



(51) МПК

C12Q 1/04 (2006.01)*C12R* 1/63 (2006.01)*C12R* 1/92 (2006.01)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,
ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21), (22) Заявка: 2004121536/13, 13.07.2004

(24) Дата начала действия патента: 13.07.2004

(45) Опубликовано: 27.01.2006 Бюл. № 03

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: SU 1767879 A1, 30.01.1994. SU 1373729 A1, 15.02.1988. SU 550850 A1, 25.09.1977. SU 1388423 A1, 15.04.1988.

Адрес для переписки:

344002, г.Ростов-на-Дону, ул. М. Горького,
117, Ростовский-на-Дону государственный
научно-исследовательский противочумный
институт

(72) Автор(ы):

Кудрякова Татьяна Александровна (RU),
Гаевская Наталья Евгеньевна (RU),
Македонова Людмила Дмитриевна (RU),
Качкина Галина Витальевна (RU)

(73) Патентообладатель(ли):

Ростовский-на-Дону государственный научно-
исследовательский противочумный институт
(RU)

(54) СПОСОБ ВНУТРИВИДОВОЙ ДИФФЕРЕНЦИАЦИИ *Vibrio cholerae* O139

(57) Реферат:

Изобретение относится к медицинской микробиологии и может быть использовано в лабораторной диагностике холеры. Сущность изобретения заключается в том, что в качестве тест-штаммов используют фагочувствительные штаммы *Vibrio cholerae* eltor KM-199 и *Vibrio cholerae* O139 KM-152, а дифференциацию проводят в два этапа, по первому этапу в качестве индикаторного штамма используют *Vibrio cholerae* eltor KM-199, инкубируют его с исследуемой культурой в течение 20-24 часов. Затем полученную смесь микроорганизмов при температуре 55-57°C прогревают 40-60 минут и высевают на газоны индикаторного штамма *Vibrio*

cholerae eltor KM-199, который предварительно засевают в слое 0,7% агара на пластинку 1,5% агара Мартена. Через сутки выращивания при 37°C проводят регистрацию фаголизиса, при этом второй этап дифференциации осуществляют, используя фаг, полученный из лизогенного штамма испытуемой культуры путем его нанесения на индикаторный штамм *Vibrio cholerae* O139 KM-152, с помощью которого выявляют только филаментозные фаги, проводя прямое фаготипирование. Использование способа позволяет с высокой точностью проводить фаготипирование с получением дополнительных характеристик холерных вибрионов, выделяемых из клинического материала. 1 табл.



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY,
PATENTS AND TRADEMARKS

(51) Int. Cl.

C12Q 1/04 (2006.01)*C12R 1/63* (2006.01)*C12R 1/92* (2006.01)(12) **ABSTRACT OF INVENTION**(21), (22) Application: **2004121536/13, 13.07.2004**(24) Effective date for property rights: **13.07.2004**(45) Date of publication: **27.01.2006 Bull. 03**

Mail address:

**344002, g.Rostov-na-Donu, ul. M. Gor'kogo,
117, Rostovskij-na-Donu gosudarstvennyj
nauchno-issledovatel'skij protivochumnyj institut**

(72) Inventor(s):

**Kudrjakova Tat'jana Aleksandrovna (RU),
Gaevskaja Natal'ja Evgen'evna (RU),
Makedonova Ljudmila Dmitrievna (RU),
Kachkina Galina Vital'evna (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Rostovskij-na-Donu gosudarstvennyj nauchno-
issledovatel'skij protivochumnyj institut (RU)**

(54) **METHOD FOR INTRASPECIES DIFFERENTIATION OF *Vibrio cholerae* O139**

(57) Abstract:

FIELD: virology, medicinal microbiology.

SUBSTANCE: method involves using phage-sensitive strains of *Vibrio cholerae* eltor KM-199 and *Vibrio cholerae* O139 KM-152 as test-strains, and differentiation is carried out for two steps. At the first step *Vibrio cholerae* eltor KM-199 is used as the strain-indicator and this strain is incubated with analyzed culture for 20-24 h. Then prepared mixture of microorganisms is heated at temperature 55-57°C for 40-60 min and inoculated on lawn with the strain-indicator *Vibrio cholerae* eltor KM-199 that is inoculated preliminary in layer 0.7% of agar on plate with 1.5% Marten's agar. After culturing for 24 h at 37°C

phagolysis is recorded. The second differentiation step is carried out by using phage obtained from lysogenic strain of analyzed culture by its applying on the strain-indicator *Vibrio cholerae* O139 KM-152 that is used for detection of filamentous phages only by carrying out the direct phagotyping. Using the proposed method allows carrying out phagotyping with high precision and obtaining additional indices of choleraic vibrios isolating from clinical material. Invention can be used in laboratory diagnosis of cholera.

EFFECT: improved and valuable method for differentiation.

1 tbl, 2 ex

Предлагаемое изобретение относится к медицинской микробиологии и может быть использовано в лабораторной диагностике холеры.

Особенностью штаммов *Vibrio cholerae* O139 «Бенгал», поступивших в Ростовский НИПЧИ из различных стран (Индия, Япония, Франция, Киргизия), и других выделенных в России явилось наличие лизогении. Обнаружение специфической метки в виде лизогенности по фагам различных морфогрупп и серологических типов было важно для идентификации токсигенных вибрионов O139 серогруппы. Холерные диагностические бактериофаги, используемые для индикации возбудителя холеры, а также специальные методы дифференциации холерных вибрионов по некоторым признакам оказались непригодными для *Vibrio cholerae* O139 в связи с фагорезистентностью последних. В связи с этим и возникла проблема разработки посредством фаговых методов, а именно профаготипированием и лизисом специфическим фагом, внутривидовой дифференциации штаммов *Vibrio cholerae* O139.

Известен способ фаготипирования *Vibrio cholerae* O139 (см. Индия, Чакрабати и др., журнал *J. Clin Microbiol*, 2000, Jan. 38 (1): 44-9), заключающийся в том, что посредством пяти фагов, выделенных в эпидемию, 500: штаммов холерных вибрионов O139 серогруппы распределили на 10 фаготипов.

Однако несмотря на то, что предложенный метод дает возможность дифференцировать штаммы нового серотипа, использовать его в России не представляется возможным, так как в нашей стране диагностические и типизирующие фаги для холерных вибрионов O139 серогруппы отсутствуют.

За прототип выбран способ дифференциации эпидемических и неэпидемических вибрионов вида *Vibrio eltor* по типу иммунитета их умеренных фагов (см. RU пат. №1767879, кл. С 12 Q 1/04, 1994 г. (01.30), в котором применяют в качестве тест-системы две индикаторные культуры *Vibrio eltor* 570/КМ-114/ и 570/222 Н/КМ-117/, при этом штамм КМ-114 чувствителен к холерным умеренным фагам всех известных иммунотипов, а его субкультура штамм КМ-117 обладает устойчивостью к литическому действию фагов III иммунотипа, при этом выявляя посредством данной тест-системы штаммы *V. eltor*, несущие фаги III иммунотипа V морфогруппы, последние расцениваются как подозрительные на принадлежность к эпидемическим.

Недостатком известного способа дифференциации является то, что с его помощью невозможно осуществлять внутривидовую дифференциацию холерных вибрионов O139 серогруппы, которые содержат различные по морфологии и антигенным свойствам испытуемые на лизис фаги, так как у штаммов новой серогруппы встречается носительство фагов двух морфогрупп I и V, либо только I, либо только V. Это обстоятельство подтверждает недостаточную точность известного способа.

Задача предлагаемого изобретения состояла в разработке способа внутривидовой дифференциации *V. cholerae* O139, позволяющего с высокой точностью проводить разграничение штаммов по маркерному фаговому признаку.

Поставленная задача достигается тем, что в известном способе внутривидовой дифференциации *V. cholerae* O139, включающем совместное инкубирование испытываемой культуры с индикаторным тест-штаммом с последующим фаготипированием, в качестве тест-штаммов используют фагочувствительные штаммы *V. cholerae eltor* КМ-199 и *V. cholerae* O139 КМ-152, а дифференциацию проводят в два этапа, по первому этапу в качестве индикаторного штамма используют *V. cholerae eltor* КМ-199, инкубируют его с исследуемой культурой в течение 20-24 часов, затем полученную смесь микроорганизмов при температуре 55-57°C прогревают 40-60 минут и высевают на газоны индикаторного штамма *V. cholerae eltor* КМ-199, который предварительно засевают в слое 0,7% агара на пластинку 1,5% агара Мартена, причем через сутки выращивания при 37°C проводят регистрацию фаголизиса, при этом второй этап дифференциации осуществляют, используя фаг, полученный из лизогенного штамма испытываемой культуры путем его нанесения на индикаторный штамм *V. cholerae* O139 КМ-152, с помощью которого выявляют только филаментозные фаги, проводя прямое фаготипирование.

Для осуществления способа используют два штамма холерных вибрионов в качестве тест-системы *V. cholerae* eltor и *V. cholerae* SG-36 (O139 серогруппа). Штамм *V. cholerae* eltor (P-13169) депонирован под номером KM-199 в ГКПБНИПЧИ «Микроб», г. Саратов и характеризуется следующими признаками.

5 Культурально-морфологические признаки.

Подвижные, слегка изогнутые палочки длиной 1,2-2,7 мкм, диаметр 0,2-0,4 мкм с одним полярно расположенным жгутиком. Спор и капсул не образует. Грамотрицательны.

На плотных средах - агар Мартена и агар Хоттингера, pH 7,6±0,2 - образует полупрозрачные колонии с голубоватым оттенком, 1,5±0,5 мм в диаметре.

10 В жидких средах - бульон Мартена и бульон Хоттингера, 1%-ная пептонная вода, pH 7,8 ±0,2 образует равномерную муть, тонкую пленку на поверхности среды.

Биохимические свойства.

Разлагает до кислоты без газа маннозу, сахарозу, глюкозу, манит, не расщепляет арабинозу, окисляет глюкозу в среде Хью-Лейфсона в аэробных и анаэробных условиях (на 15 4-е сутки), декарбоксилирует лизин, не расщепляет аргинин, не образует сероводород. Штамм устойчив к 30 мкг/мл полимиксина.

Серологические свойства.

Отношение к гомо-гетерологичным фагам: штамм лизируется диагностическими фагами эльтор, ctx⁺, ctx⁻, фагом холерным классическим «С» не лизируется. Отношение штамма к 20 видовым диагностическим сывороткам: штамм агглютинируется O-холерной сывороткой и сывороткой Огава, но не агглютинируется сыворотками Инаба, RO.

Штамм *V. cholerae* SG-36 (O139 серогруппа) депонирован под номером KM-152 и характеризуется следующими признаками.

25 Культурально-морфологические признаки.

В мазках из агаровых и бульонных культур, окрашенных по Граму, клетки имеют вид грамотрицательных, полиморфных, слегка изогнутых и прямых палочек. Подвижны, при выращивании в 0,3% щелочном агаре наблюдается помутнение столбика агара. При просмотре в электронном микроскопе - монотрихи.

30 Рост на твердых питательных средах на щелочном агаре (pH 7,6-7,8), вибрионы образуют через 18 часов роста при 37°C колонии правильной формы, диаметром 1,5-2 мм, с влажной блестящей поверхностью, полупрозрачные в проходящем свете.

Рост на жидких питательных средах: на щелочном бульоне - помутнение с нежной пленкой.

35 Биохимическая активность штамма: штамм разлагает глюкозу в аэробных и анаэробных условиях, маннозу, сахарозу, глюкозу, маннит, крахмал с образованием кислоты без газа, не продуцирует ацетилметилкарбинол, индол, декарбоксилирует лизин, не расщепляет аргинин, арабинозу, не образует сероводород. Штамм устойчив к 30 мкг/мл полимиксина.

40 Отношение к гомо-гетерологичным фагам: штамм не лизируется диагностическими фагами: холерными классическим эльтор, ТЭПВ 1-7, лизируется фагом I морфогруппы 16488, выделенным из *V. cholerae* O139-16488. Отношение штамма к видовым диагностическим сывороткам: штамм агглютинируется сывороткой O139 серогруппы, произведенной в РПЧИ; не агглютинируется O-холерной сывороткой и 45 типоспецифическими сыворотками Инаба, Огава, RO. Штамм O139 серогруппы вирулентен для кроликов-сосунков в дозе 10⁷ м.к.

Генетические особенности штамма: лизогенный, ctx⁺, tcr⁻. Штамм не способен расщеплять синтетический субстрат для нейраминидазы 2-(4-метилумбеллиферил)-N-ацетил-L-D-нейраминовою кислоту.

50 Продукт, синтезируемый штаммом: продуцент умеренного фага, серологически родственного фагам холерных вибрионов эльтор, II серотипа, III иммунной категории.

Активность (продуктивность) штамма: продуцирует умеренный фаг в титре 10⁷/мл.

Пример 1.

Готовят взвесь из клеточной суспензии фагочувствительного индикаторного штамма *Vibrio cholerae* eltor KM-199 и исследуемого штамма *Vibrio cholerae* O139 (P-16488), для этого по 1 петле суточных агаровых культур вносят в одну пробирку с 2 мл бульона Мартена (рН 7,6-7,8), проводят инкубирование в течение 20 часов при температуре 37°C.

5 Затем смесь прогревают до температуры 55-57°C в течение часа и наносят каплю взвеси на газон штамма *Vibrio eltor* KM-199, предварительно засеянного в слое 0,7% агара на пластинку 1,5% агара Мартена.

Учет проводят через 24 часа выращивания при 37°C, при этом в месте нанесения капли образуется зона просветления газона. В результате исследуемый штамм *V. cholerae* O139 (P-16488) является лизогенным и выделяет фаг.

10 Тест-штамм *V. cholerae* eltor KM-199 (P-13169) является универсально чувствительным по всем типам фагов O139, позволяя таким образом осуществлять дифференциацию штаммов *V. cholerae* O139 по их лизогенности и нелизогенности (см. таблицу).

15 Следующим (вторым этапом) способом является использование индикаторного штамма *V. cholerae* KM-152 (P-16373) для фагов *V. cholerae* O139 I морфогруппы. Для этого 0,5-1 мл 4 часовой бульонной культуры штамма KM-152 вносят в 4 мл 0,7% агара Мартена и выливают на агаровую пластинку, затем на газон культуры наносят в виде «дорожки» каплю фага, выделенного из *V. cholerae* O139 (P-16488) ФБ. На газоне штамма KM-152 фаг БФ формирует мутные зоны лизиса. Штамм KM-152 позволяет выявлять только

20 филаментозные фаги, к которым штамм KM-152 чувствителен и обладает устойчивостью к другим умеренным фагам III иммунотипа, имеющим головку и отросток. Кроме того, в результате экспериментов было выявлено, что фаги I морфогруппы *V. cholerae* O139 отличаются от фагов V морфогруппы высокой чувствительностью к хлороформу. В результате воздействия на фаги хлороформом 1:10 фаги I морфогруппы

25 погибали, а фаги V морфогруппы оставались жизнеспособными. В связи с этим для инактивации клеток смешанной культуры (индикаторный штамм с лизогенной культурой) при выделении фага используют прогревание при температуре 55-57°C в течение 40-60 минут, при этом фаги I и V морфогруппы сохраняются жизнеспособными.

30 Пример 2. Выполняют, как описано в примере 1, используя смесь *V. cholerae* eltor KM-199 и *V. cholerae* O139 (P-17625). Смесь прогревают при температуре 56°C в течение 40 минут, а затем наносят каплю взвеси в виде «дорожки» на газон штамма *V. eltor* KM-199, предварительно засеянного в слое 0,7% агара на пластинку 1,5% агара Мартена. Учет

35 проводят через 24 часа выращивания при 37°C, при этом в месте нанесения капли не образуется зона лизиса культуры. Следовательно, исследуемый штамм *V. cholerae* O139 (P-17625) нелизогенный и фаг не выделяет.

Предложенный способ внутривидовой дифференциации был разработан на основании изучения новых эпидемических штаммов токсигенных *V. cholerae* O139 серогруппы

40 специалистами Ростовского НИПЧИ. Было изучено 50 штаммов, из которых 25 $ctx^+ tcp^+$ штаммов выделены от больных холерой и 25 $ctx^- tcp^-$ культур изолированы из проб внешней среды (см. таблицу).

По известному способу штаммы были разделены на лизогенные (25 штаммов $ctx^+ tcp^+$)

45 и нелизогенные (25 штаммов $ctx^- tcp^-$). Фаг III иммунотипа содержали 6 штаммов. По предлагаемому способу фагопродукция на индикаторе KM-199 обнаружена у 25 $ctx^+ tcp^+$ штаммов, 25 $ctx^- tcp^-$ штаммы не содержали фаг в супернатанте. Фаг III иммунотипа выявлен у 6 штаммов, он не лизировал *V. cholerae* O139 KM-152. Вместе с тем фагопродукция отмечается у 19 штаммов на *V. cholerae* O139 KM-152, обеспечивая

50 дополнительно дифференциацию этой группы и повышая эффективность в 3 раза. Практическую ценность представляет выделение по предлагаемому способу фага из штамма *V. cholerae* O139-P16488, что обеспечивает получение диагностического препарата фага *V. cholerae* O139.

Фаг, выделенный на штамме KM-199, лизирует 13 штаммов $ctx^+ tcp^+$ *V. cholerae* O139, что улучшает лабораторную диагностику холерных вибрионов новой серогруппы.

В таблице представлены результаты повышения числа дифференцированных штаммов по предлагаемому способу.

5 Использование предлагаемого способа внутривидовой дифференциации *V. cholerae* O139 позволяет с помощью индикаторных штаммов KM-199 и KM-152 в определенной технологической последовательности с высокой точностью проводить фаготипирование, получая при этом дополнительные характеристики холерных вибрионов, выделяемых из клинического материала.

10 Кроме того, фагопродукция и чувствительность к фагу, выделенному из лизогенного штамма, позволяют провести прямое фаготипирование и дают чувствительный способ лабораторной диагностики *V. cholerae* O139 серогруппы, так как дифференцируются штаммы вибрионов между собой по маркерному фагу и упрощается первичная характеристика изучаемых штаммов по фаготипу, что значительно сокращает время
15 проведения экспресс-анализов и позволяет быстро устанавливать источники инфекции, территорию, регион ее распространения, проведение дифференциации очагов.

Таблица						
Кол-во изученных штаммов <i>V. cholerae</i> O139	Дифференциация холерных вибрионов O139 серогруппы					
	По предлагаемому способу				По известному способу	
	Фагопродукция KM-199	Иммунитет KM-152	Иммунитет KM-152	Лизис фагом из <i>V. cholerae</i> O139 (16488)	Фагопродукция KM-114	Иммунитет KM-117
25 $ctx^+ tcp^+$	25	19	6	13	25	6
25 $ctx^- tcp^-$	25	0	0	0	25	0

25

Формула изобретения

Способ внутривидовой дифференциации *Vibrio cholerae* O139, включающий совместное инкубирование испытуемой культуры с индикаторным тест-штаммом с последующим фаготипированием, отличающийся тем, что в качестве тест-штаммов используют фагочувствительные штаммы *Vibrio cholerae* eltor KM-199 и *Vibrio cholerae* O139 KM-152, а дифференциацию проводят в два этапа, по первому этапу в качестве индикаторного штамма используют *Vibrio cholerae* KM-199, инкубируют его с исследуемой культурой в течение 20-24 ч, затем полученную смесь микроорганизмов при температуре 55-57°C прогревают 40-60 мин и высевают на газоны индикаторного штамма *Vibrio cholerae* eltor KM-199, который предварительно засевают в слое 0,7% агара на пластинку 1,5% агара Мартена, причем через сутки выращивания при 37°C проводят регистрацию фаголизиса, при этом второй этап дифференциации осуществляют, используя фаг, полученный из лизогенного штамма испытуемой культуры путем его нанесения на индикаторный штамм *Vibrio cholerae* O139 KM-152, с помощью которого выявляют только филаментозные фаги, проводя прямое фаготипирование.

45

50