

УДК: 579.843Vibrionaceae-093/098

БИОЛОГИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ БАКТЕРИОФАГОВ ХОЛЕРНЫХ И ПАРАГЕМОЛИТИЧЕСКИХ ВИБРИОНОВ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ ПРИ ИХ ДИФФЕРЕНЦИАЦИИ

Н.Е. Гаевская, Т.А. Кудрякова, Л.Д. Македонова, Г.В. Качкина
ФКУЗ Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора, г. Ростов-на-Дону

Определены основные признаки дифференциации бактериофагов холерных и параземолитических вибрионов, что повышает возможность определения видовой принадлежности фагов и может быть использовано в научно-исследовательских целях и при решении прикладных задач по совершенствованию лабораторной диагностики. Создана общая идентификационная схема, по которой осуществляется дифференциация бактериофагов холерных и параземолитических вибрионов.

Ключевые слова: бактериофаги, холерные и параземолитические вибрионы, биологические показатели, дифференциация.

BIOLOGICAL INDICATORS OF CHOLERA AND PARAHEMOLYTIC VIBRIO BACTERIOPHAGES USED IN ITS DIFFERENTIATION

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

Rostov-on-Don Research Anti-Plague Institute of Rospotrebnadzor, Rostov-on-Don

The basic features of bacteriophage differentiation in cholera and parahemolytic vibrios are defined. It raises a possibility for detection of species belonging of the phages. These signs can be used in the research purposes and for solving of the applied problems to improve the laboratory diagnostics. The general identification scheme is created for the bacteriophage differentiation in cholera and parahemolytic vibrios.

Key words: bacteriophage, cholera and parahemolytic vibrios, biological indicators, differentiation.

Мир бактериофагов патогенных вибрионов сложен, изучен недостаточно и требует систематизации сведений о них. Важность проблемы заключается в выявлении общих закономерностей строения биологических структур, которые затем используются для их определения и классификации [5].

Изучение бактериофагов патогенных вибрионов проводилось параллельно с изучением самих микроорганизмов и послужило основой для их типирования, а также обеспечивало возможность проведения более быстрой идентификации и дифференциации выделяемых штаммов микроорганизмов [2, 4, 7]. Точности лабораторной диагностики холеры и пищевых токсикоинфекций, вызванных параземолитическими вибрионами, способствует совершенствование идентификации и дифференциации бактериофагов с последующим их применением для внутривидовой дифференциации холерных и параземолитических вибрионов, что дополняет имеющиеся данные литературы по биологической характеристике бактериофагов [3, 6].

Вместе с тем, для проведения научных исследований и решения практических задач важно выбрать свойства бактериофагов, позволяющие устанавливать сходство и различия между ними [3, 4]. Проблема идентификации и дифференциации большой группы бактериофагов, патогенных для человека вибрионов, до настоящего времени остается не решенной.

Цель работы – определение основных биологических показателей бактериофагов холерных и параземолитических вибрионов, используемых при их дифференциации.

В работе применяли фаги *Vibrio cholerae classical* – 16, *V. cholerae El Tor* – 32, *V. cholerae* O139 – 8, *V. parahaemolyticus* – 19. Размножение холерных фагов осуществляли на индикаторных культурах *V. cholerae classical* 145 (*ctx⁺ tcp⁺*), *V. cholerae El Tor* 75M (*ctx⁺ tcp⁺*), КМ-199 (P-13169) (*ctx⁺ tcp⁺*), *V. cholerae* O139 серогруппы – КМ-152 (P-16373) (*ctx⁺ tcp⁺*). Размножение бактериофагов галофильных вибрионов проводили на индикаторных штаммах *V. parahaemolyticus* КМ-97 и КМ-184. Специфичность бактериофагов испытывали на 133 штаммах бактерий близкородственных родов и семейств (*Vibrionaceae*, *Pseudomonadaceae*, *Enterobacteriaceae*). Антифаговые сыворотки получали путем внутривенной иммунизации кроликов по методу Ю.Н. Марьиной [8] соответствующими фагами: холерными бактериофагами I – XII серогрупп и параземолитическими бактериофагами I – XI серогрупп (№ 23, 67,

109, 227, 536, 616, 824). В работе использовали 0,7 %, 1,5 % агар и бульон Мартена, pH 7,6-7,8, и те же среды, но с добавлением 1,5 % или 3 % NaCl для работы с галофильными вибрионами. Обнаружение бактериофага и изучение биологических свойств осуществляли общепринятыми методами [1].

Результаты и обсуждение

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

Многолетние наблюдения за серологическими свойствами исследованных бактериофагов подтвердили стабильность их антигенной структуры – наиболее важного признака при типизации. Установлен факт сходства антигенного строения у фагов, выделенных из штаммов холерных вибрионов O1 и O139 серогрупп (фаги II серотипа). Бактериофаги *V. parahaemolyticus* не имели перекрестных реакций с антисыворотками к фагам *V. cholerae*. Холерные фаги представлены 12 серотипами, у *V. parahaemolyticus* – 11. Наиболее значительные различия у фагов патогенных вибрионов были подтверждены при определении серологической специфичности. В разнородной группе фагов на основании оригинальных антигенных свойств выделены самостоятельные группы, состоящие и не состоящие в генетическом родстве. Строение холерных фагов II, XI, XII серотипов подтвердило родство фагов внутри каждого из них. К V морфогруппе были отнесены холерные фаги II серотипа, к III – XI серотипа, к I – фаги XII серотипа.

Специфичность фагов соответствовала таксономическим группам, они не лизировали представителей микроорганизмов семейств Vibrionaceae, Pseudomonadaceae, Enterobacteriaceae.

В процессе исследования литической активности фагов были подобраны индикаторные штаммы к определенным морфогруппам фагов. На этой основе осуществлен способ дифференциации холерных фагов I и V морфогрупп [9] (штаммы *V. El Tor* KM-199 и *V. cholerae* O139 KM-152), фагов *V. parahaemolyticus* I, III, IV, V морфогрупп [5] (штаммы KM-184 и KM-97). Как правило, различия между фагами I и III-V морфогрупп подтверждались и другими тестами.

Из дополнительных методов для дифференциации фагов I морфогруппы от остальных (III-V) использовали действие инактивирующих агентов – хлороформа и повышенной температуры (65-70 °C).

Величина и морфология негативных колоний изученных фагов *V. cholerae classical*, *V. cholerae El Tor*, *V. cholerae* O139 серогруппы, *V. parahaemolyticus* были разнообразными, так как имели негативные колонии округлой формы, мутные или прозрачные, диаметром 0,3-2 мм. Данные одиночного цикла развития вышеперечисленных фагов не давали каких-либо значительных отличий. В отношении исследуемых фагов к действию мочевины и цитрата натрия различий обнаружено не было.

При сравнительном изучении бактериофагов патогенных вибрионов учитывали следующие признаки их сходства и отличия (табл. 1).

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

Заключение

Таким образом, для исследовательских целей и решения прикладных задач определены основные признаки для 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» (Свидетельство №2010620549). Отмеченные четкие таксономические показатели, полученные при сравнительном изучении бактериофагов патогенных вибрионов, легли в разработанную нами схему идентификации и дифференциации.

Таблица 1.

Идентификация и дифференциация бактериофагов холерных и парегемолитических вибрионов

Вид бактериофага	Идентификация						Дифференциация			
	индикаторные штаммы						морфогруппа	серотип	чувствительность групп фагов	
	<i>V. cholerae</i> <i>El Tor</i> 75M	<i>V. cholerae</i> <i>El Tor</i> KM-199	<i>V. cholerae</i> O139 KM-152	<i>V. cholerae</i> <i>classical</i> 145	<i>V. parahaemolyticus</i>				хлороформ	температура 70 °C
<i>V. cholerae</i> O1	+	+	+	+	-	-	I	XII	+	-
	+	+	-	+	-	-	II-V	I-XI	-	+
<i>V. cholerae</i> O139	+	+	+	+	-	-	I	XII	+	-
	+	+	-	+	-	-	V	II	-	+
<i>V. parahae-molyticus</i>	-	-	-	-	+	-	I	I	+	-
	-	-	-	-	+	+	III, IV, V	II-XI	-	+

Примечание: «+» – наличие признака, «-» – отсутствие признака

Литература

1. Адамс М. Бактериофаги. – М., 1961 – 522 с.
2. Гаевская Н.Е. Биологические свойства и диагностическое применение холерных и паразитических бактериофагов // Современные технологии обеспечения биол. безопасности: Матер. науч.-практич. школы-конф. молод. ученых и специалистов науч.-исслед. организаций Роспотребнадзора. – Оболensk, 2011 – С.169-172.
3. Гаевская Н.Е., Кудрякова Т.А., Македонова Л.Д., Качкина Г.В. Комплекс биологических признаков для идентификации и дифференциации бактериофагов патогенных для человека вибрионов // Актуальные проблемы болезней общих для человека и животных. – Ставрополь, 2012. – С. 118-119.
4. Гаевская Н.Е., Кудрякова Т.А., Македонова Л.Д., Качкина Г.В. Применение фагов паразитических вибрионов в лабораторной диагностике заболеваний, вызванных галофильными вибрионами // Матер. IV Ежегодного Всерос. Конгресса по инфекционным болезням. – Москва, 2012. – Т. 10, Прил № 1. – С. 92.
5. Кудрякова Т.А. Лизогения холерных и паразитических вибрионов и её практическое значение: Автореф. дис.... д-ра мед. наук. – Ростов-на-Дону, 1996. – 42 с.
6. Кудрякова Т.А., Ломов Ю.М., Гаевская Н.Е. и др. Бактериофаги патогенных вибрионов: идентификация и дифференциация // Холера и патогенные для человека вибрионы: Матер. пробл. комиссии. – Ростов-на-Дону, 2004. – Вып.17. – С.73-75.
7. Либинзон А.Е., Ус З.И., Гальцева Г.В. и др. Фаги галофильных вибрионов // Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. – 1995. – № 1. – С. 15-18.
8. Марьина Ю.Н. Получение антифаговой сыворотки и изучение антигенной структуры фага // Тр. Ростовского противочум. ин-та. – 1941. – Т. 2. – С.3-7.
9. Тихоненко А.С. Ультраструктура вирусов бактерий.– М., 1968. – 90 с.

Ответственный автор:

Гаевская Наталья Евгеньевна – старший научный сотрудник ФКУЗ Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора
Тел.: (3952) 22-13-12. E-mail: confirk2014@mail.ru

УДК: 615.371:[579.842.23Yersinia+579.841.95Francisella]-07

МЕТОДИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ПРИМЕНЕНИЯ КОЛИЧЕСТВЕННЫХ МОРФОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ ПРИ ДОКЛИНИЧЕСКОЙ ОЦЕНКЕ ВАКЦИН ПРОТИВ ЧУМЫ И ТУЛЯРЕМИИ

С.А. Бугоркова

ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт
«Микроб» Роспотребнадзора», Саратов

Для повышения объективности и информативности доклинического этапа оценки вакцин против чумы и туляремии дополнительно введен сравнительный морфометрический анализ состояния функциональных систем организма с определением ряда параметров, характеризующих адаптационно-компенсаторные процессы у биомоделей.

Ключевые слова: вакцины, чума, туляремия, морфометрия.

**METHODOLOGICAL ASPECTS OF APPLICATIONS OF QUANTITATIVE MORPHOLOGICAL
STUDIES IN PRECLINICAL EVALUATION OF PLAGUE AND TULAREMIA VACCINES**

S.A. Bugorkova

Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe" of Rospotrebnadzor, Saratov

Comparative morphometric analysis of the functional systems with the definition of a number of pa-