

© ГАЕВСКАЯ Н.Е., МАКЕДОНОВА Л.Д., 2016

УДК 616.932-078:578.81

Гаевская Н.Е., Македонова Л.Д.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ БАКТЕРИОФАГОВ В ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКЕ ХОЛЕРЫ

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

*Способность возбудителя холеры в период седьмой пандемии формировать отличающиеся по признаку устойчивости к бактериофагу формы определяет всю сложность решения задачи их фагодиагностики. Поиск новых рас диагностических холерных фагов актуален и связан, в первую очередь, с необходимостью подтверждения специфических свойств возбудителя холеры эффективным, простым и надежным способом. В этой связи мы поставили целью провести поиск новой расы холерных фагов, активных в отношении фагоустойчивых к коммерческому препарату диагностического фага штаммов холерных вибрионов биовара Эль-Тор. В работе использован 131 музейный устойчивый к диагностическим холерным фагам штамм *Vibrio cholerae* El Tor, выделенный в 2001–2014 гг. из различных источников. Проверена активность 25 холерных фагов по отношению к отобраным штаммам. Наиболее перспективными для конструирования фагового препарата являются три бактериофага, спектр литической активности которых составлял 44, 53 и 56% соответственно. Из числа взятых штаммов 20 культур (15%) сохранили устойчивость ко всем фагам. Предлагаемые бактериофаги имеют различный спектр литической активности в отношении холерных вибрионов Эль-Тор. Для размножения и контроля холерного диагностического бактериофага необходимо было найти новый авирулентный тест-штамм, в связи с чем была использована нетоксигенная культура *Vibrio cholerae* El Tor 19546. Анализ полученных результатов показал, что изученные холерные фаги, обладающие высокой литической активностью, могут быть использованы для диагностики фагоустойчивых штаммов холерных вибрионов. Актуальность использования метода фаговой диагностики заключается в том, что он не требует применения дорогостоящей аппаратуры и крупных материальных расходов.*

К л ю ч е в ы е с л о в а: холерные бактериофаги; диагностические бактериофаги; фаготипирование; фагорезистентность; фагодиагностика.

Для цитирования: Гаевская Н.Е., Македонова Л.Д. Использование бактериофагов в лабораторной диагностике холеры. Клиническая лабораторная диагностика. 2016; 61 (12): 849-852. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2016-61-12-849-852>
Gaievskaya N.E., Makedonova L.D.

THE APPLICATION OF BACTERIOPHAGES IN LABORATORY DIAGNOSTICS OF CHOLERA

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

*The capacity of cholera agent to develop, during the seventh pandemic, the forms differing by attribute of resistance to bacteriophage determines overall complexity of solving problem of their phage-diagnostics. The search of new races of diagnostic cholera phages is actual and in the first instance relates to necessity of confirmation of specific characteristics of cholera agent by efficient, simple and reliable mode. Thereupon, the target was established to search new race of cholera phages being active in relation to phage-resistant to commercial medication of diagnostic phage of strains of cholera comma bacilli of biovar El-Tor. The study used 131 museum resistant to diagnostic cholera phages strain *Vibrio cholerae* El Tor separated from various sources in 2001-2014. The activity of 25 cholera phages in relation to sampled strains was verified. The most promising for constructing phage medication are three bacteriophages with spectrum of lytic activity as 44%, 53% and 56% correspondingly. Out of number of selected strains only 20 cultures (15%) maintained resistance to all phages. The estimated bacteriophages have different spectrum of lytic activity in relation to cholera comma bacilli El Tor. The new avirulent test-strain was to be found for reproduction and control of cholera diagnostic bacteriophage. So, non-toxicogenic culture *Vibrio cholerae* El Tor 19546 was used. The analysis of received results demonstrated that analyzed cholera phages with high lytic activity can be used in diagnostics of phage-resistant strains of cholera comma bacilli. The actuality of application of phage-diagnostic technique lies in the fact that it requires no expensive equipment and large material expenses.*

Key words: cholera bacteriophages; diagnostic bacteriophages; phage-typing; phage-resistance; phage-diagnostics

For citation: Gaievskaya N.E., Makedonova L.D. The application of bacteriophages in laboratory diagnostic of cholera. Klinicheskiy Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics) 2016; 61 (12): 849-852. (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2016-61-12-849-852>

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

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

Financing. The study had no sponsor support.

Received 30.03.2016
Accepted 15.04.2016

Продолжающаяся седьмая пандемия холеры, ее широкое географическое распространение усилили интерес исследователей к вопросам оптимизации лабораторной диагностики

Для корреспонденции: Гаевская Наталья Евгеньевна, канд. мед. наук, зав. лаб. бактериофагов ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора, e-mail: gaevskaya.nata@mail.ru

возбудителя. Выраженная изменчивость основных биологических свойств холерных вибрионов, в том числе приобретенная фагорезистентность, диктует необходимость разработки новых диагностических фаговых препаратов.

С тех пор как Д'Эрелль впервые исследовал холерный бактериофаг, фагодиагностика по-прежнему остается важным специфическим тестом при идентификации холерных вибрионов. Практическая ценность методов фагодиагности-

ки патогенных бактерий убеждает в перспективности и актуальности поиска специфических фагов для идентификации и дифференциации холерных вибрионов.

При плановом обследовании на вибриофлору стационарных точек г. Ростова-на-Дону в период с 2000 по 2014 г. были проведены исследования по выявлению холерных фагов из проб воды поверхностных водоемов и стоков канализационных вод. Поиск проводился с диагностической целью, так как бактериологический метод выделения возбудителя холеры не всегда дает положительные результаты. В работе использовалась индикаторная система, включающая штаммы холерных вибрионов: *V. cholerae* Classical 145 (*ctx⁺tcp⁺*), *V. cholerae* El Tor 75 (*ctx⁺tcp⁺*), *V. cholerae* El Tor KM-199 (*ctx⁺tcp⁺*) [1].

В ходе мониторинговых исследований в водных пробах из объектов окружающей среды были обнаружены бактериофаги, морфо- и серогруппы которых находились в соответствии с таковыми у изолированных фагов в лизогенных штаммах, циркулирующих в данные эпидемические сезоны в реках Дон и Темерник. Обнаружение фагов XII серотипа и I морфогруппы сочеталось с циркуляцией лизогенных атоксигенных штаммов холерных вибрионов в абиотических объектах окружающей среды г. Ростова-на-Дону (рис. 1).

Носителями фагов V морфогруппы II серотипа были эпидемически значимые штаммы. Подтверждено, что обнаружение холерных фагов в воде является косвенным показателем присутствия вибрионов. С нашей точки зрения, уточнение связи между выделением фагов и штаммов холерных вибрионов из водных проб требует продолжения исследований в данном направлении.

Сотрудниками РостНИПЧИ М.С. Дрожевкиной и Ю.И. Арутюновым в 1970 г. была разработана методика и схема фаготипирования холерных штаммов, составлен набор фагов. В 1985 г. они были признаны ВОЗ лучшими в мире [2].

В лаборатории бактериофагов ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора проводится фаготипирование всех штаммов *V. cholerae* O1 (рис. 2), поступающих в институт, который является референс-центром по мониторингу холеры на территории Российской Федерации.

Способность возбудителя холеры в наблюдаемый период формировать отличающиеся по признаку устойчивости к бактериофагу формы позволяет понять всю сложность решения

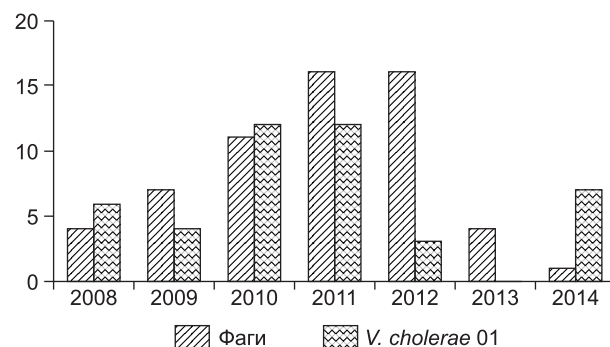


Рис. 1. Динамика выделения холерных вибрионов и фагов из рек Дон и Темерник с 2008 по 2014 г. По оси абсцисс – годы, по оси ординат – количество выделенных холерных вибрионов и фагов.

задачи их фагодиагностики. Несомненно, во многих случаях пребывание микробов во внешней среде сопровождается их глубокой изменчивостью под действием окружающей микрофлоры и бактериофагов. На рисунке 3 показаны проявления изменчивости свойств индикаторного холерного штамма (слева) под воздействием бактериофага. Различия выявлены и в усилении подвижности холерных вибрионов после воздействия холерного фага. При этом более подвижный штамм приобрел фагорезистентность (справа) к гомологичному фагу.

В то же время наличие эффективного фага для идентификации циркулирующих штаммов холерных вибрионов в данный период весьма важно при оценке изменчивости вибрионов и определении их роли, учитывая то обстоятельство, что общей закономерностью является неразрывная связь эволюции паразита и его хозяина. Многолетние наблюдения различных исследователей позволили выяснить причины фагорезистентности бактерий и констатировать тот факт, что утрата чувствительности холерного вибриона к гомологичному бактериофагу обеспечивает бактериальной клетке экологическую устойчивость в ходе эволюции. Показано, что угнетение физиологических функций или нарушение клеточного метаболизма и условий внутриклеточного развития фага являются одной из причин возникновения их фагорезистентности [2].



Рис. 2. Фаготипы штаммов холерных вибрионов, выделенных на территории Российской Федерации с 2001 по 2014 г.

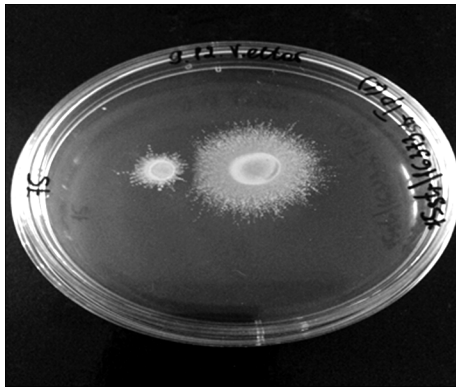


Рис. 3. Изменчивость свойств индикаторного холерного штамма под воздействием бактериофага.

Специфический исход взаимодействия фаг-бактерия контролируется наличием гомологии зон рецепции фага и клетки, наличием и соответствующей функциональной активностью бактериальных ферментативных систем, синтезирующих элементы паразита под контролем фаговой ДНК, а также существованием у клетки систем рестрикции-модификации различной специфичности [3, 4]. Нарушение нормального функционирования данных систем взаимодействия фага и бактериальной клетки может быть одной из причин возникновения фагорезистентных вариантов среди обнаруживаемых в объектах внешней среды штаммов *Vibrio cholerae El Tor* [5].

Анализ литературы показывает, что даже типичные холерные вибрионы, выделенные у больных холерой в 70-е годы XX века, весьма разнообразны по продукции фагов [2].

Также одной из причин снижения или потери чувствительности к вирулентным диагностическим фагам может являться носительство гомоиммунных умеренных фагов, которые обуславливают феномен несовместимости, заключающийся, как правило, в том, что бактерии становятся лизогенными данными фагами, приобретая тем самым иммунитет к родственному типовому диагностическому бактериофагу, то есть становятся фагорезистентными [3, 6].

Естественная коэволюция бактерий и фагов может облегчить получение новых литических фагов против фагоустойчивых бактерий, появляющихся в результате действия

других фагов или естественных изменений в бактериальных популяциях [6].

Большая заслуга в получении целого ряда диагностических фаговых систем на модели холерного вибриона принадлежит отечественным и зарубежным ученым [2].

В лабораторной диагностике холерных вибрионов применялись бактериофаги холерный классический и Эль-Тор при определении биовара, бактериофаг холерный ctx^+ , ctx^- (оценка вирулентности) и бактериофаг дифференциально-диагностический ДДФ, производимые в ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора [7]. По данным ежегодного анализа свойств холерных вибрионов, выделяемых на территории Российской Федерации, чувствительность холерных вибрионов О1 к бактериофагам СТХ+ составляла в 2001–2005 гг. от 6,5 до 40,7%, в 2011 г. – 2,9%, а в 2012–2015 гг. равнялась 0%; СТХ- в 2001–2005 гг. составляла от 13,1 до 32,0%, в 2011 г. – 8,7%, в 2012 г. – 4,2%, в 2013–2014 гг. – 0%.

Чувствительность вибрионов к бактериофагу Эль-Тор в 2004–2009 гг. достигала 5%, в 2010 г. – 0%, в 2011 г. – 6,2%, в 2012 г. – 11,5%, в 2013 г. – 24,4%, в 2014 г. – 19,4%.

Поэтому в центре внимания специалистов Роспотребнадзора оказалась проблема совершенствования диагностического препарата холерного фага, эффективно лизирующего холерные штаммы при проведении идентификации патогенного микроба.

Цель нашей работы – провести изыскание новой расы холерных фагов, активной в отношении фагоустойчивых штаммов *Vibrio cholerae El Tor* к коммерческому препарату бактериофага диагностического Эль-Тор, для практического использования.

При отборе холерного фага для диагностики холеры важно учитывать:

- максимально высокую репродуктивную активность в отношении вибрионов Эль-Тор;
- специфичность литического действия;
- степень лизиса гомологичных бактерий, продолжительность культивирования, скорость размножения, посевные дозы бактерий и фагов.

При выявлении фагочувствительного холерного вибриона Эль-Тор необходимо унифицировать условия размножения и сохранения бактерии и фага. Критерием отбора фагов является лизис фагоустойчивых штаммов холерных вибрионов Эль-Тор, выделенных от людей и из внешней среды в различные годы (2001–2014 гг.).

Для изучения и сохранения биологического разнообра-

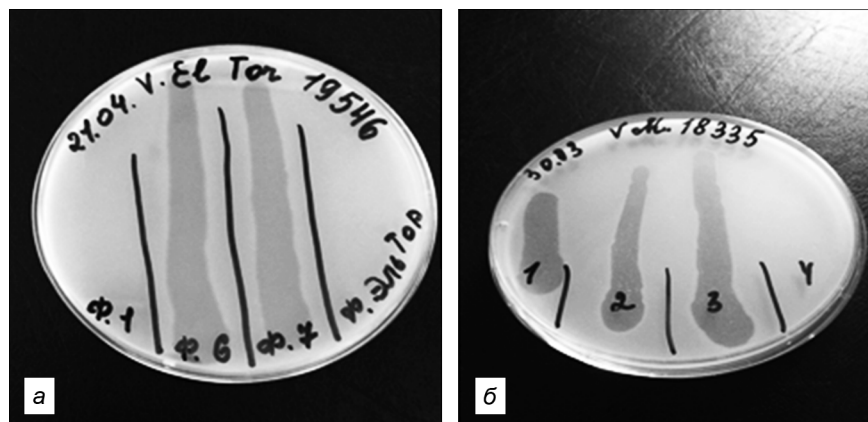


Рис. 4. Лизис штаммов *V. cholerae El Tor* холерными бактериофагами № 1, 6, 7 и фагом Эль-Тор.

a – штамм *V. cholerae El Tor* 19546 лизируется фагами № 6 и № 7, по дорожкам 1 и 4 лизис фагами № 1 и Эль-Тор отсутствует; *б* – лизис штамма *V. cholerae El Tor* 18335: дорожка 1 – фагом № 1, дорожка 2 – фагом № 6, дорожка 3 – фагом № 7, по дорожке 4 лизис фагом Эль-Тор отсутствует.

Литическая активность фагов *V. cholerae El Tor* № 1, 6, 7

Вид микроба	Изучено штаммов, всего	Генетическая характеристика штаммов	Число штаммов данного генотипа	Лизис фагами		
				№ 1, № 6, № 7	фаг Эль-Тор	
<i>V. cholerae El Tor</i>	131	ctx ⁺ tcp ⁺	7	+	-	
		ctx ⁺ tcp ⁻	64	+	-	
		ctx ⁻ tcp ⁺	3	+	-	
		ctx ⁺ tcp ⁺				
		ctx ⁻ tcp ⁻	20	-	-	
		ctx ⁺ tcp ⁺				
		ctx ⁻ tcp ⁻	37	+	+	

Примечание. +/- – наличие или отсутствие признака.

зия бактериофагов, а также для выполнения научных исследований по проблеме «Холера и патогенные вибрионы» в Ростовском-на-Дону противочумном институте собрана коллекция штаммов и холерных фагов разного происхождения, входящая в список генетических и биологических коллекций РФ (www.sevin.ru), свойства которых исследованы современными методами.

В работе использован 131 музейный устойчивый к диагностическим холерным фагам штамм *Vibrio cholerae El Tor*, выделенный в 2001–2014 гг. из различных источников. 25 холерных фагов изучены по чувствительности к отобранному штаммам. Все изученные штаммы различались генетическими свойствами: ctx⁺tcp⁺, ctx⁺tcp⁻, ctx⁻tcp⁺. Изучение свойств фагов проводили общепринятыми методами [8]. Питательные среды для экспериментов включали бульон и 0,7, 1,5% агар Мартена pH 7,6–7,8.

В процессе изучения было установлено, что 37 штаммов из 131 приобрели чувствительность к фагу Эль-Тор в процессе хранения.

Из исследованных фагов наиболее перспективными для конструирования фагового препарата признаны № 1, 6 и 7, спектр литической активности которых составлял 44, 53 и 56% соответственно (рис. 4). Из числа взятых штаммов 20 культур (15%) сохранили устойчивость ко всем фагам. Предлагаемые бактериофаги имеют различный спектр литической активности в отношении холерных вибрионов Эль-Тор (см. таблицу).

Одними из важных моментов в технологии изготовления диагностических препаратов являются используемые при этом тест-штаммы. До настоящего времени для производства диагностических фагов использовался токсигенный индикаторный штамм *Vibrio cholerae El Tor* 75. Для размножения и контроля холерного диагностического бактериофага было необходимо найти новый авирулентный тест-штамм, в связи с чем была использована нетоксигенная культура *Vibrio cholerae El Tor* 19546.

Таким образом, анализ полученных результатов показал, что изученные холерные фаги, обладающие высокой литической активностью, могут быть использованы для диагностики фагоустойчивых штаммов холерных вибрионов. Актуальность использования метода фаговой диагностики обу-

словлена тем, что он не требует применения дорогостоящей аппаратуры и крупных материальных затрат. Его отличают техническая простота, доступность и возможность получить ответ в кратчайший срок (12–18 ч).

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 3–4 см. REFERENCES)

1. Кудрякова Т.А., Македонова 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 г. Ростова-на-Дону в ходе мониторинга с 2008 по 2012 гг. В кн.: *Холера и патогенные для человека вибрионы*. Ростов-на-Дону; 2013; 26: 168–72.
2. Ломов Ю.М., Сомова А.Г., Кудрякова Т.А. *Холерные фаги*. Ростов-на-Дону; 1990.
5. Овчинникова М.М., 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*. Ростов-на-Дону; 2010; 23: 62–6.
6. Каттер Э., Сулаквелидзе А. *Бактериофаги: биология и практическое применение*. Перевод с английского. М.: Научный мир; 2012.
7. Онищенко Г.Г., Кутырев В.В., ред. *Лабораторная диагностика опасных инфекционных болезней*. М.: ЗАО «Шико»; 2013.
8. Адамс М. *Бактериофаги*. Перевод с английского. М.; 1961.

REFERENCES

1. 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 Vibrios [Kholera i patogennyye dlya cheloveka vibriony]*. Rostov-na-Donu; 2013; 26: 168–72. (in Russian)
2. Lomov Yu.M., Somova A.G., Kudryakova T.A. *Cholera Phage [Kholernyye fagi]*. Rostov-na-Donu; 1990. (in Russian)
3. Labrie S.J., Samson J., Moineau S. Bacteriophage resistance mechanisms. *Nat. Rev. Microbiol.* 2010; 8 (5): 317–27.
4. Tock M.R., Dryden D.T. The biology of restriction and anti-restriction. *Curr. Opin. Microbiol.* 2005; 8 (4): 466–72.
5. Ovchinnikova M.M., Alenkina T.V., Korovkina G.I., Gracheva I.V. The study of some of the causes of resistance fi epidemic of dangerous strains of *V. cholerae eltor* to bacteriophage diagnostic cholera ctx⁻. In: *Cholera and Human Pathogenic Vibrios [Kholera i patogennyye dlya cheloveka vibriony]*. Rostov-na-Donu; 2010; 23: 62–6. (in Russian)
6. Kutter E., Sulakvelidze A., eds. *Bacteriophages: Biology and Applications*. 1st ed. Boca Raton: CRC Press; 2005.
7. Onishchenko G.G., Kutuyrev V.V., eds. *Laboratory Diagnosis of Infectious Diseases [Laboratornaya diagnostika opasnykh infektsionnykh bolezney]*. Moscow; ЗАО «Шико»; 2013. (in Russian)
8. Adams M.H. *Bacteriophages*. New York: Interscience Publishers, Inc.; 1959.

Поступила 30.03.16

Принята к печати 15.04.16