/0
<i>B.thuringiensis</i>	1/0	1/0	1/0	1/0	1/0	1/0
<i>B.anthracooides</i>	1/0	1/0	1/0	1/0	1/0	1/0
<i>B.cereus</i>	8/0	8/0	8/1	8/2	8/1	8/1

*В числителе – количество тест штаммов, в знаменателе – количество лизированных штаммов

Таблица 4. Изучение серологического родства между нововыделенными и референс фагами *B.anthraxis* с использованием Гамма-АФС.

Фаги	Нейтрализация %		Константа нейтрализации К	
	10мин	30мин	10мин	30мин
BaGamma	90,5%	99%	117,3	76,6
Ba Act4	88%	97,5%	-	64,7
Ba Act5	86%	97%	-	58,2
BaPat	38%	50%	-	-
BaInSL	60%	80%	-	-
BaInSZ	54%	71%	-	-
BaIm	82%	91%	-	39,9
BaFah	84%	95%	-	49,8

“—”- Константа не может быть вычислена из-за низкой процентной нейтрализации

Изучение серологических свойств нововыделенных *B.anthraxis* фагов с использованием Гамма – АФС (Таблица № 4) показало близкое родство фагов ActIV и ActV с Гамма фагом и между собой (константы нейтрализации соответственно 69,2; 68,1 и 69,2), а фаги InSL и InSZ находятся в умеренном серологическом родстве. PAT бактериофаг судя по интенсивности нейтрализации Гамма-АФС, можно отнести к неродственным фагам.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В течении 2010-2011гг. из внешней среды Грузии нами выделено 5 новых бактериофагов активных в отношении *B.anthraxis*. По морфологии вириона все 5 фагов отнесены к семейству Siphoviridae. Они отличаются друг от друга и референс фагов по серологическим показателям. Фаги Act IV и ActV проявляют более близкое антигенное родство с фагом Гамма. Нововыделенные фаги *B.anthraxis* проявляют высокую литическую активность в пределах вида и могут быть использованы для идентификации сибиреязвенной палочки, а также с целью биоконтроля этого особо опасного микроба.

ЛИТЕРАТУРА

1. Holmes Ch. Spores, Plagues and History, The Story of Anthrax. 2003, pp. 46-54
2. Кухалашвили Т. “Атлас сибиреязвенных фагов в Грузии”. Тбилиси, Грузия. 2007.
3. Spencer R.S. “*Bacillus anthracis* “. Journal of clinical pathology, 2003, 56 (3), pp. 182-187.
4. Национальный Центр по контролю за заболеваниями и общественного здравоохранения Эпидемиологический бюллетень, 2016, Май, №5, Том 20.

5. Turnbull P. C. B., R. Böhm, O. Cosivi, et al., "Guidelines for the Surveillance and Control of Anthrax in Humans and Animals, World Health Organization EMC/ZDI./98.6, 3rd edition, 1998.
6. Jonczyk-Matvsiak E., M Klak, B Weber-Dabrowska, J Borysowski and A Gorski .Possible Use of Bacteriophages Active against *Bacillus anthracis* and Other *B. cereus* Group Members in the Face of a Bioterrorism Threat" *BioMed Research International* Volume 2014 , Article ID 735413
7. Filippov A., K.Segueev and M.Nikolich. "Bacteriophages, Enviromental and therapeutic Applications", journal of "Bioterrorism and Biodefence" Vol.4 No. Special Issue pp.S3:010 ref.150
8. Габрилович И. М. " Основы бактериофагии". Минск."Высшая школа", 1973.
9. Адамс М. " Бактериофаги"; М. изд –во "Иностранная Литература ", 1961.
10. Ackerman H.W. Phage Classification and Characterization". In: *Bacteriophages, Methods and Protocols*". Volume 1. Isolation, Characterization and interactions" (Ed. M.R.J. Clokie, A.M. Kropinski) 2009, Humana Press. Chapter 13, pp. 127-140
11. Kropinski A., A.Mazzacco, T. Waddel E Lingohr and R. Jonson: "Enuomeration of Bacteriophages by Double Agar Overlay Plaque Assay". In: *Bacteriophages, Methods and Protocols*". Volume 1. Isolation Characterization and interactions" (Ed. M.R.J. Clokie, A.M. Kropinski) 2009, Humana Press, Chapter 7. pp 69-80
12. Губеладзе Л., Д. Гогишвили, С. Ригвава, М. Натидзе, Т. Кокашвили, Г. Церцвадзе, М. Тедиашвили."Сравнительная характеристика бактериофагов специфичных в отношении *Bacillus anthracis*, выделенных из образцов внешней среды Грузии. Сообщение 1. Фаги *B.anthraxis* выделенные в 2009-2011гг". *Экспериментальная и Клиническая Медицина*, 2017, #3
13. Merabishvili M, M. Natidze, S. Rigvava, L. Brusetti, N. Raddadi, S. Borin, N. Chanishvili, M.Tediashvili, R Sharp, M.Barbeschi, P. Visca, and D.Daffonchio. 2006. "Diversity of *Bacillus anthracis* Strains in Georgia and of Vaccine Strains from the Former Soviet Union". *Applied. Environ.Microbiol*, v.72, No 8, p. 5631–5636