

ЛИТЕРАТУРА (пп. 1, 2, 4–8, 13 см. REFERENCES)

3. Демидович Б.П., Кудрявцев В.А. *Краткий курс высшей математики*. М.: АСТ, Астрель; 2001.
9. Покровский В.В., Юрин О.Г., Кравченко А.В., Беляева В.В., Канестри В.Г., Афонина Л.Ю., и др. Протоколы диспансерного наблюдения и лечения больных ВИЧ-инфекцией. *Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы*. 2014; S6: 1–28.
10. Ивашкин В.Т., Ющук Н.Д., Кожевникова Г.М., Маевская М.В., Маев И.В. Рекомендации по диагностике и лечению взрослых больных гепатитом С. *Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии*. 2013; 23 (2): 41–70.
11. Ивашкин В.Т., Ющук Н.Д., Маевская М.В., Знойко О.О., Дудина К.Р., Кареткина Г.Н. и др. Клинические рекомендации российской гастроэнтерологической ассоциации и российского общества по изучению печени по диагностике и лечению взрослых больных гепатитом В. *Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии*. 2014; 24 (3): 58–88.

REFERENCES

1. Abbott Molecular Inc. Abbott RealTime HIV-1 User's Manual. 2007: 59.
2. Roche Molecular Systems Inc. COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan HIV-1 Test User's Manual. 2007: 36.
3. Demidovich B.P., Kudryavtsev V.A. *Short course of higher mathematics*. Moscow: Astrel; 2001. (in Russian)
4. Braun P., Ehret R., Wiesmann F., Zabbai F., Knickmann M., Kühn R. et al. Comparison of four commercial quantitative HIV-1 assays for viral load monitoring in clinical daily routine. *Clin. Chem. Lab.* 2007; 45 (1): 93–9.
5. Scott L., Noble L., Moloi J., Erasmus L., Venter W. Evaluation of the Abbott m2000 RealTime human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) assay for HIV load monitoring in South Africa compared to the Roche Cobas AmpliPrep-Cobas Amplicor, Roche Cobas AmpliPrep-Cobas TaqMan HIV-1, and BioMerieux NucliSENS Easy. *J. Clin. Microbiol.* 2009; 47 (7): 2209–17.
6. Cook L., Ng K.W., Bagabag A., Corey L. Use of the MagNA Pure LC Automated Nucleic Acid Extraction System followed by Real-

- Time Reverse Transcription-PCR for Ultrasensitive Quantitation of Hepatitis C Virus RNA. *J. Clin. Microbiol.* 2004; 47 (7): 4130–6.
7. Mor O., Gozlane Y., Wax M., Mileguir F., Rakovsky A., Noy B., Mendelson E., Levy I. Evaluation of the RealTime HIV-1, Xpert HIV-1, and Aptima HIV-1 Quant Dx Assays in Comparison to the NucliSens EasyQ HIV-1 v2.0 Assay for Quantification of HIV-1 Viral Load. *J. Clin. Microbiol.* 2015; 53 (11): 3458–65.
8. Wirden M., Tubiana R., Fourati S., Thevenin M., Simon A., Canestri A. et al. Upgraded Cobas AmpliPrep-Cobas TaqMan Version 2.0 HIV-1 RNA Quantification Assay versus First Version: Correction of Underestimations. *J. Clin. Microbiol.* 2011; 49 (7): 2700–2.
9. Pokrovskiy V.V., Yurin O.G., Kravchenko A.V., Belyaeva V.V., Kanestri V.G., Afonina L.Yu. et al. Protocols of follow-up and treatment of patients with HIV infection. *Epidemiologiya i infektsionnye bolezni. Aktual'nye voprosy*. 2014; S6: 1–28. (in Russian)
10. Ivashkin V.T., Yushchuk N.D., Kozhevnikova G.M., Maevskaya M.V., Maev I.V. Recommendations for the diagnosis and treatment of adult patients with hepatitis C. *Rossiyskiy zhurnal gastroenterologii, gepatologii, koloproktologii*. 2013; 23 (2): 41–70. (in Russian)
11. Ivashkin V.T., Yushchuk N.D., Maevskaya M.V., Znoyko O.O., Dudina K.R., Karetkina G.N. et al. Clinical guidelines of the Russian Gastroenterological Association and the Russian Society for Study of the Liver on diagnosis and treatment of adult patients with hepatitis B. *Rossiyskiy zhurnal gastroenterologii, gepatologii, koloproktologii*. 2014; 24 (3): 58–88 (in Russian)
12. LaRue H., Rigali L., Balada-Llasat J.M., Pancholi P. Performance of the Abbott RealTime and Roche Cobas TaqMan Hepatitis C Virus (HCV) Assays for Quantification of HCV Genotypes. *J. Clin. Microbiol.* 2012; 50 (5): 1769–72.
13. Swanson P., Holzmayer V., Huang S., Hay P., Adebisi A., Rice P. et al. Performance of the automated Abbott RealTime™ HIV-1 assay on a genetically diverse panel of specimens from London: Comparison to VERSANT HIV-1 RNA 3.0, AMPLICOR HIV-1 MONITOR v1.5, and LCx® HIV RNA Quantitative assays. *J. Virol. Methods*. 2006; 137 (2): 184–92.

Поступила 30.12.16

Принята к печати 10.01.17

© ГАЕВСКАЯ Н.Е., КОЧЕТКОВА А.О., 2017

УДК 616.932-022:579.843.1]-078

Гаевская Н.Е., Кочеткова А.О.

НОВЫЕ РАСЫ ХОЛЕРНЫХ БАКТЕРИОФАГОВ, ПЕРСПЕКТИВНЫЕ ДЛЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКЕ ХОЛЕРЫ

ФКУЗ «Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора, 344002, Ростов-на-Дону, Россия

Холера продолжает оставаться проблемой здравоохранения мирового масштаба. Поэтому необходим постоянный мониторинг холеры как одного из основных компонентов эпидемиологического надзора на всех уровнях. Поиск новых рас холерных фагов, перспективных для использования в лабораторной диагностике, актуален и в первую очередь связан с необходимостью подтверждения специфических свойств возбудителя холеры эффективным, простым и надежным способом. Цель нашей работы – провести изыскание новых рас холерных фагов и наметить перспективы их практического использования. Мы использовали 360 штаммов *Vibrio cholerae* биовара El Tor, выделенных из различных источников и в разные годы, а также 43 штамма *Vibrio cholerae* Classical. В исследование были взяты как типичные культуры *Vibrio cholerae* El Tor, так и измененные варианты (RO, RS). Из изученных 25 холерных фагов наиболее перспективны для конструирования фагового препарата 4 бактериофага, спектр литической активности которых составлял у фагов El 1, O1, El 2, C1 – 57,5, 64,6, 66,3, 83,3% соответственно. Из числа взятых штаммов 32 культуры (7,9%) сохранили устойчивость ко всем фагам. Предлагаемые бактериофаги имеют различный спектр литической активности в отношении холерных вибрионов. Для размножения и контроля новых рас диагностических бактериофагов были подобраны новые авирулентные тест-штаммы. Анализ полученных результатов показал, что изученные холерные фаги, обладающие высокой литической активностью, могут быть использованы для диагностики штаммов холерных вибрионов.

Ключевые слова: холерные бактериофаги; диагностические бактериофаги; фагорезистентность; фагодиагностика.

Для корреспонденции: Гаевская Наталья Евгеньевна, канд. мед. наук, зав. лаб. бактериофагов; e-mail: gaevskaya_nata@mail.ru

Для цитирования: Гаевская Н.Е., Кочеткова А.О. Новые расы холерных бактериофагов, перспективные для использования в лабораторной диагностике холеры. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2017; 62 (7): 440-443. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2017-62-7-440-443>

Gaevskaya N.E., Kochetkova A.O.

THE NEW RACES OF CHOLERA BACTERIOPHAGES PERSPECTIVE FOR APPLYING IN LABORATORY DIAGNOSTIC OF CHOLERA

The Rostovskii-na-Donu research anti-plague institute of Rospotrebnadzor, 344002 Rostov-on-Don, Russia

*The cholera continues to be a problem of health care of world scale. Therefore, cholera is to be monitored as one of main components of epidemiological control on all levels. The search for new races of cholera phages, perspective to be applied in laboratory diagnostic, is actual and initially is related to necessity of confirmation of specific features of cholera agent by efficient, simple and reliable mode. The purpose of study is to investigate new races of cholera phages and to outline perspectives of their practical application. The study used 360 strains *Vibrio cholerae* of biovar *El Tor*, separated from various sources and in various years and also 43 strains *Vibrio cholerae* Classical. Also study included as typical ones both cultures *Vibrio cholerae* *El Tor* and altered modifications (RO, RS). Out of 25 analyzed cholera phages the most perspective for constructing phage preparation were defined four bacteriophages (El 1, O1, El 2, Cl) with spectrum of lytic activity of 57.5%, 64.6%, 66.3% and 83.3% correspondingly. Our of all covered strains 32 cultures (7.9%) retained resistance to all phages. The proposed bacteriophages have different spectrum of lytic activity as related to cholera vibrio. The new avirulent test-strains were selected for reproduction and control of new races of diagnostic bacteriophages. The analysis of obtained results demonstrated that analyzed cholera phages with high lytic activity can be applied in diagnostic of strains of cholera vibrio.*

Key words: cholera bacteriophages; diagnostic bacteriophages; phago-resistance; phago-diagnostic

For citation: Gaevskaya N.E., Kochetkova A.O. The new races of cholera bacteriophages perspective for applying in laboratory diagnostic of cholera. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)* 2017; 62 (7) : 440-443. (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2017-62-7-440-443>

For correspondence: Gaevskaia N.E., candidate of medical sciences, the head of laboratory of bacteriophages. e-mail: gaevskaya.nata@mail.ru

Conflict of interests. The authors declare absence of conflict of interests.

Acknowledgment. The study had no sponsor support.

Received 16.09.2016
Accepted 15.10.2016

Холера продолжает оставаться проблемой здравоохранения мирового масштаба в связи с существованием угрозы возникновения чрезвычайных ситуаций биолого-социального характера, имеющих международное значение и проявляющихся в виде интенсивных и масштабных эпидемий и вспышек на различных континентах мира. Это определяет необходимость постоянного мониторинга холеры как одного из основных компонентов эпидемиологического надзора на всех уровнях [1].

В практику прочно вошел метод определения фагочувствительности изучаемых культур с помощью диагностических фагов для идентификации холерных вибрионов. Однако появилось большое (до 77,4%) число резистентных к диагностическим препаратам штаммов. Способность возбудителя холеры в наблюдаемый период формировать отличающиеся по признаку устойчивости формы позволяет понять всю сложность задачи их фагодиагностики.

Иметь эффективные бактериофаги для идентификации и дифференциации циркулирующих штаммов холерных вибрионов весьма важно для оценки изменчивости холерного вибриона и определения его роли, учитывая неразрывную связь эволюции паразита и его хозяина [2]. Установлено, что угнетение физиологических функций или нарушение клеточного метаболизма и условий внутриклеточного развития фага служат одной из причин возникновения их фагорезистентности [3, 4].

Причины фагорезистентности бактерий на основании многолетних наблюдений различных исследователей позволили констатировать, что утрата чув-

ствительности холерного вибриона к гомологичному бактериофагу обеспечивает бактериальной клетке экологическую устойчивость на пути эволюции [3]. Одной из причин возникновения фагорезистентных вариантов среди обнаруживаемых из объектов внешней среды штаммов *Vibrio cholerae* *El Tor* может быть нарушение нормального функционирования систем рестрикции-модификации различной специфичности взаимодействия фага и бактериальной клетки [3, 5, 6]. Кроме того, одной из причин снижения или потери чувствительности к холерным фагам может служить носительство гомоиммунных умеренных фагов, которые обуславливают феномен несовместимости, заключающийся, как правило, в том, что бактерии приобретают иммунитет к родственному типовому бактериофагу [5, 7].

Разработка и усовершенствование существующих препаратов фагодиагностики – актуальная задача, так как фагочувствительность холерных вибрионов остается ценным специфическим тестом их идентификации и дифференциации. В зарубежной литературе отсутствуют сведения о получении фагов, пригодных для диагностики устойчивых форм холерных вибрионов.

Поиск новых рас холерных фагов актуален и в первую очередь связан с необходимостью подтверждения специфических свойств возбудителя холеры эффективным, простым и надежным способом.

Поэтому в центре внимания специалистов Роспотребнадзора оказалась проблема совершенствования диагностического препарата холерного фага, эффективно лизирующего холерные штаммы при проведе-

Варианты лизиса штаммов *V. cholerae* O1 холерными бактериофагами

Микроорганизмы	Холерные бактериофаги			
	O1	Cl	EI 1	EI 2
<i>V. cholerae</i> O1 биовара <i>Classical</i>	+ (-)	+	-	-
<i>V. cholerae</i> O1 биовара <i>El Tor</i>	+ (-)	-	+	+
	+ (-)	-	+	-
	+ (-)	-	-	+
<i>V. cholerae</i> O1 двух биоваров	+	-	-	-

Примечание. + – наличие лизиса; - – отсутствие лизиса.

нии идентификации патогенного микроба.

Цель нашей работы – провести поиск новых перспективных рас холерных фагов для использования их в лабораторной диагностике холеры.

Полученные новые расы фагов будут отличаться от исходных образцов целым рядом биологических признаков, ведущим из которых станет преодоление резистентности клетки-хозяина.

В работе использовано 267 штаммов *Vibrio cholerae* биовара *El Tor* (52 штамма ctx^+tcp^+ , 9 штаммов ctx^+tcp^- , 206 штаммов ctx^-tcp^-), из них фагорезистентных к фагу «Эльтор» – 253 штамма, выделенных в 2001–2015 гг. из различных источников, а также 24 штамма *Vibrio cholerae Classical*, полученных из Музея живых культур с Центром патогенных вибрионов Ростовского-на-Дону противочумного института Роспотребнадзора. В исследование были взяты как типичные культуры *Vibrio cholerae El Tor*, так и измененные варианты (RO, RS).

Для изучения и сохранения биологического разнообразия бактериофагов, а также для выполнения научных исследований по проблеме «Холера и патогенные вибрионы» в Ростовском-на-Дону противочумном институте собрана коллекция холерных фагов разного происхождения. Из данной коллекции изучены 25 холерных фагов по чувствительности к отобраным штаммам. Критерием отбора фагов стал лизис фагоустойчивых штаммов холерных вибрионов Эль Тор, выделенных в различные

годы от людей и из внешней среды (2001–2014 гг.). Изучение свойств фагов проводили общепринятыми методами [8].

Питательные среды для экспериментов включали бульон и 0,7 и 1,5% агар Мартена pH 7,6–7,8.

В результате были отобраны 4 холерных бактериофага, лизирующие холерные вибрионы, устойчивые к коммерческим диагностическим фагам. Анализ результатов литической активности показал, что все штаммы, взятые для лабораторных испытаний, лизируются в той или иной степени и в разных вариантах экспериментальными холерными бактериофагами (O1, Cl, EI 1, EI 2).

Предлагаемые бактериофаги имеют различный спектр литической активности в отношении холерных вибрионов Эль Тор и Classical. Диапазон литической активности у фагов составил: у фага EI 1 – 57,5%, у фага O1 – 64,6%, у фага EI 2 – 66,3%, у фага Cl – 83,3%. Данные фаги в процессе исследования образовали следующие варианты лизиса (см. таблицу).

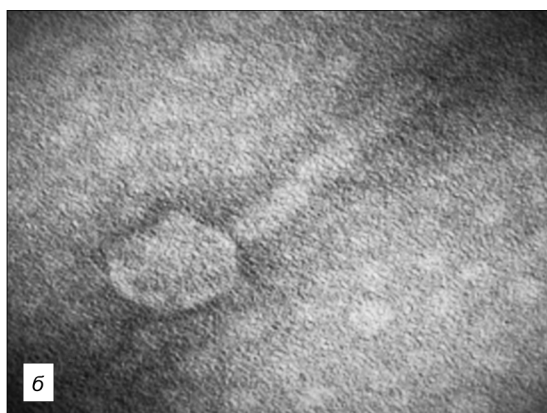
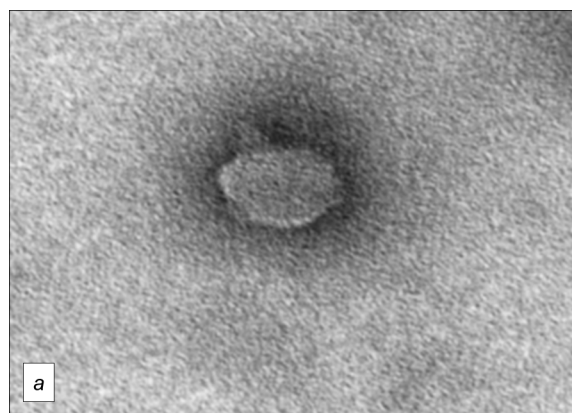
Специфичность фагов в отношении хозяина подтверждена на большом наборе представителей близкородственных микроорганизмов семейств *Vibrionaceae*, *Pseudomonadaceae*, *Enterobacteriaceae*, которые не лизировали испытуемые фаги.

По данным электронно-микроскопического исследования, новые холерные бактериофаги относились по морфологии корпускул: фаги O1, EI 1 и фаг Cl – к III морфогруппе [9] и типу C [10] семейства *Prodoviridae*; фаг EI 2 – к V морфогруппе [9] и типу A [10] семейства *Myoviridae* (см. рисунок).

При изучении действия инактивирующих агентов (хлороформа и повышенной температуры) было установлено, что к действию хлороформа фаги *V. cholerae* устойчивы и инактивировались при температуре 65–70 °C в течении 30 мин.

Попытки использовать данные холерные фаги в различных вариантах смесей не были успешными, поскольку происходило снижение диапазона литической активности и титров фагочастиц до 10^5 – 10^7 БОЕ/мл, в то время как у монофагов титры сохранялись на уровне 10^8 – 10^{10} БОЕ/мл.

Одним из важных моментов в технологии изго-



Морфология бактериофагов холерных вибрионов (вид в электронном микроскопе JEM-1011; Ув. 100 000).
а – *Prodoviridae*; б – *Myoviridae*.

товления диагностических препаратов становятся используемые при этом тест-штаммы. До настоящего времени для производства диагностических фагов использовали токсигенный индикаторный штамм *Vibrio cholerae El Tor 75*. Для размножения и контроля новых рас диагностических бактериофагов необходимо было найти новые авирулентные тест-штаммы. В качестве одного из наиболее перспективных тест-штаммов для размножения новых рас диагностических холерных бактериофагов мы использовали нетоксигенную культуру *Vibrio cholerae El Tor 19546*, которая была депонирована в ГКПБ «Микроб» № КМ-276. Также подобраны еще два атоксигенных индикаторных штамма для размножения экспериментальных диагностических бактериофагов, которые в настоящее время готовятся к депонированию.

Заключение. Анализ полученных результатов показал, что экспериментальные диагностические холерные фаги могут быть применены для идентификации штаммов холерных вибрионов серогруппы O1. Актуальность использования метода фаговой диагностики заключается в том, что он исключает применение дорогостоящей аппаратуры и большие материальные затраты. Его отличают техническая простота и доступность, которые позволяют в кратчайший (12–18 ч) срок получить ответ.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (pp. 5–6, 10 см. REFERENCES)

1. Титова С.В., Москвитина Э.А., Монахова Е.В., Писанов Р.В., Водопьянов А.С., Водопьянов С.О. и др. Современные подходы к мониторингу холеры. В кн.: *Холера и патогенные для человека вибрионы. Материалы проблемной комиссии (48.04) Координационного научного совета по санитарно-эпидемиологической охране территории Российской Федерации*. Ростов-на-Дону: Дониздат; 2015; 28: 10–6.
2. Кудрякова Т.А., Мakedонова Л.Д., Гаевская Н.Е., Качкина Г.В., Кругликов В.Д., Зубкова Д.А. и др. Характеристика холерных фагов, выделенных из поверхностных водоемов и стоков города Ростова-на-Дону в ходе мониторинга с 2008 по 2012 гг. В кн.: *Холера и патогенные для человека вибрионы. Сборник трудов конференции*. Ростов-на-Дону: Дониздат; 2013; 26: 168–72.
3. Ломов Ю.М., Сомова А.Г., Кудрякова Т.А. *Холерные фаги*. Ростов-на-Дону; 1990.
4. Овчинникова М.В., Аленкина Т.В., Коровкина Г.И., Грачева И.В.

Изучение некоторых причин фагорезистентности эпидемически неопасных штаммов *V. cholerae eltor* к бактериофагу диагностическому холерному ctx-. В кн.: *Холера и патогенные для человека вибрионы. Материалы проблемной комиссии*. Ростов-на-Дону; 2010; 23: 62–6.

5. Каттер Э., Сулаквелидзе А. *Бактериофаги: биология и практическое применение*: Пер. с англ. М.: Научный мир; 2012.
6. Адамс М. *Бактериофаги*: Пер. с англ. М.: Иностранная литература; 1961.
7. Тихоненко А.С. *Ультраструктура вирусов бактерий*. М.: Наука; 1968.

REFERENCES

1. Titova S.V., Moskvitina E.A., Monakhova E.V., Pisanov R.V., Vodop'yanov A.S., Vodop'yanov S.O. et al. Modern approaches to monitoring of cholera. In: *Cholera and Human Pathogenic Vibrio. Proceedings of the Problem Commission (48.04) of the Scientific Council on the Sanitary and Epidemiological Protection of the Territory of the Russian Federation [Kholera i patogennye dlya cheloveka vibriony. Materialy problemnoy komissii (48.04) Koordinatsionnogo nauchnogo soveta po sanitarno-epidemiologicheskoy okhrane territorii Rossiyskoy Federatsii]*. Rostov-na-Donu: Donizdat; 2015; 28: 10–6. (in Russian)
2. Kudryakova T.A., Makedonova L.D., Gaevskaya N.E., Kachkina G.V., Kruglikov V.D., Zubkova D.A. et al. Characteristic of cholera phages isolated from the surface of reservoirs and sinks of Rostov-on-Don in the course of monitoring from 2008 to 2012. In: *Cholera and Human Pathogenic Vibrio. Conference Proceedings [Kholera i patogennye dlya cheloveka vibriony. Sbornik trudov konferentsii]*. Rostov-na-Donu: Donizdat; 2013; 26: 168–72. (in Russian)
3. Lomov Yu.M., Somova A.G., Kudryakova T.A. *Cholera Phage [Kholermye fagi]*. Rostov-na-Donu; 1990. (in Russian)
4. Ovchinnikova M.V., Alenkina T.V., Korovkina G.I., Gracheva I.V. The study of some of the causes of phagorezistentnosti non-hazardous epidemic strains of *V. cholerae eltor* to bacteriophage diagnostic cholera ctx-. In: *Cholera and Human Pathogenic Vibrio. Proceedings of the Problem Commission [Kholera i patogennye dlya cheloveka vibriony. Materialy problemnoy komissii]*. Rostov-na-Donu; 2010; 23: 62–6. (in Russian)
5. Labrie S.J., Samson J., Moineau S. Bacteriophage resistance mechanisms. *Nat. Rev. Microbiol.* 2010; 8 (5): 317–27.
6. Tock M.R., Dryden D.T. The biology of restriction and anti-restriction. *Curr. Opin. Microbiol.* 2005; 8 (4): 466–72.
7. Kutter E., Sulakvelidze A. *Bacteriophages: Biology and Applications*. Boca Raton: CRP Press; 2005.
8. Adams M.H. *Bacteriophages*. New York: Interscience; 1959.
9. Tikhonenko A.S. *Ultrastructure of Viruses of Bacteria [Ul'trastruktura virusov bakteriy]*. Moscow: Nauka; 1968. (in Russian)
10. Ackerman H.B. Bacteriophage taxonomy in 1987. *Microbiol. Sci.* 1987; 4 (17): 214–8.

Поступила 16.09.16

Принята к печати 15.10.16