

- ogy of vaginal *Candida* infection: significance of numbers of vaginal yeasts and their biotypes. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 1987; 25(1): 53–66.
25. Hopwood V., Crowley T., Horrocks C. T., Milne J. D., Taylor P. K., Wamock D. W. Vaginal candidosis: relation between yeast counts and symptoms and clinical signs in non-pregnant women. *Genitourin Med.* 1988; 64(5): 331–4.
 26. Odds F. C., Webster C. E., Mayuranathan P., Simmons P. D. *Candida* concentrations in the vagina and their association with signs and symptoms of vaginal candidosis. *J. Med. Vet. Mycol.* 1988; 26(5): 277–83.
 27. Mahmoudi Rad M., Zafarghandi ASh., Amel Zabihi M., Tavallaee M., Mirdamadi Y. Identification of *Candida* species associated with vulvovaginal candidiasis by multiplex PCR. *Infect. Dis. Obstet. Gynecol.* 2012; 2012: 872169.
 28. Trama J. P., Mordechai E., Adelson M. E. Detection and identification of *Candida* species associated with *Candida* vaginitis by real-time PCR and pyrosequencing. *Mol. cell. probes.* 2005; 19(2): 145–52.
 29. Malezka R., Clark-Walker G. D. 1993. Yeasts have a Four-fold Variation in Ribosomal DNACopy Number. *Yeast.* 1993; 9(1): 53–8.
 30. Fredricks D. N., Smith C., Meier A. Comparison of six DNA extraction methods for recovery of fungal DNA as assessed by quantitative PCR. *J. Clin. Microbiol.* 2005; 43(10): 5122–8.

Поступила 11.08.14

Received 11.08.14

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2015

УДК 579.843.1:578.811.083

Гаевская Н. Е., Кудрякова Т. А., Македонова Л. Д., Качкина Г. В.

ИДЕНТИФИКАЦИЯ И ДИФФЕРЕНЦИАЦИЯ БАКТЕРИОФАГОВ ПАТОГЕННЫХ ДЛЯ ЧЕЛОВЕКА ВИБРИОНОВ

ФКУЗ «Ростовский-на-Дону ордена Трудового Красного Знамени научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора, 344002, г. Ростов-на-Дону, Россия

До настоящего времени остается нерешенной проблема идентификации и дифференциации большой группы бактериофагов патогенных для человека вибрионов. Для исследовательских целей и решения прикладных задач важно учитывать признаки бактериофагов, позволяющие выявить сходство и различия между ними. В настоящем исследовании изучены представители ДНК-содержащих бактериофагов патогенных вибрионов, из которых подавляющее большинство отличались сложным видом симметрии, – это фаги, имеющие двуспиральную ДНК, а также открытые у вибрионов в последние годы фаги с односпиральной структурой ДНК. Впервые разработана общая схема идентификации и дифференциации бактериофагов патогенных вибрионов, что повышает возможность определения видовой принадлежности фагов и сравнения с фагами, зарегистрированными в базе данных «Коллекция бактериофагов и тест-штаммов патогенных для человека вибрионов» (№ 2010620549 от 24.09.2010).

Ключевые слова: *Vibrio cholerae*; *V. parahaemolyticus*; *V. mimicus*; *V. alginolyticus*; *V. metschnikovii*.

Gaevskaia N.E., Kudriakova T.A., Makedonova L.D., Kachkina G.V.

THE IDENTIFICATION AND DIFFERENTIATION OF BACTERIOPHAGES OF HUMAN PATHOGENIC VIBRIO

The Rostov-on-Don research institute anti-plague institute, 344002 Rostov-on-Don, Russia

The issue of identification and differentiation of large group of bacteriophages of human pathogenic vibrio is still unresolved. In research and practical applied purposes it is important to consider characteristics of bacteriophages for establishing similarity and differences between them. The actual study was carried out to analyze specimens of DNA-containing bacteriophages of pathogenic vibrio. The overwhelming majority of them characterized by complicated type of symmetry - phages with double-helical DNA and also phages with mono-helical DNA structure discovered recently in vibrio. For the first time, the general framework of identification and differentiation of bacteriophages of pathogenic vibrio was developed. This achievement increases possibility to establish species assignment of phages and to compare with phages registered in the database "The collection of bacteriophages and test-strains of human pathogenic vibrio" (№2010620549 of 24.09.2010).

Key words: *V. cholerae*; *V. parahaemolyticus*; *V. mimicus*; *V. alginolyticus*; *V. metschnikovii*

Бактериофаги являются постоянным спутником патогенных вибрионов. В настоящее время их широко используют для диагностики и дифференциации патогенных вибрионов.

Среди патогенных вибрионов особое место занимают *Vibrio cholerae* и *V. parahaemolyticus*. *V. cholerae* вызывают холеру, которая является древней болезнью, обусловившей семь пандемий, и продолжает вызывать эпидемии и крупные вспышки на различных континентах, несмотря на непрекращающиеся усилия ограничить ее распространение [9]. *V. parahaemolyticus* приводят к возникновению острого ки-

шечного заболевания, протекающего по типу пищевой токсикоинфекции в виде спорадических случаев или эпидемических вспышек. Опасность заражения паразитическими вибрионами существует везде, где население использует для питания продукты моря. В местах, удаленных от побережья, зарегистрированы случаи заболевания, связанные с завозом инфицированных морепродуктов.

Бактериофаги патогенных вибрионов представляют собой группу вирусов, характеризующихся широким морфологическим и генетическим разнообразием, поэтому их идентификация и дифференциация является актуальной проблемой, тесно связывающей между собой такие вопросы, как строение вириона, антигенная структура и литическая специфичность при взаимодействии фага с клеткой-хозяином [2, 4].

Цель работы – характеристика биологических свойств

Для корреспонденции:

Гаевская Наталья Евгеньевна, науч. сотр.

Адрес: 344002, Ростов-на-Дону, ул. М.Горького, 117/40

E-mail: gaevskaya.nata@mail.ru

бактериофагов и создание схемы их идентификации и дифференциации.

Материалы и методы. Изучены 84 бактериофага: 16 рас – *V. cholerae* classical, 32 – *V. cholerae* El Tor, 8 – *V. cholerae* серогруппы O139, 19 – *V. parahaemolyticus*; для сравнения использовали фаги 4 – *V. alginolyticus*, 3 – *V. metschnikovii*, 2 – *V. mimicus*. В работе применяли следующие индикаторные штаммы: *V. cholerae* classical 145 (ctx⁺ tcp⁺), *V. cholerae* El Tor 75M (ctx⁺ tcp⁺), KM-199 (P-13169) (ctx⁻ tcp⁺), *V. cholerae* серогруппы O139 – KM-152 (P-16373) (ctx⁺ tcp⁺), *V. metschnikovii* – KM-185 и C-142 [5]. Для дифференциации фага *V. mimicus* от холерного фага ФБ использовали штамм *V. cholerae* серогруппы O37 1322-69 (ctx⁺ tcp⁺) [6]. Предложенные нами в качестве индикаторных штаммов *V. parahaemolyticus* KM-97 и KM-184 применяли для размножения бактериофагов парагемолитических вибрионов. Специфичность бактериофагов испытывали на 133 штаммах бактерий близкородственных родов и семейств (Vibrionaceae, Pseudomonadaceae, Enterobacteriaceae).

Обнаружение, выделение и размножение фага из лизогенных штаммов патогенных вибрионов проводили общепринятыми методами [1], адаптированными к работе с фагами патогенных вибрионов. Антифаговые сыворотки получали путем внутривенной иммунизации кроликов по методу Ю. Н. Марьиной [7], соответствующими фагами. Серологическую идентификацию осуществляли двумя методами: качественным и количественным [1]. Строение корпускул фагов патогенных вибрионов изучали по методике, изложенной в методических указаниях по применению прямого фаготипирования возбудителя холеры [8]. Диапазон литической, активности и специфичности фагов изучали путем постановки пробы с фагами (титр 10⁶–10¹⁰ БОЕ/мл) [1]. Результат учитывали через 18 ч культивирования при 37 °С. При изучении одиночного цикла размножения использовали методику Эл-лиса и Дельбрюка [3]. Устойчивость фагов к действию концентрированных растворов мочевины, цитрата натрия исследовали по методике F. Burnet [3]. Термоустойчивость фагов определяли методом Friedman и Cowles [3]. Хлороформ добавляли к фаголизату в количестве 10% объема среды.

Все работы со штаммами *V. cholerae* проводили в соответствии с Санитарно-эпидемиологическими правилами СП 1.3.1285–03.

Результаты и обсуждение. Изученные фаги *V. cholerae* classical, *V. cholerae* El Tor, *V. cholerae*, серогруппы O139, *V. parahaemolyticus*, *V. mimicus* имели негативные колонии

округлой формы, мутные или прозрачные, диаметром 0,3–2 мм. Данные одиночного цикла развития вышеперечисленных фагов свидетельствовали об отсутствии каких-либо значительных различий: продолжительность латентного периода составляла для фагов *V. cholerae* 60–72 мин, для *V. parahaemolyticus* – 60–75 мин; средний урожай на одну микробную клетку фагов *V. cholerae* – 7,53–17,51 корпускулы; *V. parahaemolyticus* – 1,55–2,61 корпускулы. Относительно действия на исследуемые фаги раствора 30% мочевины при экспозиции 18–20 ч и 3% цитрата натрия различий обнаружено не было.

Отличие филаментозных фагов от фагов с головками и отростком определяли по чувствительности к ним специально подобранных штаммов. Использование этого приема давало возможность проводить первичную оценку морфологической принадлежности фагов.

Выявлены существенные различия в структуре корпускул бактериофагов при применении метода электронной микроскопии. По классификации А. С. Тихоненко [10] у холерных бактериофагов определено 5 морфогрупп I–V: у *V. parahaemolyticus* 4 морфогруппы (I, III–V), у *V. alginolyticus* 3 морфогруппы (III–V). Фаги *V. cholerae* серогруппы O139 имели 2 морфогруппы вирионов (I и V), *V. mimicus* – 1 морфогруппу (I), *V. metschnikovii* – 1 морфогруппу (IV) (см. таблицу).

Для изучения антигенных свойств холерных фагов использовали сыворотки I–XII серотипов. Установили, что сыворотки к фагам XII серотипа нейтрализовали исследуемые фаги I морфогруппы, в то же время фаги V морфогруппы относились ко II серотипу, III морфогруппы – к XI серотипу. Сыворотки к холерным фагам XII серотипа нейтрализовали фаги *V. mimicus*. Бактериофаги *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus*, *V. metschnikovii* не имели перекрестных реакций с антисыворотками к фагам *V. cholerae* и *V. mimicus*. У фагов *V. metschnikovii* и *V. mimicus* определено по 1 серотипу, у *V. parahaemolyticus* – 11, у *V. alginolyticus* – 4.

Другой критерий, которым мы руководствовались при идентификации отдельных фагов, – спектр литического действия. Специфичность фагов в отношении хозяина подтверждена на большом наборе представителей близкородственных микроорганизмов семейств Vibrionaceae, Pseudomonadaceae, Enterobacteriaceae, которые не лизировали испытываемые фаги.

Диапазон литической активности фагов Эль-Тор составлял от 57,8 до 76,8% штаммов *V. cholerae*, парагемолитических фагов – 0,8–82% штаммов *V. parahaemolyticus* и 52,5% *V. alginolyticus*. Фаги *V. metschnikovii* лизировали единичные

Идентификация и дифференциация бактериофагов патогенных бактерий

Вид бактериофага	Идентификация								Дифференциация			
	индикаторные штаммы								морфогруппа	серотип	чувствительность групп фагов	
	<i>V. cholerae</i> El Tor 75M	<i>V. cholerae</i> El Tor KM-199	<i>V. cholerae</i> O139 KM-152	<i>V. cholerae</i> classical 145	<i>V. cholerae</i> O37 1322-69	<i>V. parahaemolyticus</i> KM-184	<i>V. parahaemolyticus</i> KM-97	<i>V. metschnikovii</i> KM-185			к хлороформу	к 70 °С
<i>V. cholerae</i> O1	+	+	+	+	–	–	–	–	I	XII	+	–
	+	+	–	+	–	–	–	–	II–V	I–XI	–	+
<i>V. cholerae</i> O139	+	+	+	+	–	–	–	–	I	XII	+	–
	+	+	–	+	–	–	–	–	V	II	–	+
<i>V. parahaemolyticus</i>	–	–	–	–	–	+	–	–	I	I	+	–
	–	–	–	–	–	+	+	–	III–V	III–XI	–	+
<i>V. alginolyticus</i>	–	–	–	–	–	+	+	–	III–V	IV, VI, VIII, XI	–	+
<i>V. metschnikovii</i>	–	–	–	–	–	–	–	+	IV	I	–	+
<i>V. mimicus</i>	–	+	–	–	+	–	–	–	I	XII	+	–

Примечание. + – наличие признака, – – отсутствие признака.

штаммы своего вида. Репродукций фага *V. mimicus* обнаружили при использовании штамма *V. cholerae* El Tor KM-199 (P-13169). Свойство фага другого вида вибрионов *V. metschnikovii* лизировать индикаторный штамм было утрачено после его размножения на новом свежeweделенном штамме *V. metschnikovii* и сопровождалась появлением вирулентного мутанта фага с измененным спектром. Нами получены доказательства изменчивости свойств фагов, связанных с направляющим действием штаммов-хозяев.

Выбор таксономических критериев в результате сравнительного анализа свойств различных по происхождению фагов позволил решить вопрос о возможности их внутривидовой дифференциации (см. таблицу). Материалы исследования показали, что бактериофаги патогенных вибрионов представляют собой неоднородную по свойствам группу.

Многолетние наблюдения за серологическими свойствами исследованных бактериофагов патогенных вибрионов подтвердили стабильность их антигенной структуры – наиболее важного признака при типизации. Установлен факт сходства антигенного строения фагов, выделенных из штаммов холерных вибрионов серогрупп O1 и O139 (фаги II серотипа), а также фагов *V. mimicus* с холерными фагами XII серотипа.

В процессе исследования литической активности фагов подобраны индикаторные штаммы к определенным морфотипам фагов. На этой основе реализован способ дифференциации холерных фагов I и V морфогрупп (штаммы *V. cholerae* El Tor KM-199 и *V. cholerae* O139 KM-152), фагов *V. parahaemolyticus* I, III–V морфогрупп (штаммы KM-184 и KM-97). Как правило, различия между фагами I и III–V морфогрупп подтверждались и другими тестами.

Из дополнительных методов дифференциации фагов I морфогруппы холерных и параземолитических вибрионов от остальных (III–V) применяли метод воздействия на них инактивирующих агентов – хлороформа и повышенной температуры (65–70°C). Фаги *V. cholerae* El Tor V морфогруппы и *V. parahaemolyticus* III–V морфогрупп инактивировались при 65–70°C в течение 30 мин, в то время как фаги I морфогруппы теряли активность при 75–80°C. К действию хлороформа фаги *V. cholerae* El Tor V морфогруппы и *V. parahaemolyticus* III–V морфогрупп устойчивы, а фаги I морфогруппы инактивируются под его воздействием, что использовалось нами для их дифференциации [4].

Благодаря обнаруженному свойству фагов *V. mimicus* лизировать штамм *V. cholerae* серогруппы O37, проводили их дифференциацию от холерных фагов и определение их присутствия при мониторинге объектов окружающей среды на наличие холерных вибрионов и их фагов [6].

При идентификации и дифференциации бактериофагов патогенных вибрионов целесообразно учитывать следующие признаки их сходства и различия:

- специфичность литического действия, подтверждаемая на соответствующих видах микроорганизмов, применение тест-штаммов вибрионов;
- характерную морфологию бактериофагов в электронном микроскопе – определение морфогруппы;
- отсутствие антигенного родства с бактериофагами других видов;
- устойчивость либо чувствительность к хлороформу и повышенной температуре.

В результате обобщения и анализа полученных данных о биологических свойствах ранее изученных и свежeweделенных бактериофагов патогенных вибрионов нами предложена общая схема идентификации и дифференциации бактериофагов (см. таблицу).

Представленные приемы позволяют характеризовать свежeweделенные фаги и обеспечить пополнение новыми бактериальными вирусами базы данных «Коллекция бактериофагов и тест-штаммов патогенных для человека вибрионов» (свидетельство о регистрации в Реестре баз данных Федеральной службы по интеллектуальной собственности, патентам и товарным знакам базы данных № 2010620549 от 24.09.2010).

Знание биологических особенностей фагов патогенных вибрионов имеет не только теоретическое, но и важное практическое значение, так как способствует созданию диагностических, лечебных и профилактических препаратов, изучению вопросов генетики возбудителей холеры и пищевых токсикоинфекций.

ЛИТЕРАТУРА

1. Адамс М. Бактериофаги. М.; 1961
2. Гаевская Н. Е., Кудрякова Т. А., Македонова Л. Д., Качкина Г. В., Алиева А. А. Выявление и первичная идентификация параземолитических фагов по морфологическому признаку: «Холера и патогенные для человека вибрионы»: Материалы проблемной комиссии. Ростов н/Д; 2005; 18: 104–7.
3. Кудрякова Т. А. Лизогения холерных и параземолитических вибрионов и ее практическое значение: Дис. ... Ростов-на-Дону; 1996.
4. Кудрякова Т. А. и др. Способ дифференциации бактериофагов параземолитических вибрионов III, IV, V морфогрупп от filamentозных бактериофагов I морфогруппы. Патент РФ; № 2290445; 2006.
5. Кудрякова Т. А. и др. Штамм бактерий *Vibrio metschnikovii*, используемый в качестве индикаторной культуры для выявления специфического фага. Патент РФ; № 2332453; 2008.
6. Кудрякова Т. А. и др. Способ выделения и дифференциации фага *Vibrio mimicus*. Патент РФ; № 2375437; 2009.
7. Марьяна Ю. Н. Получение антифаговой сыворотки и изучение антигенной структуры фага. Труды Ростовского противочумного института. 1941; 2: 3–7.
8. Дрожжевкина М. С., Арутюнов Ю. И. Методические указания по применению прямого фаготипирования возбудителя холеры Эль Тор. Москва; 1983.
9. Москвитина Э. А., Титова С. В., Адаменко О. Л., Кругликов В. Д. Перспективы дальнейшего совершенствования эпидемиологического надзора за холерой на территории Российской Федерации: «Холера и патогенные для человека вибрионы»: Материалы проблемной комиссии. Ростов н/Д; 2014; 27: 14–8.
10. Тихоненко А. С. Ультраструктура вирусов бактерий. М.; 1968.

REFERENCES

1. Adams M. Bacteriophages. M.; 1961.
2. Gaevskaya N. E., Kudryakova T. A., Makedonova L. D., Kachkina G. V., Alieva A. A. Detection and identification of the primary paragemolitic phages are morphologically: "Cholera and human pathogenic vibrio". Materialy problemnoi komissii. Rostov n/D; 2005; 18: 104–7. (in Russian)
3. Kudryakova T. A. Lysogenesis *Vibrio cholerae* and paragemolitic and its practical significance: Author, dis. ... Dr. med. Sciences. Rostov-na-Donu; 1996. (in Russian)
4. Kudryakova T. A. et al. The method of differentiation of bacteriophages *Vibrio parahaemolyticus* III, IV, V morfogruppy of filamentous bacteriophage I morfogruppy. Patent RF; № 2290445; 2006. (in Russian)
5. Kudryakova T. A. et al. Bacterial strain *Vibrio metschnikovii*, used as indicator for the detection of specific culture phage. Patent RF; № 2332453; 2008. (in Russian)
6. Kudryakova T. A. et al. A method for isolating and differentiating phage *Vibrio mimicus*. Patent RF; № 2375437; 2009. (in Russian)
7. Mar'ina Yu. N. Getting antiphage serum and study of the antigenic structure of the phage: Proc. Rostov, protivochum. Inst; 1941; 2: 3–7. (in Russian)
8. Drozhevskina M. S., Arutyunov Yu. I. Guidelines on the application of direct phage-typing cholera El Tor. Moscow; 1983. (in Russian)
9. Moskvitina E. A., Titova S. V., Adamenko O. L., Kruglikov V. D. Prospects for further improvement of the epidemiological surveillance of cholera in the Russian Federation: "Cholera and human pathogenic vibrio": Materialy problemnoi komissii. Rostov n/D; 2014; 27: 14–8. (in Russian)
10. Tikhonenko A. S. Ultrastructure of bacterial viruses. Moscow; 1968. (in Russian)

Получена 01.09.14

Received 01.09.14