

6. Веселов А. Я., Карманова С. Ю. Литическая активность и специфичность коммерческих бактериофагов. //Клиническая лабораторная диагностика. -1992. - № 9. – С.55-57.

7. Зуева В. С., Дмитриенко О. А., Клицунова Н. В. Роль профагов в формировании антибиотикоустойчивых популяций стафилококков в процессе трансформации, трансдукции и конъюгации. //Антибиотики и химиотерапия. – 1996. – 41. - № 10. – С.35-42.

EVALUATION OF LYTIC ACTIVITY OF SOME BACTERIOPHAGES

Kataeva L. V., Vakarina A. A., Nizhegorodtseva N. F.

Key words: *bacteriophages, sensitivity, stability, strains of bacteria, the method definition.*

Sensitivity / resistance of some opportunistic bacteria to bacteriophages were investigated by various methods (for solid and liquid medium). It was found that bacterial strains sensitivity of to several bacteriophages are different, so you must assign phage therapy only after study fagolytic activity. Furthermore, the current method of determining and assessing the phage activity is subjective.

УДК 579.843:578.1:616-092:612.015.2

БАКТЕРИОФАГИ ПАТОГЕННЫХ ДЛЯ ЧЕЛОВЕКА ВИБРИОНОВ

Кудрякова Т.А., доктор медицинских наук,

Тел.8(863) 240-27-03, e-mail: plague@aanet.ru

Македонова Л.Д., кандидат медицинских наук,

Гаевская Н.Е., Качкина Г.В.,

ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора

Ключевые слова: *бактериофаги *Vibrio cholerae* O1, O139, не O1/не O139 серогрупп, *V.albensis*, *V.parahaemolyticus*, *V.alginolyticus*, *V. mimicus*, *V.metschnikovii*, биологическая характеристика, применение.*

*Работа посвящена изучению свойств новых и имеющихся в коллекции фагов патогенных вибрионов. Показана принадлежность бактериофагов *Vibrio cholerae* O1 к пяти морфологическим типам, *V.albensis* и *V.parahaemolyticus* – к четырем, *V. mimicus* – к одному и *V.metschnikovii* – к одному. Охарактеризованы серологические свойства и установлены различия и сходства в антигенном строении. Специфичность литической активности бактериофагов использована в лабораторной диагностике патогенных вибрионов.*

Введение. Большой фактический материал, накопленный в последние три десятилетия, свидетельствует о широком распространении патогенных вибрионов, для большой группы которых бактериофаги неизвестны. Показано, что на территории России и некоторых зарубежных государств возможно обнаружение бактериофагов холерных и параземолитических вибрионов, *Vibrio fluvialis*, *Vibrio vulnificus* [1, 2, 3, 4]. В центре патогенных вибрионов Ростовского-на-Дону противочумного института были идентифицированы представители десяти видов патогенных вибрионов, коллекция культур которых нуждается в дополнении соответствующими бактериофагами и разработке методов фагодиагностики. Детальное изучение взаимоотношения бактериофагов с клеткой хозяина имеет не только теоретическое, но и важ-

ное практическое значение в диагностике заболеваний, вызываемых патогенными для человека вибрионами.

Целью работы явилось сравнительное изучение свойств свежeweделенных и имеющих в коллекции рас бактериофагов *Vibrio cholerae* O1, O139, не O1/не O139 серогрупп, *V. albensis*, *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus*, *V. mimicus*, *V. metschnikovii* для их дифференциации и применения.

Материалы и методы исследований. В работе использовали 301 фаг патогенных для человека вибрионов, выделенных из лизогенных штаммов и объектов внешней среды (таблица 1). Титры бактериофагов составляли 10^8 - 10^9 БОЕ/мл. В качестве индикаторных штаммов использовали *V. cholerae cholerae* 145, *V. cholerae eltor* 75, КМ-199, *V. cholerae* O139-КМ 152, *V. cholerae* не O1 – 16 штаммов, *V. parahaemolyticus* КМ-97, КМ-184, *V. albensis*-КМ 41, *V. metschnikovii* КМ 185, *V. cholerae* O37 серовара 1322-69.

При выращивании вибрионов применяли 0,7% и 1,5% агар и бульон Мартена (рН 7,6-7,8), для галофильных вибрионов *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus* использовали те же среды с 3% NaCl. Результаты учитывали через 18-20 часов инкубации при 37°C. биологические свойства фагов изучали классическими методами [5]. Строение корпускул исследовали в электронном микроскопе Gem-100В [6, 7]. Антифаговые сыворотки получали путем внутривенной иммунизации кроликов по методу Марьиной Ю.Н. [8]. Специфичность фагов испытывали на 135 штаммах микроорганизмов родственных видов, родов и семейств (*Vibrionaceae*, *Pseudomonadaceae*, *Enterobacteriaceae*).

В работе применяли препараты диагностических холерных бактериофагов производства ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб»: классический, эльтор, ДДФ, cтх⁺ и cтх⁻.

Результаты исследований и их обсуждение. Материалы исследования показали, что бактериофаги патогенных вибрионов представляют собой неоднородную по свойствам группу. В таблице 1 суммированы основные морфологические типы [6] изученных 301 ДНК-содержащих бактериофагов патогенных вибрионов. Впервые охарактеризованы новые фаги *V. metschnikovii* и *V. mimicus*, выделенные нами из лизогенных штаммов (патент № 2375437). Установлено, что бактериофаги объединены у *V. cholerae* O1 и не O1/не O139 – пятью морфогруппами, у *V. cholerae* O139 – двумя, *V. albensis* и *V. parahaemolyticus* – четырьмя, у *V. mimicus* – 1, *V. metschnikovii* – 1 по классификации А.С.Тихоненко [6]. У бактериофагов отмечены три типа негативных колоний: 1 - мелкие с ободком по периферии; 2 - мутные; 3 - прозрачные, от 0,5 до 2мм в диаметре.

При анализе антигенных свойств бактериофагов выявлено большое разнообразие серологических типов: 12 – у холерных фагов, 18 – у неагглютинирующихся О-сывороткой и О-139 сывороткой вибрионов, 11 – у парагемолитических и 4 – у алгинолитических вибрионов. Наряду с высокой специфичностью антифаговых сывороток представленных рас фагов, установлено сходство антигенного строения у фагов *V. cholerae* O1 и O139 серогрупп (фаги II и XII серотипов), а также фагов *V. mimicus* с холерными (XII серотип), дающими перекрестные реакции нейтрализации.

Для дифференциации бактериофагов I морфотипа от остальных (III –V) использовали действие инактивирующих агентов – хлороформа и прогревание при температуре 65°C. Установлена чувствительность к химическому агенту филаментозных фагов и устойчивость к прогреванию. Специфичность литического действия фагов патогенных вибрионов, проверенная на 135 штаммах различных видов бактерий, соответствовала таксономическим группам, и их активность не распространялась на представителей семейств *Vibrionaceae*, *Pseudomonadaceae*, *Enterobacteriaceae*. Для идентификации фагов *V. mimicus* от серологически родственных холерных, присутствие которых возможно в пробах речной воды при мониторинге объектов

Таблица 1. - Особенности структурной организации бактериофагов патогенных для человека вибрионов

Вид микроба	Число изученных фагов	Семейство фагов									
		<i>Myoviridae</i>			<i>Siphoviridae</i>			<i>Podoviridae</i>			<i>Inoviridae</i>
		A1	A2	A3	B1	B2	B3	C1	C2	C3	F1
<i>V.cholerae</i> O1	207	141	-	-	1	-	-	21	-	-	44
<i>V.cholerae</i> O139	8	7	-	-	-	-	-	-	-	-	1
<i>V.cholerae</i> не O1/не O139	28	15	-	-	2	-	5	3	2	-	1
<i>V.albensis</i>	17	-	-	-	2	-	-	2	-	-	13
<i>V.parahaemolyticus</i>	32	7	-	-	9	2	-	8	-	-	6
<i>V.alginolyticus</i>	4	1	-	-	1	-	-	1	-	-	1
<i>V.metschnikovii</i>	3	-	-	-	3	-	-	-	-	-	-
<i>V.mimicus</i>	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2
Всего	301	171	-	-	18	2	5	35	2	-	68

окружающей среды на наличие вибриофлоры, нами предложен фагочувствительный к ним штамм *V. cholerae* O37 серогруппы, устойчивый к холерным фагам [9].

Данные ретроспективного анализа более 700 штаммов вибрионов, выделенных в последние 20 лет в разных эпидемиологических ситуациях, свидетельствовали о различии лизогенных систем вибрионов, циркулировавших на контролируемых территориях в период седьмой пандемии холеры. Нами создана система из восьми тест-культур, позволяющая идентифицировать обнаруживаемые умеренные фаги, из которых *V. cholerae* KM 199, KM 152; *V. parahaemolyticus* KM 184, KM 97; *V. metschnikovii* KM 185 – депонированы в ГКПБ «Микроб». Холерные вибрионы O139 серогруппы проявили лизогенные свойства на индикаторных штаммах холерных вибрионов O1 и O139 серогрупп. Эти биологические особенности были использованы для внутривидовой дифференциации вибрионов «Бенгал» [10].

Бактериофаги применяются в диагностике некоторых видов патогенных вибрионов: в идентификации холерных вибрионов O1 и не O1/не O139 серогрупп используется фаг ДДФ, в индикации биовара – классические и эльтор фаги, проводится определение фаготипа, дифференциация штаммов на серовары и внутривидовая дифференциация с помощью метода прямого фаготипирования.

По результатам фаготипирования холерных вибрионов, изолированных из объектов окружающей среды на территории Российской Федерации, была установлена принадлежность штаммов к различным фаготипам (ф/т) в период с 2007 по 2011 годы: к трем – в 2007 году (13, 14, 19 ф/т), четырем – в 2010 (13, 14, 16, 19 ф/т) и в 2011 году – (5, 13, 15, 17 ф/т). Токсигенные холерные штаммы при использовании фагов ctx^+ и ctx^- в комплексе с гемолитической активностью по Грейгу были идентифицированы в 94%. Фаготипирование более 200 штаммов паразитических вибрионов с помощью авторского набора бактериофагов позволило определить принадлежность штаммов к одиннадцати фаготипам.

Заключение. Анализ полученных данных о свойствах большой группы бактериофагов различных видов патогенных вибрионов позволяет установить не только их общность как представителей вирусов бактерий, но и различия признаков. По данным детекции и идентификации бактериофагов *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus*, *V. albensis*, *V. mimicus*, *V. metschnikovii* определены серологические свойства и морфология фагов. При сравнительном изучении

бактериофагов обнаружены особенности по чувствительности к химическому агенту (хлороформу) и устойчивости к повышенной температуре. Специфичность литического действия бактериофагов использована для тестирования на соответствующих видах микроорганизмов. Создана База данных «Коллекция бактериофагов и тест-штаммов патогенных для человека вибрионов» (Свидетельство о гос. регистрации базы данных № 2010620549 от 24.09.2010 г.), расширяющая возможность использования в научно-практических исследованиях по проблеме «Холера и патогенные вибрионы». По мере накопления новых данных о фагах патогенных вибрионов, выяснение особенностей и специфичности лизогенных тест-систем может быть полезным в решении вопросов об эволюционных взаимоотношениях в пределах вида и между видами.

Библиографический список

1. Кудрякова Т.А. Лизогения холерных и парагемолитических вибрионов и её практическое значение. // Автореф. дисс. ... д-ра мед. наук. - Ростов – на – Дону, 1996. -42с.
2. Chen K, Lin Y, Chen G. Studies on diagnostic bacteriophage of *Vibrio fluvialis*. // *Chung-Hua Yu Fang i Hsuch Tsa chih (chinese Journal of Preventive Medicine)*, 1995, 29 (3): 138-140.
3. Pelon W, Siebeling K.I., Simonson I, Liftig R.B. Isolation of bacteriophage infection for *Vibrio vulnificus*. // *Current Microbiology*, 1995, 30 (6): 331-336.
4. Остроумова Н.М., Агапова З.М., Мороз В.П. и др. Лизогения у НАГ - вибрионов О-41 серотипа. // Генетика и биохимия особо опасных инфекций. Саратов, 1980. с.56-61.
5. Адамс М. Бактериофаги: Пер.с англ.-М., 1961,-527с.
6. Тихоненко А.С. Ультраструктура вирусов бактерий. - М., 1968, 89с.
7. Ackerman H.W. Bacteriophage taxonomy in 1987. // *Microbiol. Sci.*-1987.-Vol.4, № 7.-P.214-218.
8. Марьина Ю.Н. Получение антифаговой сыворотки и изучение антигенной структуры фага. // Тр. Рост.н/Д противочум. ин-та.-1941.-Т.2.-с.3-7.
9. Кудрякова Т.А., Македонова Л.Д., Качкина Г.В., Авдеева Е.П., Саямов С.Р. Патент РФ на изобретение № 2375437 – Способ выделения и дифференциации фага *Vibrio mimicus*. // Бюллетень № 34 от 10.12.2009г.
10. Кудрякова Т.А., Гаевская Н.Е., Македонова Л.Д., Качкина Г.В. Патент РФ на изобретение № 2268942 – Способ внутривидовой дифференциации *Vibrio cholerae* O139. // Бюллетень № 03 от 27.01.2006г.

BACTERIOPHAGES OF PATHOGENIC VIBRIOES FOR THE PERSON

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

Key words: *bacteriophages Vibrio cholerae O1, O139, neither O1/nor O139 serogroups, V.albensis, V.paraahaemolyticus, V.alginolyticus, V.mimicus, V.metschnikovii, biological properties, application.*

This article is devoted to the learning of properties of phages of pathogenic vibrioes new and available in a collection. The belonging of bacteriophages of Vibrio cholerae O1 to five morphological types is stated, V.albensis u V.paraahaemolyticus – to four, V.mimicus – to one and V.metschnikovii –to one. The serological properfies are characterized and distinctions and similarities in an anti-gene structure are stated. Specification of lytic activity of bacteriophages is used in laboratory diagnostics of pathogenic vibrioes.