

**Key words:** *bacteria, bacteriophages, ways of preparation of preparations of bacteriophages, it is purulent – inflammatory diseases, treatment*

*Effective technologies of preparation of bacteriophages new preparations are developed, including: pyobacteriophage polyvalent cleared, bacteriophage klebsiellae polyvalent cleared, bacteriophage klebsiellae pneumoniae cleared, bacteriophage an enterobakter polyvalent cleared. Preparations of bacteriophages don't cause toxic and allergic reactions, possess a wide range of antibacterial activity and high degree of clinical efficiency that gives the chance to regard them as means of antibacterial therapy effective and alternative to antibiotics. Preparations of bacteriophages are effective at treatment is purulent - inflammatory diseases of the urinogenital sphere (cystitis, a colpitis, pyelonephritis, glomerulonephritis, salpingooforitis, prostatitis), surgical infections (abscess, phlegmon, peritonitis, pleurisy, mastitis, suppurations of wounds, burns), inflammatory diseases of eyes (conjunctivitis, keratitis, a cornea ulcer, iridociklitis), stomatitises, diseases of an ear, a throat, and a nose (antritis, plays the dandy, otitis, quinsy, laryngitis, tracheitis, bronchitis, pneumonia), and also infectious diseases of newborns (peritonitis, meningitis, pneumonia, otitis, omphalitis, vesiculopustulesis, osteomyelitis, sepsis).*

УДК 579.843:578.1

## БАКТЕРИОФАГИ ПАРАГЕМОЛИТИЧЕСКИХ ВИБРИОНОВ: БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА И ПРИМЕНЕНИЕ

Гаевская Н.Е., [gaevskaya.nata@mail.ru](mailto:gaevskaya.nata@mail.ru)

Кудрякова Т.А., доктор медицинских наук,

Македонова Л.Д., кандидат медицинских наук,

Качкина Г.В.,

ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт»

Роспотребнадзор, тел. 8(863) 240-91-08

**Ключевые слова:** *Vibrio parahaemolyticus, бактериофаги, биологические свойства, фаготипирование.*

*Для первичной характеристики и дифференциации свежесвыделенных фагов параземолитических вибрионов предложены 2 индикаторных штамма. Проведено сравнительное изучение биологических свойств 20 бактериофагов параземолитических вибрионов, выделенных в разных регионах нашей страны. Осуществлено фаготипирование штаммов параземолитических вибрионов по новой схеме, которая включает в себя 11 фаготипов.*

**Введение.** При обследовании больных острыми желудочно-кишечными заболеваниями (ОЖКЗ), особенно в приморских районах, а также морской воды и её обитателей выделяются галофильные вибрионы, играющие определенную роль в патологии человека [1, 2]. Впервые параземолитические вибрионы были выделены в Японии в 1950 г., где они были признаны причиной 70% пищевых отравлений [3]. У нас в стране параземолитические вибрионы обнаружены в морях, соленых озёрах и продуктах моря.

Бактериологическая диагностика гастроэнтеритов, вызываемых параземолитически-

ми вибрионами, относится к одной из актуальных проблем. [4, 5, 6]. Во Владивостоке спорадические кишечные заболевания, вызванные парагемолитическими и алгинолитическими вибрионами, отмечались с 1977 г. и продолжаются до настоящего времени, а в июле-августе 1997 г. зарегистрирована вспышка этой инфекции [4, 7]. Штаммы *Vibrio parahaemolyticus*, обусловившие вспышку пищевой токсикоинфекции в 1997 г. и спорадические заболевания в последующие годы в г. Владивостоке относились к серогруппе O3:K6 и не были охарактеризованы по продукции умеренных фагов.

Приоритет в открытии фагов парагемолитических вибрионов принадлежит японским исследователям [8]. В нашей стране первые расы фагов были выделены и изучены в 1980 году из крабов и мидий. В 1990 году из Крымской, Одесской и Новороссийской ПЧС были доставлены в Ростовский-на-Дону противочумный институт 27 фагов, выделенных из морской воды, крабов и мидий, и 14 фагочувствительных штаммов для каждого из фагов [9, 10]. Кроме того, в Ростовском-на-Дону противочумном институте был подобран индикаторный штамм *Vibrio parahaemolyticus* O4:K12, выявляющий фаги в штаммах этого серотипа [11]. Большое количество индикаторных штаммов затрудняло выделение и размножение новых бактериофагов, что требовало отбора универсального индикаторного штамма.

Целью работы явилось изучение лизогении у поступивших из г. Владивостока и г. Новороссийска штаммов парагемолитических вибрионов, сравнение биологических свойств выделенных бактериофагов и применение их для фаготипирования.

**Материалы и методы исследований.** В работе было использовано 248 штаммов *Vibrio parahaemolyticus*, из них 64 штамма серогруппы O3:K6, полученных из Музея живых культур ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора. В качестве индикаторных штаммов использовали культуры *V. parahaemolyticus* KM-97 (tdh<sup>+</sup>trh<sup>-</sup>) и KM-184 (tdh<sup>-</sup>trh<sup>-</sup>). Концентрацию фаговых частиц определяли методом агаровых слоёв по Грациа. Титр фагов составлял  $10^7$ - $10^{10}$  БОЕ/мл. Изучение биологических свойств проводили по общепринятым методам [12]. Морфологию частиц фага исследовали в электронном микроскопе JEM-100В. Кроличьи антифаговые сыворотки получали внутривенной иммунизацией кроликов фагами в возрастающих дозах [13].

Специфичность бактериофагов испытывали на 133 штаммах бактерий близкородственных родов и семейств (*Vibrionaceae*, *Pseudomonadoceae*, *Enterobacteriaceae*).

Работу проводили на 0,7%, 1,5% агаре и бульоне Мартена с добавлением 1,5% или 3% NaCl, pH 7,6-7,8.

Результаты исследований и их обсуждение. Исследования 248 штаммов парагемолитических вибрионов на лизогению позволили выявить 33 лизогенных штамма, из которых 13, получены из г. Владивостока и относились к серогруппе O3:K6.

Из лизогенных штаммов парагемолитических вибрионов, изолированных в г. Новороссийске были выделены фаги I, III, IV, V морфогрупп и отнесены по серологическим свойствам к I, III, IV, V, VI, VIII и XI серогруппам; из штаммов, поступивших из г. Владивостока – IV морфогруппы, новой XII серогруппы.

Негативные колонии фагов парагемолитических вибрионов Черноморского побережья были округлой формы, мутные с плотным центром, диаметром 0,5-0,7 мм или полупрозрачные с ровными краями и имели диаметр 0,5-2 мм. Ко второму типу негативных колоний относились бактериофаги, выделенные из штаммов парагемолитических вибрионов Дальневосточного региона (г. Владивосток).

Фаги парагемолитических вибрионов были специфичными, они не лизировали представителей микроорганизмов семейств *Vibrionaceae*, *Pseudomonadoceae*, *Enterobacteriaceae*. Диапазон литической активности фагов парагемолитических вибрионов варьировал и у раз-

личных фагов составлял 0,8-82,6%. Бактериофаги парагемолитических вибрионов III-V морфогрупп чувствительны к повышенной температуре, при температуре 70°C отмечается полная инактивация при экспозиции в 30 мин, в то время как фаги I морфогруппы инактивируются при температуре 80°C. К действию хлороформа фаги III-V морфогрупп устойчивы, а I морфогруппы инактивируются под его действием. Умеренные фаги проявили чувствительность к 3% раствору цитрата натрия, при этом выживаемость сохранялась в пределах 27,2-98,9% при экспозиции 18-20 часов. Пребывание фагов в растворе 30% мочевины приводило к снижению активности фагов, выживаемость которых сохранялась в пределах 0,01-2,6% (табл.1).

Для первичной характеристики и дифференциации свежевыделенных фагов парагемолитических вибрионов предложены индикаторные штаммы. Испытание литической активности 33 фагов галофильных вибрионов показало, что только 2 штамма *V. parahaemolyticus* KM-97 (13) и KM-184 (3), с характеристикой по генотипу  $tdh^+rth^+Kp^+Ure^+$ , проявляют чувствительность ко всем испытанным фагам. Эти 2 штамма были отобраны из 60 не серотипированных и 124 серотипированных штаммов после проверки чувствительности к ним всех имевшихся фагов. В результате исследований был подтвержден факт, что штамм *V. parahaemolyticus* KM-184 лизируется фагами четырёх морфогрупп в отличие от штамма *V. parahaemolyticus* KM-97, который проявляет чувствительность к фагам трёх морфогрупп, исключая фаги I морфогруппы. Впервые разработан способ дифференциации бактериофагов парагемолитических вибрионов III, IV, V морфогрупп от бактериофагов I морфогруппы, на который выдан патент № 2290445.

Анализ данных фаготипирования 121 штаммов парагемолитических вибрионов различных серогрупп, имеющих в коллекции лаборатории, показал, что около 60% культур лизировались в той или иной мере типизирующими фагами в сочетаниях, которые не были предусмотрены предложенной ранее схемой фаготипирования [14]. Это дало возможность выделить новые фаготипы и усовершенствовать схему фаготипирования парагемолитических вибрионов. Расширение её с четырёх до одиннадцати фаготипов повысило типизируемость вибрионов с 48,4 % до 92,6 %. Анализ встречаемости фаготипов среди парагемолитических вибрионов различных серогрупп не выявил корреляции. Новая схема фаготипирования нашла применение при изучении 184 штаммов парагемолитических вибрионов Черноморского побережья. Установлено, что 170 штаммов (92,3%) типировались фагами и были представлены всеми фаготипами. При изучении 33 штаммов, полученных из г. Владивостока в 1997 г. было показано, что типировалось 14 штаммов (42,4%). При этом типизирующиеся штаммы представлены 1, 4, 5, 7, 10 фаготипами. Фаготипирование 31 штамма парагемолитических вибрионов, полученных из г. Владивостока в 2012 г., выявило 11 фаготип у 29 штаммов (93,5%)

Наши исследования показали, что лизогенные штаммы являются источником фагов, которые могут быть использованы в лабораторной диагностике возбудителей.

Заключение. Бактериофаги, выделенные из лизогенных штаммов парагемолитических вибрионов разных регионов России, охарактеризованы по основным таксономическим признакам. Разработанная тест-система индикаторных штаммов позволяет проводить морфологическую идентификацию специфических бактериофагов. Усовершенствована схема фаготипирования парагемолитических вибрионов, при использовании которой установлено 11 фаготипов у 92,6% штаммов.

Таблица 1 – Характеристика биологических свойств фагов парагемолитических вибрионов

№ фагов	Морфология корпускул фага		Серологический тип фага	Специфичность	Устойчивость к				Литическая активность %	Некоторые данные одиночного цикла развития фагов	
	По А.С. Тихоненко, 1968	По Аскеттап, 1987			температуре. Полная инактивация °С	Хлороформу	Мочевине 30%	Цитрату натрия 3%		Продолжительность латентного периода (в мин)	средний урожай на одну микробную клетку
67	I	FI	I	+	75-80	0	0,21	27,2	0,8	70-75	1,98±1,16
240	I	FI	I	+	70-75	0	0,11	57,7	0,8	70-75	1,77±2,06
588	I	FI	I	+	75-80	0	0,35	76,3	0,8	70-75	2,08±2,16
735	I	FI	I	+	75-80	0	0,06	68,9	0,8	70-75	1,65±0,88
1553	I	FI	I	+	70-75	0	0,15	78,5	0,8	70-75	1,55±0,78
616	III	C	III	+	65-70	100	0,81	64,7	23,5	68-70	2,23±0,49
1154	III	C	III	+	65-70	98,7	2,6	97,1	81,7	68-70	2,33±0,57
109	IV	BI	IV	+	65-70	99,4	0,87	76,8	69,4	65-70	1,86±0,59
3256	IV	BI	IV	+	60-65	100	0,37	98,9	80,3	68-70	1,68±0,48
17733	IV	BI	-	+	65-70	97,6	1,6	96,5	21,6	62-67	2,15±0,69
17748	IV	BI	-	+	60-65	96,6	0,56	95,8	29,5	65-67	1,35±0,47
19151	IV	BI	-	+	60-65	100	0,12	98,7	32,6	60-65	2,61±0,60
7	V	A	V	+	65-70	100	0,04	44,3	48,8	65-70	2,04±1,58
23	V	A	V	+	65-70	100	0,01	57,7	35,7	67-70	2,14±0,59
101	V	A	V	+	65-70	99,3	1,3	77,4	48,3	68-70	2,34±0,47
3600	V	A	VI	+	60-65	97,7	0,07	98,3	28,6	65-67	2,51±0,68
824	V	A	VI	+	65-70	98,5	0,67	88,6	31,7	60-65	1,98±2,26
227	V	A	VIII	+	65-70	100	0,45	94,2	20	65-67	2,53±0,58
507	III	C	XI	+	65-70	100	0,08	56,7	38,8	65-70	2,35±0,69
536	III	C	XI	+	60-65	100	0,31	98,8	82,6	65-70	2,55±0,59

Примечание: + наличие признака;

– бактериофаги I морфогруппы;

– бактериофаги, выделенные в г. Владивосток.

**Библиографический список**

1. Данилкина Е.Б. Совершенствование методов выделения и идентификации патогенных для человека вибрионов: Автореф. дис... канд. мед. наук. – Ростов-на-Дону, 1995. – 16 с.
2. Soumare M., Seydi M., Gbabangai E. et al. Acute *Vibrio parahaemolyticus* gastroenteritis in Dakar // *Med. Mal. Infect.* – 2007. – Vol. 37, № 10. – P.673-677.
3. Fujino T., Okumo Y., Nakada D. et al. On the bacteriological examination of shirasu food poisoning // *J. Jap. Ass. Infect. Dis.* – 1951. – Vol. 35. – P. 11-17.
4. Маслов Д.В. Вспышка галофилеза среди населения г. Владивостока Приморского края // *Здоровье населения и среда обитания.* – 1997. – №12. – С.17-21.
5. Смоликова Л.М., Ломов Ю.М., Мишанькин Б.Н. и др. Галофильные вибрионы, обусловившие вспышку пищевой токсикоинфекции во Владивостоке // *Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол.* – 2001. – №6. – С.3-7.
6. Barbieri E., Falzano L., Fiorentini C. et al. Occurrence, diversity and pathogenicity of halophilic *Vibrio* spp. and non-O1 *Vibrio cholerae* from estuarine waters along the Italian Adriatic coast // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1999. – Vol.65, №6. – P.2748-2753.
7. Тарасенко Т.Т., Грушина Г.А., Воронок В.М., Хоменко Т.В. Пищевые токсикоинфекции, вызываемые галофильными вибрионами в г. Владивостоке: эпидемиологическая характеристика // *Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол.* – 1999. – № 2 – С. 36-39.
8. Nakanishi H., Iida Y., Maeshima K., Teramoto T. Isolation and properties of bacteriophages of *Vibrio parahaemolyticus* // *Biken J.* – 1966 – Vol.9, №3. – P.149-157.
9. Кудрякова Т.А., Македонова Л.Д., Дудкина О.С. и др. Фаги галофильных вибрионов и их применение // *Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол.* – 1992. – №9-10. – С.5-8.
10. Либинзон А.Е., Ус З.И., Гальцева Г.В. и др. Фаги галофильных вибрионов // *Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол.* – 1995. – №1. – С.15-18.
11. Кудрякова Т.А., Македонова Л.Д., Дудкина О.С. и др. Лизогения параземолитических вибрионов O4:K12 // *Микробиол. журнал.* – 1992. – Т.54, №6. – С.45-49.
12. Адамс М. Бактериофаги – М., 1961 – 522 с.
13. Марьина Ю.Н. Получение антифаговой сыворотки и изучение антигенной структуры фага // *Тр. Ростовского. противочум. ин-та.* – 1941. – Т.2. – С.3-7.
14. Хайтович А.Б., Кудрякова Т.А., Македонова Л.Д. и др. Фаговары галофильных вибрионов // *Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол.* – 1997. – № 2. – С. 7-10.

**BACTERIOPHAGES OF PARAHAE MO LYTIC VIBRIOES: BIOLOGICAL PROPERTIES AND APPLICATION**

*Gaevskaya N.E., Kudryakova T.A., Makedonskaya L.D, Kachkina G.V.*

**Key words:** *Vibrio parahaemolyticus*, bacteriophages, biological properties, lysotypy.

*For the primary characteristic and differentiation of the just allocated phages of parahaemolytic vibrioies two indicator strains are suggested. The comparative studying of biological properties of 20 bacteriophages of the parahaemolytic vibrioies allocated in different regions of our country is made. The lysotypy of strains of parahaemolytic vibrioies according to the new scheme which includes 11 types of phages is performed.*