

# ВЫДЕЛЕНИЕ ЛЕГИОНЕЛЛЕЗНОГО БАКТЕРИОФАГА: ОСНОВНЫЕ БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА

УДК 615:576.858.9

Поступила 6.10.2010 г.



**С.А. Разгулин**, д.м.н., профессор кафедры эпидемиологии, директор НИИ профилактической медицины;  
**А.А. Григорьев**, д.м.н., профессор кафедры мобилизационной подготовки и экстремальной медицины

Нижегородская государственная медицинская академия, Н. Новгород

Впервые выделен умеренный легионеллезный бактериофаг из органов морской свинки, зараженной культурой *Legionella pneumophila* штамма Филадельфия-1. Негативные колонии бактериофага — от 1,5 до 2,5 мм в диаметре, центральная часть колоний — прозрачная и окружена зоной неполного лизиса по периферии. По данным электронной микроскопии, корпускулы фага состоят из многогранной удлинённой головки растянутой гексагональной формы и короткого отростка. Бактериофаг специфичен, лизирует бактерии основных видов возбудителей болезни легионеров, но в то же время обладает определенной литической активностью в отношении клеток возбудителя туляремии.

**Ключевые слова:** болезнь легионеров, легионеллезный бактериофаг, лизогения.

## English

### Isolation of legionellosis bacteriophage: main biological characteristics

**S.A. Razgulin**, D.Med.Sc., Professor, the Department of Epidemiology, Director of SRI of Preventive Medicine;  
**A.A. Grigoryev**, D.Med.Sc., Professor, the Department of Preparedness Activity and Emergency Medicine

Nizhny Novgorod state medical academy, N. Novgorod

For the first time a temperate legionellosis bacteriophage has been isolated from the organs of a guinea pig infected with *Legionella pneumophila*, Philadelphia-1 strain. A bacteriophage plaque is from 1.5 to 2.5 mm in diameter, and the central part of colonies is transparent and surrounded by the zone of incomplete lysis in periphery. According to electron microscopy data, phage corpuscles consist of a polyhedral elongated head of extended hexagonal form and a short process. The bacteriophage is specific, and lyses the bacteria of main agents of a legionnaires' disease, but at the same time it has some lytic activity concerning the cells of tularemia agent.

**Key words:** legionnaires' disease, legionellosis bacteriophage, lisogeny.

Болезнь легионеров — острое инфекционное заболевание, характеризующееся разнообразием клинических проявлений, возбудителем которого служат факультативные внутриклеточные паразиты — легионеллы. Легионеллезная пневмония составляет 2—6% от общего числа пневмоний и 10—15% от так называемых атипичных пневмоний, вызываемых микоплазмами, хламидиями, легионеллами и коксиеллами [1]. В США ежегодно регистрируют около 25 000 случаев заболеваний, вызванных *Legionella pneumophila*. Вспышки носят как эпидемический (на фоне гиперэндемической активности), так и эпизодический характер. Вместе с тем отмечается увеличение доли нозокомиальных пневмоний. В России заболевание

диагностируют редко, но есть сообщения о более чем 100 спорадических случаях легионеллеза. Не исключена возможность бессимптомного или субклинического его течения, поскольку более 20% лиц старшего возраста серопозитивны [2].

В странах, где налажена лабораторная диагностика легионеллеза, его доля среди госпитальных инфекций дыхательных путей неуклонно возрастает и составляет в среднем 0,5—4,0% от числа больных пневмонией [1]. Вероятно, следует согласиться с высказыванием ряда специалистов о том, что спорадический легионеллез регистрируется там, где на должном уровне налажена лабораторная диагностика этого заболевания [2, 3].

Для контактов: Григорьев Аркадий Александрович, тел. моб. +7 910-795-20-36; e-mail: aralgr@bk.ru.

В современных условиях диагностика большинства инфекционных заболеваний ввиду их выраженного клинического полиморфизма невозможна без объективного лабораторного подтверждения. Вместе с тем в схеме лабораторной диагностики практически всех опасных заболеваний бактериальной природы используются специфические бактериофаги, позволяющие в короткие сроки и с высокой степенью достоверности идентифицировать выделенную микробную культуру.

Метод использования бактериофагов (определение чувствительности этиологического агента болезни к диагностическому бактериофагу) продолжает рассматриваться в качестве высокочувствительного, специфичного, экономичного, технологически простого, доступного и удобного для практического здравоохранения в случае необходимости массового анализа проб. В настоящее время предложено пять методических подходов, используемых в диагностике легионеллеза: выделение культуры возбудителя — «золотой стандарт»; определение уровня антител и растворимого антигена легионелл в моче; выявление возбудителя в клиническом материале с помощью методов иммунофлуоресценции, а также ДНК-зондов или полимеразной цепной реакции [1, 4]. Клиническая диагностика легионеллеза трудна, так как проявления его неспецифичны и полиморфны. Отсутствие бактериофага, пригодного для диагностики болезни легионеров, существенно снижает эффективность противоэпидемических, лечебно-профилактических мероприятий.

На сегодняшний день многие аспекты биологии легионелл не изучены, в частности, остается открытым вопрос и о наличии у них специфического бактериофага. Проведенный нами патентный поиск по фондам описаний изобретений России и ведущих зарубежных стран показал отсутствие данных о фактах обнаружения и способах выделения легионеллезного бактериофага.

В настоящее время известны многие бактериофаги, применяемые для идентификации и фаготипирования бактерий различного систематического положения [5]. Однако все они не могут быть использованы для идентификации и фаготипирования легионелл в связи с высокой специфичностью механизмов взаимодействия бактерий и паразитирующих вирусов. По этой причине они не способны адсорбироваться на поверхности клеток легионелл, репродуцироваться в них и вызывать их лизис.

**Цель исследования** — выделить легионеллезный бактериофаг и изучить его основные морфологические и физиологические характеристики и свойства, тем самым улучшить лабораторную диагностику легионеллеза.

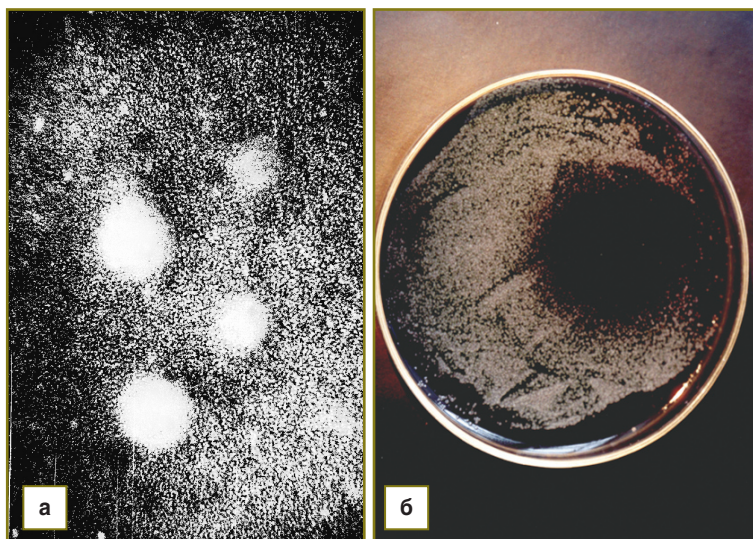
**Материалы и методы.** Этапы получения бактериофага, состоящие из выделения и накопления фаговых частиц, проверки специфичности свойств и последующего применения в целях лабораторной диагностики, являются типовыми. Легионеллезный бактериофаг выделен из органов морской свинки методом обогащения с «подсевом». Для этого инфицированных сублетальной дозой культуры легионелл штамма Филадельфия-1

лабораторных животных усыпляли хлороформом через 8—16 сут после заражения. Гомогенаты из паренхиматозных органов эвтаназированных животных заливали небольшим количеством забуференного физиологического раствора NaCl (рН=7,0) и фильтровали через свечу Шамберлана. Полученные фильтраты вносили во флаконы с двухсуточной культурой легионелл штамма Филадельфия-1, выращенной в статических условиях при температуре 35—37°C. В каждый флакон инокулировали 0,1 мл суспензии агаровой культуры, выращенной на угольно-дрожжевом агаре (УДА), содержащей 1·10<sup>9</sup> КОЕ/мл по стандартному образцу мутности (ГИСК им. Л.А. Тарасевича). Среды готовили согласно рекомендациям [3]. Легионеллы культивировали на УДА с добавлением L-цистеина гидрохлорида — 0,4 г/л, пиррофосфата железа — 0,25 г/л, Асес-буфера — 10 г/л, α-кетоглутаровой кислоты — 1 г/л, рН=6,9—7,0. Все реактивы произведены ф. Sigma (Россия). В качестве жидкой питательной среды использовали бульон на основе протеозопептона №3 (Difco) — 15 г/л, дрожжевого экстракта — 10 г/л, NaHCO<sub>3</sub> — 0,042 г/л, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> — 4 г/л, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> — 1 г/л и с добавлением L-цистеина гидрохлорида и пиррофосфата железа в тех же количествах, что и в УДА.

После 3—15 сут инкубирования при температуре 35—37°C в статических условиях содержимое очищали от бактерий фильтрованием. Фильтраты проверяли на присутствие в них легионеллезного бактериофага по методу агаровых слоев Грациа [6] с предварительным инкубированием смеси (бактериофаг+культура) в термостате при температуре 35—37°C в течение 20 мин. Спектр литического действия, адсорбционную способность, продолжительность латентного периода внутриклеточного развития выделенного бактериофага, средний урожай фаговых частиц на одну инфицированную клетку определяли методами М. Адамса [5]. Тепловую инактивацию проводили путем нагревания суспензии бактериофага в 0,1 М фосфатном буфере в термостате на водяной бане. При каждой избранной температуре фаг выдерживали 10 мин. Электронно-микроскопическое исследование ультраструктуры фагов осуществляли методом негативного контрастирования 2,0% водным раствором уранилацетата при увеличении в 60—120 тыс. раз и ускоряющем напряжении 70 кВ. Экспериментальные исследования выполняли в соответствии с Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных. Для получения антифаговой сыворотки использованы кролики массой 3—5 кг. Иммунизацию проводили по методу М. Адамса [5].

Статистическую обработку данных осуществляли общепринятыми методами с использованием критерия Стьюдента (р<0,05) [7].

**Результаты и обсуждение.** На начальном этапе выделения легионеллезного бактериофага из органов лабораторных животных обнаружены как мутные, так и с прозрачным центром, зоной неполного лизиса по периферии негативные колонии (НК). Они имели правильную круглую форму с относительно ровными краями. Диаметр их не превышал 1,5—2,5 мм. Однако мутные



**Рис. 1.** Вид лизиса индикаторной культуры *L. pneumophila* штамма Филадельфия-1: а — морфология негативных колоний на двухслойном УДА, приготовленном по методу Грациа,  $\times 12$ ; б — форма зоны лизиса при нанесении капли фага на агаровую культуру

НК отличались следами роста индикаторной культуры. Для выделения «чистой» линии бактериофага проводили многократные пересевы из прозрачных изолированных НК без признаков вторичного роста бактерий.

В результате десяти пассажей получена «чистая» линия фага, которая формировала только прозрачные НК на двухслойном УДА, приготовленном по методу Грациа, с типовой индикаторной культурой *L. pneumophila* штамма Филадельфия-1. Легионеллезный бактериофаг через 48—96 ч инкубирования при температуре 35—37°C образовывал колонии округлой формы диаметром 1,5—2,5 мм с прозрачным центром и узкой зоной неполного лизиса по периферии, с относительно ровным краем (рис. 1, а). Нанесение фаговой суспензии на газон индикаторной культуры по методу Отто [6] приводило через 48—72 ч термостатирования при температуре 35—37°C к образованию четкой зоны специфического лизиса (рис. 1, б).

Полученный бактериофаг вызывал лизогенизацию чувствительных к нему легионелл (*L. pneumophila*, *L. micdadei*, *L. dumoffii* и *L. bozemanii*) в бульоне и полужидком агаре при высокой множественности инфекции, в результате чего культуры приобретали иммунитет к гомологичному фагу.

По морфологии НК и способности к лизогенизации чувствительных к нему бактерий обнаруженный бактериофаг следует отнести к умеренным фагам.

Адсорбция фага индикаторными бактериями в жидкой среде составляла 90%. Продолжительность латентного периода — 2 ч. Средний выход фага из одной инфицированной клетки —  $150 \pm 20$  корпускул. Иммунизация кроликов суспензией бактериофага с адьювантом Фрейнда приводила к образованию специфических антител. Полученная антифаговая сыворотка в разведении 1:100 инактивировала 100% бактериофага. Фаг термоллабилен. Инактивация начинается при темпера-

туре 50°C, а полное разрушение происходит после инкубации при температуре 55°C в течение 30 мин.

При посевной дозе  $1 \cdot 10^6$  КОЕ в 1 мл 2—3-суточной бульонной культуры и множественности инфекции (0,01—0,1) в течение 24—36 ч инкубирования при температуре 35°C накапливалось до  $1 \cdot 10^5$  КОЕ/мл. Бактериофаг содержит дезоксирибонуклеиновую кислоту, молекулярная масса которой составляет  $13 \cdot 10^6$  Да.

Изучение ультраструктуры легионеллезного бактериофага показало, что он относится к третьей морфологической группе вирусов бактерий по А.С. Тихоненко [8]. По данным электронной микроскопии, корпускулы фага состоят из многогранной удлиненной головки растянутой гексагональной формы размером  $60 \times 30$  нм и короткого отростка длиной  $15 \pm 5$  нм (рис. 2, а).

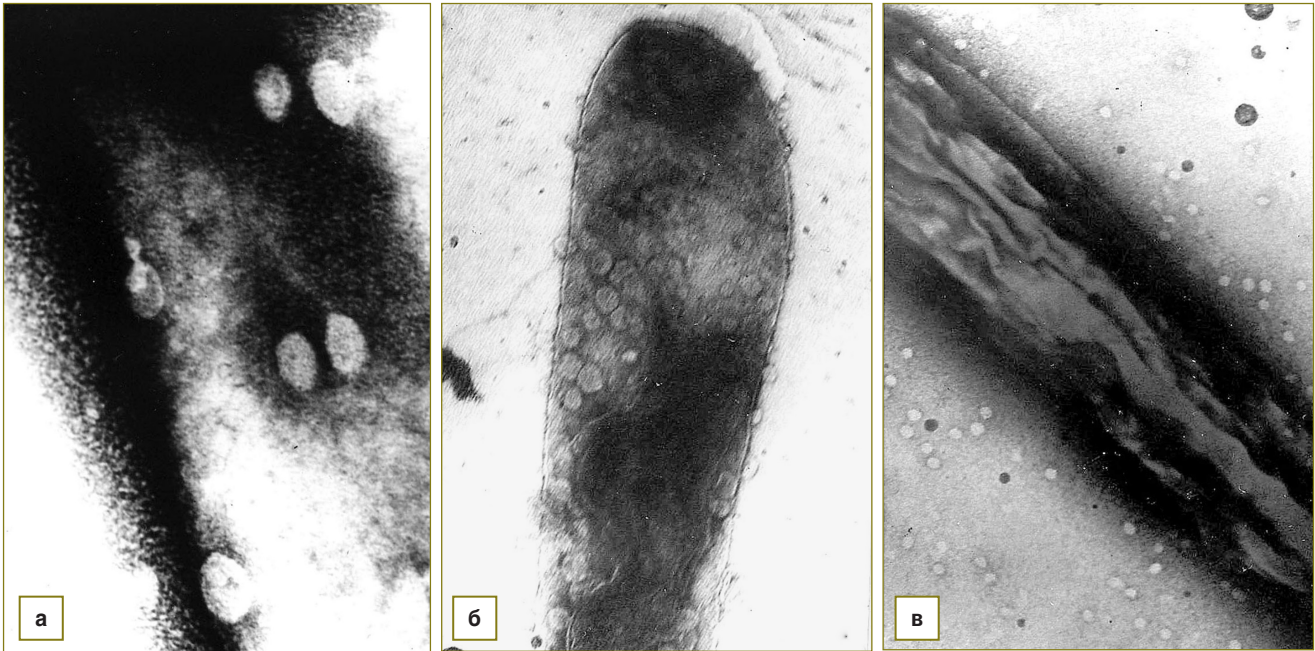
При инфицировании легионелл образуются в довольно значительном количестве корпускулы фагов (рис. 2, б), которые способны адсорбироваться на поверхности клеток *L. pneumophila* штамма Филадельфия-1 (рис. 2, в).

Бактериофаг высокоспецифичен и лизирует бактерии основных видов возбудителей легионеллеза: *L. pneumophila* (9 штаммов), *L. micdadei*, штамм Tatlock, *L. dumoffii*, штамм TEX-KL и *L. bozemanii*, штамм Wiga.

Бактериофаг не оказывает литического действия на *Yersinia pestis* (10 штаммов), *Vibrio cholerae eltor*, *Bacillus anthracis*, *Brucella abortus*, *Yersinia pseudotuberculosis* (10 штаммов), *Escherichia coli* (4 штамма), *Salmonella choleraesuis*, *Streptococcus faecium*, *Streptococcus equi*, *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus saprophyticus* и *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus*, *Bacillus subtilis*, *Proteus vulgaris* и *Proteus mirabilis*, *Shigella sonnei* и *Shigella flexneri*, *Serratia marcescens*, *Pseudomonas aeruginosa* (2 штамма), *Pasteurella multocida*, *Burkholderia mallei*, *Burkholderia pseudomallei*, *Listeria monocytogenes*. В то же время выделенный бактериофаг обладает определенной литической активностью в отношении клеток возбудителя туляремии: *Francisella tularensis* (штаммы №499, 501, 503, 543, 15 НИИЭГ и Schu).

Таким образом, в результате проведенных исследований впервые из органов морской свинки выделен штамм умеренного легионеллезного бактериофага, активный в отношении *L. pneumophila*, *L. micdadei*, *L. dumoffii* и *L. bozemanii*. Непосредственно из культуры легионелл бактериофаг выделить не удалось. Бактериофаг активен в отношении основных видов возбудителей болезни легионеров, обладает способностью к адсорбции на поверхности легионелл и вызывает их лизис, обусловленный репродукцией фаговых частиц в инфицированной бактериальной клетке. По результатам экспериментальных исследований оформлена заявка на изобретение, получен патент и диплом на открытие [9, 10]. Бактериофаг обладает высокой специфичностью, лизируя только штаммы основных видов возбудителей болезни легионеров. В то же время





**Рис. 2.** Частицы легионеллезного бактериофага: *а* — морфология фаговых корпускул,  $\times 120\,000$ ; *б* — клетка бактерии легионеллы с внутриклеточным фагом,  $\times 80\,000$ ; *в* — адсорбция фаговых корпускул на поверхности клеточной стенки легионеллы,  $\times 60\,000$

родственные микроорганизмы, такие как *Pasteurella multocida*, *Yersinia spp.*, а также сапрофитные микроорганизмы, возбудители оппортунистических и опасных инфекций к этому бактериофагу не чувствительны, за исключением *F. tularensis*. **Примечательно, что культуры *F. tularensis* в некоторых случаях также давали «перекрест» в серологических реакциях с антигеном возбудителя болезни легионеров [3].** По-видимому, на поверхности клеточных оболочек этих микроорганизмов имеются близкие по антигенной специфичности рецепторы, обеспечивающие начальные этапы литического процесса при использовании бактериофага в максимальных концентрациях. Природа обнаруженного явления, возможно, обусловлена тесным филогенетическим родством бактерий родов *Legionella* и *Francisella*.

У легионеллезного бактериофага имеется отросток, однако концевая часть его видна не всегда. Концевой аппарат отростка в большинстве случаев не несет каких-либо дополнительных образований. Адсорбция корпускул бактериофага происходит равномерно по всей поверхности микробной клетки без преимущественной локализации их на отдельных участках. Очевидно, антигенные локусы бактериальной клетки, ответственные за адсорбцию легионеллезного бактериофага, равномерно распределены по всей поверхности микробной клетки.

В настоящее время, несмотря на новейшие разработки молекулярно-биологических методов идентификации инфекционных агентов, основное значение при диагностике легионеллеза придается бактериологическим исследованиям, поскольку только выделение культуры легионелл является бесспорным доказательством

наличия болезни легионеров. Остальные методы, будь то ускоренные, серологические, молекулярно-биологические, пригодны лишь для постановки предварительного или ретроспективного диагноза.

Отсутствие в литературе сведений о легионеллезном бактериофаге обусловлено, на наш взгляд, трудностью его выделения вследствие чувствительности к L-цистеину. Возбудитель болезни легионеров отличается высокой требовательностью к составу искусственных питательных сред. Обязательным и незаменимым компонентом любых (жидких и плотных) питательных сред, разработанных для выращивания легионелл, должен быть L-цистеин. По данным Д.М. Гольдфарба [6], L-цистеин оказывает прямое фагоцидное действие на многие бактериофаги, находящиеся в свободном состоянии. Для уменьшения противофагового эффекта L-цистеина автором был применен модифицированный двухслойный метод Грация, используемый при обнаружении и титровании бактериофагов на плотных питательных средах. Предварительная инкубация смеси (фаг+культура) в термостате, очевидно, вызывает необратимую адсорбцию фаговых частиц на поверхности клеток легионелл. В таких условиях L-цистеин в меньшей степени оказывает противофаговое действие на бактериофаг, находящийся в контакте с бактериальной клеткой, и не подавляет репродукцию бактериофага внутри легионеллы.

**Заключение.** Впервые выделен легионеллезный бактериофаг и доказана перспективность его использования для обнаружения и идентификации легионелл при выделении их от больных или объектов внешней среды. Установлена достаточно высокая диагностическая ценность легионеллезного бактериофага, что дает

возможность рекомендовать его для применения на практике.

Использование легионеллезного бактериофага в комплексе с другими методами (микробиологическими, биохимическими, серологическими и др.) позволит повысить информативность анализов и, следовательно, улучшить качество лабораторной диагностики легионеллеза. Обнаруженный легионеллезный бактериофаг может также найти применение в исследованиях генома возбудителя легионеллеза.

### Литература

1. *Тартаковский И.С., Синопальников А.И.* Легионеллез: роль в инфекционной патологии человека. *Клин микробиол и антимикробная химиотерапия* 2003; 3(1): 4—16.
2. *Медицинская микробиология.* М: Медицина; 1999.
3. *Прозоровский С.В., Покровский В.И., Тартаковский И.С.* Болезнь легионеров (легионеллез). М: Медицина; 1984.
4. *Тартаковский И.С., Бархатова О.И., Темужникова Н.Д. и др.* Лабораторная диагностика возбудителей опасных инфекционных болезней. Саратов; 1998.
5. *Адамс М.* Бактериофагия. М: Иностранная литература; 1961.
6. *Гольдфарб Д.М.* Бактериофагия. М: Медгиз; 1961.
7. *Ашмарин И.П., Воробьев А.А.* Статистические методы в микробиологических исследованиях. Л: Изд-во мед. литературы; 1962.
8. *Тихоненко А.С.* Ультраструктура вирусов бактерий. М: Наука; 1968.
9. *Григорьев А.А., Пименов Е.В., Дармов И.В. и др.* Штамм легионеллезного бактериофага НИИМ, активный в отношении *Legionella pneumophila, L. micdadei, L. dumoffii* и *L. bozemanii*. Патент РФ №2236458, приоритет от 30.07.2003.
10. *Григорьев А.А., Пименов Е.В., Дармов И.В. и др.* Легионеллезный бактериофаг НИИМ. Диплом на открытие №369, выд. МААНОИИ 2008, рег. номер 462. М; 2008.