



Выделение и изучение биологических свойств бактериофагов, специфичных к *Bordetella bronchiseptica*

Т. А. Кочетова¹, В. В. Юскевич², Г. Т. Садикова³, В. М. Попова⁴

ООО Научно-производственный центр «МикроМир» (ООО НПЦ «МикроМир»), г. Москва, Россия

¹ <https://orcid.org/0000-0001-8280-4341>, e-mail: kochetova@micromir.bio

² <https://orcid.org/0000-0002-0459-7479>, e-mail: v.yuskevich@micromir.bio

³ <https://orcid.org/0000-0002-7711-7958>, e-mail: gulnurs.5959@gmail.com

⁴ <https://orcid.org/0000-0002-9630-1945>, e-mail: popovavm9@yandex.ru

РЕЗЮМЕ

Представлены результаты собственных исследований по выделению бактериофагов, активных в отношении *Bordetella bronchiseptica*. Из клинического материала от животных с признаками респираторных заболеваний выделено три новых бактериофага: vB_BbrS_2/200220.7.2, vB_BbrS_4/200220.7.1, vB_BbrM_5/200220.7.2. Подробно описана методика выделения бактериофагов и их основные биологические свойства. Литическая активность выделенных бактериофагов, определяемая методом агаровых слоев, варьировала от $(2,3 \pm 1,4) \times 10^8$ до $(9,0 \pm 0,2) \times 10^8$ БОЕ/мл, а спектр литического действия составил от 61,5 до 76,9%. Показана стабильность титра бактериофагов при хранении фаголизата в течение 8 месяцев без добавления консерванта. Морфологию негативных колоний бактериофагов изучали на различных питательных средах и анализировали по двум признакам: размер и прозрачность. На средах наблюдалась диссоциация негативных колоний на прозрачные, мутные и прозрачные с мутными ореолами. Бляшки также различались по размеру: от $0,6 \pm 0,2$ до $2,6 \pm 0,1$ мм. Отмечены высокие показатели температурной устойчивости при воздействии на бактериофаги высокой температуры от +40 до +95 °C с шаговым интервалом 5 °C. Изучение специфичности показало, что выделенные бактериофаги лизируют близкородственные бактерии. В ходе электронно-микроскопических исследований для каждого бактериофага были определены такие параметры, как среднее значение диаметра головки и среднее значение длины хвоста. В соответствии с международной номенклатурой вирусов, по морфологическим параметрам фаги vB_BbrS_2/200220.7.2 и vB_BbrS_4/200220.7.1 отнесены к семейству Siphoviridae, бактериофаг vB_BbrM_5/200220.7.2 – к семейству Myoviridae. Полученные результаты исследований *in vitro* показали, что выделенные бактериофаги могут быть перспективными для применения в ветеринарной медицине в фаготерапии заболеваний, вызванных бактерией *Bordetella bronchiseptica*.

Ключевые слова: бактериофаги, *Bordetella bronchiseptica*, фаготерапия, фагопрофилактика

Для цитирования: Кочетова Т. А., Юскевич В. В., Садикова Г. Т., Попова В. М. Выделение и изучение биологических свойств бактериофагов, специфичных к *Bordetella bronchiseptica*. *Ветеринария сегодня*. 2022; 11 (3): 273–279. DOI: 10.29326/2304-196X-2022-11-3-273-279.

Конфликт интересов: Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Для корреспонденции: Кочетова Татьяна Андреевна, научный сотрудник ООО НПЦ «МикроМир», 107031, Россия, г. Москва, Нижний Кисельный пер., д. 5/23, стр. 1, e-mail: kochetova@micromir.bio.

Isolation and study of biological properties of *Bordetella bronchiseptica*-specific bacteriophages

T. A. Kochetova¹, V. V. Yuskevich², G. T. Sadykova³, V. M. Popova⁴

Research and Production Center "MicroMir" LLC, Moscow, Russia

¹ <https://orcid.org/0000-0001-8280-4341>, e-mail: kochetova@micromir.bio

² <https://orcid.org/0000-0002-0459-7479>, e-mail: v.yuskevich@micromir.bio

³ <https://orcid.org/0000-0002-7711-7958>, e-mail: gulnurs.5959@gmail.com

⁴ <https://orcid.org/0000-0002-9630-1945>, e-mail: popovavm9@yandex.ru

SUMMARY

The paper presents results of our studies on isolation of bacteriophages active against *Bordetella bronchiseptica*. Three new bacteriophages were recovered from clinical material of animals with respiratory disease signs: vB_BbrS_2/200220.7.2, vB_BbrS_4/200220.7.1, vB_BbrM_5/200220.7.2. The lytic activity of isolated bacteriophages determined by the method of agar layers varied from $(2.3 \pm 1.4) \times 10^8$ to $(9.0 \pm 0.2) \times 10^8$ BOE/ml, and the lytic spectrum ranged from 61.5 to 76.9%. The bacteriophage titer stability was shown during 8-month storage of phage lysate with no preservative added. The morphology of bacteriophage negative colonies was tested in various nutrient media and analyzed based on two parameters: size and transparency. Dissociation of negative colonies into clear colonies, cloudy colonies, and clear colonies with cloudy halos was observed in the media. Plaques also varied in size from 0.6 ± 0.2 to 2.6 ± 0.1 mm. High levels of temperature stability were noted during exposure of bacteriophages to high temperatures ranging from +40 to +95 °C in 5 °C step. The study of specificity showed

that the isolated bacteriophages lyse closely-related bacteria. In the course of electron microscopic testing of each bacteriophage such parameters as the average diameter of the head and the average length of the tail were determined. In accordance with the international classification of viruses by morphological characteristics the *vB_BbrS_2/200220.7.2* and *vB_BbrS_4/200220.7.1* phages have been assigned to the family *Siphoviridae*, *vB_BbrM_5/200220.7.2* bacteriophage has been assigned to the family *Myoviridae*. The obtained results of *in vitro* studies have shown that the isolated bacteriophages can be prespective in veterinary use for phage therapy of *Bordetella bronchiseptica*-induced diseases.

Keywords: bacteriophages, *Bordetella bronchiseptica*, phage therapy, phage prophylaxis

For citation: Kochetova T. A., Yuskevich V. V., Sadykova G. T., Popova V. M. Isolation and study of biological properties of *Bordetella bronchiseptica*-specific bacteriophages. *Veterinary Science Today*. 2022; 11 (3): 273–279. DOI: 10.29326/2304-196X-2022-11-3-273–279.

Conflict of interest: The authors declare no conflict of interest.

For correspondence: Tatiana A. Kochetova, Researcher, Research and Production Center “MicroMir” LLC, 107031, Russia, Moscow, Nizhnii Kisel’nyi pereulok, d. 5/23, str. 1, e-mail: kochetova@micromir.bio.

ВВЕДЕНИЕ

Bordetella bronchiseptica – аэробная грамотрицательная подвижная палочка. Вызывает респираторные заболевания у большинства домашних (свиньи, кролики, кошки, собаки) и диких животных всех возрастов, однако наиболее подвержены риску инфицирования молодые особи до года и животные с хроническими заболеваниями [1–3]. Бактерия размножается среди ресничек эпителия дыхательного тракта, заражение происходит воздушно-капельным путем, инкубационный период длится от 5 до 20 сут [2, 4].

Респираторная инфекция (бордетеллез), вызванная *B. bronchiseptica*, развивается достаточно быстро, вызывая инфекционный трахеобронхит у собак, широко известный как «питомниковый кашель», пневмонии, риниты у кошек и кроликов [3, 5, 6]. В некоторых случаях болезнь может активно прогрессировать до бронхопневмонии и привести к смерти [1, 7, 8]. *B. bronchiseptica* является причиной атрофического ринита и бронхопневмонии у свиней. У животных происходит атрофия носовой перегородки и носовой раковины [3, 4, 9, 10]. Зафиксированы случаи инфицирования людей бактериями *B. bronchiseptica* [2, 3, 5, 6, 11–14]. Заболеванию в основном подвержены дети, лица с хроническими заболеваниями и ослабленным иммунитетом. Заражение происходит в процессе непосредственного контакта с больными животными, не исключается вероятность перекрестного заражения между людьми [5, 6, 11–14].

На сегодняшний день основными средствами лечения бордетеллеза домашних и сельскохозяйственных животных являются антибиотики, однако их эффективность снижается вследствие распространения антибиотикорезистентных штаммов *B. bronchiseptica* [15, 16]. Это влечет за собой активный рост заболеваемости среди животных, снижение продуктивности сельскохозяйственных животных и, соответственно, экономические потери в животноводстве. Прослеживается прямая угроза здоровью человека, так как присутствует риск заражения антибиотикоустойчивыми штаммами *B. bronchiseptica* от животных-носителей.

Разработка новых средств и методов профилактики и лечения бордетеллеза является актуальной задачей в ветеринарии. Одним из перспективных и безопасных решений данного вопроса является использование пре-

паратов на основе бактериофагов. Перспективы применения фагов, активных в отношении *B. bronchiseptica*, обусловлены их безопасностью, отсутствием негативного воздействия на нормофлору организма [4, 17].

Бактериофаги могут использоваться не только как альтернатива антибиотикам, но и в сочетании со всеми видами традиционной антибактериальной терапии [17]. В исследовании, проведенном G. Y. Park et al. [10], установлено, что бактериофаги обладают терапевтическим потенциалом в отношении респираторных заболеваний, вызванных *B. bronchiseptica*, и могут участвовать в подавлении бактериального воспаления. Однако механизм данного процесса остается неизученным.

Целью настоящего исследования являлось выделение бактериофагов, активных в отношении *B. bronchiseptica*, изучение их биологических свойств для дальнейшей оценки возможности практического применения в ветеринарной медицине.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Штаммы бактерий *B. bronchiseptica* выделены из клинического материала от кроликов, собак и кошек (смывы со слизистых, пробы фекалий, вода из поилок). Образцы поступали из приютов, ветеринарных клиник и ветеринарных институтов г. Москвы и Московской области. Отбор патогенных изолятов *B. bronchiseptica* для создания рабочей коллекции штаммов ООО НПЦ «МикроМир» производился по результатам идентификации микроорганизмов, выполненной микроскопическим, биохимическим и масс-спектрометрическим методами. Штаммы паспортизированы и депонированы в коллекцию микроорганизмов ООО НПЦ «МикроМир». Все исследуемые штаммы бактерий были предварительно проверены на отсутствие профагов в культуре по методу С. Лурия и Д. Дарнелла [18], а также с использованием индукции ультрафиолетовым излучением [19].

Бактерии *B. bronchiseptica* культивировали при температуре $(37 \pm 0,5)^\circ\text{C}$ в течение 24 ч на VHI-агаре (HiMedia Laboratories Pvt. Limited, Индия) с добавлением 5% стерильной дефибринированной крови барана.

Выделение бактериофагов и изучение их биологических свойств проводили методами, предложенными М. Адамсом [20] и Д. М. Гольдфарбом [21]. Источником для выделения бактериофагов служили образцы био-

материала от животных, из которых ранее были выделены штаммы *B. bronchiseptica*. Образцы ресуспендировали в 20 мл изотонического физиологического раствора. Полученную взвесь освобождали от крупных частиц и бактерий центрифугированием в низкоскоростном режиме (5000 об/мин, 20 мин) на центрифуге Avanti J-E (Beckman Coulter, Inc., США) [22]. Патологические материалы жидкой фазы центрифугировали без предварительного ресуспендирования при тех же параметрах. Супернатант отделяли от осадка и проводили центрифугирование на ультрацентрифуге Optima L-90K (Beckman Coulter, Inc., США) в высокоскоростном режиме (27 000 об/мин, 120 мин). Осадок ресуспендировали в 0,05 М Трис-НСI-буфере (pH 7,0–7,2) и фильтровали через мембранные фильтры с диаметром пор 1,2; 0,45; 0,22 мкм (Sartorius, Германия). Наличие фагов в фильтрате выявляли по методу Грация [20, 21]. Обнаружение различных видов негативных колоний на газоне роста тест-культуры свидетельствовало о присутствии нескольких видов фагов в исследуемом материале [22]. Чистые линии бактериофагов получали из морфологически однородных негативных колоний. Для этого 0,1 мл 18-часовой культуры тест-штамма засеивали в колбы с 20 мл ВНИ-бульона и инкубировали в термостате (Binder, Германия) при температуре 37 °С. В логарифмической фазе роста в культуру вносили фрагмент агаровой пластинки с единичным пятном лизиса. Контролем служила колба без фрагмента негативной колонии. Содержимое колб культивировали в термостате (Binder, Германия) при температуре 37 °С в течение 24 ч, по истечении данного времени в колбах с тест-штаммом наблюдалось просветление, а в контроле – выраженное помутнение среды. Затем содержимое колб центрифугировали 20 мин при 5000 об/мин на центрифуге Avanti J-E (Beckman Coulter, Inc., США) [22]. Отобранный супернатант последовательно фильтровали через мембраны с диаметром пор 1,2; 0,45; 0,22 мкм. Полученный фаголизат вновь исследовали методом агаровых слоев [20, 21]. Методику повторяли до получения однородных негативных колоний.

Для получения достаточного количества фаголизата со стабильно высоким титром бактериофаги культивировали по следующей методике: в колбы с 50 мл ВНИ-бульона добавляли 0,3 мл чувствительной к фагу культуры *B. bronchiseptica*. Суспензию инкубировали

в орбитальном шейкере-инкубаторе (BioSan ES-20/60, Латвия) со скоростью перемешивания 140 об/мин при температуре 37 °С в течение 2,5 ч. Затем в колбы вносили по 3,0 мл чистой линии бактериофага и культивировали при температуре 37 °С в течение 18–24 ч со скоростью перемешивания 140 об/мин. По прошествии данного времени содержимое колб центрифугировали в низкоскоростном режиме 20 мин при 5000 об/мин, затем фаговые частицы переосаждали при 27 000 об/мин в течение 120 мин на центрифуге Optima L-90K (Beckman Coulter, Inc., США). Осадок ресуспендировали в 0,05 М Трис-НСI-буфере (pH 7,0–7,2) и фильтровали через мембраны с диаметром пор 1,2; 0,45; 0,22 мкм. Для определения титра фаголизат титровали по общепринятым методикам на плотных питательных средах (метод Грация) [20, 21], после чего фильтрат помещали в стерильные пробирки для хранения при 4 °С.

Литическую активность выделенных фагов определяли по методу Грация [20, 21].

Спектр литической активности исследовали на 13 тест-культурах *B. bronchiseptica* методом спот-тестирования [22].

Изучение морфологии негативных колоний бактериофагов проводили на различных плотных питательных средах: ВНИ-агар 1,5%-й (HiMedia Laboratories Pvt. Limited, Индия) с добавлением 5% стерильной дефибринированной крови барана, ВНИ-агар 1,5%-й (HiMedia Laboratories Pvt. Limited, Индия), ГРМ-агар 1,5%-й (ФБУН ГНЦ ПМБ, Россия), Бордетелагар 1,5%-й (ФБУН ГНЦ ПМБ, Россия) [23]. В пробирки с 0,8 или 0,4%-м ВНИ-агаром (HiMedia Laboratories Pvt. Limited, Индия) добавляли по 1,0 мл разведений титруемого бактериофага и по 0,1 мл бактериальной суспензии, затем высевали на предварительно подготовленную чашку с твердым агаром (1,5%-м). Морфологию бляшек определяли после инкубирования в течение 18–20 ч при температуре 37 °С [22].

Электронно-микроскопические исследования полученных бактериофагов, контрастированных 1%-м уранилацетатом, проводили под просвечивающим электронным микроскопом JEM-1011 (JEOL, Япония). Снимки были сделаны с помощью установленной камеры Erlangshen ES500W (Gatan, США). Измерения параметров бактериофагов производили с помощью программы ImageJ.

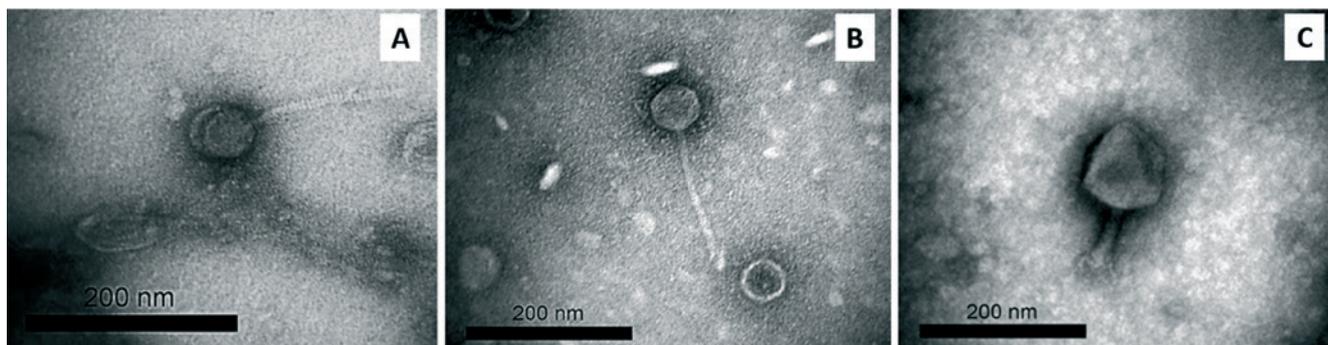


Рис. 1. Электронные микрофотографии бактериофагов, активных в отношении *B. bronchiseptica*: А – vB_BbrS_2/200220.7.2; В – vB_BbrS_4/200220.7.1; С – vB_BbrM_5/200220.7.2 (контрастирование 1%-м раствором уранилацетата, увеличение 250 000×)

Fig. 1. Electron micrographs of bacteriophages active against *B. bronchiseptica*: А – vB_BbrS_2/200220.7.2; В – vB_BbrS_4/200220.7.1; С – vB_BbrM_5/200220.7.2 (1% uranyl acetate solution used as a contrast agent, 250, 000× magnification)

Таблица 1
Морфология негативных колоний бактериофагов

Table 1
Morphology of bacteriophage negative colonies

Питательная среда	Морфология негативных колоний		
	vB_BbrS_2/200220.7.2	vB_BbrS_4/200220.7.1	vB_BbrM_5/200220.7.2
ВНИ-агар 1,5%-й с кровью	– прозрачные, Ø 1,8 ± 0,3 мм; – мутные, Ø 0,9 ± 0,1 мм; – прозрачные с мутным ореолом, Ø 2,3 ± 0,3 мм	– прозрачные, Ø 1,2 ± 0,3 мм; – мутные, Ø 1,0 ± 0,1 мм; – прозрачные с мутным ореолом, Ø 2,4 ± 0,1 мм	– прозрачные, Ø 0,6 ± 0,2 мм; – мутные, Ø 1,9 ± 0,1 мм
ВНИ-агар 1,5%-й	– мутные, Ø 1,1 ± 0,1 мм	– мутные, Ø 1,0 ± 0,1 мм	– мутные, Ø 1,0 ± 0,1 мм
ГРМ-агар 1,5%-й	– мутные, Ø 1,0 ± 0,1 мм	– мутные, Ø 1,0 ± 0,1 мм	– мутные, Ø 1,0 ± 0,1 мм
Бордетелагар 1,5%-й	– прозрачные, Ø 2,2 ± 0,3 мм; – мутные, Ø 0,9 ± 0,1 мм; – прозрачные с мутным ореолом, Ø 2,4 ± 0,2 мм	– прозрачные, Ø 1,6 ± 0,2 мм; – мутные, Ø 1,0 ± 0,1 мм; – прозрачные с мутным ореолом, Ø 2,6 ± 0,1 мм	– прозрачные, Ø 1,5 ± 0,2 мм; – мутные, Ø 1,0 ± 0,1 мм; – прозрачные с мутным ореолом, Ø 2,1 ± 0,1 мм

Таблица 2
Спектр литического действия выделенных бактериофагов, активных в отношении *B. bronchiseptica*

Table 2
Lytic spectrum of isolated bacteriophages active against *B. bronchiseptica*

№ п/п	Штаммы	Бактериофаги		
		vB_BbrS_2/200220.7.2	vB_BbrS_4/200220.7.1	vB_BbrM_5/200220.7.2
1	<i>B. bronchiseptica</i> 200220.7.1	++++	++++	++++
2	<i>B. bronchiseptica</i> 200220.7.2	++++	++++	++++
3	<i>B. bronchiseptica</i> 200220.6.1	–	+	–
4	<i>B. bronchiseptica</i> 1	+	–	++
5	<i>B. bronchiseptica</i> 2	++++	++++	–
6	<i>B. bronchiseptica</i> 3	++	++	++
7	<i>B. bronchiseptica</i> 4	–	+	–
8	<i>B. bronchiseptica</i> 200220.4.4	+++	–	–
9	<i>B. bronchiseptica</i> C-93	–	+	–
10	<i>B. bronchiseptica</i> C-97	+	+++	+
11	<i>B. bronchiseptica</i> C-98	+	+	+
12	<i>B. bronchiseptica</i> 43	–	+	+
13	<i>B. bronchiseptica</i> 44	–	–	++

«–» – отсутствие зоны лизиса; «+» – образование зоны лизиса с большим количеством колоний вторичного роста бактерии; «++» – образование зоны лизиса с небольшим количеством колоний вторичного роста бактерии; «+++» – зона лизиса с единичными колониями вторичного роста; «++++» – прозрачная зона лизиса без колоний вторичного роста [25].

«–» – absence of lysis zone; «+» – lysis zone formed with multiple colonies of secondary bacterial growth; «++» – lysis zone formed with few colonies of secondary bacterial growth; «+++» – lysis zone with sporadic colonies of secondary bacterial growth; «++++» – clear lysis zone with no colonies of secondary bacterial growth [25].

Специфичность фага изучали методом спот-тестирования фаголизата на газон близкородственных бактерий: *Bordetella parapertussis* C-95, *Bordetella parapertussis* C-94, *Bordetella pertussis* C-99. Штаммы получены из коллекции микроорганизмов ООО НПЦ «Микро-Мир».

Для изучения температурной устойчивости выделенных бактериофагов фаголизаты прогревали в твердотельном термостате «Термит» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия) с повышением температуры от 40 до 95 °С. Каждые 20 мин из пробирки отбирали пробу, при этом повышая температуру на 5 °С [24]. Контрольные пробирки не прогревали. Активность исследуемых фагов определяли по методу Грациа [20, 21].

Изучение стабильности титра фага, закрытого во флакон и хранящегося при температуре 4–8 °С без добавления консерванта в течение 8 мес., проводили по методу Грациа [20, 21].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Из образцов биоматериала от животных выделено 3 новых вирулентных бактериофага (рис. 1), которым присвоены наименования: vB_BbrS_2/200220.7.2; vB_BbrS_4/200220.7.1; vB_BbrM_5/200220.7.2.

Морфологию негативных колоний бактериофагов изучали на различных питательных средах и анализировали по двум параметрам – размеру и прозрачности. Проявление этих признаков зависело от состава питательной среды и концентрации агара в верхнем слое. В таблице 1 представлены результаты анализа морфологии негативных колоний бактериофагов, полученных на штаммах *B. bronchiseptica*. На различных средах наблюдалась диссоциация негативных колоний на прозрачные, мутные и прозрачные с мутными ореолами. Бляшки также различались по размеру, самые маленькие имели диаметр 0,6 ± 0,2 мм, а самые большие – 2,6 ± 0,1 мм. Стоит отметить, что данная морфология бляшек отмечена при использовании в верхнем слое 0,8%-го агара. В то же время при использовании в верхнем слое 0,4%-го агара на питательных средах ВНИ- и ГРМ-агаре образуются преимущественно крупные (2,5 ± 0,1 мм) прозрачные колонии, т. е. разведение агара способствует образованию большего количества прозрачных колоний и увеличению размера бляшек. Таким образом, состав питательной среды оказывает значительное влияние на морфологию бляшек, что соответствует выводам, сделанным N. Ramesh et al. [23]. Кроме того, в работе М. Адамса [20] отмечалось также, что подсчет стерильных пятен не имеет абсолютного значения – количество фаговых частиц в препарате зависит от состава питательной среды и штамма чувствительных бактерий.

Титры бактериофагов vB_BbrS_2/200220.7.2; vB_BbrM_5/200220.7.2 исследованы на тест-штамме *B. bronchiseptica* 200220.7.2 и составили (2,3 ± 1,4) × 10⁸; (6,1 ± 1,2) × 10⁸ БОЕ/мл соответственно. Наиболее высоким титром обладал бактериофаг vB_BbrS_4/200220.7.1 – (9,0 ± 0,2) × 10⁸ БОЕ/мл. Его титр исследован на тест-штамме *B. bronchiseptica* 200220.7.1.

Результаты исследований спектра литической активности выделенных бактериофагов представлены в таблице 2. Данные получены на основе трех повторений. Исследования показали, что выделенные бактериофаги характеризуются различным спектром литического действия. Максимальным спектром лити-

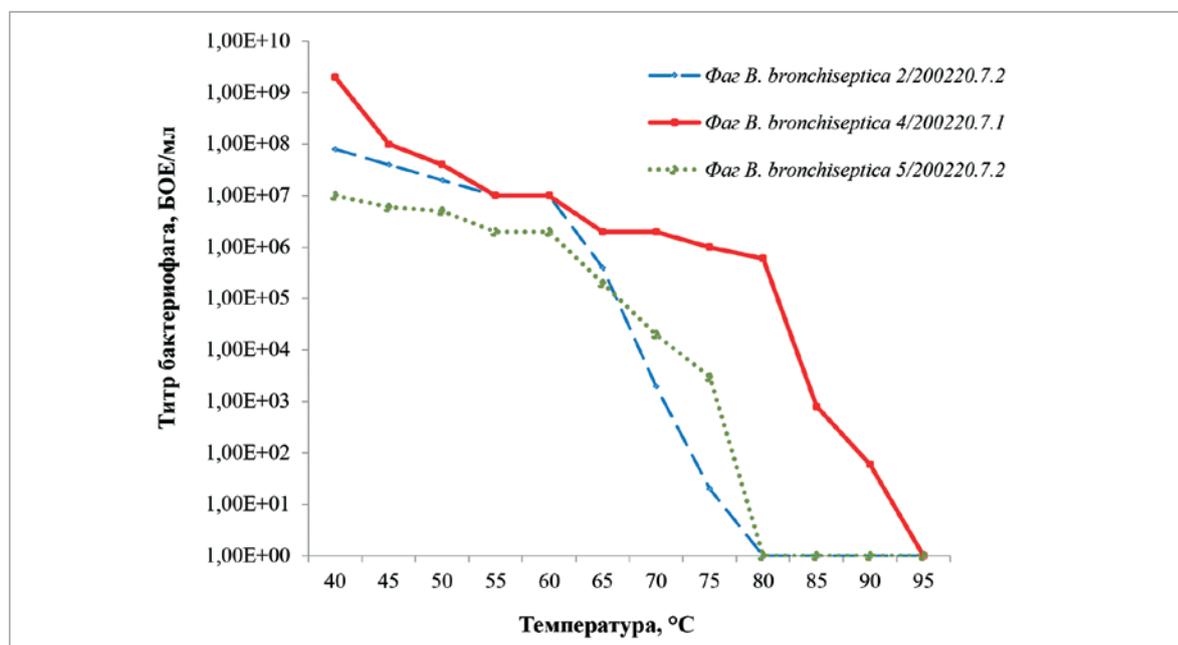


Рис. 2. Устойчивость выделенных бактериофагов к тепловому воздействию

Fig. 2. Heat resistance of isolated bacteriophages

ческого действия обладал фаг *vB_BbrS_4/200220.7.1*, который лизировал 10 из 13 бактериальных штаммов, что составило 76,9%. Бактериофаги *vB_BbrS_2/200220.7.2* и *vB_BbrM_5/200220.7.2* лизировали 61,5% штаммов *B. bronchiseptica*.

Для каждого выделенного бактериофага были определены такие параметры, как среднее значение диаметра головки (по противоположным углам) и среднее значение длины хвоста. Вирионы фага *vB_BbrS_2/200220.7.2* состоят из головки икосаэдрической формы размером $49 \pm 2,67$ нм и изгибаемого несокращающегося отростка длиной $171 \pm 2,26$ нм. Вирионы бактериофага *vB_BbrS_4/200220.7.1* имеют сходные с фагом *vB_BbrS_2/200220.7.2* морфологические характеристики: головка икосаэдрической формы размером $61 \pm 2,88$ нм и изгибаемый несокращающийся отросток длиной $158 \pm 6,17$ нм. Вирионы фага *vB_BbrM_5/200220.7.2* состоят из головки икосаэдрической формы размером $108 \pm 3,49$ нм и прямого сокращающегося хвостового отростка длиной $69 \pm 5,37$ нм. В соответствии с международной номенклатурой вирусов по морфологическим параметрам фаги *vB_BbrS_2/200220.7.2* и *vB_BbrS_4/200220.7.1* отнесены к семейству *Siphoviridae*, бактериофаг *vB_BbrM_5/200220.7.2* – к семейству *Myoviridae*.

Изучение специфичности показало, что выделенные бактериофаги лизируют не только штаммы *B. bronchiseptica*, но также проявляют активность в отношении штаммов *Bordetella parapertussis* C-95 и *Bordetella parapertussis* C-94.

В результате исследования температурной устойчивости бактериофагов установлено, что прогревание фагов в течение 20 мин свыше 40°C приводит к снижению их литической активности (рис. 2). При температуре 80°C происходит полная инактивация бактериофагов *vB_BbrS_2/200220.7.2* и *vB_BbrM_5/200220.7.2*, при 95°C – бактериофага *vB_BbrS_4/200220.7.1*. Данные получены на основе трех повторений.

Для использования выделенных фагов в производстве необходимо исследовать изменение литической активности с течением времени [26, 27]. Фильтраты бактериофагов хранились во флаконах при температуре $4-8^\circ\text{C}$ без добавления консерванта. Литическую активность определяли по истечении 8 мес. Установлено, что в течение данного периода времени титр бактериофагов не снизился. Результаты представлены в таблице 3.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, бактериофаги *vB_BbrS_2/200220.7.2*, *vB_BbrS_4/200220.7.1*, *vB_BbrM_5/200220.7.2*, по результатам исследований *in vitro*, являются перспективными для дальнейших научных исследований в контексте фототерапии заболеваний, вызванных бактерией *B. bronchiseptica*. Применение препаратов на основе вирулентных бактериофагов в ветеринарии позволит безопасно и эффективно устранять инфекцию без воздействия на нормофлору, минимизировать риск передачи антибиотикоустойчивых штаммов *B. bronchiseptica* человеку, снизить потери продуктивности сельскохозяйственных животных и улучшить экономические показатели в отрасли животноводства.

Таблица 3

Изменение литической активности бактериофагов, активных в отношении *B. bronchiseptica*, с течением времени

Table 3

Temporal variations in lytic activity of bacteriophages active against *B. bronchiseptica*

Бактериофаг	Титр до хранения, БОЕ/мл	Титр после 8 мес. хранения, БОЕ/мл
<i>vB_BbrS_2/200220.7.2</i>	$(2,3 \pm 1,4) \times 10^8$	$(3,1 \pm 0,4) \times 10^8$
<i>vB_BbrS_4/200220.7.1</i>	$(9,0 \pm 0,2) \times 10^8$	$(8,6 \pm 0,2) \times 10^8$
<i>vB_BbrM_5/200220.7.2</i>	$(6,1 \pm 1,2) \times 10^8$	$(4,1 \pm 1,1) \times 10^8$

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Беляева А. С., Савинов В. А., Капустин А. В., Лаишевцев А. И. Бордетеллез домашних животных. *Вестник Курской государственной сельскохозяйственной академии*. 2019; 7: 111–119. eLIBRARY ID: 41253859.
2. Васильев Д. А., Васильева Ю. Б., Мاستиленко А. В., Сверкалова Д. Г., Семанина Е. Н., Борисова О. Ю. и др. Бордетеллез животных: характеристика заболевания и возбудителя, разработка методов диагностики. Ульяновск: УГСХА им. П. А. Столыпина; 2014. 206 с.
3. МР 3.1.2.0072-13 Диагностика коклюша и паракоклюша: методические рекомендации. М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора; 2013. 56 с. Режим доступа: <https://files.stroyinf.ru/Data2/1/4293743/4293743262.pdf>.
4. Szymczak M., Grygorciewicz B., Karczewska-Golec J., Decewicz P., Panowski J. A., Orszagh-Szturo H., et al. Characterization of a unique *Bordetella bronchiseptica* vB_BbrP_BB8 bacteriophage and its application as an antibacterial agent. *Int. J. Mol. Sci.* 2020; 21 (4):1403. DOI: 10.3390/ijms21041403.
5. Brady C., Ackerman P., Johnson M., McNamara J. *Bordetella bronchiseptica* in a pediatric Cystic Fibrosis center. *J. Cyst. Fibros.* 2014; 13 (1): 43–48. DOI: 10.1016/j.jcf.2013.08.002.
6. Monti M., Diano D., Allegrini F., Delmonte A., Fausti V., Cravero P., et al. *Bordetella bronchiseptica* pneumonia in a patient with lung cancer; a case report of a rare infection. *BMC Infect. Dis.* 2017; 17 (1):644. DOI: 10.1186/s12879-017-2736-7.
7. Coutts A. J., Dawson S., Binns S., Hart C. A., Gaskell C. J., Gaskell R. M. Studies on natural transmission of *Bordetella bronchiseptica* in cats. *Vet. Microbiol.* 1996; 48 (1–2): 19–27. DOI: 10.1016/0378-1135(95)00128-x.
8. Dawson S., Jones D., McCracken C. M., Gaskell R. M., Hart C. A., Gaskell C. J. *Bordetella bronchiseptica* infection in cats following contact with infected dogs. *Vet. Rec.* 2000; 146 (2): 46–48. DOI: 10.1136/vr.146.2.46.
9. Chen Y., Yang L., Sun E., Song J., Wu B. Characterisation of a newly detected bacteriophage infecting *Bordetella bronchiseptica* in swine. *Arch. Virol.* 2019; 164 (1): 33–40. DOI: 10.1007/s00705-018-4034-0.
10. Park G. Y., Yu H. J., Son J. S., Park S. J., Cha H. J., Song K. S. Specific bacteriophage of *Bordetella bronchiseptica* regulates *B. bronchiseptica*-induced microRNA expression profiles to decrease inflammation in swine nasal turbinate cells. *Genes Genomics.* 2020; 42 (4): 441–447. DOI: 10.1007/s13258-019-00906-7.
11. Dworkin M. S., Sullivan P. S., Buskin S. E., Harrington R. D., Olliffe J., MacArthur R. D., Lopez C. E. *Bordetella bronchiseptica* infection in human immunodeficiency virus-infected patients. *Clin. Infect. Dis.* 1999; 28 (5): 1095–1099. DOI: 10.1086/514761.
12. Ner Z., Ross L. A., Horn M. V., Keens T. G., MacLaughlin E. F., Starnes V. A., Woo M. S. *Bordetella bronchiseptica* infection in pediatric lung transplant recipients. *Pediatr. Transplant.* 2003; 7 (5): 413–417. DOI: 10.1034/j.1399-3046.2003.00074.x.
13. Powers H. R., Shah K. *Bordetella bronchiseptica* bloodstream infection in a renal transplant patient. *Transpl. Infect. Dis.* 2017; 19 (6). DOI: 10.1111/tid.12774.
14. Rampelotto R. F., Hörner A., Hörner C., Righi R., Hörner R. Pneumonia caused by *Bordetella bronchiseptica* in two HIV-positive patients. *Sao Paulo Med. J.* 2016; 134 (3): 268–272. DOI: 10.1590/1516-3180.2015.02492701.
15. Dewan K. K., Skarlupka A. L., Rivera I., Cuff L. E., Gestal M. C., Taylor-Mulneix D. L., et al. Development of macrolide resistance in *Bordetella bronchiseptica* is associated with the loss of virulence. *J. Antimicrob. Chemother.* 2018; 73 (10): 2797–2805. DOI: 10.1093/jac/dky264.
16. Kadlec K., Schwarz S. Antimicrobial resistance in *Bordetella bronchiseptica*. *Microbiol. Spectr.* 2018; 6 (4). DOI: 10.1128/microbiolspec.ARBA-0024-2017.
17. Мотовилова Т. М., Качалина Т. С., Аникина Т. А. Оценка роли бактериофагов в этиотропной терапии инфекционно-воспалительных процессов на примере лечения хронического неспецифического эндометрита. Взгляд клинициста. *Трудный пациент*. 2013; 11 (8–9): 20–24. eLIBRARY ID: 20658728.
18. Садурдинова Г. Р. Усовершенствование схемы индикации и идентификации бактерий вида *Klebsiella oxytoca* с помощью фагового биофарма: автореф. дис. ... канд. биол. наук. Уфа; 2017. 21 с. Режим доступа: <https://viewer.rsl.ru/ru/rsl01008710265?page=1&rotate=0&theme=white>.
19. Романова Н. А., Феоктистова Н. А., Золотухин С. Н., Васильев Д. А., Алешкин А. В. Сравнительная эффективность методов выделения фагов бактерий *Vacillus megaterium*. *Вестник ветеринарии*. 2013; 64 (1): 26–27. eLIBRARY ID: 18337641.
20. Адамс М. Бактериофаги. М.: Медгиз, 1961. 521 с.
21. Гольдфарб Д. М. Бактериофагия. М.: Медгиз; 1961. 298 с.
22. Руководство по медицинской микробиологии. Книга 1. Общая и санитарная микробиология. Под ред. А. С. Лабинской, Е. Г. Волиной. М.: Бино; 2008. 1077 с.
23. Ramesh N., Archana L., Madurantakam Royam M., Manohar P., Eniyan K. Effect of various bacteriological media on the plaque morphology of *Staphylococcus* and *Vibrio* phages. *Access Microbiol.* 2019; 1 (4):e000036. DOI: 10.1099/acmi.0.000036.
24. Горшков И. Г., Викторов Д. А., Васильев Д. А. Выделение и изучение биологических свойств бактериофагов *Aeromonas sobria*. *Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии*. 2015; 3: 59–63. DOI: 10.18286/1816-4501-2015-3-59-63.
25. Асланов Б. И., Зуева Л. П., Кафтырева Л. А., Бойцов А. Г., Акимкин В. Г., Долгий А. А. и др. Рациональное применение бактериофагов в лечебной и противоэпидемической практике: федеральные клинические (методические) рекомендации. Нижний Новгород: Ремедиум Приволжье; 2014. 54 с.
26. Рыскалиева Б. Ж., Беккалиева А. К., Ляшенко Е. А. Выделение и исследование биологических свойств бактериофага, активного в отношении фитопатогенных бактерий *Pectobacterium carotovorum*. *Устойчивое развитие науки и образования*. 2018; 10: 180–184.
27. Семанина Е. Н. Выделение и изучение биологических свойств бактериофагов *Bordetella bronchiseptica* и разработка на их основе биофарма для индикации и идентификации: автореф. дис. ... канд. биол. наук. Саратов; 2012. 21 с. Режим доступа: <https://viewer.rsl.ru/ru/rsl01005012190?page=1&rotate=0&theme=white>.

REFERENCES

1. Belyaeva A. S., Savinov V. A., Kapustin A. V., Laishevcev A. I. Animal bordetellosis. *Bulletin of the Kursk Agricultural Academy*. 2019; 7: 111–119. eLIBRARY ID: 41253859. (in Russ.)
2. Vasiliev D. A., Vasilieva Ju. B., Mastilenko A. V., Sverkalova D. G., Semanina E. N., Borisova O. Ju., et al. Animal bordetellosis: disease and pathogen description, diagnostic method development. Ulyanovsk: USAU named after P. A. Stolypin; 2014. 206 p. (in Russ.)
3. МР 3.1.2.0072-13 Whooping cough and parapertussis diagnosis: methodical guidelines. Moscow: Federal Center for Hygiene and Epidemiology of Rosпотребнадзор; 2013. 56 p. Available at: <https://files.stroyinf.ru/Data2/1/4293743/4293743262.pdf>. (in Russ.)
4. Szymczak M., Grygorciewicz B., Karczewska-Golec J., Decewicz P., Panowski J. A., Orszagh-Szturo H., et al. Characterization of a unique *Bordetella bronchiseptica* vB_BbrP_BB8 bacteriophage and its application as an antibacterial agent. *Int. J. Mol. Sci.* 2020; 21 (4):1403. DOI: 10.3390/ijms21041403.
5. Brady C., Ackerman P., Johnson M., McNamara J. *Bordetella bronchiseptica* in a pediatric Cystic Fibrosis center. *J. Cyst. Fibros.* 2014; 13 (1): 43–48. DOI: 10.1016/j.jcf.2013.08.002.
6. Monti M., Diano D., Allegrini F., Delmonte A., Fausti V., Cravero P., et al. *Bordetella bronchiseptica* pneumonia in a patient with lung cancer; a case report of a rare infection. *BMC Infect. Dis.* 2017; 17 (1):644. DOI: 10.1186/s12879-017-2736-7.
7. Coutts A. J., Dawson S., Binns S., Hart C. A., Gaskell C. J., Gaskell R. M. Studies on natural transmission of *Bordetella bronchiseptica* in cats. *Vet. Microbiol.* 1996; 48 (1–2): 19–27. DOI: 10.1016/0378-1135(95)00128-x.
8. Dawson S., Jones D., McCracken C. M., Gaskell R. M., Hart C. A., Gaskell C. J. *Bordetella bronchiseptica* infection in cats following contact with infected dogs. *Vet. Rec.* 2000; 146 (2): 46–48. DOI: 10.1136/vr.146.2.46.
9. Chen Y., Yang L., Sun E., Song J., Wu B. Characterisation of a newly detected bacteriophage infecting *Bordetella bronchiseptica* in swine. *Arch. Virol.* 2019; 164 (1): 33–40. DOI: 10.1007/s00705-018-4034-0.
10. Park G. Y., Yu H. J., Son J. S., Park S. J., Cha H. J., Song K. S. Specific bacteriophage of *Bordetella bronchiseptica* regulates *B. bronchiseptica*-induced microRNA expression profiles to decrease inflammation in swine nasal turbinate cells. *Genes Genomics.* 2020; 42 (4): 441–447. DOI: 10.1007/s13258-019-00906-7.
11. Dworkin M. S., Sullivan P. S., Buskin S. E., Harrington R. D., Olliffe J., MacArthur R. D., Lopez C. E. *Bordetella bronchiseptica* infection in human immunodeficiency virus-infected patients. *Clin. Infect. Dis.* 1999; 28 (5): 1095–1099. DOI: 10.1086/514761.
12. Ner Z., Ross L. A., Horn M. V., Keens T. G., MacLaughlin E. F., Starnes V. A., Woo M. S. *Bordetella bronchiseptica* infection in pediatric lung transplant recipients. *Pediatr. Transplant.* 2003; 7 (5): 413–417. DOI: 10.1034/j.1399-3046.2003.00074.x.
13. Powers H. R., Shah K. *Bordetella bronchiseptica* bloodstream infection in a renal transplant patient. *Transpl. Infect. Dis.* 2017; 19 (6). DOI: 10.1111/tid.12774.
14. Rampelotto R. F., Hörner A., Hörner C., Righi R., Hörner R. Pneumonia caused by *Bordetella bronchiseptica* in two HIV-positive patients. *Sao Paulo Med. J.* 2016; 134 (3): 268–272. DOI: 10.1590/1516-3180.2015.02492701.
15. Dewan K. K., Skarlupka A. L., Rivera I., Cuff L. E., Gestal M. C., Taylor-Mulneix D. L., et al. Development of macrolide resistance in *Bordetella bronchiseptica* is associated with the loss of virulence. *J. Antimicrob. Chemother.* 2018; 73 (10): 2797–2805. DOI: 10.1093/jac/dky264.
16. Kadlec K., Schwarz S. Antimicrobial resistance in *Bordetella bronchiseptica*. *Microbiol. Spectr.* 2018; 6 (4). DOI: 10.1128/microbiolspec.ARBA-0024-2017.

17. Motovilova T. M., Kachalina T. S., Anikina T. A. Assessment of bacteriophages as etiotropic treatment for infectious and inflammatory processes on the pattern of chronic non-specific endometritis. The clinical view. *Difficult Patient*. 2013; 11 (8–9): 20–24. eLIBRARY ID: 20658728. (in Russ.)
18. Sadrtidinova G. R. Improvement of indication and identification scheme of *Klebsiella oxytoca* bacteria using phage biological product: author's abstract of Candidate of Science (Biology) thesis. Ufa; 2017. 21 p. Available at: <https://viewer.rsl.ru/ru/rsl01008710265?page=1&rotate=0&theme=white>. (in Russ.)
19. Romanova N. A., Feoktistova N. A., Zolotukhin S. N., Vasilyev D. A., Aleshkin A. V. Comparative efficacy of isolation methods for phages of *Bacillus megaterium*. *Vestnik veterinarii*. 2013; 64 (1): 26–27. eLIBRARY ID: 18337641. (in Russ.)
20. Adams M. H. Bacteriophages. New York – London: Interscience Publishers; 1959. 592 p.
21. Goldfarb D. M. Bacteriophagy. Moscow: Medgiz; 1961. 298 p. (in Russ.)
22. Medical microbiology guide. Book 1. General and sanitary microbiology. Ed. by A. S. Labinskaya, E. G. Volina. Moscow: Binom; 2008. 1077 p. (in Russ.)
23. Ramesh N., Archana L., Madurantakam Royam M., Manohar P., Emani K. Effect of various bacteriological media on the plaque morphology of *Staphylococcus* and *Vibrio* phages. *Access Microbiol*. 2019; 1 (4): e000036. DOI: 10.1099/acmi.0.000036.
24. Gorshkov I. G., Viktorov D. A., Vasilyev D. A. Isolation and study of biological properties of bacteriophages *Aeromonas sobria*. *Vestnik of Ulyanovsk State Agricultural Academy*. 2015; 3: 59–63. DOI: 10.18286/1816-4501-2015-3-59-63. (in Russ.)
25. Aslanov B. I., Zueva L. P., Kaftyreva L. A., Boytsov A. G., Akimkin V. G., Dolgij A. A., et al. Rational use of bacteriophages in medical and anti-epidemic practice: federal clinical (methodical) guidelines. Nizhny Novgorod: Remedium Privolzh'e; 2014. 54 p. (in Russ.)
26. Ryskaliyeva B. Zh., Bekkaliyeva A. K., Lyashenko E. A. Isolation and study of the biological properties of bacteriophages active against phytopathogenic bacteria *Pectobacterium carotovorum*. *Ustoichivoe razvitie nauki i obrazovaniya*. 2018; 10: 180–184. (in Russ.)
27. Semanina E. N. Isolation and study of *Bordetella bronchiseptica* bacteriophage biological properties and development of a relevant biological product for indication and identification: author's abstract of Candidate of Science (Biology) thesis. Saratov; 2012. 21 p. Available at: <https://viewer.rsl.ru/ru/rsl01005012190?page=1&rotate=0&theme=white>. (in Russ.)

Поступила в редакцию / Received 11.04.2022

Поступила после рецензирования / Revised 18.05.2022

Принята к публикации / Accepted 14.06.20

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ / INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Кочетова Татьяна Андреевна, научный сотрудник ООО НПЦ «МикроМир», г. Москва, Россия.

Юскевич Виктория Викторовна, кандидат биологических наук, заведующий бактериологической лабораторией ООО НПЦ «МикроМир», г. Москва, Россия.

Садикова Гульнур Тахавиевна, научный сотрудник ООО НПЦ «МикроМир», г. Москва, Россия.

Попова Валентина Михайловна, кандидат медицинских наук, заместитель генерального директора ООО НПЦ «МикроМир», г. Москва, Россия

Tatiana A. Kochetova, Researcher, Research and Production Center “MicroMir” LLC, Moscow, Russia.

Victoria V. Yuskevich, Candidate of Science (Biology), Head of Bacteriological Laboratory, Research and Production Center “MicroMir” LLC, Moscow, Russia.

Gulnur T. Sadykova, Researcher, Research and Production Center “MicroMir” LLC, Moscow, Russia.

Valentina M. Popova, Candidate of Science (Medicine), Deputy General Director, Research and Production Center “MicroMir” LLC, Moscow, Russia.