

УДК 579.253.4:615.281.8

DOI: 10.31040/2222-8349-2025-0-3-64-70

МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ И БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА БАКТЕРИОФАГА vB_CPSM_E3 ЛИТИЧЕСКОГО ДЛЯ *CORYNEBACTERIUM PSEUDOTUBERCULOSIS*

© Х.А. Алмуслимави, Н.В. Пименов

Исследование литического бактериофага vB_CpsM_E3, активного против *C. pseudotuberculosis* – возбудителя казеозного лимфаденита (КЛ) у крупного рогатого скота. Фаг выделен из проб навоза Московской области и проявлял литическую активность против 84% тестируемых штаммов.

Электронная микроскопия идентифицировала фаг как представителя семейства *Myoviridae* (морфотип A1) с размерами капсида 54.3 ± 5.3 нм и хвоста 224.3 ± 8.3 нм. Фаг сохранял стабильность при pH 6–9 и температуре от -20°C до 50°C , но инактивировался при экстремальных значениях pH (≤ 4 или ≥ 10) и температуре выше 60°C .

Адсорбция характеризовалась двухфазной кинетикой ($K_0 = 7.7\text{--}8.5 \times 10^{-9}$ мл/мин/КОЕ) с выходом 76–84 БОЕ на клетку. Латентный период составлял 30 мин с полным лизисом за 90 мин. Фаг проявлял специфичность к *Corynebacterium spp.* (*C. xerosis*, *C. amycolatum*), но не действовал на другие бактерии.

Ключевые слова: *Corynebacterium pseudotuberculosis*, бактериофаг, *Myoviridae*, казеозный лимфаденит.

Введение. *C. pseudotuberculosis* – это грам-положительный факультативно внутриклеточный патоген, вызывающий казеозный лимфаденит (КЛ) – хроническое инфекционное заболевание овец, коз, а реже лошадей и крупного рогатого скота [1]. КЛ характеризуется образованием пиогранулематозных абсцессов в периферических и внутренних лимфатических узлах, что приводит к постепенной потере веса, снижению надоев молока и настригов шерсти, а также выбраковке туш при убое. Экономический ущерб значителен: глобальные ежегодные потери оцениваются в сотни миллионов долларов из-за снижения продуктивности, вынужденного забоя и торговых ограничений [1].

Этот микроорганизм особенно устойчив во внешней среде и может длительное время сохраняться в почве и на предметах, что способствует передаче между животными. Существующие методы профилактики – антибиотики, вакцины и улучшение условий содержания – имеют серьезные ограничения. Антибиотикотерапия часто неэффективна против внутриклеточных стадий инфекции и нагноившихся абсцессов, а доступные вакцины обеспечивают лишь частичную защиту и не предотвращают выделение бактерий [2].

Кроме того, во всем мире все чаще сообщается о появлении мультирезистентных (MDR) штаммов *C. pseudotuberculosis*, что затрудняет лечение. Антимикробный кризис, вызванный такой устойчивостью, обусловил острую необходимость в поиске новых терапевтических подходов, одним из которых является фаговая терапия, демонстрирующая значительные перспективы [3, 4].

Материалы и методы. Целевые штаммы для подбора бактериофагов были предоставлены из коллекции Научно-исследовательского института эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского (МНИИЭМ), а также выделены авторами самостоятельно (*C. pseudotuberculosis* ($n = 25$), *C. xerosis* ($n = 10$), *C. amycolatum* ($n = 8$), *C. confusum* ($n = 5$), *C. composti* ($n = 6$), *C. ammoniagenes* ($n = 10$), *C. minutissimum* ($n = 6$), *C. striatum* ($n = 6$), *C. epidermidis* ($n = 2$), *C. pseudodiphtheriticum* ($n = 2$), *Escherichia coli* ($n = 3$), *Staphylococcus aureus* ($n = 3$), *Klebsiella pneumoniae* ($n = 2$), *Bacillus subtilis* ($n = 4$)).

Во всех экспериментах *Corynebacterium* высевали на колумбийский агар с добавлением 5% овечьей крови (производства «Condalab»).

АЛМУСЛИМАВИ Хасан Абдулвахаб Мохаммад Джавад, Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии имени К.И. Скрябина, e-mail: Hassan91zh@yahoo.co.uk
ПИМЕНОВ Николай Васильевич – д.б.н., Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии имени К.И. Скрябина, e-mail: pimenov-nikolai@yandex.ru

Затем культуру либо высевали на агар с сердечно-мозговым бульоном (СМБ, «Condalab»), либо выращивали в жидкой среде СМБ с аэрацией, достигаемой встряхиванием. *E. coli*, *K. pneumoniae* и *S. aureus* сначала культивировали на 5% кровяном агаре, а затем выращивали в мясопептонном бульоне (МПБ). Для выделения бактериофагов, их размножения и всех последующих исследований использовали *C. pseudotuberculosis*. Спектр литической активности определяли на других бактериальных штаммах.

Образцы речной воды, сточных вод, почвы и навоза были собраны для выделения нескольких фагов на территории Москвы и Московской области (через виварий Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии – МВА имени К.И. Скрябина»), а также в Московской, Смоленской, Владимирской, Калужской, Тверской областях. Стандартные методики были модифицированы для идентификации бактериофагов, специфичных к *C. pseudotuberculosis* [2, 4, 5].

Литическую активность бактериофагов оценивали с использованием двух взаимодополняющих методов: количественного метода Грация и полуколичественного метода Аппельмана. В методе Грация чашки Петри покрывали базовым слоем агара ВНИ (1.5%), поверх которого наносили слой мягкого агара (1%), засеянного культурой бактерий-хозяев в ранней логарифмической фазе роста (~10⁷ КОЕ/мл). Десятикратные серийные разведения фаголизатов в стерильном физиологическом растворе (0.9% NaCl, pH 7,1) наносили по 25 мкл в трех повторностях на бактериальный газон. После инкубации при 37°C в течение 18–24 часов количество бляшкообразующих единиц (БОЕ/мл) рассчитывали по разведениям с четкими литическими зонами (30–300 бляшек на пятно). Исследование методом Аппельмана было проведено в последовательном ряду десятикратных разведений тест-бактериофага. Затем во все пробирки добавляли по 1 капле (0.2 мл) 18-часовой бульонной культуры *Corynebacterium pseudotuberculosis*. Дополнительные пробирки 11 и 12 служили контрольными пробирками: одна из них содержала жидкую питательную среду и культуру (без фага), другая – питательную среду (контроль стерильности). Все пробирки вы-

держивали при температуре 37°C в течение 18 часов. Литическую активность фага, выраженную в титре, определяли по последней пробирке, в которой нет помутнения или осадка. Титр фага по Аппельману выражали максимальным разведением фага, при котором происходил полный лизис соответствующей культуры.

Изучение морфологии вирионов фагов. Электронно-микроскопическое исследование приготовленных концентрированных препаратов бактериофагов проводили на электронном микроскопе JEOL-100 S при ускоряющем напряжении 80 киловольт с использованием метода негативного контрастирования 2%-м водным раствором уранил-ацетата при инструментальном увеличении в 53 018 раз и фотографическом увеличении в 25–80 раз.

Спектр литической активности и диапазон специфичности выделенных фагов исследовали на различных бактериальных штаммах (*Corynebacterium*, *E. coli*, *K. pneumoniae* и *S. Aureus*, *B. subtilis*). Круг восприимчивых хозяев определяли по наличию зон лизиса в ходе спот теста.

Исследование термостабильности бактериофагов включало экспозицию при температурах от –20 до 80°C (по 1 час для каждого режима). После инкубации в течение 18 часов при 37°C проводили количественную оценку выживших фагов по методу бляшкообразования. Анализ устойчивости к различным значениям pH (диапазон 2–12) выполняли при 25°C в течение 1 часа с последующим титрованием по методу Грация. Для каждого экспериментального условия использовали три независимые повторности.

Адсорбционную способность бактериофага, специфичного к *C. pseudotuberculosis*, исследовали путем инкубации смеси фага (МОИ = 0.001) с бактериальными клетками в экспоненциальной фазе роста при комнатной температуре. В заданные временные точки (0–25 мин) отбирали пробы по 100 мкл, которые немедленно смешивали с 900 мкл SM-буфера и хлороформом (2 капли). После центрифугирования (5 000 × g, 5 мин, 4°C) в супернатанте определяли титр фага по количеству БОЕ методом двойного агарового слоя. Исходный титр (время 0 мин) принимали за 100%.

Латентный период и размер выхода фагов *C. pseudotuberculosis* определяли, отслеживая количество фаговых частиц во время реплика-

ции в штамме 1463. Бактерии выращивали до средней экспоненциальной фазы ($OD_{600} = 0.3$), центрифугировали и заражали при множественности инфицирования (MOI) 0.01–0.005. Неадсорбированные фаги удаляли центрифугированием, а зараженные клетки ресуспендировали в бульоне LB. Пробы отбирали каждые 10 минут в течение 2 часов и сразу титровали. Размер выхода рассчитывали как отношение максимального числа высвободившихся фагов (после репликации) к количеству инфицированных клеток (латентная фаза). Результаты представлены как средний титр фага ($\pm$ стандартное отклонение) из трех повторностей.

Результаты и их обсуждение. Селективный анализ с использованием spot-теста выявил присутствие бактериофагов в пробах навоза, отобранных в семи локациях Москвы и Московской области. Исследованные объекты включали фермы ПР «Васильевское», МТФ «Озерецкое» и «Алферьево» (Сергиево-Посадский район, КРС), ООО «Шульгино» (Волоколамский район, козы), а также виварий Московской государственной академии ветеринарной медицины и биотехнологии – МВА имени К.И. Скрябина (конюшни и отделения для КРС и МРС). В остальных образцах специфичные к *C. pseudotuberculosis* бактериофаги обнаружены не были. После выделения единичных бляшкообразующих единиц было получено десять изолятов фагов. Номенклатура фагов соответство-

вала системе Кропинского (vB_Cps_Z1, vB_Cps_Z2, vB_Cps_H, vB_Cps_N, vB_Cps_M1, vB_Cps_M2, vB_Cps_M3, vB_Cps_E1, vB_Cps_E2, vB_Cps_E3). Зоны лизиса демонстрировали разнообразную морфологию с диаметром от 0.5 до 3 мм. Все фаги проявляли литическую активность с титрами в диапазоне 10^{-2} – 10^{-7} (метод Аппельмана) и 1×10^3 – 3×10^8 БОЕ/мл (метод Грация).

Бактериофаги vB_Cps_H, vB_Cps_M1, vB_Cps_M2 и vB_CpsM_E3 продемонстрировали высокую литическую активность по методам Градса и Аппельмана и были отобраны в качестве кандидатов для создания биологического препарата – коктейля фагов.

В данном исследовании для дальнейшего изучения был выбран бактериофаг vB_CpsM_E3, выделенный из навоза конюшни вивария Московской государственной академии ветеринарной медицины и биотехнологии. Данный фаг проявляет высокую литическую активность в отношении *C. pseudotuberculosis*. На рис. 1 представлена характерная морфология зоны лизиса – четкая центральная зона диаметром 1–2 мм, что свидетельствует о выраженной способности фага подавлять рост бактерий и эффективно лизировать клетки-хозяева (табл. 1). Количественная оценка литической активности двумя независимыми методами (Аппельмана и двойного агарового слоя) показала высокие значения: титр 10^{-6} и концентрация 6×10^7 БОЕ/мл соответственно.

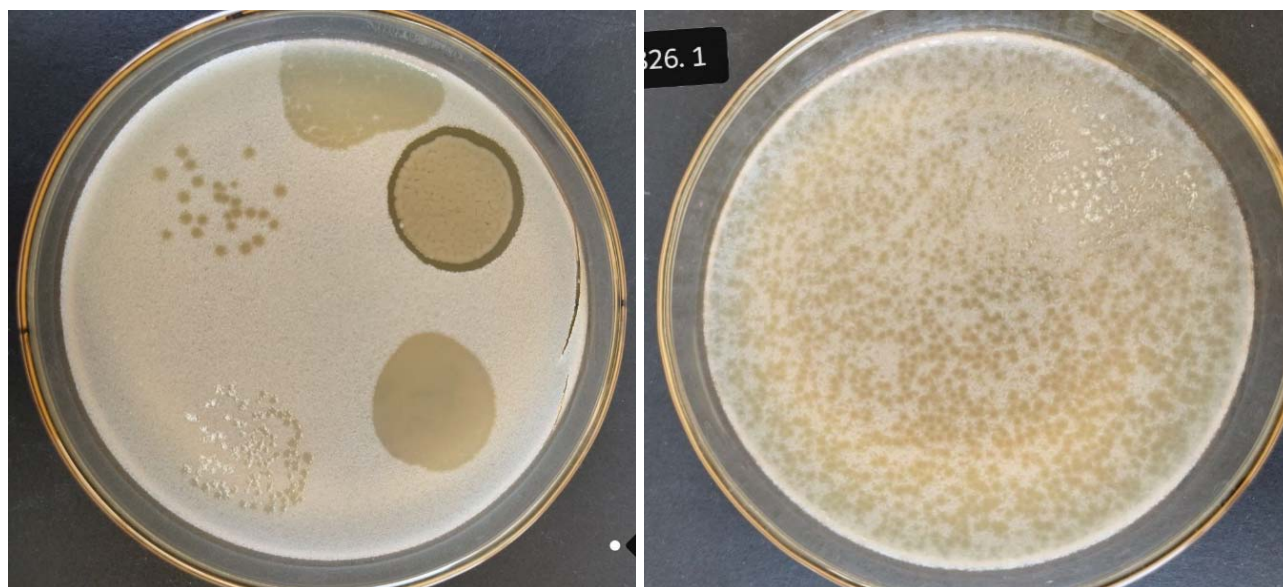


Рис. 1. Морфология зоны ингибирования фага *C. pseudotuberculosis* vB_CpsM_E3 после 24-часовой инкубации

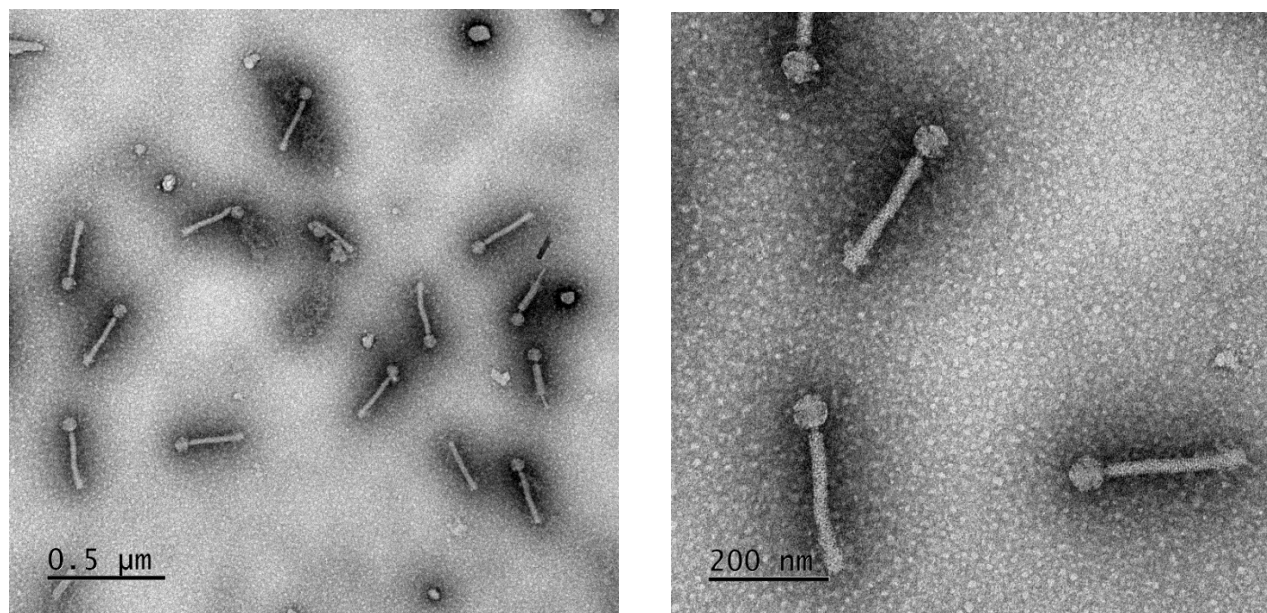


Рис. 2. Электронно-микроскопические. *C. pseudotuberculosis* vB_CpsM_E3

Для определения спектра хозяев фага vB_CpsM_E3 была протестирована его вирулентность в отношении грамположительных и грамотрицательных бактерий: *C. pseudotuberculosis* ($n = 25$), *C. xerosis* ($n = 10$), *C. amycolatum* ($n = 8$), *C. confusum* ($n = 5$), *C. composti* ($n = 6$), *C. ammoniagenes* ($n = 10$), *C. minutissimum* ($n = 6$), *C. striatum* ($n = 6$), *C. epidermidis* ($n = 2$), *C. pseudodiphtheriticum* ($n = 2$), *Escherichia coli* ($n = 3$), *Staphylococcus aureus* ($n = 3$), *Klebsiella pneumoniae* ($n = 2$), *Bacillus subtilis* ($n = 4$). Вирулентность фага vB_CpsM_E3 была определена следующим образом: при тестировании на 25 культурах *C. pseudotuberculosis* он показал четкую зону ингибирования с высокой вирулентной активностью, что соответствует примерно 84% вирулентности против *C. pseudotuberculosis*. Фаг также проявил значительную литическую активность против других видов рода *Corynebacterium*, включая 80% активности против *C. xerosis* и 80% активности против *C. amycolatum*. Была также обнаружена более низкая степень активности против *C. minutissimum*, хотя и в меньшей степени. Заметим, что фаг не образовывал литического действия на другие тестируемые виды на *C. composti*, *C. ammoniagenes*, *C. striatum*, *C. epidermidis*, *C. pseudodiphtheriticum*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Bacillus subtilis*, что демонстрирует его высокую специфичность к *C. pseudotuberculosis* и относительно широкий

спектр действия внутри рода *Corynebacterium*, охватывающий *C. xerosis*, *C. amycolatum* и *C. minutissimum*.

Электронная микроскопия и микроморфометрия вирионов были использованы для определения морфотипа и таксономической классификации коринебактериофага vB_CpsM_E3. Как показано на рис. 2, данный бактериофаг относится к четвертой морфологической группе согласно классификации А.С. Тихоненко. Характерное для семейства *Myoviridae*, он имеет икосаэдрический капсид (диаметр головки: 54.3 ± 5.3 нм) и сокращающийся хвост с поперечной исчерченностью. Детальные измерения выявили длину хвоста 224.3 ± 8.3 нм и ширину 22.8 ± 2.7 нм, что соответствует морфотипу A1 по системе Тихоненко (рис. 2). Эти морфологические признаки однозначно подтверждают его принадлежность к семейству *Myoviridae* с морфотипом A1.

Бактериофаг vB_CpsM_E3 демонстрирует четкие границы стабильности при температурных и pH-воздействиях (табл. 1). В отношении устойчивости к pH фаг проявлял наилучшую стабильность в нейтральной и слабощелочной среде (pH 6–8), достигая пикового значения 5.20×10^9 БОЕ/мл (контроль при pH 7). Высокие титры сохранялись в диапазоне pH 5–9 (10^9 – 10^9 БОЕ/мл), но резко снижались в экстремально кислых ($\leq$ pH 4) или щелочных ($\geq$ pH 10) условиях, с полной инактивацией при pH ≤ 3 или ≥ 12 . Критическими точками стали pH 4

и pH 10, при которых титры снижались в 100 раз (9.00×10^7) и 10 раз (1.20×10^8) соответственно. Термический анализ выявил максимальную стабильность в диапазоне от -20 до 50°C , с титрами в пределах 10^8 БОЕ/мл (например, $2.49 \pm 0.21 \times 10^8$ при -20°C). Резкое снижение титра наблюдалось при превышении 50°C : до 9.05×10^7 БОЕ/мл при 60°C и до 3.24×10^4 БОЕ/мл к 80°C , что свидетельствует о термической лабильности при высоких температурах.

Бактериофаг vB_CpsM_E3 демонстрирует сложную двухфазную кинетику адсорбции на *C. pseudotuberculosis* (табл. 2). В течение первых 5 мин наблюдается медленный процесс адсорбции: в среднем $93.40 \pm 8.92\%$ фагов остаются

свободными, а константа скорости адсорбции (K_0) сохраняется на низком уровне (0.08 – 1.89×10^{-9} мл/мин/КОЕ). Резкий переход происходит на 6-й минуте: количество свободных фагов стремительно снижается до $23.04 \pm 11.47\%$, а значение K_0 возрастает до 7.70×10^{-9} мл/мин/КОЕ, что указывает на кооперативный характер связывания. В последующей фазе (7–20 минут) система достигает устойчивого состояния: доля адсорбированных фагов составляет 77.71 – 84.88% , а K_0 остается высоким (7.77 – 8.49×10^{-9} мл/мин/КОЕ). Стандартное отклонение данных варьирует от 1.02% (3 мин) до 11.47% (6 мин), что отражает неоднородность процесса адсорбции.

Т а б л и ц а 1

Профиль стабильности бактериофага vB_CpsM_E3

Стабильности pH		Стабильности Температура	
pH	Титр бактериофага БОЕ/мл	$^\circ\text{C}$	Титр бактериофага БОЕ/мл
7 Контроль	$(5.20 \pm 0.00) \times 10^9$	4 Контроль	$(2.30 \pm 0.00) \times 10^8$
6	$(4.95 \pm 0.05) \times 10^9$	-20	$(2.49 \pm 0.21) \times 10^8$
8	$(5.15 \pm 0.15) \times 10^9$	25	$(2.51 \pm 0.27) \times 10^8$
9	$(4.75 \pm 0.05) \times 10^9$	30	$(3.09 \pm 0.40) \times 10^8$
5	$(1.30 \pm 0.10) \times 10^9$	40	$(2.48 \pm 0.31) \times 10^8$
4	$(9.00 \pm 1.00) \times 10^7$	50	$(2.59 \pm 0.05) \times 10^8$
10	$(1.20 \pm 0.10) \times 10^8$	60	$(9.05 \pm 1.75) \times 10^7$
11	$(2.50 \pm 0.50) \times 10^7$	70	$(1.09 \pm 0.14) \times 10^6$
12	(0.00 ± 0.00)	80	$(3.24 \pm 2.36) \times 10^4$
3	(0.00 ± 0.00)	–	–
2	(0.00 ± 0.00)	–	–

Т а б л и ц а 2

Кинетика адсорбции бактериофага vB_CpsM_E3 на *C. pseudotuberculosis*

Время, мин	Свободные фаги, %	Адсорбированные фаги, %	Константа скорости адсорбции (K_0)
	(Среднее $\pm$ CO)	(100% – свободные)	($\times 10^{-9}$ мл/мин/КОЕ)
0	100.00 ± 0.00	0	0
1	99.18 ± 1.16	0.82	0.08
2	99.31 ± 1.20	0.69	0.07
3	98.36 ± 1.02	1.64	0.16
4	88.06 ± 1.66	11.94	1.19
5	81.08 ± 5.89	18.92	1.89
6	23.04 ± 11.47	76.96	7.7
7	16.76 ± 4.12	83.24	8.32
8	20.73 ± 7.78	79.27	7.93
9	22.29 ± 10.20	77.71	7.77
10	21.17 ± 9.48	78.83	7.88
13	17.66 ± 5.17	82.34	8.23
15	18.40 ± 6.44	81.6	8.16
20	15.12 ± 1.80	84.88	8.49

Латентный период и урожайность бактериофага vB_CpsM_E3. Значения латентного периода и размера порции бактериофага являются средними $\pm$ SD (стандартное отклонение) по результатам трехкратных анализов

Время, мин	Титр фага Среднее $\pm$ CO	Примечания
0	$(2.4 \pm 0.3) \times 10^3$	Базовый уровень (неадсорбированные фаги)
10	$(2.6 \pm 0.6) \times 10^3$	Латентный период
20	$(2.7 \pm 0.3) \times 10^3$	
30	$(4.1 \pm 0.1) \times 10^3$	
40	$(4.1 \pm 0.1) \times 10^3$	
50	$(4.1 \pm 0.1) \times 10^3$	Роста период
60	$(6.6 \pm 7.8) \times 10^3$	
70	$(1.9 \pm 0.1) \times 10^4$	
80	$(1.6 \pm 0.5) \times 10^5$	
90	$(2.6 \pm 0.4) \times 10^7$	Плато период
100	$(2.0 \pm 0.1) \times 10^7$	
110	$(1.7 \pm 0.2) \times 10^7$	
120	$(2.0 \pm 0.2) \times 10^7$	
140	$(1.8 \pm 0.0) \times 10^7$	

Биологические свойства бактериофага vB_CpsM_E3

Наименование штамма бактериофага	<i>C. pseudotuberculosis</i> 1089 vB_CpsM_E3
Клетка-хозяин	<i>Corynebacterium Pseudotuberculosis</i> 1089
Семейство фагов по данным электронного микроскопа	<i>Myoviridae</i>
Морфотип	A1
Литическая активность по Аппельману, степень разведения	10^{-6}
Литическая активность по Грациа, БОЕ/см ³	6×10^7
Константа скорости адсорбции фаг-клетка, см ³ /мин	1.64×10^{-8}
Латентный период, мин.	35
Литический спектр (из 25 изолятов)	21 или 84%

При количественном определении высвободившихся фаговых частиц был установлен средний размер бурста, составляющий приблизительно 76–84 БОЕ/клетку (табл. 3). Данный штамм фага представляет собой перспективного кандидата для создания лечебно-профилактических препаратов благодаря выходу 76–84 вирионов на клетку и подтвержденным биологическим характеристикам, включая литическую активность, стабильность, специфичность, спектр вирулентности, продолжительность латентного периода и скорость адсорбции. Дополнительным аргументом в пользу его потенциального клинического применения служит полный лизис всех клеток-хозяев в течение 90 мин.

Заключение. Бактериофаг vB_CpsM_E3 обладает высокой литической активностью в отношении *C. pseudotuberculosis* и может использо-

ваться в качестве альтернативы традиционным антибиотикам, особенно при лечении инфекций, вызванных мультирезистентными штаммами. Основные преимущества данного фага включают: высокую специфичность и вирулентность (инфицирует 84% штаммов *C. pseudotuberculosis*), стабильность при физиологических уровнях pH (6–9) и умеренных температурах (от –20 до 50°C), эффективную репликацию с коротким латентным периодом (около 30 мин) и высоким выходом фаговых частиц (76–84 БОЕ/клетку), а также узкий спектр хозяев, что ограничивает воздействие на неродственные виды бактерий. Эти свойства позволяют рассматривать vB_CpsM_E3 в качестве перспективного терапевтического средства против казеозного лимфаденита в ветеринарии. Дальнейшие исследования должны быть направлены на оценку его эффективности *in vivo* и разработку фармацевтических препаратов на его основе.

Литература

1. de Oliveira Zamprogna T., Ribeiro D., Azevedo V.A.C. и др. Бактериологическое, цитологическое и молекулярное исследование *Corynebacterium pseudotuberculosis*, микобактерий и других бактерий при казеозном лимфадените и в здоровых лимфоузлах забитых овец // Braz J Microbiol. 2021. Т. 52. № 1. С. 431–438.
2. Общая и санитарная микробиология с техникой микробиологических исследований: Учебное пособие / под ред. А.С. Лабинской, Л.П. Блинковой, А.С. Ещиной. М.: Медицина, 2004. 576 с.
3. Алмуслимави Х.А., Пименов Н.В. Биологические свойства бактериофагов к *Corynebacterium pseudotuberculosis* с селекцией штамма-кандидата для специфического биопрепарата // Ветеринарный врач. 2024. № 6. С. 50–57. DOI: 10.33632/1998-698X_2024_6_50.
4. Мохаммед З.С., Пименов Н.В. Биологические свойства двух новоизолированных бактериофагов, специфичных для *Moraxella bovis* // Известия Уфимского научного центра РАН. 2025. № 1. С. 68–74. DOI: 10.31040/2222-8349-2025-0-1-68-74.
5. Kropinski A.M., Mazzocco A., Waddell T.E., Lingohr E., Johnson R.P. Enumeration of bacteriophages by double agar overlay plaque assay // Methods in molecular biology. 2009. V. 501. P. 69–76.

References

1. de Oliveira Zamprogna T., Ribeiro D., Azevedo V.A.C. i dr. Bakteriologicheskoe, tsitologicheskoe i molekulyarnoe issledovanie *Corynebacterium pseudotuberculosis*, mikobakteriy i drugikh bakteriy pri kazeoznom limfadenite i v zdorovykh limfouzлах zabitykh ovets // Braz J Microbiol., 2021, vol. 52, no. 1, pp. 431–438.
2. Obshchaya i sanitarnaya mikrobiologiya s tekhnikoy mikrobiologicheskikh issledovaniy: Uchebnoe posobie / pod red. A.S. Labinskoy, L.P. Blinkovoy, A.S. Eshchinoy. Moscow: Meditsina, 2004, 576 p.
3. Almuslimavi Kh.A., Pimenov N.V. Biologicheskie svoystva bakteriofagov k *Corynebacterium pseudotuberculosis* s selektsiey shtamma-kandidata dlya spetsifichnogo biopreparata // Veterinarnyy vrach, 2024, no. 6, pp. 50–57. DOI: 10.33632/1998-698X_2024_6_50.
4. Mokhammed Z.S., Pimenov N.V. Biologicheskie svoystva dvukh novoizolirovannykh bakteriofagov, spetsifichnykh dlya *Moraxella bovis* // Izvestiya Ufinskogo nauchnogo tsentra RAN, 2025, no. 1, pp. 68–74. DOI: 10.31040/2222-8349-2025-0-1-68-74.
5. Kropinski A.M., Mazzocco A., Waddell T.E., Lingohr E., Johnson R.P. Enumeration of bacteriophages by double agar overlay plaque assay // Methods in molecular biology, 2009, vol. 501, pp. 69–76.

MORPHOLOGICAL AND BIOLOGICAL PROPERTIES OF BACTERIOPHAGE VB_CPSM_E3 LYTIC FOR *CORYNEBACTERIUM PSEUDOTUBERCULOSIS*

© H.A. Almuslimawi, N.V. Pimenov

Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology named after K.I. Skryabin,
23, ulitsa Akademika Skryabina, 109472, Moscow, Russian Federation

The study examined the lytic bacteriophage vB_CpsM_E3 of *C. pseudotuberculosis*, the causative agent of caseous lymphadenitis (CLA) in cattle. The phage was isolated from manure samples in the Moscow region and had lytic activity against 84% of the strains tested.

Electron microscopy defined the phage as a *Myoviridae* family member of morphotype A1 with 54.3±5.3 nm and 224.3±8.3 nm size for capsid and tail, respectively. The phage remained stable under pH 6–9 and temperature –20°C to 50°C and got inactivated under extreme pH (≤ 4 or ≥ 10) and $>60^\circ\text{C}$ temperature.

Adsorption was biphasic ($K_0 = 7.7\text{--}8.5 \times 10^{-9}$ mL/min/CFU) with 76–84 PFU/cell burst size. Latency period was 30 minutes and complete lysis in 90 minutes. Phage was specific for *Corynebacterium* spp. (*C. xerosis*, *C. amycolatum*) without effectiveness against other bacteria.

Keywords: *Corynebacterium pseudotuberculosis*, bacteriophage, *Myoviridae*, caseous lymphadenitis.