

*ივანე ჯავახიშვილის სახელობის თბილისის სახელმწიფო უნივერსიტეტი
ზუსტ და საბუნებისმეტყველო მეცნიერებათა ფაკულტეტი
მიმართულება: იმუნოლოგია, მიკრობიოლოგია*

თინათინ ელბაქიძე

**ადამიანის პათოგენი ქოლერას ჯგუფის ბაქტერიების და მათ მიმართ
სპეციფიკური ბაქტერიოფაგების გამოყოფა, დახასიათება და
მრავალფეროვნება**

დისერტაცია

ბიოლოგიის დოქტორის აკადემიური ხარისხის მოსაპოვებლად

სამეცნიერო ხელმძღვანელები: მარინე თედიაშვილი, ბიოლოგიის მეცნიერებათა
დოქტორი

ნინო გაჩეჩილაძე, ბიოლოგიის მეცნიერებათა
დოქტორი

თბილისი 2015

ანოტაცია

უკანასკნელ წლებში კლიმატის ცვლილებასთან დაკავშირებით დიდ ინტერესს იწვევს წყლის ავტოქტონური მიკროფლორის, განსაკუთრებით კი პათოგენური ვიბრიონების ეკოლოგიასა და ბიომრავალფეროვნებასთან დაკავშირებული საკითხები. *V. cholerae* და მისი მონათესავე სახეობა *V. mimicus*-ი ზღვის, მტკნარ და მცირემარილიან წყლიან გარემოში გავრცელებული ბაქტერიებია. *V. cholerae*-ს O1 და O139 სეროტიპებს აქვთ მკაფიოდ გამოხატული კლინიკური და ეპიდემიური მნიშვნელობა, იწვევენ რა სწრაფად გავრცელებად, პანდემიური პოტენციალის მქონე, საშიშ, ნაწლავურ დაავადებას-ქოლერას. საქართველოს თბილი, სუბტროპიკული კლიმატი ხელსაყრელ პირობას ქმნის პათოგენური ვიბრიონების გამრავლებისა და გავრცელებისათვის. პათოგენის დროული დეტექცია გარემოში, ძალზედ მნიშვნელოვანია მისი ეფექტური ზედამხედველობისათვის. ქოლერას ჯგუფის ვიბრიონების მიმართ სპეციფიკური ბაქტერიოფაგების ინტენსიური დახსიათება საშუალებას იძლევა უკეთ იყოს შეცნობილი მათი პოპულაციის სტრუქტურის ცვლილების და პათოგენურობის მექანიზმების საკითხები. წყლიან გარემოში არსებული ბაქტერიული ვირუსები ზემოქმედებენ წყლისმიერი ინფექციების ეთიოლოგიურ სტრუქტურაზე. ამდენად ფაგების პროფილი და რაოდენობრივი შემცველობა მნიშვნელოვან ინფორმაციას იძლევა პათოგენების შესახებ, ამ უკანასკნელთა არარსებობის შემთხვევაშიც კი.

წარმოდგენილი კვლევის ძირითადი მიზანი იყო საქართველოს სხვადასხვა წყლის რეზერვუარში ქოლერას ჯგუფის ვიბრიონების - *V. cholerae*-ს და *V. mimicus*-ის და მათ მიმართ აქტიური ბაქტერიოფაგების გამოვლენა, გამოყოფა და დახსიათება სხვადასხვა მიკრობიოლოგიური, მოლეკულური და იმუნოლოგიური მეთოდების გამოყენებით.

ჩატარებული კვლევისათვის შექმნილი იყო შტამების სამუშაო კოლექცია, რომელიც მოიცავდა *V. cholerae*-ს 846 და *V. mimicus*-ის 11 დახსიათებულ იზოლატს, მათ შორის *V. cholerae*-ს ეპიდემიური სეროტიპების შტამებს. კვლევის პროცესში გამოყოფილ იქნა *V. cholerae*-ს მიმართ სპეციფიკური 82 და *V. mimicus*-ის მიმართ სპეციფიკური 7 პირველადი ფაგური იზოლატი. მათი შემდგომი შესწავლის პროცესში შერჩეულ იქნა *V. cholerae*-ს მიმართ სპეციფიკური 24 და *V. mimicus*-ის მიმართ სპეციფიკური 7 ბაქტერიოფაგი. მოხდა ამ ბაქტერიოფაგების დეტალური დახსიათება და დაჯგუფება სხვადასხვა ბიოლოგიური თვისებების (ლიზისური სპექტრი, ვირიონის მორფოლოგია, მგრძობელობა ფიზიკო-ქიმიური ფაქტორების მიმართ) და გენეტიკური მახასიათებლების მიხედვით. დადგინდა ბაქტერიოფაგების მაღალი მრავალფეროვნება და მათი გამოყენების პოტენციალი პატრონი, პათოგენური ბაქტერიების გამოვლენისა და ბაქტერიული შტამების დიფერენცირების მიზნით, ასევე ქოლერის და მსგავსი გასტროენტერიტების პროფილაქტიკისა და თერაპიის მიზნით გამოყენებისათვის.

სადისერტაციო ნაშრომში წარმოდგენილი კვლევა განხორციელდა გიორგი ელიაგას სახ. ბაქტერიოფაგიის, მიკრობიოლოგიის და ვირუსოლოგიის ინსტიტუტის მიკრობული ეკოლოგიის ლაბორატორიაში, DTRA CBR GG-13 გრანტის ფარგლებში.

**Iv. Javakhishvili Tbilisi State University
Faculty of Exact and Natural Sciences
Department: Immunology, Microbiology**

Tinatin Elbakidze

**Isolation, Characterization and Diversity of Human Pathogenic Vibrios of
V. cholerae Group and Their Corresponding Bacteriophages**

**This Dissertation is submitted in accordance with the requirements for the degree of Doctor of
Philosophy in Biology**

**Research Directors: Marina Tediashvili, Ph.D
Nino Gachechiladze, Ph.D**

Tbilisi 2015

Abstract

In recent years, there has been a renewed interest in understanding of the ecology and biodiversity of water autochthonous flora and human pathogenic vibrios, in particular -*Vibrio cholerae* and related species-*V. mimicus*-naturally occurring bacteria in marine, fresh-, and brackish water environments, causing various forms of gastroenterites. *V. cholerae* O1 and O139 is an etiological agent of the most serious diarrheal disease -cholera that has the potential to appear in explosive outbreak, epidemic or even pandemics. Warm and subtropical climate of Georgia may provide a favorable condition for reproduction and distribution of pathogenic vibrios. Timely detection of *V. cholerae* in environmental sources is of a great importance for efficient surveillance and control of cholera. Intensive characterization of phages specific to *V. cholerae* and *V. mimicus* may provide a useful information on population structure of these clinically important bacteria and mechanisms of their pathogenicity. Abundance and profile of *V. cholerae*-specific bacteriophages in water environment may have prognostic or retrospective indication for cholera outbreaks.

The main goal of this study was to enumerate and characterize bacteriophages specific to *V. cholerae* and *V. mimicus*, naturally-occurring in Georgian water environment, by use of different microbiological, molecular and immunological methods.

For the study purpose a working strain collection, consisting of 846 strains of *V. cholerae*, including strains belonging to O1 and O139 serotypes, and 11 strains of *V. mimicus* strains was created. Eighty two phages specific to *V. cholerae* and 7 phages specific to *V. mimicus* were collected and preliminarily characterized. Among them 24 phages specific to *V. cholerae* and 7 *V. mimicus* -specific phages were further characterized by basic biological features (lytic spectrum, virion morphology, life cycle phases, sensitivity to physical and chemical factors etc.) and genetic peculiarities. Obvious diversity of studied phages specific to cholera group vibrios was revealed, as well as their potential for as phage indicators, and means for subtyping of host bacterial population and the infection control.

The presented work was conducted in the laboratory of Microbial Ecology of George Eliava Institute of Bacteriophages, microbiology and Virology, Tbilisi, Georgia, supported by DTRA CBR grant GG-13

შინაარსი

| | |
|---|----|
| თავფურცელი----- | 1 |
| ანოტაცია----- | 2 |
| შინაარსი----- | 4 |
| შესავალი----- | 6 |
| I. ლიტერატურული მიმოხილვა----- | 9 |
| 1.1. ქოლერას ჯგუფის ვიბრიონების ზოგადი დახასიათება ----- | 9 |
| 1.1.1. გვარის <i>Vibrio</i> ზოგადი დახასიათება----- | 9 |
| 1.1.2. ქოლერას ჯგუფის ვიბრიონების კლასიფიკაცია და ტქსონომია----- | 10 |
| 1.1.3. ისტორიული ცნობები <i>V. cholerae</i> -ზე----- | 11 |
| 1.1.4. <i>V. cholerae</i> -ს სეროტიპები, პათოგენობა და პათოგენობის ფაქტორები----- | 12 |
| 1.1.5. <i>V. cholerae</i> არა- O1----- | 14 |
| 1.1.6. <i>V. cholerae</i> –გავრცელება და ეკოლოგია----- | 14 |
| 1.1.7. დაავადება ქოლერა და წინასწარგანწყობა----- | 17 |
| 1.2. ბაქტერიოფაგები----- | 18 |
| 1.2.1. ბაქტერიოფაგების აღმოჩენა ----- | 18 |
| 1.2.2. ბაქტერიოფაგების კლასიფიკაცია ----- | 19 |
| 1.2.3. ბაქტერიოფაგების ძირითადი ტიპები----- | 22 |
| 1.2.4. ბაქტერიოფაგის განვითარების ძირითადი სტადიები----- | 23 |
| 1.2.4.1. ბაქტერიოფაგის აღსორბცია და დნმ-ის ექვეცია----- | 23 |
| 1.2.4.2. ბაქტერიოფაგის უჯრედშიდა განვითარება----- | 24 |
| 1.2.4.3. ბაქტერიოფაგის მოქმედებით გამოწვეული პატრონუჯრედის ლიზისი----- | 25 |
| 1.2.4.4. ვირულენტური ბაქტერიოფაგების სასიცოცხლო ციკლი ----- | 25 |
| 1.2.4.5. ზომიერი ბაქტერიოფაგების საციცოხლო ციკლი----- | 27 |
| 1.2.5. ბაქტერიოფაგების ბიოლოგიური თვისებები და გარემო ფაქტორების მიმართ რეზისტენტობა----- | 28 |
| 1.2.6. ბაქტერიოფაგების დახასიათებისა და იდენტიფიკაციის მეთოდები----- | 28 |
| 1.2.7. <i>Vibrio</i> -ს გვარის ბაქტერიების მიმართ სპეციფიკური ბაქტერიოფაგები----- | 30 |
| 1.2.8. ფაგოთერაპია და ისტორიული კონტექსტი----- | 30 |
| II. მასალები და მეთოდები----- | 34 |
| 2.1. კვლევაში გამოყენებული მასალები ----- | 34 |
| 2.2. კვლევაში გამოყენებული მეთოდები----- | 38 |
| 2.2.1. ღია წყალსატევებიდან აღებული წყლის სინჯების დამუშავება----- | 38 |
| 2.2.2. <i>Vibrio</i> -ს გვარის ბაქტერიების გამოყოფა----- | 38 |
| 2.2.3. ბაქტერიული შტამების ბიოლოგიური თვისებების შესწავლა----- | 39 |
| 2.2.4. ბაქტერიოფაგების გამოყოფა ----- | 44 |
| 2.2.5. ბაქტერიოფაგების ბიოლოგიური თვისებების შესწავლა ----- | 44 |
| 2.2.6. ბაქტერიოფაგების გამრავლება----- | 46 |
| 2.2.7. ფიზიკო-ქიმიური ფაქტორების ზემოქმედება ბაქტერიოფაგებზე ----- | 47 |

| | |
|---|-----|
| 2.2.8. ბაქტერიოფაგების გენეტიკური თვისებების შესწავლა----- | 48 |
| III კვლევის შედეგები----- | 49 |
| 3.1. ქოლერას ჯგუფის ვიბრიონების კოლექციის შექმნა----- | 49 |
| 3.2. ქოლერას ჯგუფის ვიბრიონების იზოლატების ბიოლოგიური თვისებების შესწავლა----- | 52 |
| 3.3. <i>V. cholerae</i> -ს ტოქსიგენური შტამების პირდაპირი გამოვლენა სხვადასხვა იმუნოლოგიური მეთოდით----- | 57 |
| 3.4. <i>V. cholerae</i> -ს და <i>V. mimicus</i> -ის მიმართ სპეციფიკური ბაქტერიოფაგების გამოყოფა და გავრცელება----- | 66 |
| 3.5. <i>V. cholerae</i> -ს და <i>V. mimicus</i> -ის მიმართ სპეციფიკური ბაქტერიოფაგების დახასიათება----- | 70 |
| 3.5.1. ბაქტერიოფაგების მორფოლოგიური პარამეტრები----- | 70 |
| 3.5.2. ფაგების ლიზისური აქტივობის სპექტრი ----- | 73 |
| 3.5.3. პატრონ-უჯრედთან ურთიერთქმედების ფაზები ----- | 76 |
| 3.5.4. ბაქტერიოფაგების სეროლოგიური თვისებების შესწავლა ანტიფაგური შრატის გამოყენებით----- | 76 |
| 3.5.5. <i>V. Cholerae</i> O1-ის მიმართ სპეციფიკური ბაქტერიოფაგების ზეგავლენა შტამების მიერ ქოლერის ტოქსინის პროდუქციაზე----- | 79 |
| 3.6. ფიზიკო-ქიმიური ფაქტორების ზეგავლენა ბაქტერიოფაგების სიცოცხლისუნარიანობაზე ----- | 80 |
| 3.7. ბაქტერიოფაგების გენეტიკური მახასიათებლები----- | 90 |
| IV შედეგების განხილვა----- | 94 |
| V დასკვნები----- | 101 |
| VI გამოყენებული ლიტერატურა----- | 102 |

შესავალი

სასმელი წყლის და სარეკრეაციო მიზნით გამოყენებული წყალსატევების მიკრობული დაბინძურება ერთ-ერთ მნიშვნელოვან პრობლემას წარმოადგენს, როგორც განვითარებადი, ასევე განვითარებული ქვეყნებისთვის და საზოგადოებრივი ჯანდაცვის მთავარ საკითხად განიხილება. დიარეული დაავადებების გამომწვევი სხვადასხვა ენტეროპათოგენები ავადობის და სიკვდილიანობის მნიშვნელოვან მიზეზად გვევლინებიან, განსაკუთრებით, მცირე ასაკის ბავშვებში. დაბინძურებულ წყალთან კონტაქტის შედეგი შეიძლება იყოს წყლისმიერი ინფექციების გავრცელება. რეკრეაციული მიზნით გამოყენებული წყლების მიკრობული ფლორა, შესაძლოა, მოიცავდეს ისეთ მიკრობულ პათოგენებს, როგორცაა: *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Vibrio* spp., *Escherichia coli*, *Clostridium* spp. და სხვა, ადამიანის ენტეროვირუსებს და უმარტივესებს [82,85,188]. ინფექციების გამომწვევი ავტოქტონური ორგანიზმების წყალში გამრავლების ერთ-ერთი განმაპირობებელი ფაქტორია გარემოს კლიმატური პირობები და ასევე ანთროპოგენური გავლენით გამოწვეული დაბინძურება.

თბილისის შემოგარენში არსებულ ტბებში და ზღვის სანაპირო ზოლში რეგულარული მონიტორინგის შედეგად დაგროვილი ინფორმაცია ენდემურ რეგიონებში გავრცელებული ენტეროპათოგენების შემცველობაზე, მათ ეპიდემიოლოგიურ და კლინიკურ მნიშვნელობაზე, გამოყენებული ანტიმიკრობული აგენტების მიმართ მგრძობელობაზე და სხვ. საშუალებას იძლევა დაიგეგმოს პრევენციული ზომები წყლისმიერი ინფექციური დაავადებების გავრცელების თავიდან ასაცილებლად.

უკანასკნელ წლებში კლიმატის ცვლილებასთან დაკავშირებით განსაკუთრებულ ინტერესს იწვევს ქოლერას ჯგუფის ვიბრიონების ეკოლოგიასა და ბიომრავალფეროვნებასთან დაკავშირებული საკითხები. ადამიანის პათოგენი არაჰალოფილური, ქოლერას ჯგუფის ვიბრიონები *V.cholerae* და *V. mimicus* ზღვის და მტკნარი წყლის ბუნებრივი ბინადარია, ხშირად ასოცირებული არიან ზღვის ორგანიზმებთან: თევზებთან, ზოოპლანქტონთან, მოლუსკებთან. *V. cholerae* O1-ის სეროტიპის “კლასიკური” და “El Tor” ბიოტიპები, ასევე შემდგომში აღმოჩენილი *V. cholerae* O139-ის [154] სეროტიპი მწვავე ინფექციური დაავადების-ქოლერას ეთიოლოგიური აგენტი. ქოლერა იწვევს წვრილი ნაწლავის დაზიანებას, დიარეას პირღებინებით, დეჰიდრატაციას, ოლიგურიას და კოლაფსს. ქოლერა ვრცელდება დაბინძურებული წყლით, ზღვის და სხვა საკვები პროდუქტებით. აშშ-ს CDC-ის კლასიფიკაციით *V. Cholerae* განსაკუთრებით საშიში პათოგენების მე-2 კატეგორიას განეკუთვნება რადგან აქვს პანდემიის განვითარების მაღალი პოტენციალი. სახეობა-*V. mimicus* ბიოქიმიური პარამეტრებით ახლოს დგას *V. cholerae*-სთან, თუმცა დიარეის შედარებით იოლი ფორმის გამომწვევია.

ქოლერა სერიოზულ პრობლემას წარმოადგენს ტროპიკული კლიმატის, ასევე ცუდი საყოფაცხოვრებო პირობებისა და ჰიგიენის მქონე განვითარებადი ქვეყნებისთვის. უკანასკნელ წლებში (2010-2014) *V. cholerae*-ს ეპიდემიური სეროტიპების მიერ გამოწვეული დაავადების ყველაზე დიდ აფეთქებას ადგილი ქონდა ჰაიტიზე, კონგოს დემოკრატიულ რესპუბლიკაში, სიერა ლეონეში, მექსიკასა და სამხრეთ სუდანში [45,189]. საქართველოს თბილი, სუბტროპიკული კლიმატი ხელსაყრელ პირობას ქმნის ვიბრიონების გამრავლებისა და განვითარებისთვის. დაბალი და საშუალო მარილიანობა, ასევე ტემპერატურა, რომელიც 18°C-ს აღემატება, ქმნის სასურველი

ზრდის პირობებს *Vibrio*-ს გვარის წარმომადგენლებისთვის. ადრეულ XX საუკუნის 70-იან წლებში საქართველოს ტერიტორიაზე ადგილი ქონდა ქოლერას 8 შემთხვევას, რაც გამოწვეული იყო “El Tor” ბიოტიპით. დაავადების აფეთქება ლოკალიზებული იყო სათანადო კარანტინული ზომების მიღებით და რისკ ჯგუფების პროფილაქტიკური მეურნეობის გზით [39]. უკანასკნელ წლებში სამხრეთ კავკასიის რეგიონში (თბილისის შემოგარენში არსებული ტბები, შავი ზღვა) ჩატარებულმა კვლევებმა აჩვენა საქართველოს სარეკრეაციო წყალსატევებში წყლის ხარისხის გაუარესება. უნდა აღინიშნოს, რომ მოქმედ სასოფლო-სამეურნეო არეალში არსებული მცირემარდიანი წყლის რეზერვუარის-კუშისის ტბის დაბინძურების ხარისხი ჭარბობდა თბილისის ზღვის-მტკანირი წყლის რეზერვუარის მიკრობული დაბინძურების ხარისხს [68]. გარემო-კლიმატური პირობები და მათი სეზონური ცვლილება დიდ ზეგავლენას ახდენს პათოგენური ვიბრიონების, ასევე მათი სპეციფიკური ბაქტერიოფაგების გავრცელებაზე. ბაქტერიოფაგები სიცოცხლის ყველაზე გავრცელებული ფორმებია დედამიწაზე. ბუნებრივ პირობებში ბაქტერიოფაგებს დიდ როლი ენიჭებათ ბაქტერიული პოპულაციის რეგულაციასა და გენეტიკურ მრავალფეროვნებაში, რაც ბაქტერიულ შტამებს და სახეობებს შორის გენეტიკური გაცვლის გზით ხორციელდება [91]. ბაქტერიოფაგები მედიცინასა და ვეტერინარიაში განიხილებიან ანტი-ინფექციურ აგენტებად, რომელთაც გამორჩეული ანტიბაქტერიული მოქმედება ახასიათებთ. ანტიბიოტიკების მიმართ მულტირეზისტენტული ბაქტერიული შტამების აღმოცენებამ თანამედროვე მედიცინაში გაზარდა ინტერესი ფაგების მიმართ. ფაგებს აქვთ სპეციფიკური მოქმედება, მათი სამიზნე ბაქტერიული უჯრედია და არა ადამიანის ან სხვა ეუკარიოტული უჯრედები. ეს არის მნიშვნელოვანი განსხვავება ფაგური პრეპარატისა ანტიბიოტიკისგან, რომელიც მოქმედებს, როგორც პათოგენის, ასევე ნორმალური მიკროფლორის წინააღმდეგ, ვითარდება მიკრობული დისბალანსი, რასაც მიყვარათ მეორადი ინფექციების განვითარებისკენ.

ბაქტერიოფაგები გამოყენებოდა ბაქტერიული ინფექციების პრევენციისა და სამკურნალოდ [17,148] ანტიბიოტიკების აღმოჩენამდეც. თერაპიული ფაგური პრეპარატები იწარმოებოდა ფარმაცევტული ინდუსტრიის მიერ ყოფილ საბჭოთა კავშირში (1923 წლიდან) და აღმოსავლეთ ევროპაში (1952 წლიდან). კლინიკურმა ფაგოთერაპიის ცდებმა აჩვენა ფაგების პროფილაქტიკური და თერაპიული გამოყენების დადებითი მხარე. ადამიანში ვირულენტური ფაგების გამოყენების უარყოფითი მაჩვენებლები ფაქტობრივად არ იყო აღწერილი [169]. მიუხედავად ფაგების თერაპიული მიზნით გამოყენების უსაფრთხოებისა, ჩვეულებრივ მათი ფართო მოხმარება დასავლეთის განვითარებულ ქვეყნებში არ ხდება და ფაგების მოქმედების ეფექტურობა ჯერ კიდევ საკამათო საკითხია. გარდა ამისა ერთ-ერთ შეზღუდვას წარმოადგენს ფაგების მაღალი სპეციფიკურობა სამიზნე ბაქტერიული სახეობის მიმართ.

ბაქტერიოფაგების პრაქტიკული გამოყენების არეალი განსხვავდება, გამომდინარე მათი ლიზისური სპექტრიდან. აღწერილია მათი ინდიკატორებად და ტრასერებად ბუნებრივი, ღია წყალსატევების დაბინძურების ხარისხის, წყაროსა და გავრცელების გზების დადგენის მიზნით გამოყენება. *V. cholerae* O1-ის მიმართ სპეციფიკური ბაქტერიოფაგები ოდითგანვე ინტერესის სფეროს წარმოადგენდა-ინფექციების სადიაგნოსტიკოდ. მისი ბაქტერიოფაგების სპეციფიკური ნაკრებები დღემდე გამოიყენება *V. cholerae* O1-ის სეროტიპის “კლასიკური” და “El Tor” ბიოტიპების

განსახსნავებლად. ქოლერას ეპიდემიის მეთვალყურეობისთვის ფაგოტიპირება ფართოდ მიღებული მეთოდია [24]. საერთაშორისო ფაგოტიპირების სქემა, რომელიც მოწოდებულია ბასუს და მუკერჯის [24] მიერ, მოიცავს 5 ფაგს (I, II, III, IV და V). თუმცა დროთა განმავლობაში არსებული სქემა არასაკმარისად სპეციფიკური აღმოჩნდა და 1993 წელს "El Tor"-ის ბიოტიპის შტამებისთვის ფაგოტიპირების ახალი სქემა იყო მოწოდებული [51].

დაავადება ქოლერა მისი აღმოცენების ადგილიდან საკმაოდ სწრაფად ვრცელდება. ეპიდემიოლოგიური თვალსაზრისით მნიშვნელოვანია დაავადების გავრცელების თვალყურის დევნება. ჩამდინარე წყლებში *V. cholerae* O1-ის შტამებისა და შესაბამისი ფაგების დეტექცია შესაძლოა იყოს სპეციფიკური საშუალება ქოლერას აფეთქებების წინასწარ განჭვრეტისა მანამ, სანამ, შემთხვევათა მნიშვნელოვანი რაოდენობა იჩენს თავს ან რეტროსპექტულად, დაავადების უკვე ჩავლილი ეპიზოდის გამოსავლენად.

ჩვენი კვლევის ძირითად მიზანს წარმოადგენდა საქართველოს წყლიან გარემოში არაჰალოფილური (ქოლერას ჯგუფის) ვიბრიონების მიმართ სპეციფიკური ბაქტერიოფაგების გამოყოფა და დახასიათება მათ მიერ გამოწვეული ინფექციური დაავადებების რისკის შეფასებისა და ბიომრავალფეროვნების დადგენის მიზნით, ასევე შემდგომში სამკურნალო-პროფილაქტიკური გამოყენებისათვის.

კვლევის ძირითადი ამოცანები იყო:

1. საქართველოს წყლიან გარემოში გამოყოფილი (შავი ზღვა, ლისის ტბა, კუმისის ტბა, თბილისის ზღვა) *V. cholerae*-ს და *V. mimicus*-ის დახასიათებული და იდენტიფიცირებული ბაქტერიული შტამების კოლექციის შექმნა;
2. *V. cholerae*-ს და *V. mimicus*-ის მიმართ სპეციფიკური ბაქტერიოფაგების გამოყოფა, გამრავლება და კლონირება;
3. ბაქტერიოფაგების მორფოლოგიური და ბიოლოგიური თვისებების შესწავლა;
4. ბაქტერიოფაგების სტაბილობის შესწავლა სხვადასხვა ფიზიკო-ქიმიური ფაქტორების მიმართ;
5. გამოყოფილი ფაგების გენეტიკური დახასიათება და მათი მრავალფეროვნების შესწავლა;
6. ფაგების პოტენციალის დადგენა მათ მიერ გამოწვეული ინფექციების ბიოკონტროლის მიზნით.

I. ლიტერატურული მიმოხილვა

1.1. ქოლერას ჯგუფის ვიბრიონების ზოგადი დახასიათება

1.1.1. გვარის *Vibrio* ზოგადი დახასიათება

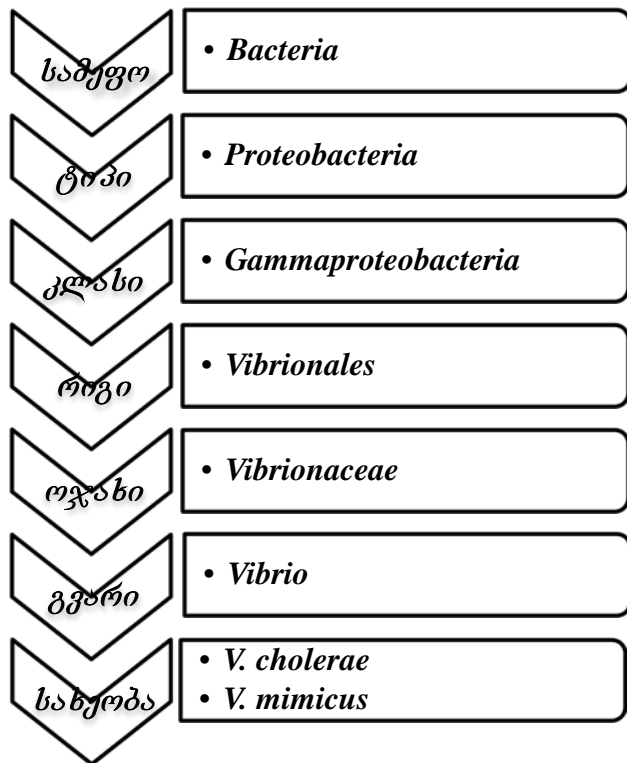
1964 წელს მიკრობიოლოგთა გაერთიანების საერთაშორისო ასოციაციის მიერ ჩამოყალიბდა ოჯახი სახელწოდებით *Vibrionaceae* [112] რომელშიც გაერთიანებულია შემდეგი გვარის წარმომადგენლები: *Vibrio*, *Aeromonas*, *Plesiomonas*, *Photobacterium* და *Enhydrobacter*. ამგვარი სისტემატიკა ხელსაყრელია *Vibrionaceae*-ს ოჯახის წარმომადგენლების (ოქსიდაზადადებითი, პოლარული შოლტის მქონე, მოძრავი) დიფერენციაციისათვის *Enterobacteriaceae*-ს ოჯახის მიკროორგანიზმთა წარმომადგენლებისაგან (ოქსიდაზაუარყოფითი, პერიტრიხები, ნაკლებად მოძრავი და უმოძრაო).

გვარი *Vibrio* –*Vibrionaceae*-ს ოჯახის წარმომადგენელია. ჯახი *Vibrionaceae* მოიცავს ადამიანისა და ცხოველის ოპორტუნისტულ პათოგენებს [63,177], ასევე ზღვის ფაუნის, თავისუფლად მცხოვრებ ქემოპეტროტროფებს და/ან კომენსალებს [86,90]. ჯახი *Vibrionaceae*-ს წარმომადგენლები ქმნიან წყლიანი გარემოს პრედომინანტურ პეტროტროფულ ბაქტერიათა ჯგუფს [161]. ვიბრიონების როლი წყლიან გარემოში მოიცავს ბიოდეგრადაციას, საკვების რეგენერაციას და ბიოგეოქიმიურ ციკლს [58]. ვიბრიონები წყლის მიკრობიოტას უხვი კომპონენტებია [178]. *Vibrio*-ს გვარის წარმომადგენლებში შედის 6 სახეობა არაჰალოფილური ბაქტერიების, მათ შორის არის ადამიანის პათოგენები *V. cholerae* და *V. mimicus*, ასევე, 45 სახეობა ჰალოფილური ვიბრიონების [28], რომელთაგან რამდენიმე ადამიანის პათოგენს წარმოადგენს (*V. alginolyticus*, *V. cincinnatiensis*, *V. damsela*, *V. fluvialis*, *V. furnissii*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*, *V. hollisae*).

ვიბრიონები გრამუარყოფითი, მოღუნული ჩხირებია. მათი ზომა მერყეობს 1,4-3მკმ სიგრძეში და 0,5-0,8მკმ სიგანეში. დამახასიათებელია ერთი ან რამდენიმე პოლარული შოლტი, რომელიც უჯრედის კედლის გარე მემბრანის გაგრძელებას წარმოადგენს და უზრუნველყოფს მათ მოძრაობას. ისინი ოქსიდაზადადებითი (გააჩნიათ ინდოფენოლოქსიდაზის გამოყოფის უნარი) მიკროორგანიზმებია (გამონაკლისს წარმოადგენს *V. metschnikovii* და *V. gazogenes*). ვიბრიონები ფაკულტატურ ანაერობებს მიეკუთვნებიან. მათი გამრავლებისთვის ხელსაყრელი ტემპერატურა 30 გრადუსია, თუმცა უმეტესობა მათგანი კარგად მრავლდება 15-დან 37 გრადუსზეც. ამ გვარის თითქმის ყველა წარმომადგენლის ცხოველმყოფელობისათვის საჭიროა ნატრიუმის იონები და წყალბად იონთა მაღალი კონცენტრაცია. კარგად მრავლდებიან pH 9 და წყალბად იონთა უფრო მაღალი კონცენტრაციის დროსაც. მათთვის დამლუპველია მჟავა გარემო.

1.1.2. ქოლერას ჯგუფის ვიბრიონების კლასიფიკაცია და ტქსონომია

ცნობილია ვიბრიონების 70-ზე მეტი სახეობა. ისინი პირობითად ორ ჯგუფად იყოფა: არაჰალოფილურ და ჰალოფილურ ვიბრიონებად. არაჰალოფილურ ვიბრიონებს მიეკუთვნება ქოლერას ჯგუფის ვიბრიონი- *V.cholerae* და *V. mimicus*. ეს უკანასკნელნი მიეკუთვნებიან *Proteobacteria*-ს ტიპს, *Gamma Proteobacteria*-ს კლასს, *Vibrionales*-ის რიგს, *Vibrionaceae*-ს ოჯახს და *Vibrio*-ს გვარს [73] (სურ1). გვარი *Vibrio* მოიცავს 45-მდე სახეობას [28]. 12 სახეობა მუდმივად გამოიყოფა ადამიანის კლინიკური სინჯებიდან, დაავადებები, რომლებშიც ისინი არიან ჩართულნი მოიცავს: დიარეას, სეპტიცემიას და ჭრილობით ინფექციებს [72,98,112]. ბერჯის სისტემური ბაქტერიოლოგიის (2005) მიხედვით გვარი *Vibrio*-ს 12 სახეობიდან 11 ადამიანის აშკარა პათოგენს წარმოადგენს იწვევს რა დიარეას და ექსტრაინტესტინალურ ინფექციებს. სამი სახეობა: *V. cholerae*, *V.parahaemolyticus* და *V.vulnificus*-ის მიერ ადამიანში გამოწვეული ინფექციების სისშირე ყველაზე დიდია. გვარი *Vibrio* კლინიკური დაავადების სამი ძირითადი სინდრომის გამომწვევია, ესენია: გასტროენტერიტები, ჭრილობითი ინფექციები და სეპტიცემია.



სურ.1. *V. cholerae*-ს და *V. mimicus*-ის ტაქსონომია

1.1.3. ისტორიული ცნობები *V. cholerae*-ზე

1854 წელს იტალიელმა მეცნიერმა ფილიპო პაციიმ ფლორენციაში ქოლერის ეპიდემიის მიმდინარეობისას აღმოაჩინა გვარი *Vibrio*-ს პირველი წარმომადგენელი, ქოლერის დაავადების გამომწვევი *V. cholerae*. მან მიკროსკოპით შეისწავლა ამ დაავადებით დაღუპულ ადამიანთა ნაწლავის ლორწოვანის მდგომარეობა და ყველა მათგანში *V. cholerae* აღმოაჩინა. მოგვიანებით რ.კოხმა [123] ეგვიპტეში (1883წ) და ინდოეთში (1884წ) ქოლერის მე-5 აფეთქების მიმდინარეობისას, უელატიანიან აგარზე გამოყო *V. cholerae*-ს სუფთა კულტურა. მან და მისმა ჯგუფმა შეისწავლეს ფატალური შემთხვევების დიდი რიცხვი და აღმოაჩინეს, რომ ყველა დაღუპულის ნაწლავის ქსოვილებში შეინიშნებოდა *V. cholerae*-ს ჩხირის არსებობა. კოხმა და მისმა ჯგუფმა არამარტო დაადგინა, რომ დაავადების გამომწვევი სწორედ ეს მიკროორგანიზმი იყო, არამედ ისიც, რომ ეს დაავადება ამ მიკროორგანიზმით დაბინძურებული წყლის მეშვეობით ვრცელდება.

1905 წელს აჩარდმა და ბენსაუდმა შეიმუშავეს ქოლერის შრატით აგლუტინაციის რეაქციის მეშვეობით, ქოლერის ვიბრიონის იდენტიფიკაციის მეთოდი, რამაც მიგვიყვანა გვარი *Vibrio*-ს წარმომადგენლების ორ ჯგუფად დაყოფამდე: ქოლერის შრატით აგლუტინირებადი ვიბრიონები (ქოლერული ვიბრიონები) და ნაგ-ვიბრიონები. თუმცა ამ ორი ჯგუფის წარმომადგენლების ბიოქიმიური თვისებების შესწავლამ მათი დიფერენციაციის ნაცვლად ისინი მეტად დაახლოვა ერთმანეთს.

ფ.გოტშილისმა 1906 წელს ელტორის საკარანტინო სადგურიდან კუჭ-ნაწლავის ინფექციით დაღუპულ ადამიანთა ნაწლავებიდან გამოყო ვიბრიონის 38 შტამი. 6 მათგანი აგლუტინირებოდა ქოლერის შრატით. მიუხედავად ავტორის დასაბუთებისა, რომ ეს შტამები კულტურალური და ანტიგენური თვისებებით მსგავსი იყო ქოლერის ვიბრიონების, ეპიდემიოლოგიური თვალსაზრისით ისინი არ მიაკუთვნეს ქოლერას, რადგან არ დასტურდებოდა მათი ხანგრძლივი მატარებლობა. 1906 წელს ელტორის ვიბრიონებთან დაკავშირებულ კვლევებში მნიშვნელოვანი წვლილი შეიტანეს მეცნიერებმა რ.კრაუსმა და ე.პრიბრამ, რომლებმაც ჩატარებული ცდების საფუძველზე ელტორის ვიბრიონებში მიუთითეს ჰემოტოქსინისა და ეგზოტოქსინის არსებობა, რაც იმ დროს მიღებული კრიტერიუმებით არაქოლერული ვიბრიონების მახასიათებლად ითვლებოდა. ამრიგად ზემოთ აღწერილი შტამები მიაკუთვნეს არაქოლერულ ვიბრიონებს და ელტორს პარაქოლერული ვიბრიონები უწოდეს. ასეთმა მცდარმა გადაწყვეტილებამ ტრაგიკულ შედეგებამდე მიგვიყვანა. პარაქოლერა ელტორის პირველი მსხვილმასშტაბიანი აფეთქება 1938 წელს სულავესის კუნძულზე დაფიქსირდა. დაავადება ინფიცირებულთა 70%-ში ლეტალურად დასრულდა.

V. cholerae- წყლისმიერი დაავადება- ქოლერას ეთიოლოგიური აგენტია, რომლის ძირითად გამომწვევად *V. cholera* O1 გვევლინება [60,143,146]. უკანასკნელი ათწლეულების მანძილზე ქოლერას ეპიდემია აღნიშნულია სამხრეთ ამერიკის აფრიკის და აზიის 75 ქვეყანაში. ოველწლიურად მთელი მსოფლიოს მასშტაბით ხდება სპორადული შემთხვევების აღრიცხვა. ქოლერას პირველი პანდემია დაფიქსირდა 1817 წელს. გასული ორი საუკუნის განმავლობაში 7 პანდემიაა აღრიცხული [118,152]. ქოლერას პანდემიები ჩვეულებრივ სათავეს ინდოეთის ნახევარკუნძულიდან, განგის დელტიდან იღებდა და შემდეგ ვრცელდებოდა სხვა კონტინენტებზე [75,159]. უკანასკნელი (2010-2014), ქოლერას ყველაზე მნიშვნელოვანი აფეთქება მოხდა ჰაიტიზე, კონგოს დემოკრატიულ რესპუბლიკაში, სიერა ლეონეში, მექსიკასა და სამხრეთ

სუდანში [45,189]. ქოლერას მე-5 (1881-1896) და მე-6 (1899-1923) პანდემიების გამომწვევად მიჩნეულია *V. cholerae* O1 “კლასიკური” ბიოტიპი [118]. მე-7 პანდემია დაიწყო 1961 წელს და გამოწვეული იყო სხვა ბიოტიპის– “El Tor”-ის მიერ. “El Tor”-ის ბიოტიპი გამოყოფილი იყო პილიგრიმებიდან, “El Tor”-ის საკარანტინო ბანაკიდან. სხვა პანდემიებისგან განსხვავებით, რომლებიც სათავეს ინდოეთის ნახევარკუნძულის განგის დელტიდან იღებდნენ [48,131,152] მე-7 პანდემიამ სულავესის კუნძულზე, ინდონეზიაში იჩინა თავი [114], 1992 წლის ბოლოს მადრასში (ინდოეთი) და შემდგომში სამხრეთ ბანგლადეშში მიმდინარე ქოლერის ეპიდემიის შესწავლამ გამოავლინა ქოლერის ახალი გამომწვევი- O139 “Bengal” სეროტიპი [53,154]. ეპიდემიური შტამების *V. cholerae* O1 და *V. cholerae* O139-ს ძირითადი დამახასიათებელი თვისება, მათ მიერ ქოლერა ტოქსინის (CT) პროდუცირებაა, რაც დიარეის გამოწვევის მთავარი განმსაზღვრელი ფაქტორია [118].

1962 წელს, როცა *V. cholera* “El Tor”-ის შტამმა თითქმის მთელი მსოფლიო მოიცვა და პანდემიის სახე მიიღო, მსოფლიო ჯანდაცვის ორგანიზაციის გენერალურმა ანსამბლემ ეს დაავადება კარანტინულად გამოაცხადა და მასზე საერთაშორისო სანიტარული წესები განავრცო.

1.1.4. *V. cholerae*-ს სეროტიპები, პათოგენობა და პათოგენობის ფაქტორები

როგორც ქოლერულ ისე არაქოლერულ ვიბრიონებს გააჩნიათ საერთო ტიპოსპეციფიური, თერმოსტაბილური O-ანტიგენი და სახეობასპეციფიური H-ანტიგენი. ამის საფუძველზე გვარი *Vibrio*-ს წარმომადგენლები დაყვეს სეროჯგუფებად. რომელთაგან პირველში გაერთიანდა ქოლერის ვიბრიონი და მიიღო სახელწოდება *V. cholera* O1. დღესდღეისობით 200-მდე სეროჯგუფია ცნობილი. O1 სეროჯგუფს მიეკუთვნებიან ბიოტიპები “კლასიკური” და “El-Tor”.

გვარი *Vibrio*-ს სახეობების ანტიგენურ სტრუქტურას განსაზღვრავს ბაქტერიული ანტიგენების მთავარი კლასები: სომატური (O), კაფსულარული (K) და ფლაგელარული (F), რომლებიც ასოცირებულია ბაქტერიული ლიპოპოლისაქარიდულ ექსტრაცელულარულ შრესთან ან კაფსულასთან და ფლაგელუმთან. *V. cholerae* იყოფა ორ სეროჯგუფად: *V. cholerae* O1 და *V. cholerae* არა-O1. ეს უკანასკნელი მორფოლოგიურად და ბიოქიმიურად მსგავსია *V. cholerae* O1 –ის, არ აგლუტინირდება O1 ჯგუფის სპეციფიკური ანტიშრატით [56,71]. *V. cholerae*-ს შორის 180 O ანტიგენია ცნობილი, თუმცა სეროჯგუფები O1 და O139 მოიცავენ ყველა იმ შტამს, რომელთაც გამოიწვიეს ეპიდემიები და პანდემიები [158,194]. *V. cholerae* O1-ის სეროტიპში გაერთიანებულია 3 სეროტიპი: ოგავა, ინაბა და ჰიკოშიმა, რომელთა ანტიგენური ფრმულაა: AB, AC და ABC [87]. პრეარსებულ ეპიდემიურ შტამში ტიპოსპეციფიური, თერმოსტაბილური O-ანტიგენის ცვლილებამ შესაძლოა გამოიწვიოს ახალი პათოგენის ჩამოყალიბება, რომელსაც ეპიდემიური შტამის მიმართ იმუნურ პოპულაციაში დაავადების გამოწვევის უნარი ექნება [14,154]. ამგვარად იჩინა თავი *V. cholerae* O139-ის (ბენგალი) შტამმა, *V. cholerae* O1-ის ეპიდემიური შტამიდან O ანტიგენის ბიოსინთეზის რეგონების გენეტიკური ცვლილების გზით [27,146,167]. *V. cholerae* O139 შტამი იწვევს დაავადებას ისეთ ორგანიზმში, რომელიც იმუნურია O1 შტამის მიმართ [29,145].

V. cholerae ტოქსინის (CT) წარმომქმნელი ბაქტერიული მიკროორგანიზმია. იგი ასინთეზებს 2 ტიპის ტოქსინს: ენდო და ეგზოტოქსინს (ენტეროტოქსინი). დაავადების განვითარებაში ძირითადი როლი ენტეროტოქსინს ეკუთვნის. იგი ორი კომპონენტისგან შედგება A (ctxA) და B (ctxB). B პრაქტიკულად არატოქსიურია და მონაწილეობს წვრილი ნაწლავის ეპითელური უჯრედების მემბრანის სპეციფიკურ რეცეპტორებზე მიმაგრებაში. A ტოქსიკურია, იგი ააქტიურებს სპეციფიკურ ფერმენტებს, რაც იწვევს მარილების ჰიპერსეკრეციას და უჯრედების გაუწყლოებას. გენები, რომლებიც აკოდირებენ CTA და CTB სინთეზს კოდირებულია ფილამენტური ფაგით CTXΦ. *V. cholerae* მწვავე დიარეულ დაავადებას იწვევს და სამხრეთ აზიის, აფრიკისა და ლათინური ამერიკის ენდემურ სახეობას წარმოადგენს. CDC-ის კლასიფიკაციით *V. cholerae* განსაკუთრებით საშიშ პათოგენების მე-2 კატეგორიას განეკუთვნება. ქოლერის დაავადების გამომწვევი წყარო ამ მიკროორგანიზმით დაბინძურებული წყალი ან საკვებია. ეს დაავადება განვითარებული ქვეყნებისთვის არის დამახასიათებელი. ასეთ ქვეყნებში ქოლერის აფეთქებები ყოველწლიურად 120000-ზე მეტი ადამიანის სიცოცხლეს იწირავს. ცნობილია ქოლერას დიდი აფეთქებები ლათინურ ამერიკაში მომხდარი 1991 წელს, ინდოეთში 1992-1993 წლებში, გომაში, ზაირში 1994 წელს, რომლის დროსაც 70000 დაავადების შემთხვევიდან 12000 ლეტალურად დასრულდა. ქოლერას ეპიდემიოლოგიიდან აღსანიშნავია ის, რომ ამ დაავადებას *V. cholerae*-სთვის ენდემურ ადგილებში სეზონური ხასიათი აქვს. ინფიცირებულების მეტი წილი 1-იდან 5 წლამდე ბავშვებზე მოდის. წლიდან წლამდე იცვლება ამ მიკრობის ანტიბიოტიკომპრძობელობა და ეპიდემიური შტამების კლონების ნაირსახეობა. 1970 წელს ქოლერას ეპიდემიას ადგილი ჰქონდა ყოფილი საბჭოთა კავშირის ტერიტორიაზეც (ასტრახანი, ოდესა), რომელმაც გარკვეულ წილად საქართველოც მოიცვა (აჭარა). საქართველოს თბილი, სუბტროპიკული კლიმატი ხელსაყრელია ვიბრიონების გამრავლებისა და გავრცელებისათვის. 70-იანი წლების დასაწყისში საქართველოს ტერიტორიაზე ქოლერის 8 შემთხვევა იყო დაფიქსირებული, რომელთაგან ერთი ლეტალურად დასრულდა, თუმცა დაავადების აფეთქება ლოკალიზებული იყო სათანადო კარანტინული ზომების მიღებით და რისკ ჯგუფების პროფილაქტიკური მკურნალობის გზით [39]. ყველა ეს შემთხვევა O1 ჯგუფის ბიოტიპით-ელტორით იყო გამოწვეული. 80-იან წლებში სხვადასხვა ნაგ-ვიბრიონები იყო გამოყოფილი ჭოროხისა და მაჭახელას ესტუარიებიდან. თუმცა საბჭოთა კავშირის დაშლის შემდგომ პერიოდში წყლისა და კვებითი ინფექციების ინტენსიური მონიტორინგის შესახებ გამოქვეყნებული ცნობები არ არსებობს. ქოლერას გაცილებით მნიშვნელოვან აფეთქებას ქონდა ადგილი შავი ზღვისპირეთის კიდევ ერთ ქვეყანაში-თურქეთში.

სახეობა *V. mimicus*-ი ბიოქიმიური პარამეტრებით ახლოს დგას *V. cholerae*-სთან. თავდაპირველად აღწერილი იყო, როგორც ბიოქიმიურად ატიპიური *V. cholerae* (არ ახდენს საქაროზის ფერმენტაციას. TCBS-ის სელექტიურ ნიადაგზე მწვანე კოლონიების სახით იზრდება). *V. cholerae*-სთან შედარებით მსუბუქი დიარეის გამომწვევია, ასევე იწვევს დიარეას ან გასტროინტენსტინალური ტრაქტის ინფექციებს [154].

1.1.5. *V. cholerae* არა-O1

V. cholerae-ს ზოგიერთი შტამები არ ავლენენ ინტოქსიკაციას O1 ანტიშრატით, თუმცა იწვევენ დიარეულ გართულებებს. *V. cholera* არა-O1-ის მიერ გამოწვეული ინფექციის 130 შემთხვევა იყო დაფიქსირებული ფლორიდაში 1983-დან 1993 წლამდე [63]. *V. cholerae* არა-O1 აღწერილი იყო, როგორც ქოლერას მსგავსი დაავადების მცირე აფეთქებებისა და სპორადული შემთხვევების გამომწვევი აგენტი [29,122, 142,144]. *V. cholerae* არა-O1-ის წარმომადგენლები არ შეიცავენ ტოქსინის გენებს, ფართოდ არიან გავრცელებულნი წყლიან გარემოში და წარმოადგენენ თავისუფლად მცხოვრებ ორგანიზმებს [32,190]. განსხვავებით *V. cholerae* O1-სგან არ ახასიათებთ ეპიდემიური ან პანდემური პოტენციალი [32], თუმცა ხშირად ვლინდებიან ქოლერას მსგავსი დიარეის სპორადული შემთხვევების [100,139,165] და ლოკალური აფეთქებების [16,64] მიზეზად, რომელსაც ხშირად თან სდევს ტემპერატურის მატება და განაავალში სისხლის და ლორწოს არსებობა [64,100]. *V. cholerae* არა-O1-ის წარმომადგენლები ძირითადად ჩართულნი არიან არაინვაზიურ დაავადებებში, როგორცაა სეპტიცემია იმუნიტეტ დაქვეითებულ ორგანიზმებში [157,133]. *V. cholerae* არა-O1-ის იზოლატები შესაძლოა გამოიყოს დიარეის შემთხვევების დროს და ასევე გარემოდან, სადაც ქოლერას აქვს ადგილი. შტამები ხშირ შემთხვევაში ჰემოლიზურია. ადამიანის ინფექცია, რომელიც *V. cholerae* არა-O1-ით არის გამოწვეული ზღვის პროდუქტის მიღებასთან, დაბინძურებულ გარემოსთან, მტკნარ, მცირემარილიან ან ზღვის წყალთან და ასევე მოგზაურობასთან [55,65,142] არის დაკავშირებული. იტალიაში აღწერილი იყო *V. cholerae* O158-ის მიერ გამოწვეული ინფექცია [81]. იტალიაში ფართოდ გავრცელებული სეროვარიანტი იყო ასევე O40 (16%), რომელსაც მოსდევდა O6 (12%) და O2, O8, O41, ასევე, O64 და O107 (თითოეული-6%), ყველა იზოლატი იყო CT გენის მიმართ ნეგატიური [81]. გარემოში *V. cholerae* არა-O1-ის შტამები რიცხობრივად აჭარბებს *V. cholerae* O1-ის შტამებს და უმრავლესობას ამ შტამებისა არ აღენიშნებათ ისეთი ვირულენტური ფაქტორების არსებობა, როგორცაა ქოლერა ტოქსინი და კორეულატორი პილი [25,119].

1.1.6. *V. cholerae*–გავრცელება და ეკოლოგია

V. cholerae წარმოადგენს, როგორც ადამიანის პათოგენს, ასევე წყლის გარემოს ბუნებრივ ბინადარს [54,61]. კოლველმა და თანაავტორებმა (1981) გამოთქვეს ჰიპოთეზა, რომ *V. cholerae* წარმოადგენს მცირემარილიანი წყლის და ესტუარიების ბუნებრივად არსებულ მიკრობულ ფლორას. შინგლეტონმა და თანაავტორებმა (1982) დაადასტურეს *V. cholerae*-ს, როგორც ესტუარიების მიკრობული თანასახოგადობის წევრის უტყუარობა. *V. cholerae*-ს ავტოქტონური არსებობა ქოლერას ენდემური რეგიონების წყლიან გარემოში დადგინდა სხვადასხვა სწავლებით [58,102,83]. საწინააღმდეგოდ იმ მოსაზრებისა, რომ *V. cholerae* წარმოადგენს მხოლოდ კლინიკურ ბაქტერიას, რომელიც მცირე ხნით ცოცხლობს მხოლოდ წყლიან გარემოში *V. cholerae* ამჟამად ცნობილია, როგორც მცირემარილიანი წყლების ბინადარი [57]. ოლველმა და თანაავტორებმა (1977) პირველმა გამოთქვეს ჰიპოთეზა, რომ სანაპირო წყლები *V. cholerae*-ს მნიშვნელოვანი რეზერვუარია. პირდაპირი დეტექციის მეთოდებით შესწავლილი იყო *V.*

cholerae O1-ის სიმბიონტური ასოციაცია პლანქტონთან [103]. *V. cholerae* ნანახი იყო, ზღვის წყალში და სხვა გარემოში, როგორც ქოლერას ენდემურ, ასევე ქოლერას არარსებულ რეგიონებში [55,105,113,119]. *V. cholerae* გამოყოფილი იყო მრავალი გეოგრაფიული არეალის, როგორც კონტინენტური, ასევე ზღვის წყლიდან და ესტუარიებიდან [23,54,55]. დღეისობით *V. cholerae* მიჩნეულია ავტოქტონური ბაქტერიების [55,115,116,132], მათი გავრცელების არეალის წევრად და მისი არსებობა არ არის კორელაციაში კოლიფორმებთან და ფეკალურ ინდიკატორებთან [97,132]. დღეისობით *V. cholerae* სხვადასხვა წყლიანი გარემოს, როგორცაა ოკეანე, ესტუარიები, მდინარეები და ტბები ბუნებრივ ბინადრად მოისაზრება [57,186]. წყალი (და მასთან ასოცირებული მიკროორგანიზმები, ცხოველები და მცენარეები) ბუნებრივი გარემოა არაჰალოფილური და ჰალოფილური ვიბრიონებისთვის. გარემო პირობები, მასში არსებული ორგანული და არაორგანული ქიმიკატებით, pH-ით, ტემპერატურით, მარილიანობით, უანგბადის სიმჭიდროვით და ულტრაიისფერი სხივების ზემოქმედებით არეგულირებენ ვიბრიონების კონცენტრაციას და გავრცელებას, როგორც მტკნარ, ასევე ზღვის წყლის ეკოსისტემაში [47]. ფაქტორები, რომლებიც განსაზღვრავენ ვიბრიონების გავრცელებას მოიცავენ ადამიანის, ცხოველის ან მცენარის მასპინძელ ორგანიზმებს, არაორგანულ ნივთიერებებს და ნახშირბადის წყაროს, ტემპერატურას, მარილიანობას, გახსნილ უანგბადს და ზედაპირის ქვემოთ არსებულ სიღრმეს სახეობებისთვის, რომლებიც არსებობენ ოკეანეებში [162]. *V. cholerae*-ს დადებითი ნიშუშები (წყლის) კორელაციაშია ჰაერის ტემპერატურასთან [135]. *V. cholerae*-ს მიკობული ეკოლოგიის საუკეთესო მაგალითია მტკნარ და მარილიან წყლებში მისი გადარჩენის შესაძლებლობა “თავისუფლად მცხოვრებ მდგომარეობაში”. გავრცელების არეალია: ჩამდინარე და მცირემარილიანი წყლები, ესტუარიები, სანაპირო ყურეები, დაბინძურებული დინებები, მდინარეები და ტბები. *V. cholerae* ასევე არსებობს ეპიბიოტურ ფორმაში, მრავალ, მიკროსკოპულ ცოცხალ არსებასთან [96]. მიკროორგანიზმები, რომლებიც ასოცირებული არიან *V. cholerae*-სთან მოიცავენ ციანობაქტერიებს, ფიტოპლანქტონს (დიატომები, მტკნარი წყლის წყალმცენარეები) და ზოოპლანქტონს [47,104].

V. cholerae O1 და O139-ის ტრანსმისიას ადამიანებში ადგილი აქვს ძირითადად დაბინძურებული წყლისა და საკვების მოხმარების დროს (გაურეცხავი ხილი, ბოსტნეული, უმი ზღვის პროდუქტი). წყალი წარმოადგენს მთავარ როლს ქოლერას გადაცემაში. საკვებისმიერი ქოლერას აფეთქებები ძირითადად დაკავშირებულია ზღვის პროდუქტთან. მოლუსკები, კიბოსნაირნი და თევზები დომინირებენ, როგორც ქოლერას გამომწვევი წყაროები [15,153]. ტოქსიგენური *V. cholerae* O1 აღმოჩენილი იყო სასმელად უვარგის წყლებში სატვირთო გემებიდან [140]. წყლის ფრინველები შესაძლოა იყვნენ ვექტორები *V. cholerae*-სთვის. *V. cholerae* “El Tor” ბიოტიპი კონცენტრირდება წყლის ჰიაცინტების (*Eichhornia crassipes*) ზედაპირზე, შესაბამისად ძლიერდება მისი გადარჩენის შესაძლებლობა და წყლით გადაცემის პოტენციალი [166]. მსგავსი კავშირი იყო აღწერილი *V. cholerae* O139-ის და *Eichhornia crassipes* შემთხვევაში [30]. *V. cholerae* O1-ის სპეციფიკური კავშირის შესაძლებლობა ცოცხალ Copepod-თან დადასტურებული იყო ელექტრონული მიკროსკოპით [101]. ამ ორგანიზმს შეუძლია მტკნარ და ზღვის წყლებში არსებობა, როგორც ცოცხალ და კულტივირებად, ასევე ცოცხალ და არაკულტივირებად (VBNC) მდგომარეობაში [88]. VBNC არის მდგომარეობა, როცა მეტაბოლურად აქტიური უჯრედები არ კულტივირდებიან

მიკრობიოლოგიურ ნიადაგზე [59]. VBNC-ის მდგომარეობაში უჯრედები განიცდიან მნიშვნელოვან შემცირებას ზომაში და მორფოლოგიურ ცვლილებას, გადადიან რაკოკის მდგომარეობაში. VBNC-ის მდგომარეობაში გადასვლა შესაძლოა დაკავშირებული იყოს საკვები ნივთიერებების სიმცირესთან და ფიზიკური ფაქტორებით გამოწვეულ სტრესთან. მიკროკოსმის ექსპერიმენტებმა ცხადყო, რომ VBNC-ის უჯრედები ინარჩუნებენ გარემოში სიცოცხლისუნარიანობას წლების განმავლობაში და აქვთ დაავადების გამოწვევის უნარი [59]. *V. cholerae* O1-ის უნარი კოლონიზირდეს და დაუკავშირდეს კრევეტების და კობრჩხალების ეგზოსკელეტონს, ქმნის ერთგვარ პოტენცილას წყლის გარემოში გადარჩენისთვის [43]. ლამი და თანაავტორები (2007) სწავლობდნენ ცოცხალ და არაკულტივირებად *V. cholerae* O1-ის შტამებს წყლის გარემოს ბიოფილმებში და მათ როლს ქოლერას გადაცემაში. ამ ექსპერიმენტის შედეგად დაგინდა, რომ არსებული შტამები ინარჩუნებდნენ სიცოცხლისუნარიანობას 495 დღის განმავლობაში, მატბარიას (ბანგლადეში) წყალსატევში. ამრიგად ბიოფილმები შესაძლოა მოქმედებდეს, როგორც რეზერვუარი *V. cholerae* O1-ის მიერ გამოწვეულ ეპიდემიათა შეუღებებში. *V. cholerae*- თანაარსებობს კიბოსნაირთა ზოოპლანქტონთან [101,94], ასევე აღმოჩენილია წყალმცენარეებშიც [70,108,109]. *V. cholerae* გამოყოფილია მტკნარი და ზღვის წყლის მაკროფიტებიდან, ასევე ზღვის ფსკერზე მცხოვრები ორგანიზმებიდან, როგორებიცაა: კრევეტები, ხამანწკები [182], კობრჩხალები [31]. ნაჩვენებია *V. cholerae*-ს უჯრედშიდა გამრავლების უნარი თავისუფლად მცხოვრებ ამებაში [8]. *V. cholerae* ცოცხლობს წყალში, როგორც თავისუფლად მცხოვრები ორგანიზმი პლანქტონის ფაზაში [186,192]. *Chironomus* sp, diptera-ს კვრცხის მასები ნავსაყუდელია *V. cholerae*-სთვის და მოქმედებს, როგორც ნახშირბადის ერთადერთი წყარო, შესაბამისად ქმნის ბუნებრივ რეზერვუარს ქოლერას ვიბრიონებისთვის [189]. აბდიმ და თანაავტორებმა (2007) აღწერეს *V. cholerae* O1-ის შტამები, როგორც ფაკულტატიური უჯრედშიდა ბაქტერიები, რომელთაც აქვთ უნარი გადარჩნენ და გამრავლდნენ სიმბიოზური თანაცხოვრების შედეგად წყლის ამებას შიგნით (*Acanthamoeba castellanii*). ამ ურთიერთკავშირმა აჩვენა *V. cholerae* O1-ის და “El Tor”-ის შტამების ფაკულტატიური, შიდაუჯრედული ქცევა და *A.castellanii*-ის შესაძლო როლი, როგორც გარემოში არსებული მასპინძლის, *V. cholerae*-ს შტამებისთვის. ამრიგად, *V. cholerae*-ს აქვს გარემოში, როგორც ასოცირებულად ასევე თავისუფლად არსებობის უნარი.

V. cholerae-ს პანდემური ბუნება ცხადყოფს ამ ორგანიზმის ადაპტაციის და გადარჩენის უნარს მრავალფეროვან გარემო პირობებში [118]. ქოლერას ეპიდემიოლოგიის თვალსაზრისით დიდი მნიშვნელობა აქვს *V. cholerae* O1-ის გადარჩენის უნარს წყლიან გარემოში, მცირე საკვები ნივთიერებების პირობებში. ნანახია ქოლერას შტამების სიცოცხლისუნარიანობა ღარიბი საკვები არის პირობებში, ინარჩუნებდნენ რა ცხოველმყოფელობას 75 დღის განმავლობაში, კულტივირების მაღალი დოზით დაცემის გარეშე [19]. დადგინდა *V. cholerae* O1-ის ბუნებრივი არსებობა ეპიდემიების განვითარებებს შორის, განსაკუთრებით არაკულტივირებად ფორმაში და მათი არსებობა აგრეგატების სახით ბიოფილმებში [12]. ადამიანის ნაწლავისა და წყლიანი გარემოს ზედაპირზე ქოლერას ვიბრიონების ადგეზია მნიშვნელოვან როლს ასრულებს *V. cholerae* O1-ის, როგორც პათოგენის ასევე გარემოში არსებული ორგანიზმის წარმატებით არსებობაში [120].

ქოლერას ეპიდემიები ასოცირებულია დიდი რაოდენობის ნალექთან და ზღვის ზედაპირის სიმაღლის ზრდასთან [136,134]. ორივე დასახელებული მდგომარეობა, მიზეზია ესტუარიებში ორგანული და არაორგანული კომპონენტების ცვლილების, რაც საწყისი ზედაპირია ადამიანთა და ზღვის გარემოს შორის [91,150]. გარემოს და კლინიკური მონაცემების ანალიზმა ცხადყო წყლის ტემპერატურის, სიღრმის, უხვი ნალექის, გამტარობის და copepod-ების რიცხვის კორელაცია ქოლერას ტოქსინის მაპროდუცირებელ ბაქტერიების არსებობასთან [106]. დისტანციურად მართვადი სატელიტით დადგინდა ზღვის ზედაპირის ტემპერატურისა და ზღვის ზედაპირის სიმაღლის კორელაცია ქოლერას ეპიდემიებთან [60,136]. ეკოლოგიურმა კვლევებმა გამოავლინა წყლის ტემპერატურის, მარილიანობის, ორგანული ნივთიერებების და სელიმენტებთან და ორგანიზმებთან ასოციაციის პოტენციური ტენდენციის მნიშვნელოვანი ზეგავლენა გარემოში ქოლერას ვიბრიონების არსებობასა და რიცხვზე [185]. ტემპერატურას და გახსნილი ნახშირბადის ხარისხს დიდი ზეგავლენა აქვს *V. cholerae*-ს ვიბრიონების ზრდაზე [121]. პატელმა და თანაავტორებმა (2004) შეისწავლეს *V. cholerae* O1-ის “კლასიკური” და “El Tor” ბიოტიპის, ასევე არა-O1-ის გადარჩენის უნარი სამრეწველო დაბინძურებულ წყლებში, რკინის იონების კონცენტრაციის ხელისშემწეობა დამოკიდებულებაში და გამოთქვეს ვარაუდი, რომ წყლის ქიმიური დაბინძურება არის ერთერთი ყველაზე მნიშვნელოვანი ხელშემწეობი ფაქტორი *V. cholerae*-ს ვიბრიონების შემდგომი არსებობის, პროლიფერაციისა და წყლიან გარემოში გადარჩენის.

1.1.7. დაავადება ქოლერა და წინასწარ განწყობა

V. cholerae O1-ით გამოწვეულ ინფექციას თან ახლავს დიარეა, პირღებინება და კრუნჩხვები. დაავადება-ქოლერა ხასიათდება უხვი დეჰიდრატაციით დიარეის ფონზე, რასაც თან სდევს სითხისა და ელექტროლიტების კარგვა. ფეკალიების მოცულობა შესაძლოა აღწევდეს 1ლ/სთ [95,151]. მწვავე ინფექცია ასოცირებულია კუჭის დაბალ მუავიანობასთან და O ჯგუფის სისხლთან [33]. O ჯგუფის სისხლის მქონე ადამიანები ჰოსპიტალიზაციის მაღალი რისკის ქვეშ იმყოფებიან *V. cholerae* O1-ის “კლასიკური” და “El Tor”, ასევე *V. cholerae* O139-ით გამოწვეული ინფექციების დროს [22,74]. დაავადება-ქოლერა ხასიათდება "ბრინჯის ნახარშისებური" სეკრემენტებით, სხეულის მასის 10%-ის (ან მეტი) დაკარგვით, კანის ნორმალური ტურგორის დაკარგვით, ჩავარდნილი თვალებით, ანურიით, სუსტად გამოხატული პულსით, შეცვლილი ცნობიერებით და კოლაფსით. მწვავე ინფექცია შესაძლოა დამთავრდეს ლეტალური შედეგით, დეჰიდრატაციის მკურნალობის, სითხეებისა და ელექტროლიტების ჩანაცვლების გარეშე [63]. გამოითქვა ჰიპოთეზა, რომლის მიხედვითაც *V. cholerae*-ს შტამების მიერ გამოწვეული ინფექცია არის ევოლუციური ძალა O ჯგუფის სისხლის დაბალ გავრცელებასთან მიმართებაში, განგის მდინარის დელტაში, რომელიც ქოლერას ისტორიულ და გლობალურ ეპიცენტრს წარმოადგენს [118].

ქოლერისა და სხვა ვიბრიონების მიერ გამოწვეული მძიმე ინფექციური დაავადებების კონტროლისა და პრევენციის სტრატეგია დამოკიდებულია ამ მიკროორგანიზმების ბუნების, მათი პათოგენობის არსის უფრო დრმა და დეტალურ შეცნობაზე და რა თქმა უნდა მათი საარსებო გარემოსა და გავრცელების გზების შესწავლაზე.

1.2. ბაქტერიოფაგები

1.2.1. ბაქტერიოფაგების აღმოჩენა

ბაქტერიოფაგების აღმოჩენა მე-20 საუკუნის ერთ-ერთი უმნიშვნელოვანესი მოვლენა იყო, რომელიც ორი მეცნიერის, ბრიტანელი ფ.ტუორტის (1915 წ.) და კანადელი მეცნიერის ფ.დერელის (1917წ.) სახელებთან არის დაკავშირებული. 1917 წელს მიკრობიოლოგი ფ.დერელი სწავლობდა დიზინტერიის ეთიოლოგიასა და პათოგენს, აკვირდებოდა ავადმყოფი ადამიანების ფეკალური მასის, ფილტრატის დამატებით გამოწვეულ ბაქტერიული კულტურის ლიზისს. ბაქტერიების გამსხნელ აგენტს მან ბაქტერიოფაგი–”ბაქტეიების შთანთქმელი” (ლათ. Bacterium-ბაქტერია, phagos-მშთანთქმელი) უწოდა, ხოლო ბაქტერიოფაგების მოქმედებას, რომელიც ბაქტერიების ლიზისით მთავრდება–ბაქტერიოფაგის ფენომენი.

ბაქტერიოფაგის ფენომენს აკვირდებოდნენ სხვა მკვლევარებიც, მაგრამ ამ მოვლენის ბიოლოგიური არსი პირველად სწორედ ფ.დერელმა შეაფასა. მან გამოთქვა მოსაზრება, რომ მის მიერ აღმოჩენილი ბაქტერიოფაგი ბაქტერიის ვირუსია, რომელიც ბაქტერიული უჯრედის შიგნით მრავლდება, რის გამოც ეს უკანასკნელი იშლება და გარემოში გამოდიან ახლად წარმოქმნილი ვირუსული შთამომავლობის ნაწილაკები. აღსანიშნავია ქართველი მეცნიერის, გიორგი ელიაშვილის დამსახურება, რომელმაც 1917 წელს მტკვრის წყალში ვიბრიონის აღმოჩენასთან ერთად აღწერა ბაქტერიოფაგის ფენომენი [40].

ბაქტერიოფაგის ფენომენის შესახებ გამოკვლევებს განსაკუთრებული ადგილი უჭირავს მიკრობიოლოგიის ისტორიაში. კულტივირების სიმარტივემ, გენერაციის მოკლე პერიოდმა, თაობების დიდი რაოდენობით მიღებამ, ხელი შეუწვევს როგორც ვირუსების ნაწილაკების სტრუქტურების, ასევე ბაქტერიულ უჯრედთან მათი ურთიერთქმედების მექანიზმების წარმატებით შესწავლას. 50-60-იან წლებში ბაქტერიულ ვირუსებზე ჩატარებულმა გამოკვლევებმა შესაძლებელი გახადა მნიშვნელოვანი შედეგების მიღება მოლეკულური ბიოლოგიის უმთავრესი პრობლემის გადასაჭრელად. სწორედ ბაქტერიოფაგები აღმოჩნდნენ ხელსაყრელი მოდელები გენების ულტრასტრუქტურების, მუტაგენეზის მოლეკულური მექანიზმების, გენეტიკური კოდის წაკითხვისა და ორგანიზმის მემკვიდრეობით სტრუქტურებზე რადიაციის გავლენის შესასწავლად.

ფ.დერელი თვლიდა, რომ ყველა ბაქტერიოფაგი მიეკუთვნება ერთ სახეობას–Bacteriophageum intestinale, რომელიც იყოფა მრავალ რასად, მაგრამ მოგვიანებით დაადგინეს, რომ ისინი ქმნიან ბაქტერიების ვირუსების სხვადასხვაგვარ ჯგუფებს, რომლებიც ბუნებაში ფართოდ არიან გავრცელებულნი. ყველგან, სადაც მრავლდებიან ბაქტერიები, აქტივობის ცენტრები ან მიკოპლაზმები შესაძლებელია ფაგების აღმოჩენა. ისინი ბინადრობენ ადამიანის და ცხოველის ნაწილაკებში, ჩამდინარე წყლებში, ნიადაგში.

1.2.2. ბაქტერიოფაგების კლასიფიკაცია

ბაქტერიოფაგების პირველი კლასიფიკაცია [92] ეფუძნებოდა პატრონი ბაქტერიული უჯრედების ტიპებს და მათ მიერ გამოწვეული დაავადებების სიმპტომებს. 1962 წელს ლვოფის, ჰორნის და ტუნეირის კლასიფიკაციას საფუძვლად დაედო ვირიონის მორფოლოგია, კერძოდ, ნუკლეინის მჟავის ტიპი, კაფსიდის ფორმა და კაფსომერების რაოდენობა [11,40,92]. ეს სქემა მოგვიანებით ცნობილი იყო LT-სისტემის სახელწოდებით, რომლის შემადგენლობაშიც შედიოდა ΦX174 და ორი კუდიანი ფაგი. მოგვიანებით, პრაქტიკულმა აუცილებლობამ განაპირობა მეცნიერების მიყვანა იმ დასკვნამდე, რომ ბაქტერიოფაგების კლასიფიკაციას საფუძვლად უნდა დაედოს მორფოტიპი და გენეტიკური თვისებები. მორფოტიპების მიხედვით ცნობილია ბრედლის და ატიხონენკოს კლასიფიკაციის სქემები. 1967 წელს ბრედლიმ მიზნად დაისახა ბაქტერიული ვირუსების სისტემაში მოყვანა, გათვალისწინებული იქნა მათი მორფოლოგიური ნიშნები და ნუკლეინის მჟავის ფორმა და ამის მიხედვით ჩამოყალიბდა ფაგების ექვსი ძირითადი ჯგუფი:

- A. ფაგები კუმშვადი წანაზარდით;
- B. მოკლე წანაზარდიანი ფაგები;
- C. კუბური ფორმის ფაგები;
- D. ერთდაფიანი დნმ-ის შემცველი ფაგები;
- E. რნმ-ის შემცველი ფაგები;
- F. ძაფისებური (ფილამენტური) ფაგები.

ბაქტერიოფაგები, შემადგენელი ნაწილაკების ფორმის მიხედვით, არსებობენ სფეროსებრნი, ჩხირისებრნი (ძაფისებრნი) და რთული ფორმის. ძირითადად, შესწავლილია რთული, სპერმატოზოიდის ფორმის ფაგები, რომლებიც შედგებიან თავის და მორჩებისაგან (წანაზარდებისაგან). ფაგის თავს აქვს სწორი ან მოგრძო ფორმა, რაც დამოკიდებულია ნუკლეინის მჟავის მდებარეობაზე. თავის საშუალო ზომაა: დიამეტრი 60-100ნმ. ზოგიერთ ფაგს მორჩი ძალიან მოკლე აქვს ან საერთოდ არ გააჩნიათ. მოგრძო კუდის ზომა მერყეობს 100-200ნმ-ის ფარგლებში. კუდს აქვს სხვადასხვა სიგრძე, სიგანე და აგებულება, როგორც წესი, სპირალური სიმეტრიის, სწორედ ამიტომ, თუ თავის აღნაგობა მრავალ ფაგს ერთნაირი აქვს, მაშინ წანაზარდის სტრუქტურაში აღინიშნება არსებითი განსხვავება. სწორედ ამ განსხვავების საფუძველზე შეიძლება გაიმიჯნოს ფაგების მორფოლოგიური ტიპები.

გამოკვლეული და კლასიფიცირებული იყო დაახლოებით 2850 ფაგი ელექტრონულ-მიკროსკოპულად [11]. ამ ჩამონათვალში არ არიან გაერთიანებული დეფექტური ფაგები, ბაქტერიოციდულად მსგავსი ფაგები და აქამდე არაკულტივირებული ფაგები. აკერმანმა და აიზენსარკმა მოგვცეს საკლასიფიკაციო სქემა. მათ განიხილეს არანაკლებ 1061 ფაგისა და გააფართოვეს ბრედლის ორიგინალური კლასიფიკაცია ახალადმოჩენილი ფაგებით. აკერმანმა კლასიფიკაციის დაზუსტებისათვის შემოიღო მორფოლოგიური ქვეტიპები [10] სადაც გათვალისწინებულია ფაგის თავისა და კუდის შეფარდებითი ზომები, თავის ფორმა და მასზე სპეციფიკური წარმონაქმნების არსებობა. 10 ოჯახი დაყოფილია 4 მორფოლოგიურ ტიპად:

1. კუდიანი ფაგები
2. კუბური უკუდო ფაგები
3. ძაფისებრი ფაგები
4. პლეომორფული უკაფსიდო (ლიპიდებიანი) ფაგები.

ელექტრონული მიკროსკოპით გამოკვლეულ 5100 ბაქტერიოფაგს შორის 4950 (96%) წანაზარდიანი (კუდიანი) ფაგია. კუდიანი (2 ჯაჭვიანი დნმ-ით) ფაგების ტიპი შედგება 3 დიდი ფილოგენეტიკური ოჯახისაგან [11,37]:

I მიოვირიდე- ფაგები გრძელი კუმშვადი წანაზარდით. ამ ოჯახში შედის წანაზარდიანი ფაგების 25%.

II სიფოვირიდე- ფაგები გრძელი, მოქნილი კუდით, რომლის შალითას არ გააჩნია შეკუმშვის უნარი. ამ ოჯახს მიეკუთვნება კუდიანი ფაგების 61% [11]. ტიპური წარმომადგენლებია: T1, T5, L5, λ ფაგები და სხვ. ოჯახი მოიცავს 6 გვარს.

III პოდოვირიდე- მოკლე წანაზარდიანი ფაგებია. ტიპური წარმომადგენლები არიან:

P22, T7 ფაგები და სხვა. ამ ოჯახში გაერთიანებულია 3 გვარის, კუდიანი ფაგების 14%. კუდიანი ფაგები დაიყო მათი თავების სიგრძის მიხედვით. წანაზარდიან ფაგებს გააჩნიათ იკოსაედრის ან ოქტაედრის ფორმის თავი. იგი შედგება თავის, კუდის და ფაკულტატური სტრუქტურებისგან, როგორცაა თავის ან კუდის ფიბრილები, საყელო, ბაზალური ფირფიტა. კაფსიდში მოთავსებულია სუპერსპირალიზებული ორძაფიანი დნმ. წანაზარდიანი ფაგები შესაძლოა იყოს ვირულენტური ან ზომიერი (50%-50%) [40].

ოჯახი *Myoviridae* წარმოდგენილია ფაგების მრავალფეროვანი ჯგუფით, რომლის ძირითადი მორფოლოგიური მახასიათებელია კუმშვადი წანაზარდი. აღნიშნული ოჯახის წარმომადგენლებს უნარი აქვთ დააინფიცირონ, როგორც გრამ-დადებითი, ასევე გრამ-უარყოფითი ბაქტერიები და არქეობაქტერიები. ვირუსების ტაქსონომიის საერთაშორისო კომიტეტის კლასიფიკაციის მიხედვით, წანაზარდიანი ფაგების სამივე ოჯახი აერთიანებს 15 გვარს, აქედან *Myoviridae*-ს ოჯახი დაყოფილია შემდეგ გვარებად: T4-ის მსგავსი ვირუსები, P1-მსგავსი ვირუსები, P2-მსგავსი ვირუსები, Mu-მსგავსი ვირუსები, SPO1-მსგავსი ვირუსები, PBS1-მსგავსი ვირუსები, H-მსგავსი ვირუსები. აღნიშნული გვარები მკვეთრად განსხვავდებიან ერთმანეთისგან სასიცოცხლო ციკლის და გენომის სტრუქტურით. მაგ.: P1-ჯგუფი ლიზოგენურ ფაგებს აერთიანებს, Mu-ტრანსპოზონებს წარმოადგენს და არ ექვემდებარება P2-ის მსგავსად საიტსპეციფიკურ რეკომბინაციებს, ხოლო T4 ლითიური ბაქტერიული ვირუსია. მათი გენომის ზომები ვარირებს 30000 ნწყ-დან 170000 ნწყ-მდე. *Myoviridae*-ს ოჯახში ფაგები ძირითადად გაერთიანებულია მორფოლოგიური ნიშნების მიხედვით.

ბრუსოვის და თანაავტორების მიერ 1996 წელს ჩატარებულმა კვლევამ ცხადყო, რომ ფაგის ერთი მორფოტიპის მეორედ გარდაქმნა მუტაციით არ ხდება. ერთი ოჯახის ფაგებს შორის შემჩნეულია მხოლოდ მცირე სტრუქტურული განსხვავებები. მაგ.: მაღალი დნმ-ის ჰომოლოგიის მქონე რემეჯაური სტრუქტოკოკური ფაგები განსხვავდებოდნენ მხოლოდ საყელოს მორფოლოგიური შენებით.

ზემოთ ჩამოთვლილი სამი ოჯახიდან დიდი ზომის კაფსიდით და დნმ-ის მაღალი შემცველობით ხასიათდება *Myoviridae*, ხოლო *Podoviridae* და *Siphoviridae*, ამ მახასიათებლებით უფრო ახლო მსგავსებას ავლენენ [40]. მორფოლოგიური კრიტერიუმი აუცილებელია, მაგრამ არასაკმარისია, რადგან არსებობენ მორფოლოგიურად იდენტური ფაგები, რომელთაც მასპინძლის განსხვავებული სპეკტრი აქვთ და პირიქით.

კუდიანი ფაგების რაოდენობა აღწევს იზოლატების 95%-ს. კუბური და ძაფისებრი ფაგები შედარებით იშვიათობას წარმოადგენენ, ამიტომ მათი დალაგება უფრო ადვილია, ვიდრე ზემოთ აღნიშნულის. გენომში G+C შემცველობა ფაგებში და მათ მასპინძლებში, წესისამებრ, საკმაოდ მსგავსია. იგივე შეიძლება ითქვას მონათესავე ფაგებში აზოტოვანი ფუძეების სიხშირეზე. მაღალი ტაქსონომიური ღირებულების

მქონეა ბაქტერიოფაგების სეროლოგიური თვისებები და ნეიტრალიზაციის ტესტები რაც საშუალებას გვაძლევს, დავაჯგუფოთ მჭიდროდ მონათესავე ვირუსები. ახლად გამოყოფილი ფაგების დასახასიათებლად აუცილებელია მასპინძლის არეალის დადგენა. შემდეგ შესამოწმებელია მორფოლოგიური და სეროლოგიური თვისებები. წესისამებრ, მორფოლოგიურად განსხვავებული ფაგები სეროლოგიურადაც განსხვავდებიან. საყურადღებოა აგრეთვე ფიზიკო-ქიმიური თვისებები, განსაკუთრებით, კუბური, ძაფისებრი და პლემორფული ფაგებისთვის. ამიტომ ვირუსების ტაქსონომიის საერთაშორისო კომიტეტმა ზუსტი კლასიფიკაციისათვის დაადგინა, რომ გამოყენებული უნდა იქნეს ვირიონისა და მისი ნუკლეინის მჟავის თვისებები: 1) ვირიონის მორფოლოგია და ზომები, 2) ნაწილაკის (მოლეკულური) მასა, სედიმენტაციური თვისებები, მისი ღებობის სიმკვრივე, 3) მოლეკულური მასა, ნუკლეინის მჟავის შეფარდებითი წილი და მისი კონფორმაცია, 4) სეროლოგიური თვისებები და ნუკლეინის მჟავის ჰიბრიდიზაციის მონაცემები, 5) ფიზიოლოგიური ტესტები და ლიზისური აქტივობის სპექტრი. გამოყოფილი ნათესაური (მსგავსი) ფაგების სახელწოდების შესახებ ერთნაირი ტერმინოლოგია არ არის, ზოგი მეცნიერი სახეობას ხმარობს, ზოგი კი ოჯახს.

ბაქტერიოფაგების კლასიფიკაციის ერთ-ერთი მნიშვნელოვანი მეთოდია ჰომოლოგიური დონეები და გენომებში მათი არსებობა. ერთ-ერთი მეთოდია აგრეთვე რესტრიქციული პროფილების შედარება ფაგის დნმ-ში. არანაკლებ მნიშვნელოვანია ფაგის შემადგენელი სტრუქტურული ცილების შესწავლა. რესტრიქციული ანალიზის მეთოდი შედარებით იოლია: რესტრიქციული ენდონუკლეაზების დიდი რაოდენობა იძლევა ფაგების დიფერენცირების საშუალებას. თუ ორი ფაგი რესტრიქციული ანალიზით მსგავსია, ეს მოწმობს მათ ნათესაობაზე ან მსგავსებაზე. ფაგების მსგავსების დასამტკიცებლად პირდაპირი მეთოდიც არსებობს. ეს არის მათი რეკომბინაციის და სიცოცხლისუნარიანი ჰიბრიდების წარმოქმნის აღმოჩენა, ასე დადგინდა მსგავსება P22 და S ფაგს შორის [126]. ბაქტერიოფაგების შედარებითი დასახასიათება უნდა ჩატარდეს გარკვეული სქემით. კერძოდ, ფაგი ჯერ უნდა მიეკუთვნოს ამა თუ იმ ცნობილ ოჯახს და შემდეგ უნდა მოხდეს მისი შედარება ამ ოჯახის სხვა ფაგებთან. ასეთი შედარება იძლევა პასუხს, მოცემული ფაგი (თუ მუტანტი) უკვე არსებული ფაგის წარმოებულა [36], თუ ამ ოჯახის ახალი წარმომადგენელი. ბრუსოვის და თანაავტორების მიერ 1996 წელს ჩატარებულმა კვლევამ ცხადყო, რომ ფაგის ერთი მორფოტიპის მეორედ გარდაქმნა მუტაციით არ ხდება. ერთი ოჯახის ფაგებს შორის შემჩნეულია მხოლოდ მცირე სტრუქტურული განსხვავებები. აუცილებელია ახლად გამოყოფილი ფაგის იდენტიფიკაცია და იმის გარკვევა, რომელ ოჯახს მიეკუთვნება იგი, რადგან ერთი ოჯახის ფაგებს გააჩნიათ მსგავსი გენეტიკური ორგანიზაცია, მათი გენომები შეგვიძლია წარმოვიდგინოთ, როგორც გენების ბლოკების მოდულების შემადგენლობა.

საყოველთაოდ ცნობილი ფაგური ნომენკლატურის არარსებობამ განაპირობა ის, რომ ახალი ფაგის დასახელებისათვის 1983 წელს აკერძანმა შემოგთავაზა წესები:

1. უარყოფა მხოლოდ ერთადერთი ასოსი ან ერთადერთი რიცხვის, ისევე აუცილებელია, როგორც უარყოფა ძალიან ხშირად გამოყენებული ასოსი P და F.
2. მასპინძლის და რიცხვის, გვარის და სახეობის ინტერნაციონალური გამოყენება.
3. უკვე ცნობილი ფაგების ახალი იზოლატების აღნიშვნა გამოყოფის ადგილის ინიციალების დამატებით.

ვირუსების ტაქსონომიის საერთაშორისო კომიტეტმა (1992 ICTV), როგორც ხერხემლიანების, უხერხემლოების და მცენარის ვირუსებისთვის, ასევე ბაქტერიების ვირუსებისათვის, განსაზღვრა ვირუსების ოჯახები. თანამედროვე კლასიფიკაციის მიხედვით ბაქტერიოფაგები გაერთიანებულია *Caudovirales* კლასის 13 ოჯახში და 31 გვარში. კლასიფიკაცია დამყარებულია შემდეგ კრიტერიუმებზე:

1. ვირიონის ულტრასტრუქტურა: ბინალური სიმეტრიის (წანაზარდიანი), კუბური, სპელიკალური (სპირალური), ფილამენტურიან პლეიომორფული;
2. ნუკლეინის მუავის ტიპი;
3. შემადგენლობა და ანტიგენური თვისებები;
4. მოლეკულური მასა;
5. პატრონ-უჯრედების წრე.

1.2.3. ბაქტერიოფაგების ძირითადი ტიპები

ბაქტერიოფაგები, ისევე როგორც ვირუსები, შედგებიან ნუკლეინის მუავისა და ცილისაგან. მათი უმეტესობა შეიცავს დნმ-ს, ხოლო ზოგიერთი რნმ-ს. ფაგური დნმ შესაძლოა იყოს ერთაფიანი ან ორბაფიანი; ხაზობრივი ან ჩაკეტილი, ციკლური. ნაწილი ფაგების შემადგენლობაში აღმოჩენილია უჩვეულო აზოტოვანი ფუძეები, მაგალითად: T2 ფაგს აქვს 5-მეთილციტოზინი, რომელიც ციტოზინს ცვლის. *B. subtilis*-ის ფაგს თიმილის შემცვლელი 5-მეთილურაცილი აქვს. ფაგის თავის კაფსიდი და მორჩის შალითა აგებულია მოწესრიგებული პოლიპეპტიდური სუბერთეულებისგან, რომლებიც თავში განლაგებულნი არიან კუბური, ხოლო მორჩში-სპირალური სიმეტრიით. მიუხედავად ფაგების ნაირგვარობისა, მათ ბევრი საერთო თვისება აქვთ. მაგ.: ფაგის უჯრედში შეჭრის შემდეგ უჯრედის მეტაბოლიზმში ჩარევა და სხვა. ყველა ბაქტერიოფაგის საერთო ნიშანია უჯრედშიდა პარაზიტიზმი. ფაგისა და პატრონ-უჯრედის ურთიერთქმედების დონე სხვადასხვა ფაგის შემთხვევაში სხვადასხვაა. მაგ.: *E.coli*-ს მიმართ სპეციფიკურ T-წვეილ ფაგებს გააჩნიათ გენები, რომლებიც ფუნქციურად გარკვეული ბაქტერიული გენების მსგავსნი არიან. ასეთი ფაგები შედარებით ავტონომიურები არიან. ბაქტერიოფაგის და უჯრედის ურთიერთობის მიხედვით ფაგები შეიძლება დაიყოს 3 ტიპად, კერძოდ: 1) ჭეშმარიტად ვირულენტური ფაგები. ვირულენტური ფაგით უჯრედის ინფიცირების დროს ხდება ინფიცირებული უჯრედის დაშლა და ფაგის შთამომავლობის გამოსვლა (აბორტული ინფექციის გარდა). ასეთ ფაგებს უწოდებენ ჭეშმარიტად ვირულენტურ ფაგებს, არსებობს ზოგიერთი ფაგების ვირულენტური მუტანტებიც. 2) ზომიერი ფაგები. ზომიერი ფაგით უჯრედის ინფიცირება შეიძლება განვითარების სხვადასხვა გზით ჩამოყალიბდეს: 1) ლიზისური, მსგავსად ვირულენტური ფაგების ლიზისური ციკლისა, 2) ლიზოგენური, როცა ზომიერი ფაგის გენომი გადადის განსაკუთრებულ – პროფაგურ მდგომარეობაში. ლიზოგენურ ბაქტერიაში გარკვეულ პირობებში შესაძლოა მოხდეს ფაგის ლიზისური გამრავლება. 3) ფაგები, რომლებიც უჯრედის ინფიცირების შემდეგ არ იწვევენ მის დაშლას. უჯრედი, რომელიც დასნებოვნებულია ასეთი ფაგით, იმყოფება განუწყვეტელი (პერმანენტული) ინფექციის მდგომარეობაში. ფაგის ასეთი განუწყვეტელი პროდუცირების გამო უჯრედის გაყოფის სიჩქარე რამდენადმე შენელებულია. ასეთი ტიპისაა ძაფისებური (ფილამენტური) ფაგები.

ბაქტერიოფაგები, რომლებიც იწვევენ პროდუქციულ ინფექციას და ფაგის სიცოცხლისუნარიან შთამომავლობას, იწოდებიან არადეფექტურ ფაგებად. ყველა არადეფექტური ფაგისათვის ცნობილია 2 ან 3 მდგომარეობა:

- 1) არაუჯრედული (თავისუფალი, მომწიფებული ფაგის მდგომარეობა);
- 2) ვეგეტაციური ფაგი;
- 3) ზომიერი ფაგისათვის არსებობს პროფაგის მდგომარეობა.

1.2.4. ბაქტერიოფაგის განვითარების ძირითადი სტადიები

1.2.4.1 ბაქტერიოფაგის აღსორბცია და დნმ-ის ექვეყცია

ფაგისა და ბაქტერიის ურთიერთქმედება იწყება ფაგის მიერთებით (აღსორბციით) უჯრედის სტრუქტურებთან–რეცეპტორებთან. აღსორბციის პროცესი (კინეტიკა) სხვადასხვა ფაგში განსხვავებულად მიმდინარეობს. მსგავსი ფაგის შემთხვევაში რეცეპტორული უბნები შეიძლება განსხვავებული იყოს და პირიქით. არის ფაგები, რომლებიც აღსორბციისათვის იყენებენ ბაქტერიის სპეციფიურ წარმონაქმნებს ე.წ. პილებს. უმეტესობა ფაგებისათვის აღსორბციის პროცესი შეუქცევადია, რომელიც უჯრედში ფაგის გენომის ექვეყციით მთავრდება. ნაჩვენებია, რომ შესაძლებელია ზოგიერთი ფაგისათვის ექვეყციის პროცესის სტიმულირება. ამ დროს მიმდინარეობს გრავიტაციული ურთიერთქმედება ფაგის კუდის გამონაზარდსა და ციტოპლაზმურ მემბრანის ცილოვან კომპონენტებს შორის, ამ სახის სტიმულაცია ხელს უწყობს უჯრედში ფაგის გენომის დროზე ადრე შეჭრას. ხშირად ფაგის აღსორბციული აპარატის მოქმედებით ხდება უჯრედის მემბრანული შეღწევადობის პოტენციალის ცვლილება. ამ დროს შეიძლება დაირღვეს უჯრედის ბიოქიმიური აქტივობა. რისი თავიდან ასაცილებლადაც ფაგს გააჩნია გენები, რომლებიც ახორციელებენ ინფიცირებული უჯრედის მემბრანის მთლიანობის და დაურღვევლობის კონტროლს. რეცეპტორების ქიმიური ბუნება ერთი ოჯახის ფაგების შემთხვევაშიც შეიძლება სხვადასხვა იყოს. რეცეპტორი შეიძლება წარმოადგენდეს ცილოვან მოლეკულას, პოლისაქარიდს, ლიპოპოლისაქარიდებს, ლიპოპროტეინებს და სხვა. აღსორბციის პროცესის რაოდენობრივი დახასიათებისათვის იყენებენ 2 ძირითად მეთოდს:

- ა) ნარევის ქლოროფორმირების მეთოდი;
- ბ) ბაქტერიული უჯრედების დალექვა ცენტრიფუგების გზით. ამ მეთოდებით განისაზღვრება ინფიცირებული და არაინფიცირებული ბაქტერიების რაოდენობა, ინფექციის მრავლობითობა (ფაგური ნაწილაკების საშუალო რაოდენობა 1 ბაქტერიაზე). რაც შეეხება ფაგის გენომის გამოსვლას კაფსიდიდან და მის უჯრედში შეღწევას, ამ პროცესს ახორციელებს სპეციალური ლიზისური ფერმენტების მოქმედება. მათი მოქმედება შეიძლება ისეთი ეფექტური იყოს, რომ ინფექციის მაღალი მრავლობითობის დროს უჯრედის გარსი დაიშალოს და ფაგის შთამომავლობა არ იქნეს მიღებული. ამ პროცესს უწოდებენ ლიზისს, გამრავლების გარეშე. ფაგს ექვეყციის თავისებური მექანიზმი აქვს. T4 ფაგის გენომის შესვლა უჯრედში კუდის შალითის შეკუმშვით ხდება. T5 ფაგის გენომის შესვლა 2 სტადიად მიმდინარეობს: ჯერ დნმ-ის ერთი ნაწილი შედის უჯრედში, შემდეგ მეორე. აღსორბციული რეცეპტორების რაოდენობა ყოველი ფაგის ოჯახისათვის განსაზღვრულია, ამიტომ ფაგის აღსორბციული თვისებების შესწავლა უკვე ადრე არსებული ფაგოგამძლე

ბაქტერიულ მუტანტებზე შესაძლებლობას იძლევა, რომ გადაირჩეს გამძლე, ბაქტერიული მუტანტები. მეცნიერების მიერ არსებობს მოსაზრება, რომ კოველოლუცია ბაქტერია-ფაგი გარკვეულად შეზღუდულია. შეზღუდვა განპირობებულია ფაგის ცილების და ბაქტერიის რეცეპტორული აპარატის თვისებებით. ზოგიერთმა მუტაციებმა ბაქტერიებში შეიძლება გამოიწვიონ მექანიკური წინააღმდეგობა ადსორბციაში. თუ მაგალითად, რეცეპტორული უბანი ბაქტერიული კედლის ზედაპირის ტიპოლოგიის შეცვლით აღმოჩნდება ჩადრმავებული, ფაგის ადსორბციულ აპარატს არ შეუძლია მასთან პირდაპირი შეხება. ძალიან ძნელია გადაირჩეს ისეთი მუტანტური ფაგები, რომელთაც ექნებათ გაფართოებული მოქმედების სპექტრი იმ ბაქტერიული მუტანტების მიმართ, რომლებსაც რეცეპტორული უბანი საერთოდ დაკარგული აქვთ. (მაგ. “nonsense” – მუტაციის დროს შესაბამის გენში).

1.2.4.2 ბაქტერიოფაგის უჯრედშიდა განვითარება

ფაგის გენომის შეჭრის შემდეგ იწყება ფაგის ვეგეტატიური უჯრედშიდა გამრავლება. სხვადასხვა ფაგს უჯრედშიდა განვითარების ეტაპი განსხვავებული აქვს. ფაგების უჯრედშიდა განვითარება ყველაზე კარგად არის შესწავლილი E.coli-ს T-წყვილი ფაგების მაგალითზე. ფაგის დნმ-ის შეჭრის შემდეგ უჯრედში იწყება მისი ტრანსკრიფცია (ინფორმაციული რნმ-ის წარმოქმნა ბაქტერიული რნმ-პოლიმერაზის საშუალებით). ამ დროს მიმდინარეობს ტრანსკრიფციის ფაზების მონაცვლეობა (ადრეულის წინა, ადრეული, გვიანი) და განსაზღვრული ცილების თანმიმდევრული წარმოქმნა, რომლებიც, თავის მხრივ, ხელს უწყობენ განვითარების ეტაპების სწორ მსვლელობას. ადრეულის წინა პერიოდში ხდება ციტოპლაზმური მემბრანის ფუნქციების გაძლიერება. ადრეულ პერიოდში ხდება გენომის რეპლიკაცია (მაგ. ფაგში). რეპლიკაციის ყოველი ეტაპი და მათი სქემა კონტროლდება ფაგის გენომის განსაზღვრული პროდუქტით. რეპლიკაციის განხორციელებისათვის აუცილებელია, რომ ფაგის გენომი იყოს განსაზღვრულ ფორმაში, კერძოდ დაცული იყოს უჯრედული ნუკლეაზებისაგან და დნმ-ის მოლეკულის ბოლოებზე განხორციელდეს გენომის უბნების რეპლიკაცია. ზოგიერთ ფაგს ეს ფორმა უყალიბდება დნმ-ის რამდენიმე მოლეკულის გაერთიანებით, რომლებიც პირველადი რეპლიკაციის დროს წარმოიქმნება. ხდება რეკომბინაციული ტიპის - „თავი და ბოლო“ ფორმირება (მაგ. T ტიპის ფაგებში). სხვა ფაგები, კერძოდ, λ ფაგი წარმოქმნიან დნმ-ის რგოლურ ფორმას მოლეკულის ბოლოებზე არსებული წებოვანი დაბოლოებების საშუალებით (კომპლემენტარული ერთჯაჭვიანი ნუკლეოტიდების თანმიმდევრობა). განსხვავებულია ტრანსპოზონის დნმ-ის რეპლიკაცია, რაც ხორციელდება ფაგის გენომის ჩაჯდომით ბაქტერიის გენომში (ტრანსპოზიცია). ამის შედეგად ფაგის გენომის დაბოლოებები მუდმივად უკავშირდებიან ბაქტერიის დნმ-ში ნუკლეოტიდების თანმიმდევრობას და დაცულნი არიან ბაქტერიული ნუკლეაზების ზემოქმედებისაგან. დნმ-ის რეპლიკაციასთან ერთად მიმდინარეობს ფაგის გენომის რეკომბინაცია, რომელიც შეიძლება აღმოვაჩინოთ რეკომბინატების არსებობით, მაგ. თუ უჯრედი ინფიცირდება 2 გენეტიკურად (მარკირებულით) სხვადასხვა ფაგით. დნმ-ის სინთზის დაწყების შემდეგ, როდესაც წარმოიქმნება ფაგის რამდენიმე გენომი, იწყება გვიანი გენების წაკითხვა, ანუ გვიანი გენების პოზიტიური რეგულაცია. გვიანი გენები აკონტროლებენ სხვადასხვა ცილებს ვირუსული ნაწილაკების აუცილებელი შენებისათვის, როგორცაა: სტრუქტურული ცილები, ფერმენტები: მემბრანაზა, ენდოლიზინი და სხვ..

პრაქტიკულად, თითქმის ყველა შესწავლილი ფაგის გენომში მოცემულია არსებითი და არაარსებითი გენები. ეს უკანასკნელნი არ არიან აუცილებელი ფაგის განვითარების ციკლის განხორციელებისათვის. თუმცა ზოგჯერ, გარკვეულ პირობებში, ამ გენების არსებობა ასევე ხდება აუცილებელი ფაგის სრულყოფილად განვითარებისათვის. ფაგის უჯრედშიდა განვითარების ბოლო ეტაპზე ხდება ე.წ. „ლიზისის დროის“ ჩართვა. ე.ი. ამოქმედდება ფაგის ფუნქცია დაშალოს უჯრედის გარსი და გამოათავისუფლოს მომწიფებული ფაგური ნაწილაკები. სხვადასხვა ფაგის შემთხვევაში „ლიზისური დროის“ მექანიზმი სხვადასხვანაირად მოქმედებს. ნივთიერების (სეკრეტის) გამოყოფა უშუალოდ ფაგის მიერ არ ხდება, არამედ ხდება ორი ლიზისური ფერმენტის წარმოქმნის გაკონტროლება (T წყვილ და λ ფაგებში) ერთი შლის უჯრედულ მემბრანას, მეორე კი – უჯრედული გარსის რიგდულ მუკოპოლიმერულ შრეს. λ და P22 ფაგებში ეს გენები განლაგებული არიან ერთმანეთის გვერდით გენომში და ტრანსკრიპციის ერთი და იგივე ერთეულში შედიან. ხოლო T4 ფაგში, ლიზისის მაკონტროლირებელი ფერმენტების გენები რეგულირდება ცალ-ცალკე, მაგრამ შეთანხმებულად. ლიზისის აუცილებელი პირობაა– ფოსფორილირებისა და მემბრანის მთლიანობის დაცვის მექანიზმების შეწყვეტა.

1.2.4.3 ბაქტერიოფაგის მოქმედებით გამოწვეული პატრონ უჯრედის ლიზისი

ბაქტერიოფაგით ინფექციას მოყვება ფაგით გამოწვეული პატრონ უჯრედის ლიზისი. ბევრ ბაქტერიოფაგს ამგვარ პროცესში სჭირდება ორი, ფაგით კოდირებული ცილის მოქმედება. პირველი არის ე.წ. ჰოლინი, პატარა ტრანსმემბრანული პროტეინი, რომელიც წარმოშობს მცირე ზომის დაზიანებებს ციტოპლაზმურ მემბრანაში. ეს დაზიანებები ფუნქციონირებენ, როგორც ფორები და აძლევენ საშუალებას განთავისუფლდეს მეორე ცილა–ენზიმი, რომელსაც აქვს პეპტიდოგლიკანის-ჰიდროლიზის უნარი.

1.2.4.4 ვირულენტური ბაქტერიოფაგების სასიცოცხლო ციკლი

ფაგის ბაქტერიულ უჯრედზე ადსორბციით იწყება განვითარების ლიზისური ციკლი [40,93]. ბაქტერიოფაგის ადსორბცია პატრონ უჯრედზე მკაცრად სპეციფიკურია და ზედაპირული სტრუქტურების-რეცეპტორების საშუალებით ხორციელდება. გრამ-უარყოფით ბაქტერიაში ნებისმიერი ცილა, ოლიგოსაქარიდი, ლიპოპოლისაქარიდი შეიძლება წარმოადგენდეს რეცეპტორს ფაგისათვის. მორფოლოგიურად მსგავსი ფაგების რეცეპტორული უბნები შეიძლება განსხვავებული იყოს და პირიქით. არის ფაგები, რომლებიც ადსორბციისათვის იყენებენ ბაქტერიის სპეციფიკურ წარმონაქმნებს ე.წ. პილებს. ადსორბციის პროცესი, მისი კინეტიკა, სხვადასხვა ფაგის შემთხვევაში განსხვავებულია. ადსორბციის სისწორე ხშირად დამოკიდებულია მრავალ გარემო ფაქტორზე და მასპინძელი მიკრობის ფიზიოლოგიურ მდგომარეობაზე. მაგალითად λ რეცეპტორების ექსპრესია ხდება მხოლოდ მალტოზის შაქრის თანაარსებობისას [129]. მრავალი ფაგისთვის სხვადასხვა კოფაქტორების არსებობაა აუცილებელი, მაგალითად Ca^{2+} , Mg^{2+} იონების, ან სხვა მარტივი კათიონების. მუტაციების დროს, რომელსაც თან ახლავს ბაქტერიული რეცეპტორების ცვლილება,

უჯრედი კარგავს ფაგის ადსორბციის უნარს და იძენს რეზისტენტობას მის მიმართ. უმეტესობა ფაგებისათვის ადსორბციის პროცესი შეუქცევადია, რომელიც უჯრედში ფაგის გენომის ექვევით მთავრდება.

ბაქტერიოფაგის გენომი კუდის გავლით შედის უჯრედში. ეს პროცესი არ განიხილება როგორც დნმ-ის მარტივი ინექცია, ამ პროცესში ჩართულია დნმ-ის ტრანსფერის რამდენიმე მექანიზმი [129]. ფაგის ადსორბციის შემდეგ, უჯრედის კედლის შემადგენლობაში არსებული თუთიის იონები (Zn^{2+}) იწვევს ფაგის კუდის დისტალური ნაწილის ბოჭკოების გაგლეჯას. გამოთავისუფლებული ბაზალური ფირფიტა, კუდის დისტალურ ნაწილში მოთავსებული ფერმენტის ენდოლიზინის (ლიზოციმის) გამოყოფით ახდენს ბაქტერიული უჯრედის კედლის მიმდებარე ფრაგმენტის ლიზირებას. ამავდროულად შალითაში გამოთავისუფლებული Ca^{2+} იონები იწვევს ატფ-აზას აქტივირებას, რაც თავის მხრივ განაპირობებს შალითის შეკუმშვას და უჯრედში ციტოპლაზმატური მემბრანის გავლით კუდის ღერძის შეჭრას. ამის შემდგომ ადგილი აქვს ვირუსული დნმ-ის უჯრედის ციტოპლაზმაში სწრაფ გადასვლას [40,129]. გრავიტაციული ურთიერთქმედებით ფაგის კუდის გამონაზარდსა და ციტოპლაზმურ მემბრანის ცილოვან კომპონენტებს შორის, შესაძლებელია ზოგიერთი ფაგისათვის ექვევით პროცესის სტიმულირება. მსგავსი სტიმულაცია ხელს უწყობს უჯრედში ფაგის გენომის დროზე ადრე შეჭრას [110,111]. ხშირად ფაგის ადსორბციული აპარატის მოქმედებით ხდება უჯრედის მემბრანული შეღწევადობის პოტენციალის ცვლილება. ამ დროს შეიძლება დაირღვეს უჯრედის ბიოქიმიური აქტივობა. რის თავიდან ასაცილებლად ფაგს გააჩნია გენები, რომლებიც ახორციელებენ ინფიცირებული უჯრედის მემბრანის მთლიანობის და დაურღვევლობის კონტროლს [125].

უჯრედში ფაგის დნმ-ის ინექციის შემდეგ საწყის საფეხურს წარმოადგენს მასპინძლის რნმ-პოლიმერაზას მიერ ფაგის პრომოტორის შეცნობა და ადრეული გენების ტრანსკრიფცია [125]. ამ გენების პროდუქტები იცავენ ფაგურ დნმ-ს და ახდენენ მასპინძელი უჯრედის რესტრუქტურისა: ინაქტივირებენ მასპინძელი უჯრედის პროტეაზებს, რესტრიქციულ ენზიმებს, შლიან სხვადასხვა ცილებს. შუალედური გენების ტრანსკრიფცია მიმართულია ფაგის ახალი დნმ-ის სინთეზისთვის. შუალედურ გენებს მოყვება გვიანი გენები, რომლებიც უკვე კოდირებენ ფაგური ნაწილაკების ასაწყობ სტრუქტურებს. ახალი ფაგების თავმოყრას უჯრედში ეწოდება ფაგის მომწიფება. ფაგის დნმ-ის ინექციიდან ფაგების ახალი შთამომავლობის გამოთავისუფლებამდე დროის ინტერვალს ეწოდება ლატენტური პერიოდი [128]. ლატენტური პერიოდი დამოკიდებულია მასპინძლის ფიზიოლოგიაზე და მერყეობს 20 წთ-დან 30-40 სთ-მდე.

ფაგის სასიცოცხლო ციკლის საბოლოო საფეხური, რომელიც მოჰყვება ბაქტერიოფაგით ინფექციას, არის ფაგის ახალი თაობის გამოთავისუფლება და მასპინძელი უჯრედის ლიზისი [129, 138]. კუდიან ბაქტერიოფაგებს ამგვარ პროცესში სჭირდებათ ფაგით კოდირებული ორი ცილის მოქმედება. პირველი არის ე.წ. პოლინი, პატარა ტრანსმემბრანული პროტეინი, რომელიც წარმოშობს მცირე ზომის დაზიანებებს ციტოპლაზმურ მემბრანაში. ეს დაზიანებები ფორების ფუნქციას ასრულებს და აძლევს საშუალებას გათავისუფლდეს მეორე ცილა – ენზიმი-ლიზინი, რომელსაც აქვს პეპტიდოგლიკანის ჰიდროლიზის უნარი. სხვადასხვა ფაგის შვილედულ პოპულაციებში ვირიონების რაოდენობა მეტ-ნაკლებად მუდმივია და იწოდება, როგორც ფაგის გამოსავლიანობა, ანუ ფაგის გამოსავალი.

ვირულენტური ფაგი შესაძლებელია აღმოჩნდეს ე.წ. ფსევდოლიზოგენურ მდგომარეობაში, რომელსაც ზოგჯერ მტარებლობას უწოდებენ [129]. ცნობილია ფსევდოლიზოგენიის რამდენიმე მექანიზმი. ზოგჯერ ის ვითარდება ბაქტერიების ფაგისაგან დროებითი იზოლაციის შედეგად. ეს გამოყოფა შესაძლებელია სუფთა მექანიკურ ხასიათს ატარებდეს, მაგალითად, რომელიმე წებოვანი სუბსტრატი უჯრედებს გარს ეკვრის და ხელს უშლის ფაგებით მათ სწრაფ ინფიცირებას. ხშირ შემთხვევაში ფსევდოლიზოგენიას განსაზღვრავს საკვები ნივთიერებების ნაკლებობა. ასეთ დროს არ არის საკმარისი ენერჯია იმისთვის, რომ ფაგმა განახორციელოს თავისი სასიცოცხლო ციკლი და ფაგის გენომი მასპინძელი უჯრედის შიგნით არის არააქტიურ მდგომარეობაში.

1.2.4.5 ზომიერი ბაქტერიოფაგების საციცოცხლო ციკლი

ზომიერი ფაგებისთვის დამახასიათებელია სასიცოცხლო ციკლის 2 გზა: ლიზისური ან ზომიერი. ის, თუ რომელი გზით წარიმართება სასიცოცხლო ციკლი, დამოკიდებულია ბაქტერიული უჯრედის ფიზიოლოგიური მდგომარეობის განმსაზღვრელ მრავალ ფაქტორზე [40,128]. ლიზისური გზის შემთხვევაში, ლიზოგენური ფაგები გადიან განვითარების იგივე ეტაპებს, რასაც ლიტიური ფაგები. ზომიერი სასიცოცხლო ციკლის შემთხვევაში, ფაგური დნმ ინტეგრირდება ბაქტერიულ დნმ-ში პროფაგის სახით და რეპლიცირდება სინქრონულად ბაქტერიულ გენომთან ერთად. სწორედ ამ მოვლენას ლიზოგენია ეწოდება, ხოლო ბაქტერიულ კულტურას ლიზოგენური. ლიზოგენია საკმაოდ სტაბილური თვისებაა და მხოლოდ გარკვეული გარემო ფაქტორების გავლენით აღინიშნება ფაგის ვირულენტობის განმსაზღვრელი გენების სტიმულაცია და ფაგის ინდუქცია [40,128]. ლიზოგენიის კონცეფციას გააჩნია ცვალებადი ისტორია. ფაგის პირველ მკვლევარებს 1920-1930 წლებში სჯეროდათ, რომ ფაგი დაკავშირებული იყო ბაქტერიასთან და თავად ბაქტერიას ჰქონდა ფაგების სპონტანური გენერაციის უნარი, რომელიც პრინციპში ამ დროს უფრო ფერმენტად მიიჩნეოდა და არა ცოცხალ ვირუსად [40,112]. შემდგომში ნახეს, რომ ეს უჯრედები მრავლდებოდნენ ფაგის პროდუქციის გარეშე, თუმცა გარკვეულ შემთხვევაში მათ შეამჩნიეს უჯრედის სპონტანური ლიზისი და არეში თავისუფალი ფაგი. ლვოფმა ფაგის უჯრედშიდა მდგომარეობას პროფაგი უწოდა და მოგვიანებით აჩვენა, რომ ლიზოგენური უჯრედის ულტრაიისფერი დასხივებით ადგილი ჰქონდა პროფაგის ლიტიური ზრდის ინიციაციას და შედეგად ფაგის ინდუქციას [128]. ლიზოგენიის მოვლენას ხშირად თან ახლავს ე.წ. ლიზოგენური კონვერსია, რომლის დროსაც აღინიშნება ვირუსული დნმ-ით გამოწვეული ბაქტერიული უჯრედის გენეტიკური თვისებების ცვლილება [42,80]. ლიზოგენურ ფაგებს უნარი აქვთ გადაიტანონ მასპინძელი უჯრედის გენები ერთი ბაქტერიიდან მეორეში (ტრანსდუქცია) [41,128]. მრავალ ლიზოგენურ ფაგს გააჩნია ინტეგრირებისთვის სპეციფიკური საიტები. ამ შემთხვევაში ტრანსდუქცია მოიხსენიება, როგორც სპეციალიზირებული ტრანსდუქცია. სხვა ფაგებისთვის დამახასიათებელი არ არის ინტეგრირებისთვის სპეციალური უბნების არსებობა და ისინი ინტეგრირდებიან ბაქტერიული დნმ-ის ნებისმიერ უბანში, შემთხვევითად. ასეთი სახის ტრანსდუქცია უკვე მოიაზრება, როგორც გენერალიზირებული ტრანსდუქცია [128].

ფაგების როლი ბუნებაში, როგორც გენების ჰორიზონტალურად გადატანებისა, საკმაოდ დიდია, განსაკუთრებით ბაქტერიების ევოლუციის თვალსაზრისით [41]. მიკრობთა ვირუსები მიიჩნევიან ბაქტერიებს შორის გენების, მათ შორის ანტიბიოტიკორეზისტენტული გენების ჰორიზონტალურ გადატანაში მონაწილე ყველაზე მეტად გავრცელებულ ვექტორებად. თანამედროვე კვლევები მოწმობს, რომ ფაგები რეზისტენტული გენების რეზერვუარს წარმოადგენენ და მონაწილეობენ მათ გავრცელებაში, ფილოგენეტიკურად არამონათესავე მიკრობებს შორისაც კი. ფაგებით გენების ჰორიზონტალური გადატანა საკმაოდ ხშირი მოვლენა უნდა იყოს, რაც ახსნის ანტიბიოტიკორეზისტენტული გენების ასეთ მრავლობითობას და გავრცელების ფართო არეალს.

12.5. ბაქტერიოფაგების ბიოლოგიური თვისებები და გარემო ფაქტორების მიმართ რეზისტენტობა

ბაქტერიოფაგებს ახასიათებთ ანტიგენური თვისებები. ორგანიზმში მათი შეყვანის შემდეგ წარმოიქმნება ანტისხეულები, რომლებიც ფაგის აქტივობას ანეიტრალებენ და ახასიათებთ მაღალი სპეციფიკურობა. ფაგები შეიცავენ ტიპოსპეციფიკურ და ჯგუფოსპეციფიკურ ანტიგენებს. ტიპოსპეციფიკური ანტიგენების მიხედვით მათ ყოფენ სეროტიპებად.

ფაგები ფიზიკური და ქიმიური ფაქტორებისადმი უფრო მაღალი გამძლეობით ხასიათდებიან, ვიდრე ადამიანის ვირუსები. მათი უმრავლესობა ინაქტივირდება არანაკლებ 65-70°C-ზე. კარგად იტანენ გაყინვას და შენახვას დაბალ ტემპერატურაზე, ასევე, გამოშრობას. სულემის 0,5%-იანი, ფენოლის 1%-იანი ხსნარები ვერ ახდენენ მათზე შესამჩნევ გავლენას, ხოლო ფორმალინის 1%-იანი ხსნარი რამდენიმე წუთში იწვევს მათ ინაქტივაციას, მათ აქვთ მაღალი მგრძობელობა მჟავებისადმი. ულტრაიისფერი სხივები და მაიონიზირებელი რადიაცია ახდენს ფაგების ინაქტივაციას, ხოლო დაბალი დოზები იწვევენ მათ მუტაციას.

12.6. ბაქტერიოფაგების დახასიათებისა და იდენტიფიკაციის მეთოდები

ბაქტერიოფაგების კვლევაში მათი დახასიათებისათვის გამოიყენება შემდეგი სტანდარტული მახასიათებლები: ფაგის ერთჯერადი გამრავლების ციკლი (ეგც), ნეგატიური კოლონიების დახასიათება, ლიზისური აქტივობის სპექტრი, სეროლოგიური მახასიათებლები, ფაგური ნაწილაკების ფიზიკო-ქიმიური თვისებები, ფაგის დნმ-ის ტიპი და რესტრიქციული პროფილი [5,6].

ფაგის ერთჯერადი გამრავლების ციკლი. ფაგის ერთჯერადი გამრავლების დროს უნდა იქნეს უზრუნველყოფილი ფაგის განვითარების დაწყება ერთდროულად ინფიცირებული ბაქტერიების უმრავლესობაზე. ამის მიღწევა შეიძლება სხვადასხვა მეთოდით. ფაგები, რომლებიც კარგად აღსორბირდება, თხევად არეზე აღსორბციას განიცდიან დაახლოებით 3-5- წთ-ის განმავლობაში. ერთჯერადი გამრავლების გზა აჩვენებს განვითარების თითოეული პერიოდის ხანგრძლივობას. ფაგის უჯრედშიდა გამრავლების დროს ყოფენ 3 პერიოდად: ეკლიფსური (ფარული), ლატენტური და ლიზისის დრო. ფარულ პერიოდში (დრო ინფექციის დაწყებიდან ანუ ფაგის გენომის

ბაქტერიაში შესვლიდან პირველი მომწიფებული ფაგების წარმოქმნამდე ხორციელდება უჯრედშიდა განვითარების ყველა პროცესი, რომელიც ფაგის მომწიფებისათვის არის აუცილებელი. ფარული და ლატენტური პერიოდების ხანგრძლივობა ჩვეულებრივ ერთერთი შედარებით დამახასიათებელი თვისებაა ამა თუ იმ ფაგისათვის. სტანდარტული ცდების პირობებში საკონტროლო ფაგის თანაობისას შეიძლება მოხდეს შედარება კონტროლთან. ლიზისის და ლატენტური პერიოდის ხანგრძლივობა სხვადასხვაა. ლიზისის დრო და ინფექციის მრავლობითობა არ იძლევა ფაგის იდენტიფიკაციის საშუალებას.

ნეგატიური კოლონია (ნკ). ეს მახასიათებელი ახლად გამოყოფილი ფაგის პირველადი იდენტიფიკაციის საშუალებაა. ფაგის ნეგატიური კოლონია მყარ ან ნახევრადთხევად აგარზე წარმოიქმნება ფაგის მიერ ბაქტერიული უჯრედის ინფიცირების შედეგად. ფაგის იდენტიფიკაციისას თუნდაც ნათესაური ფაგების შემთხვევაში ნეგატიური კოლონიის ფორმა და ზომა არის საკმაოდ სპეციფიკური თვისება. ნეგატიური კოლონიით შეიძლება ერთი ფაგის მეორისაგან განსხვავება: ცენტრალური ლიზისის ზონის სიდიდით, სიმღვრივით, ორეოლის არსებობით, მისი ფორმით და ზომით, ოპალესენციის უნარით. ნეგატიური კოლონიების შედარებით არ შეიძლება შეფასდეს ფაგების მსგავსება, მაგრამ თუ ორი ფაგის ნეგატიური კოლონია ერთმანეთისაგან განსხვავდება, ეს ფაგები არ შეიძლება იდენტურნი იყვნენ [3,4, 7, 180].

ლიზისური აქტივობის სპექტრი, ანუ მასპინძელ ბაქტერიათა სპექტრი წარმოადგენს ბაქტერიოფაგების დახასიათებისა და იდენტიფიკაციის ერთ-ერთ საშუალებას და მას დიდი საკლასიფიკაციო მნიშვნელობა აქვს. იმისათვის, რომ ლიზისური აქტივობა გამოყენებული იქნეს ფაგის საიდენტიფიკაციოდ აუცილებელია:

- აღებულ იქნეს პოტენციური მასპინძლების ფართო სპექტრი და აგრეთვე მათი სხვა ნათესაური სახეობების ბაქტერიები
- უნდა შემოწმდეს ფაგის აქტივობა სხვადასხვა მუტანტებზე— შტამებზე, რომლებიც სხვა ფაგების მიმართ რეზისტენტულნი არიან;
- შესაძლებელია, დადგინდეს, თუ რატომ არ არის ფაგი აქტიური ამა თუ იმ შტამის მიმართ; მისი განვითარების რომელი პერიოდის დათრგუნვა ხდება მასპინძელ უჯრედში (აღსორბცია, უჯრედშიდა გამრავლება) [7,11,49].

ანტიფაგური შრატის გამოყენება ბაქტერიოფაგების იდენტიფიკაციისათვის. სპეციფიკური ანტიფაგური შრატები ერთერთი უმთავრესი საშუალებაა ფაგების იდენტიფიკაციისა და კლასიფიკაციისათვის. ანტიფაგური შრატების მომზადების მეთოდი მარტივია, ხოლო ნეიტრალიზაციის ჯვარედინი რეაქცია— საკმარისად ზუსტი, რომლის შედეგად შეიძლება დადგინდეს არის თუ არა ორი ფაგი ერთმანეთის მსგავსი. თუ ერთი და იგივე წყაროდან მცირე დროის პერიოდში გამოყოფილი იყო 2 ფაგი, რომელთაც აქვთ ერთნაირი მგრძობელობა ანტიფაგური შრატის მიმართ, მაგრამ განსხვავდებიან ლიზისური აქტივობის სპექტრით, მიუთითებს, რომ გვიან აღმოჩენილი ფაგი წარმოადგენს პირველი ფაგის მუტანტს (ფაგის აქტივობის სპექტრის გაზრდით). მსგავსი ფაგები შეიძლება აღმოჩნდნენ სხვადასხვა სეროტიპებშიც.

ფაგური ნაწილაკების ფიზიკო-ქიმიური თვისებები. ფაგის ვირიონის მორფოლოგიური თვისებები, რომლებიც შეისწავლება ელექტრონული მიკროსკოპიის საშუალებით, არის

ფაგის ერთერთი მნიშვნელოვანი დამახასიათებელი თავისებურება, მაგრამ საორიენტაციო და არა ზუსტი. ბაქტერიოფაგების დახასიათებისათვის მეტად მნიშვნელოვან მახვენებლებს წარმოადგენს სხვადასხვა ფიზიკო-ქიმიური ფაქტორების მოქმედება, როგორცაა: ქლოროფორმის და სხვა ორგანული გამსხნელების მოქმედება, თერმონაქტივაცია, UV გამოსხივება, არის სხვადასხვა pH და მრავალი სხვა.

1.2.7. *Vibrio*-ს გვარის ბაქტერიების მიმართ სპეციფიკური ბაქტერიოფაგები

Vibrio-ს გვარის მიმართ სპეციფიკური ბაქტერიოფაგები პირველად იდენტიფიცირებული იქნა დერელის მიერ 1926 წელს და 1950 წლისთვის აღწერილ იქნა რამდენიმე, *V. cholerae*-ს მიმართ სპეციფიკური ბაქტერიოფაგი. ადრეული შრომები *V. cholerae*-ს ფაგების შესახებ შეეხებოდა ძირითადად მათ გამოყენებას მკურნალობის და პროფილაქტიკის მიზნით და ნაკლებად უკავშირდებოდა შტამების დიფერენციაციას. *V. cholerae*-ს ფაგების მიმართ ინტერესი განახლდა VII პანდემიის გაგრძელებასთან და 1960-იან წლებში “El Tor”-ის ბიოტიპის აღმოჩენასთან ერთად. ამჟამად კვლევებს უკვე ორი მიმართულება მიენიჭა, ერთის მხრივ ფაგოტიპირების სქემის შექმნა ლიტიური ფაგების და მეორეს მხრივ, კლასიფიკაცია- ლიზოგენური ფაგების გამოყენებით. აღმოჩენილია *Vibrio*-ს გვარის მიმართ სპეციფიკური 85 ფაგი, 84 მათგანი მიეკუთვნება კუდიან ფაგებს, მხოლოდ ერთი არის ფილამენტური. კუდიანი ფაგები მიეკუთვნებიან 6 მთავარ მორფოტიპს და Myoviridae-ს, Siphoviridae-ს, და Podoviridae-ს ოჯახებს. 63 ფაგი კლასიფიცირდა 18 სახეობად. ფილამენტური ფაგი არის Inovirus-ის გვარის და Inoviridae-ს ოჯახიდან. *Vibrio*-ს ფაგები ძალზედ ჰეტეროგენულია და მოიცავს ზოგიერთ მორფოლოგიურად საინტერესო ვირუსებს. ზოგიერთი ფაგი ახლოს დგას სხვა გრამ (-) ბაქტერიათა ფაგებთან, შესაძლოა ეს მათ ფილოგენეზურ ნათესაობაზეც მიანიშნებდეს.

V. cholerae-ს ფილამენტური ბაქტერიოფაგი- CTX ითვლება ქოლერა-ტოქსინის გენის კლასტერის (*ctxAB*) გადატანის მექანიზმად. მოცემული ფაგი ინტეგრირდება ქრომოსომულ დნმ-ში attRS- მიმაგრების საიტის საშუალებით, ხოლო შტამებში, რომელთაც ეს საიტი არ გააჩნიათ, რეპლიცირებს პლაზმიდის სახით. ვინაიდან *ctxAB* CTX ფაგის სტრუქტურის ნაწილია, მას შეუძლია *ctxAB*-ს ჰორიზონტალურად გადატანა ტოქსიგენურიდან არატოქსიგენურ შტამებზე.

1.2.8. ფაგოთერაპია და ისტორიული კონტექსტი

ფ.დერელის მიერ ფაგის აღმოჩენიდან მალევე დაიწყო მისი გამოყენება დიზენტერიის სამკურნალოდ. სწორედ ეს იყო ფაგის პირველადი თერაპიული გამოყენება [50]. ეს კვლევა მიმდინარეობდა პარიზში 1919 წელს. პირველი ექსპერიმენტები საკმაოდ ეფექტური აღმოჩნდა, თუმცა წარმატებული შედეგები მაშინვე არ გამოქვეყნებულა. პირველი ანგარიში, სადაც მითითებულია ფაგოთერაპიის წარმატებული შემთხვევა, გამოიცა 1921 წელს, როცა ფაგი გამოიყენეს კანის სტაფილოკოკური დაავადების სამკურნალოდ [50]. მალევე ჩატარდა მრავალი მსგავსი კვლევა, რომლის შედეგებიც ხაზს უსვამდა ფაგების დიდ პოტენციალს სხვადასხვა

ინფექციების სამკურნალოდ, რამაც ხელი შეუწყო რამდენიმე ფაგური პრეპარატის წარმოებას სხვადასხვა კომპანიების მიერ. ფ.დერელის ლაბორატორია უშვებდა 5 სამკურნალო კომერციულ პრეპარატს სხვადასხვა ბაქტერიული ინფექციების სამკურნალოდ [9]. თერაპიული ფაგური პრეპარატები მნიშვნელოვანი პროდუქტები იყო ფარმაცევტულ ინდუსტრიაში, აღმოსავლეთ ევროპასა (1952 წლიდან) და ყოფილ საბჭოთა კავშირში (1923 წლიდან). ამ ქვეყნებში ფაგოთერაპიული კვლევები და ფაგური თერაპიის განვითარება ცენტრირებული იყო პოლონეთის მეცნიერებათა აკადემიის იმუნოლოგიის და ექსპერიმენტული თერაპიის ჰირსცფილდის ინსტიტუტში (ეროცლავი, პოლონეთი), უფრო ფართოდ კი გელიავას სახელობის ბაქტერიოფაგიის, მიკრობიოლოგიის და ვირუსოლოგიის ინსტიტუტში (თბილისი, საქართველო). თერაპიული ფაგები იწარმოებოდა ასევე აშშ-ში. უილიამ სმიტმა და კოლეგებმა თავებში განხორციელებული ექსპერიმენტების სერიით ასახეს ფაგების წარმატებით გამოყენება *E.coli*-ით გამოწვეულ ინფექციებში. არსებობს ცნობები, ფაგების გამოყენების ექსპერიმენტულ თავებში და ზღვის გოჭებში *Pseudomonas aeruginosa* და *Acinetobacter*-ით გამოწვეული ინფექციების პრევენციისა და მკურნალობის მიზნით [21,34,164]. ბოგოვაზოვამ და მკვლევრებმა [34] შეაფასეს ბაქტერიოფაგების ეფექტურობა *Klebsiella ozaenae*, *K.rhinoscleromatis* და *K.pneumoniae*-ით გამოწვეული ინფექციების მკურნალობაში. ფაგური თერაპია გამოყენებული იყო სხვადასხვა ინფექციის სამკურნალოდ, როგორცაა: ბაქტერიული დიზენტერია [26,179], ჭრილობები [155], კუჭ-ნაწლავის ტრაქტის ინფექციები [163], კანისა და ნაზალური ლორწოვანი გარსის ინფექციები, საღმონელოზი, გამოწვეული სხვა ეთიოლოგიური აგენტებით, კერძოდ: *Shigella*, *Salmonella*, *Proteus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*.

ფაგები მსგავსნი არიან ანტიბიოტიკების, იმდენად, რამდენადაც აქვთ გამორჩეული ანტიბაქტერიული მოქმედება. ფაგებს აქვთ სპეციფიკური მოქმედება, ზემოქმედებენ რა, მხოლოდ სამიზნე ბაქტერიულ უჯრედზე და არა ადამიანზე ან სხვა ეუკარიოტულ უჯრედებზე. *V. cholerae*-ს მიმართ სპეციფიკური ფაგები ყოველთვის მოქმედებენ *V. cholerae*-ს მიმართ და არ ახდენენ სხვა მაგ.: *Shigella*-ს, *Salmonella*-ს ან *E.coli*-ის ბაქტერიის უჯრედის ლიზისს. ეს არის მნიშვნელოვანი განსხვავება ფაგური პრეპარატისა ანტიბიოტიკისგან, რომელიც მოქმედებს, როგორც პათოგენის ასევე ნორმალური მიკროფლორის წინააღმდეგ. შედეგად პაციენტში აღვილი აქვს მიკრობულ დისბალანსს, რასაც მიჰყვაროთ მეორადი ინფექციების განვითარებისკენ. ყოფილ საბჭოთა კავშირში და აღმოსავლეთ ევროპაში ჩატარებულმა კლინიკურმა ფაგოთერაპიის ცდებმა აჩვენა ფაგების პროფილაქტიკური და თერაპიული გამოყენების დადებითი მხარე. ადამიანში ლითიური ფაგების გამოყენების უარყოფითი მაჩვენებლები ჯერ არ აღწერილა [169]. მიუხედავად ფაგების გამოყენების უსაფრთხოებისა თერაპიული მიზნით, ჩვეულებრივ მათი ფართო მოხმარება არ ხდება და ფაგების მოქმედების ეფექტურობა ჯერ კიდევ კამათის საკითხია. ერთ-ერთი შეზღუდვა არის ფაგების მაღალი სპეციფიკურობა სამიზნე ბაქტერიული სახეობის მიმართ.

V. cholerae O1-ის მიმართ სპეციფიკური ბაქტერიოფაგების შესწავლა ოდითგანვე ინტერესის სფეროს წარმოადგენდა. ფაგები გამოიყენებოდა *V. cholerae* O1-ის მიერ გამოწვეული ინფექციების დიაგნოზის დასამტკიცებელ საშუალებად. ბაქტერიოფაგები დღემდე გამოიყენება *V. cholerae* O1-ის სეროტიპის “კლასიკური” და “El Tor” ბიოტიპების განსასხვავებლად. წარსულში *E.coli*-ის მიმართ სპეციფიკური ბაქტერიოფაგები გამოიყენებოდა წყალში არაენტეროპათოგენური სპეციფიკურობის,

ფეკალური დაბინძურების დეტექციისთვის [184]. ქვეყნებში, სადაც ქოლერა ენდემურია, *V. cholerae* O1-ის მიმართ სპეციფიკური ბაქტერიოფაგები ნანახი იყო ჩამდინარე წყლებში და შემდგომში გამოყენებული, როგორც შტამების მარკერები [17] და ასევე *V. cholerae* O1-ის და O139-ის ბიოტიპირებისთვის [24,46,51,148]. ქვეყნებში, სადაც ქოლერა ავლენს სეზონურობას, ხასიათდება რა ეპიდემიური გამოვლინებებით, გარემოს ზედამხედველობამ შესაძლოა მნიშვნელოვანი როლი ითამაშოს ქოლერას კონტროლში. *V. cholerae* O1-ის მიერ გამოწვეული ასიმპტომური ინფექციები უფრო ხშირი ხასიათისაა აქტიურ შემთხვევებთან შედარებით [187], ამგვარად ჩამდინარე წყლებში *V. cholerae* O1-ის შტამებისა და შესაბამისი ფაგების დეტექციის კონტროლი შესაძლოა იყოს მისაღები საშუალება ქოლერას აფეთქებების წინასწარ განჭვრეტისა მანამ, სანამ შემთხვევათა მნიშვნელოვანი რაოდენობა იჩენს თავს. არაერთგზის იყო ნათქვამი, რომ ჩამდინარე წყლებში ვიბრიოფაგების არსებობა დაკავშირებულია ქოლერას შემთხვევებთან.

ანტიბიოტიკების აღმოჩენა მიჩნეულია მედიცინის სფეროში ერთერთ მნიშვნელოვან მიღწევად. თუმცა ანტიბიოტიკების მიმართ მულტირეზისტენტული ბაქტერიული შტამების დაგროვებამ თანამედროვე მედიცინაში ერთ-ერთი ყველაზე კრიტიკული პრობლემა წარმოშვა. ანტიბიოტიკების აღმოჩენამდე და ფართოდ გამოყენებამდე შემოთავაზებული იყო ბაქტერიოფაგების გამოყენება ბაქტერიული ინფექციების პრევენციისა და სამკურნალოდ. კანის სტაფილოკოკური ინფექციის წარმატებული მკურნალობა აღწერილი იყო საფრანგეთში [38]. ბრიტანელმა ბაქტერიოლოგმა ერნესტ ჰანკინმა აღწერა ანტიბაქტერიული მოქმედება *V. cholerae*-ს მიმართ ინდოეთის მდინარეებში (განგი და იამუნა) [92]. მან ივარაუდა, რომ უცხო აგენტი (რომელიც ტარდებოდა თხელ ფაიფურის ფილტრში და იყო თერმოლაბილური), იყო პასუხისმგებელი ამ ფენომენზე და ქოლერას ეპიდემიის გავრცელების შეზღუდვაზე [92]. ჰანკინის კვლევებიდან თითქმის 20 წლის შემდეგ ინგლისელმა ფრედერიკ ტუორტმა გამოთქვა ჰიპოთეზა, რომ ეს აგენტი უნდა ყოფილიყო ვირუსი [183]. მე-20 საუკუნის ოციან წლებში დერელი სტუმრობდა ინდოეთს, კერძოდ ჰაფკინის ინსტიტუტს, ბომბეში სადაც მუშაობდა შავი ჭირის საწინააღმდეგო ფაგოთერაპიაზე, რამაც ხელი შეუწყო ინდოეთში ბაქტერიოფაგების კვლევის დასაბამს, ინდოეთის კვლევის ფონდის ასოციაციის მეშვეობით და ასევე ფაგოთერაპიას, განსაკუთრებით ქოლერას ეპიდემიების დროს რელიგიური ფესტივალების და პილიგრიმების არსებობისას.

დაავადება ქოლერა იდეალური შემთხვევაა ფაგოთერაპიისთვის. დაავადების ტრანსმისიის და ეპიდემიოლოგიის მახასიათებლები კარგად არის ცნობილი, თუმცა ეფექტური ვაქცინა დღემდე არ არის შექმნილი. დაავადება ქოლერასთვის არსებული ფაგური თერაპია არ არის მკაფიოდ დადგენილი პაციენტების სამკურნალოდ ან პრევენციისთვის, როგორც ამას დერელი იმედოვნებდა [67]. გამოკვლეული იყო, რომ ქოლერას სიმპტომების სიმწვავე და ხანგრძლივობა და ამ დაავადებით გამოწვეული საერთო სიკვდილიანობა შემცირდა მას შემდეგ რაც პაციენტებმა ორალური გზით მიიღეს *V. cholerae*-ს მიმართ სპეციფიკური ფაგები [170]. 1960 წელს მსოფლიო ჯანდაცვის ორგანიზაციის (WHO) მიერ ადგილი ქონდა ქოლერას მკურნალობის საერთაშორისო მცდელობას დაკაში ფაგოთერაპიის გზით. ეს მცდელობა ჩატარდა ფართოდ მიღებული საერთაშორისო სტანდარტებით, ჯანდაცვის ეროვნული ინსტიტუტების (აშშ) ზედამხედველობის ქვეშ. WHO-ს მიერ დაფინანსებულ კვლევებში 1970 წელს, ბანგლადეშში ფაგოთერაპია შედარებული იყო ტეტრაციკლინთან,

როგორც თერაპიულ აგენტთან. ნაჩვენები იყო, რომ დიდი დოზით ფაგური თერაპია მსგავსი იყო ტეტრაციკლინის მოქმედებასთან ფეკალიებიდან ვიბრიონების გამოყოფის შემცირების თვალსაზრისით.

ინფექციურ პათოლოგიაში ბაქტერიოფაგის გამოყენების რეკომენდაციები დაფუძნებულია იმ გამოცდილებაზე, რაც დაგროვდა მრავალი წლის მანძილზე. დღეისთვის ბაქტერიოფაგები წარმატებით გამოიყენება ჩირქოვან-ანთებითი, ინფექციების, ნაწლავური და შარდ-სასქესო გზების ინფექციური ანთებითი პროცესების სამკურნალოდ [99, 130, 141, 168, 169].

II. მასალები და მეთოდები

2.1 კვლევაში გამოყენებული მასალები

წყლის სინჯები

ბაქტერიული შტამებისა და ბაქტერიოფაგების გამოსაყოფად წყლის სინჯებს ვიღებდით საქართველოს სხვადასხვა წყალსატევიდან, კერძოდ: თბილისის შემოგარენში არსებული მტკნარი წყალსატევებიდან (ლისის და კუმისის ტბები, თბილისის ზღვა, მდ. მტკვარი) და შავი ზღვის სხვადასხვა წერტილიდან (მდ. სუფსის შესართავი, მდ.ჭოროხის შესართავი, მწვანე კონცხის სანაპირო ზოლი და ბათუმის ბულვარი).

ბაქტერიული შტამები:

შივილი სტანდარტული შტამი-მოწოდებული საქართველოს (თბილისი) დაავადებათა კონტროლის ეროვნული ცენტრის (NCDC) კოლექციიდან. *V. cholerae*-ს ორი სტანდარტული შტამი: O1 “El Tor” (V.ch 890-M-878) და *V. cholerae* O1 “კლასიკური” (V.ch 145-P-1) ბიოტიპები. პასტერის ინსტიტუტის (CIP) მიერ მოწოდებული 4 სტანდარტული შტამი: *V. cholerae* O1 “კლასიკური” (V.chCIP 55.91, V.chCIP 62.13) და *V. cholerae* O1 “El Tor” (V.ch CIP 106855) ბიოტიპები და *V. cholerae* O139 (V.ch CIP 104151). ასევე *V. mimicus*-ის სტანდარტული შტამი (*V. mimicus* ATCC33653) მოწოდებული იყო ამერიკის ტიპიურ კულტურათა კოლექციიდან (ATCC, Manassas, VA USA).

2006-2009 წლებში, მონიტორინგის შედეგად საქართველოს წყლიანი გარემოდან (ლისის და კუმისის ტბები, თბილისის ზღვა, მდ. მტკვარი და შავი ზღვის წერტილები: მდ. სუფსის შესართავი, მდ.ჭოროხის შესართავი, მწვანე კონცხის სანაპირო ზოლი და ბათუმის ბულვარი) გამოყოფილი 846 *V. cholerae*-ს და 11 *V. mimicus*-ის იზოლატი, რომლებიც შემდგომში გამოყენებული იყო სპეციფიკური ბაქტერიოფაგების გამოსაყოფად და გასამრავლებლად. გამოყოფილი ბაქტერიული იზოლატები ინახება გელიავას სახელობის ბაქტერიოფაგის, მიკრობიოლოგიისა და ვირუსოლოგიის ინსტიტუტში.

V. cholerae-ს და *V. mimicus*-ის მიმართ სპეციფიკური ბაქტერიოფაგები

V. cholerae-ს მიმართ სპეციფიკური სტანდარტული ბაქტერიოფაგები: ბაქტერიოფაგი 163 (I ჯგუფის პროტოტიპი; ATCC 14100-B4) და ბაქტერიოფაგი 138 (II ჯგუფის პროტოტიპი; ATCC 14100-B1) მოწოდებული იყო ამერიკის ტიპიურ კულტურათა კოლექციიდან (ATCC, Manassas, VA USA). სამუშაოს შესრულების დროს გამოყოფილი 82 ბაქტერიოფაგის პირველადი იზოლატი. *V. cholerae*-ს მიმართ სპეციფიკური 24 იზოლატი და *V. mimicus*-ის მიმართ სპეციფიკური 7 იზოლატი, შემდგომი ექსპერიმენტული კვლევისთვის.

მიკრობიოლოგიური არეები:

Vibrio spp. მიკროორგანიზმების საიდენტიფიკაციო:

- TCBS- თიოსულფატ-ციტრატ-ნაღვლის მარილების- საქაროზას შემცველი მყარი არე.

ბაქტერიებისა და ბაქტერიოფაგების კულტივირებისა და შენახვისათვის საჭირო მყარი, თხიერი და ნახევრადთხიერი საკვები არეები:

- LB (Luria-Bertani) ლურია-ბერტანის მყარი 2%-იანი აგარი (Difco);
- LB (Luria-Bertani) ლურია-ბერტანის თხიერი არე (Difco);
- LB (Luria-Bertani) ლურია-ბერტანის ნახევრადთხიერი 0.7%-იანი არე (Difco);
- სოიოს აგარი და ბულიონი (“Difco”, “Biomereux”);
- პეპტონიანი ტუტე წყალი;
- კონცენტრირებული ბულიონი.

ბაქტერიების ფიზიოლოგიურ-ბიოქიმიური თვისებების შესასწავლად:

- T₁N₁ აგარი-ტრიპტონ მარილიანი აგარი;
- T₁N₆ ბულიონი-ტრიპტონ მარილიანი ბულიონი;
- T₁N₈ ბულიონი-ტრიპტონ მარილიანი ბულიონი;
- GSA აგარი –3% ნატრიუმის ქლორიდის შემცველი აგარი;
- GA აგარი-ჟელატინიანი, უმარილო აგარი;
- ჰიუ-ლეიესონის (HF) გლუკოზიანი არე;
- ამინომჟავები: არგინინი, ლიზინი, ორნითინი;
- ნახშირწყლები: საქაროზა, მანოზა, არაბინოზა, ლაქტოზა.

სამუშაო ბუფერული სისტემები და ქიმიური რეაქტივები:

- ფაგური ბუფერი – 50mM Na₂HPO₄, 22mM KH₂PO₄, 85mM NaCl, 12mM MgSO₄, 11mM CaCl₂, pH 7,2;
- PBS –დაბუფერებული ფიზიოლოგიური ხსნარი, pH 7,4 (Sigma);
- TA- ტრის აცეტატური ბუფერი pH 7,4(Sigma);
- 5M NaCl- ხსნარი;
- 10mM MgCl₂- ხსნარი;
- 10mM Tris- 1mM EDTA ბუფერული ხსნარი pH 7,4;
- SM ბუფერი (100mMNaCl, 8mM MgSO₄•7H₂O, 50mMTris-Cl (1 M, pH 7.5), 0.002% (w/v) ჟელატინი);
- 1% SDS.

V. cholerae-ს იზოლატების სეროლოგიური იდენტიფიკაციისთვის:

- ფლუორესცენტულად მონიშნული ანტისხეულები (New Horizon Diagnostics, MD) გარემოში *V. cholerae*-ს ეპიდემიური სეროტიპების გამოსავლენად პირდაპირი ფლუორესცენტული ანალიზის (DFA -direct fluorescent antibody assay) მეთოდით;

- ქოლერას პოლი-იმუნური შრატი (“Difco”) გარემოში *V. cholerae*-ს ეპიდემიური სეროტიპების გამოსავლენად;
- Cholera O1 SMART™ გარემოში *V. cholerae*-ს ეპიდემიური სეროტიპების გამოსავლენად;

ბაქტერიოფაგების სეროლოგიური დახასიათებისთვის:

- ანტიფაგური (APS) შრატები. მიღებული იყო ბოცვრების იმუნიზაციის შედეგად *V. cholerae*-ს მიმართ სპეციფიკური ბაქტერიოფაგების გამოყენებით (სულ 3 ანტიფაგური შრატი: APS 54, APS 10CH, APS 105);
- ადიუვანტი (Freund’s adjuvant, Difco);
- ლაბორატორიული ცხოველები: შინშილას ჯიშის 20 ბოცვერი. გამოყენებული იყო ანტიფაგური შრატის მისაღებად;

ბაქტერიული დნმ-ის გამოსაყოფად და გენეტიკური იდენტიფიკაციისთვის:

- სპეციალური კომერციული ნაკრები (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA da Gen Elute, Sigma) ბაქტერიული დნმ-ის გამოსაყოფად;
- პოლიმერაზული ჯაჭვური რეაქციის (ITS PCR) პრაიმერები *V. cholerae*-ს და *V. mimicus*-ის იზოლატების გენეტიკური იდენტიფიკაციისთვის (ცხრ.1);
- *V. cholerae*-ს ეპიდემიური სეროტიპების (*V. cholerae* O1 “კლასიკური” და “El Tor“ ბიოტიპი, *V. cholerae* O139) და ვირულენტობის ფაქტორების შესასწავლად (ctxA გენები) გამოყენებული პოლიმერაზული ჯაჭვური რეაქციის (მულტიპლექს-PCR) პრაიმერები (ცხრ.2).

ცხრ.1. პოლიმერაზული ჯაჭვური რეაქციის (ITS -PCR) პრაიმერები

| პოლიმერაზა ჯაჭვური რეაქცია (ITS-PCR) | | |
|--------------------------------------|-------------------------|---------------------|
| სამიზნე გენი/პრაიმერი | 5'-3' თანმიმდევრობა | წყარო |
| <i>V.cholerae</i> | | |
| pVCM-R1 | AGTCACTTAACCATACAACCCG | Huq et al., 2006 |
| pVC-F2 | TTAAGCSTTTTCRCTGAGAATG | |
| <i>V.mimicus</i> | | |
| pVCM-R1 | AGTCACTTAACCATACAACCCG | |
| pVM-F1 | TTTAAGTGCATTTCGRTGAGTGC | |

ცხრ.2. პოლიმერაზული ჯაჭვური რეაქციის (მულტიპლექს-PCR) პრაიმერები

| მულტიპლექსური პოლიმერაზა ჯაჭვური რეაქცია | | |
|--|--------------------------|---------------------|
| სამიზნე გენი/პრაიმერი | 5'-3' თანმიმდევრობა | წყარო |
| <i>V.cholerae</i> O1 | | Huq et al., 2006 |
| pTcpA-647R | TTACCAAATGCAACGCCGAATG | |
| pTcpA-72F | CACGATAAGAAAACCGGTCAAGAG | |
| <i>V.cholerae</i> El Tor და O139 | | |
| pTcpA-477R | CGAAAGCACCTTCTTTTCACGTTG | |
| pTcpA-72F | CACGATAAGAAAACCGGTCAAGAG | |
| <i>ctxA</i> ტოქსიგენური გენები | | |
| ctxA 636-614 pCTA-614R | CGATGATCTTGGAGCATTCCCAC | |
| ctxA 73-94 pCTA-94F | CGGGCAGATTCTAGACCTCCTG | |

რესტრიქციული ენდონუკლეაზები: ბაქტერიოფაგების რესტრიქციული პროფილის შესასწავლად (ცხრ.3):

ცხრ.3. რესტრიქციული ენდონუკლეაზები

| რესტრიქციული ენდონუკლეაზა | ამოსაცნობი თანმიმდევრობა | გაჭრის ადგილი |
|---------------------------|--------------------------|-----------------|
| EcoR I | 5'GAATTC 3' | 5'--G AATTC--3' |
| | 3'CTTAAG 5' | 3'--CTTAA G--5' |
| EcoR V | 5'GATATC 3' | 5'--GAT ATC--3' |
| | 3'CTATAG 5' | 3'--CTA TAG--5' |
| Hind III | 5'AAGCTT 3' | 5'--A AGCTT--3' |
| | 3'TTCGAA 5' | 3'--TTCGA A--5' |
| BamH I | 5'GGATCC 3' | 5'--G GATCC--3' |
| | 3'CCTAGG 5' | 3'--CCTAG G--5' |
| Pst I | 5' CTGCAG 3' | 5'--CTGCA G--3' |
| | 3' GACGTC 5' | 3'--G ACGTC--5' |
| Not I | 5' GCGGCCGC 3' | GCGGCC-- GC |
| | 3' CGCCGGCG 5' | CG-- CCGGCG |

2.2. კვლევაში გამოყენებული მეთოდები

2.2.1. ღია წყალსატევებიდან აღებული წყლის სინჯების დამუშავება

კვლევის მიზნისა და სპეციფიკის გათვალისწინებით სინჯების აღების სიხშირე და დამუშავების პროცედურა განსხვავდებოდა. წყლის სინჯების აღება წარმოებდა ერთი ძირითადი სქემის მიხედვით. სინჯებს ვიღებდით დღის პირველ ნახევარში 11-15 საათამდე ინტერვალში. სინჯებს ვიღებდით წყლის ზედაპირიდან 15-30სმ სიღრმეზე სტერილურ ჭურჭელში 1 ლიტრის მოცულობით. პარალელურად ვინიშნავდით: ამინდს, ტემპერატურას და სხვა კლიმატურ პირობებს. წყლის ნიმუშების ანალიზს ვანხორციელებდით სინჯის აღებიდან 4 სთ-ის განმავლობაში.

წყლის ფიზიკო-ქიმიური პარამეტრების განსაზღვრა. წყლის ზოგიერთ ფიზიკო-ქიმიურ პარამეტრი, როგორცაა მარილიანობა, გამტარობა, წყალბად იონთა კონცენტრაცია, წყალში გახსნილი ჟანგბადის რაოდენობა და მყარი ნაწილაკების რაოდენობა, ისაზღვრებოდა მულტიპარამეტრული პორტატული საზომი ხელსაწყო (YSI 556 MPS) საშუალებით.

მიკრობული დაბინძურების ხარისხის განსაზღვრა. საკვლევ წყალში საერთო მიკრობული რიცხვის განსაზღვრისათვის ვიყენებდით 1,8% -იანი LB აგარის ფინჯნებს. საკვლევი წყლის საწყისი და ათჯერადი განზავებები 1 მლ რაოდენობით დაგვქონდა პეტრის ფინჯანზე და ვამატებდით 15-20 მლ გამლღვალ 45°C-მდე გაგრილებულ LB აგარს. ვახდენდით ინკუბაციას 37°C-ზე 24-48 საათის განმავლობაში და ვითვლიდით წარმოქმნილი ბაქტერიული კოლონიების რაოდენობას. „Aerobic Count plates“ (3M, აშშ) პეტრიფილმების მეშვეობით ვსაზღვრავდით წყლის ნიმუშში აერობების საერთო რაოდენობას. პეტრიფილმზე დაგვქონდა საკვლევი წყლის საწყისი და ათჯერადი განზავება 1 მლ-ის ოდენობით. ვახდენდით ინკუბაციას 37°C-ზე 24 საათის განმავლობაში. შედეგს ვიწერდით შესაბამისი სქემის მეშვეობით.

2.2.2. *Vibrio*-ს გვარის ბაქტერიების გამოყოფა

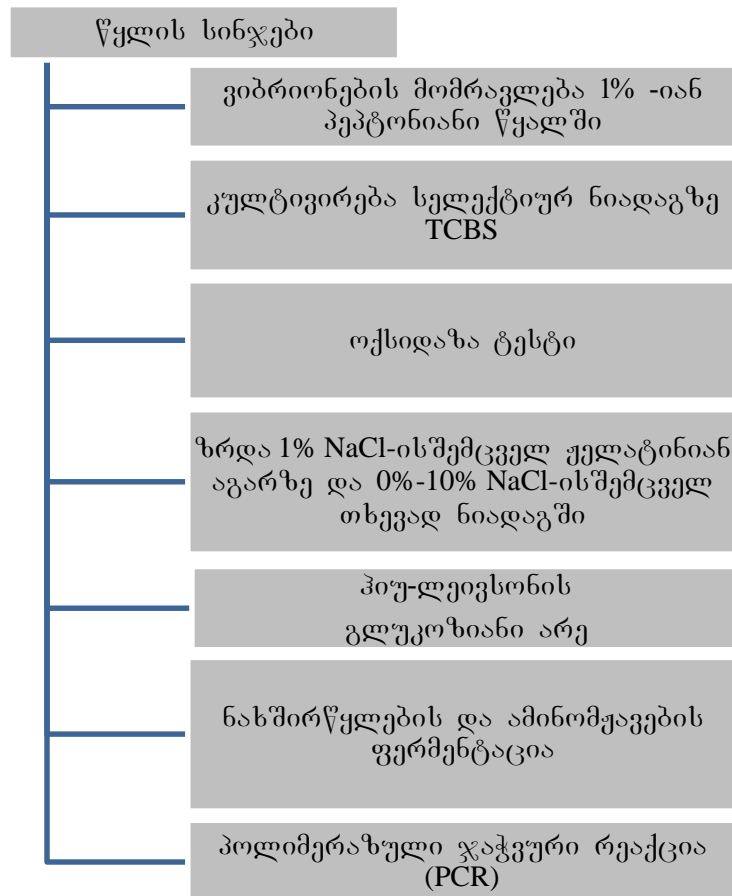
100 ლიტრი წყალი ტარდება 200მკმ-იან და 64მკმ-იან ბადეში. 100მლ გაფილტრული წყალი (PFW-plankton free water) იფილტრება 0,45მკმ-იან ფილტრში, თავსდება 100 მლ პეპტონიან წყალში. 10-20 მლ გაფილტრული წყალი იფილტრება 0,45მკმ-იან ფილტრში, თავსდება TCBS-ის ნიადაგზე და ორივე ვარიანტი ინახება თერმოსტატში 37°C-ზე 24 საათის განმავლობაში. 9მლ პეპტონიან წყალს ემატება 1 მლ პლანქტონი (64მკმ და 200 მკმ-იან ბადეში გაფილტრული) და ინახება თერმოსტატში 37°C-ზე 24 საათის განმავლობაში.

2.2.3. ბაქტერიული შტამების ბიოლოგიური თვისებების შესწავლა

საკვლევი შტამების კულტურალურ-მორფოლოგიურ თვისებებს ვსწავლობდით ბაქტერიების ზრდის მიხედვით მყარ, თხევად და ნახევრადთხევად არეებზე.

ბიოქიმიური თვისებების შესწავლა საკვლევი შტამების ბიოქიმიური თვისებების შესწავლას ვაწარმოებდით სპეციალიზირებულ საკვებ არეებზე (სურ.2), კერძოდ: პროტეოლიზურ აქტივობას ვსწავლობდით ქელატინის გაჯირჯვების მიხედვით GSA აგარზე. ჰიუ-ლეივსონის გლუკოზიან არეში მიკროორგანიზმების კულტივირებისას გლუკოზის მოხმარება განიხილება ორი მექანიზმით: გლუკოზის ფერმენტაციით (ზეთმოსხმული სინჯარა) ან გლუკოზის დაუანგვით (უზეთო სინჯარა). იზოლატები მოწმდებოდა მარილის მოხმარებაზე, ნახშირწყლების მოხმარებაზე (საქაროზა, ლაქტოზა, მანოზა, არაბინოზა), ოქსიდაზაზე, ლიზინ და ორნიტინ დეკარბოქსილასა და არგინინ-დეჰიდროლასაზე. ბიოქიმიურ ტესტებზე დაყრდნობით იდენტიფიცირებული *V.cholerae*-ს და *V. mimicus*-ის შტამები შემდგომ დამატებით მოწმდებოდა ორ სახეობა-სპეციფიური პოლიმერაზული ჯაჭვური რეაქციით.

საკვლევი წყლის ნიმუშებიდან ვიბრიონების გამოყოფისა და იდენტიფიკაციის სქემა



სურ.2. *Vibrio*-ს გვარის ბაქტერიების იდენტიფიკაციის სქემა

გენეტიკური იდენტიფიკაცია. შტამების გენეტიკური დახასიათება ხდებოდა ITS-პოლიმერაზული ჯაჭვური რეაქციით (ITS-PCR, Internal Transcribed Spacer PCR) სპეციფიკური პრაიმერების გამოყენებით. *V. cholerae* O1-ის, *V. cholerae* O139-ის და ტოქსოგენური გენების (ctxA, ctxB, omp) აღმოსაჩნად ვიყენებდით მულტიპლექსური პოლიმერაზული ჯაჭვური რეაქციის მეთოდს (Multiplex-PCR). გენომური დნმ-ის გამოყოფას ვახდენდით სპეციალური კომერციული ნაკრების გამოყენებით (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). სახეობა-სპეციფიკური პრაიმერების გამოყენებით ხდებოდა ბიოქიმიურად იდენტიფიცირებული *V. cholerae*-ს და *V. mimicus*-ის იზოლატების იდენტიფიკაცია პოლიმერაზული ჯაჭვური რეაქციის (პჯრ) საშუალებით. პოლიმერაზულ ჯაჭვურ რეაქციაში გამოყენებული იყო ბაქტერიული კულტურების დნმ, Taq-დნმ პოლიმერაზა, თავისუფალი ნუკლეოტიდების ნარევი –დეოქსინუკლეოზიდ ტრიფოსფატები (dATP, dCTP, dGTP, CITTP 10 მმოლი თითოეული კონცენტრაცია) და ოლიგონუკლეოტიდური პრაიმერი (პირდაპირი და უკუ-მიმართულების). პჯრ-პროდუქტების ანალიზს ვახდენდით 1-1,2% აგაროზას გელში ელექტროფორეზით.

Cholera O1 და Bengal DFA–პირდაპირი ფლუორესცენტული ანალიზი. Cholera DFA-ის ტესტი მოიცავს *V. cholerae* O1–ის გარე მემბრანაზე არსებულ O1 ლიპოპოლისაქარიდის A ანტიგენის მიმართ და *V. cholerae* O139-ის გარე მემბრანაზე არსებულ O139 ლიპოპოლისაქარიდის ზედაპირული ანტიგენის მიმართ სპეციფიკურ მონიკლონურ ანტისხეულებს, რომლებიც პირდაპირ არიან დაკავშირებულნი ფლუორესცენტულ იზოთიოციანიტთან (FITC). მეთოდი გამოიყენება *V. cholerae* O1 და *V. cholerae* O139-ის სწრაფი, ადვილი დეტექციისა და აღრიცხვისთვის წყლის, საკვების და ფეკალურ სინჯებში. მასალას წარმოადგენდა წყლის ნიმუშები:კონცენტრირებული, გამდიდრებული წყალი, გამდიდრებული პლანქტონი (64მკმ და 200მკმ, 64მკმ ჰომოგენიზირებული და 200მკმ ჰომოგენიზირებული). ვახდენდით წყლის ნიმუშის დაფიქსირებას DFA-ის პრეპარატისთვის. გამდიდრებული წყლის ნიმუშიდან და გამდიდრებული პლანქტონის ნიმუშიდან 1 მლ გადაგვაქონდა ეპენდორფში. ვატრიალებდით 5000გ/წთ 5წთ-ის განმავლობაში. სუპერნატანტს ვღვრიდით და ნალექს ვხსნიდით 1მლ ფიზიოლოგიურ ხსნარში. ხელახლა ვატრიალებდით 5000გ/წთ 5 წუთის განმავლობაში. სუპერნატანტს კვლავ ვღვრიდით, ნალექს ვხსნიდით 1მლ ფიზიოლოგიურ ხსნარში და ვაფიქსირებდით 10მკლ 37%-იანი ფორმალდეჰიდით.

- ცდის დაწყებამდე ყველა მატერიალი თავსდებოდა ოთახის ტემპერატურაზე;
- სასაგნე მინაზე წვეთდება 5მკლ სინჯის ნიმუში;
- ცალკე სასაგნე მინაზე წვეთდებოდა *V. cholerae* O1 –ის და Bengal-ის პოზიტიური და ნეგატიური კონტროლი, 5მკლ-ის ოდენობით;
- სასაგნე მინებს ვაშრობდით 30 წუთის განმავლობაში;
- შემდეგ ეტაპზე ვამატებდით 5მკლ ეთანოლს და კვლავ ვაშრობდით;
- ვამატებდით 10მკლ ქოლერა DFA რეაგენტს (O1 და Bengal);
- სასაგნე მინებს ვათავსებდით ნესტიან გარემოში და ინკუბაციას ვახდენდით 37°C ტემპერატურაზე;
- ვრეცხავდით PBS-ში ვაშრობდით და ვათავსებდით სიბნელეში;
- ვაწვეთებდით თითო წვეთ ფლუორესცენტულ Mounting Medium-ს;

- სინჯებს ვნახულობდით ფლუორესცენტულ მიკროსკოპში 100x გადიდებაზე იმერსიული ზეთით.

აგლუტინაციის რეაქცია **B.D. Difco™ V. cholerae-ს ანტიშრატი**. გამოიყენებოდა ქოლერას პოლი-იმუნური შრატი (“B.D. Difco™”) გარემოში *V. cholerae-ს* ეპიდემიური სეროტიპების გამოსავლენად (ცხრ.4).

ცხრ.4. რეაგენტები

| ანტიშრატი | O ანტისხეულები |
|--|----------------|
| B.D. Difco™ <i>V. cholerae-ს</i> ანტიშრატი Poly | ABC |
| B.D. Difco™ <i>V. cholerae-ს</i> ანტიშრატი Ogawa | B |
| B.D. Difco™ <i>V. cholerae-ს</i> ანტიშრატი Inaba | C |

B.D. Difco™ *V. cholerae-ს* ანტიშრატი Poly გამოიყენება *V. cholerae-ს* იზოლატების სავარაუდო დადგენისათვის. შემდეგ ეტაპზე აგლუტინაციის რეაქცია ტარდება B.D. Difco™ *V. cholerae-ს* ანტიშრატი “ოგავა” და B.D. Difco™ *V. cholerae-ს* ანტიშრატი “ინაბა”-ს გამოყენებით.

- B.D. Difco™ *V. cholerae-ს* ანტიშრატი 1 წვეთის ოდენობით დაიტანება სასაგნე მინაზე;
- ანტიშრატზე მარყუით თანაბრად ნაწილდება მყარ არეზე გაზრდილი საკვლევი მიკრობული კულტურა;
- აგლუტინაციის შედეგის წასაკითხად სასაგნე მინას 1 წუთის განმავლობაში წრიულად ვამოძრავებთ.

შედეგების წაკითხვა:

- 4+ 100%-იანი აგლუტინაცია, უკანა ფონი სუფთაა, უმნიშვნელოდ ბუნდოვანი;
- 3+ 75%-იანი აგლუტინაცია, უკანა ფონი უმნიშვნელოდ ბუნდოვანია;
- 2+ 50%-იანი აგლუტინაცია, უკანა ფონი ზომიერად ბუნდოვანია;
- 1+ 25%-იანი აგლუტინაცია, უკანა ფონი ბუნდოვანია;
- – აგლუტინაცია არ შეიმჩნევა;
- პოზიტიური კონტროლი აჩვენებს 3+ ან მეტ აგლუტინაციის ხარისხს;
- ნეგატიური კონტროლის დროს აგლუტინაცია არ შეიმჩნევა;
- საკვლევი იზოლატების შემთხვევაში 3+ ან მეტი ხარისხის აგლუტინაცია 1 წთ-ის განმავლობაში, დადებითი შედეგია.

Cholera O1 SMART™–მგრძობიარე, მემბრანული ანტიგენის სწრაფი ტესტი. Cholera O1 SMART™ მოიცავს მონოკლონურ ანტისხეულებს, მოთავსებულს სპეციალური ფორმის ჰორიზონტალურ ფირფიტებზე. ანტისხეულები სპეციფიურია *V. cholerae* O1–ის O1 ლიპოპოლისაქარიდის A ანტიგენის მიმართ (ცხრ.5) ანტი- A ანტიგენ სპეციფიკური ანტისხეული დაფარული კოლოდალური ოქროს ნაწილაკებით (წითელი შეფერილობის) მოთავსებულია მემბრანულ ზედაპირზე. ნიმუში თავსდება სპეციალურ საფილტრაციო ფოსოში. როდესაც საკვლევი სინჯი შეიწოვება (S) საფილტრაციო ნაწილში, ოქროს კონიუგატი ურთიერთქმედებს ნებისმიერ ანტი –A ანტიგენტან, რომელიც წარმოდგენილია მემბრანის მთელ სიგრძეზე, სადაც აღინიშნება დაკავშირებული ანტისხეულის ორი ზონა: T-ტესტის და C-კონტროლის ზონა. ანტისხეულ-ოქროს კონიუგატები, რომლებიც დაუკავშირდნენ ანტიგენს მოცემულ ნიმუშში, დაიკავშირება *V. cholerae* O1-ის დამჭერი ანტისხეულების ზონაში (T ზონა), რაც გამოისახება ვიზუალურად შეფერილი ხილული ზოლის სახით და ასახავს პოზიტიურ შედეგს (T). იმ შემთხვევაში თუ ნიმუშში *V. cholerae* O1 არ არის, წარმოდგენილ T ზონაში არ წარმოიქმნება შეფერილი ზოლი და საკვლევი სინჯი განაგრძობს მიგრაციას პოზიტიური კონტროლის ზონამდე (რომელიც არ არის სპეციფიკური A ანტიგენის მიმართ), და დაუკავშირდება ნებისმიერ არსებულ ანტისხეულ-ოქროს კონიუგატს, შედეგად წითელი ზოლი გამოისახება C-ზონაში. C ზოლი უნდა იყოს ხილული, რაც ტესტის სწორი მუშაობის მაჩვენებელია. ტესტის შესრულების მთლიანი დრო 20 წუთია.

ცხრ.5. Cholera O1 SMART™ ტესტი

| | |
|------------------|---|
| დადებითი შედეგი | T და C ზონაში გამოისახება წითელი ზოლი |
| უარყოფითი შედეგი | მხოლოდ C ზონაში გამოისახება წითელი ზოლი |
| არასწორი შედეგი | მხოლოდ T ზონაში გამოისახება წითელი ზოლი |
| არასწორი შედეგი | ფერადი ზოლი არცერთ ზონაში არ წარმოიქმნება |

GM1-ELISA-ფერმენტდაკავშირებული იმუნოსორბენტული ანალიზი-ქოლერის ტოქსინის დეტექციისთვის [62,76]. ექსპერიმენტისთვის ვიყენებდით:

- *V. cholerae*-ს შტამები ($\times 10^3$ უჯრ/მლ კულტურა, კულტივირებული 16 სთ 30°C სანჯღრეველაზე, დაცენტრიფუგებული და გაფილტრული);
- GM1 განგლიოზიდი (2მგ/მლ სამუშაო კონც. PBS-ში განზავებული)-მოქმედებს, როგორც დამაკავშირებელი საიტი ქოლერის ტოქსინისთვის (სეკრეტირებული

- ტოქსინი ემაგრება მასპინძელ ორგანიზმში ლორწოვანი გარსის უჯრედებს GM1 -თან დაკავშირების გზით);
- BSA-შრატის ცილა (Bovine serum albumin, 1მგ/მლ სამუშაო კონც. PBS Tween 20-ში განზავებული). ახასიათებს: სტაბილურობა, ბიოქიმიურ რეაქციებში ეფექტურობის ნაკლებობა. დამაკავშირებელი თვისებების გამო აქვს ბლოკირების უნარი, ამიტომ მნიშვნელოვნად ამცირებს არასასურველ კავშირებს, რაც ხელისშემშლელი ფაქტორს წარმოადგენს ანალიზის ჩატარების დროს;
 - PBS –ფოსფატური ბუფერი;
 - Tween 20- (პოლიოქსიეთილენი) სტაბილურობის და არატოქსიურობის გამო გამოიყენება, როგორც დეტერგენტი. აცილებს არასპეციფიურად დაკავშირებულ პროტეინებს. ბლოკავს პროტეინების დამაკავშირებელ უბნებს პლანშეტის ფოსფატში (ზავდება TBS ან PBS-ში);
 - ანტი-CT (cholera toxin) AB (1:2000 PBS Tween 20-Si);
 - ანტი-Rabbit IMG Ab პეროქსიდაზ კონიუგატი;
 - ფოსფატ-ციტრატული ბუფერი ნატრიუმის პერბორატით (1 კაფსულა:100მლ დისტილატი);
 - OPD (o-phenylene diamine dihydrochloride) სუბსტრატი (0.4მგ/მლ სამუშაო კონც.).

მიკროკოსმების ექსპერიმენტი *V.cholerae*-ს სიცოცხლისუნარიან, მაგრამ არაკულტივირებადი მდგომარეობის (VBNC) უჯრედებზე. კულტურებს ვზრდიდით დაცურებულ 1.8%-იან LB-აგარზე. 24 საათიანი ინკუბაციის შემდეგ 37⁰C-ზე, ნაზრდს ვრეცხავდით 5 მლ ფიზიოლოგიური ხსნარით და შეგვქონდა სხვადასხვა არეებში: LB-ბულიონში, ლისის ტბის და ზღვის წყლებში, T₁N₆-არეში. თითოეულს ვათავსებდით მაცივრის (4⁰C) და ოთახის (25⁰C) ტემპერატურებზე. მიკროკოსმების თითოეული სინჯარიდან დროის გარკვეული ინტერვალით ვახდენდით ბაქტერიების ამოთესვას, როგორც LB, ასევე TCBS-ის ნიადაგზე. უჯრედების დათვლა ხდებოდა არაკულტივირებად მდგომარეობაში, როდესაც ადგილი ჰქონდა 0.1 უჯ/მლ-ზე ნაკლები კულტივირებადი უჯრედის გამოვლენას. კულტივირებადი უჯრედების გამოვლენის ლიმიტი დგინდებოდა მიკროკოსმის 10 მლ-ის გაფილტვრით 0.22 მკმ ფორონების ფილტრში და შემდეგ ფილტრის მოთავსებით 1.8%-იან LB-აგარზე.

2.2.4. ბაქტერიოფაგების გამოყოფა

ბაქტერიული ვირუსების წყლიდან გამოყოფას და კულტივირებას ვახდენდით სტანდარტული გამდიდრების მეთოდით. თითოეული საიტიდან 100 მლ წყალს ვფილტრავედით 0.45 მკმ-იან ფილტრში. წყლის სინჯს ვუმატებდით კონცენტრირებულ ბულიონს და ბაქტერიული კულტურის ნარევეს, თანაფარდობით 10:1:1 და ვათავსებდით თერმოსტატში მთელი ღამით 37°C-ზე. 5000 ბრ/წთ ცენტრიფუგირების შემდეგ ვამატებდით ქლოროფორმს და ვაწვეთებდით შესაბამისი ბაქტერიების გაზონებზე. ფაგის ლიზისური ზონების აღმოსაჩენად ფინჯნებს ვამოწმებდით 6-18-24 საათში.

ბაქტერიოფაგების მიღება შტამებიდან ხდებოდა ფისკის მეთოდით [4], შერჩეული ინდიკატორი შტამების მეშვეობით. 24 სთ-იანი ბაქტერიულ კულტურას ვაცენტრიფუგებდით 5,000 rpm-ზე და ვფილტრავედით 0.45 მკმ-იან ზომის ფილტრში, შემდეგ ვაწვეთებდით ინდიკატორი შტამის გაზონზე. 18 სთ-იანი ინკუბაციის შემდეგ ვნახულობდით ლიზისურ ზონებს, რომელთაც ვჭრიდით გაზონიდან და ვაინკუბირებდით ინდიკატორ შტამთან ერთად ფაგის შემდგომი გამრავლებისა და გასუფთავებისათვის.

2.2.5 ბაქტერიოფაგების ბიოლოგიური თვისებების შესწავლა

ფაგების სუფთა ხაზების მისაღებად ვიყენებდით ორშრიანი აგარის მეთოდს. მორფოლოგიურად ერთგვაროვანი კოლონიებიდან 5-10 თანმიმდევრული პასაჟის შედეგად.

ფაგების ლიზისური სპექტრის შესწავლას ვაწარმოებდით მყარ საკვებ არეზე კრეიჯის მეთოდის მოდიფიკაციის მიხედვით. “სპოტ ტესტის” მეშვეობით ფაგის სუსპენზიის წვეთები დაგვექონდა ლოგარითმულ ფაზაში არსებული ბაქტერიების გაზონებზე [130]. საცდელი ფაგის სამუშაო ტიტრი შეადგენდა 1×10^8 ნაწ/მლ. 37°C t-ზე 18-24 სთ ინკუბაციის შემდეგ აღვირცხავდით შედეგებს რასაც თან სდევდა ფაგების შემდგომი კონცენტრირება და გასუფთავება.

ფაგების ლიზისის სტაბილობის შესწავლას ვახდენდით თხიერ არეში “აპელმან“-ის მეთოდის გამოყენებით. 4,5მლ LB ბულიონის შემცველ სინჯარებში შეგვექონდა 2×10^9 უჯრ/მლ კონცენტრაციის ბაქტერიული კულტურის 10მკლ და ვუმატებდით 0,2მკმ-იან მემბრანულ ფილტრში გაფილტრულ 0,5მლ საკვლევ ბაქტერიოფაგს ისეთი განზავებებით, რომ ფაგური ნაწილაკების რაოდენობა პირველი სინჯარიდან ბოლო სინჯარისკენ თანმიმდევრობით შემცირებულიყო 10^8 ნაწ/მლ- 10^1 ნაწ/მლ. ვახდენდით ინკუბაციას 37°C-ზე 4-6-24-48 საათის განმავლობაში. საკვლევ ფაგის ლიზისის სტაბილობის მახასიათებლად აღვირცხავდით ინკუბაციის დროს და იმ ბოლო განზავებას, რომელ სინჯარაშიც არ აღინიშნებოდა ბაქტერიული კულტურის ზრდა.

ფაგის ზუსტი ტიტრის დადგენას მოცემულ შტამზე ვახდენდით აგარის ორშრიანი ფენების მეთოდით [4].

ფაგის ნეგატიური კოლონიის მორფოლოგიას ვადგენდით სტანდარტული შემადგენლობის ნიადაგზე (LB-ნიადაგი) ორშრიანი აგარის მეთოდის საშუალებით. ნეგატიური კოლონიების ანალიზს ვახდენდით მათი ფორმირების დასრულების შემდეგ (18-24სთ) [4].

ფაგის ვირონის მორფოლოგიას ვსწავლობდით ელექტრონული მიკროსკოპის საშუალებით. პრეპარატებს ვამზადებდით ნეგატიური კონტრასტირების მეთოდით ურანილაცეტატის 2%-იანი წყლიანი ხსნარის გამოყენებით. ფაგის სუსპენზია ან კონცენტრატი დაგვქონდა საკონტრასტო ნიმუშებთან ერთად კოლოდიუმის აპკებზე-ბადებზე. სტანდარტულ კვლევას ვაწარმოებდით IEM-1200SX (Jeol, იაპონია) და M10 (Opton-Zeiss, გერმანია) ელექტრონული მიკროსკოპის საშუალებით.

პატრონ - უჯრედთან ურთიერთქმედების ფაზების შესწავლა ხდებოდა თითოეული პარამეტრის მიხედვით, კერძოდ:

ა) ადსორბციის სიჩქარეს და ინტენსივობას ბაქტერიულ უჯრედებზე ვსაზღვრავდით არაადსორბირებული ფაგის რაოდენობის მიხედვით, ქლოროფორმირების მეთოდით [86,90].

ბ) ლატენტიური პერიოდის ხანგრძლივობას და საშუალო გამოსავლის სიდიდეს ვადგენდით ელისის და დელბრუკის კლასიკური მეთოდით [4].

ფაგის ეფექტური მრავლობითობის განსაზღვრისათვის ვაწარმოებდით განზავებების ორ სერიას: 1) 4,5მლ ბულიონიან სინჯარებში შეგვქონდა მყარ არეზე გაზრდილი ბაქტერიული კულტურის ჩამონარეცხი განზავებების იმ ანგარიშით, რომ მიკრობთარიცხვი თანმიმდევრობით შემცირებულიყო 10^8 უჯრ/მლ- 10^1 უჯრ/მლ. სინჯარებს ვამატებდით 0,2 მკმ ფოროფენების მემბრანულ ფილტრში გაფილტრულ საკვლევი ბაქტერიოფაგის 50მკლ-ს (10^8 ნაწ/მლ). 2) იგივე მოცულობის ბულიონიან სინჯარებში შეგვქონდა 0,2მკმ ფოროფენების მემბრანულ ფილტრში გაფილტრული საკვლევი ბაქტერიოფაგი იმ ანგარიშით, რომ ფაგური ნაწილაკების რიცხვი თანმიმდევრობით შემცირებულიყო 10^8 ნაწ/მლ- 10^1 ნაწ/მლ და თითოეულ სინჯარას ვამატებდით დაცურებულ აგარზე გაზრდილი ბაქტერიული კულტურის ჩამონარეცხის 50მკლ-ს. ვახდენდით ინკუბაციას თერმოსტატში 18 საათის განმავლობაში 37°C -ზე, რის შემდეგაც ყველა სინჯარაში ვამოწმებდით საკვლევი ფაგის ტიტრს გრაციას მეთოდით. ეფექტურ მრავლობითობად მივიჩნებდით საკვლევი ბაქტერიოფაგის და ბაქტერიული კულტურის იმ შეფარდებას, რომელშიც ბაქტერიოფაგი მაქსიმალურად გამრავლდა. (მაგ. 1 ფაგური ნაწილაკი : 100 ბაქტერიული უჯრედი).

სპეციფიკური იმუნური შრატებით ბაქტერიოფაგების ნეიტრალიზაცია. სპეციფიკური ანტიფაგური შრატები მიღებული იყო ბოცვრების იმუნისაციის შედეგად *V. cholerae*-ს მიმართ სპეციფიკური ბაქტერიოფაგებით: Vch105, Vch54, Vch10CH (სულ 3 ანტიფაგური შრატი). სპეციფიკური ანტიფაგური შრატის მისაღებად 2-3 კგ წონის ბოცვრების ყურის ვენაში შეგვყავდა საკვლევი ფაგის ($1-5 \times 10^{11}$ ნაწ/მლ) და ფროინდის ადიუვანტის ნარევი (1:1, 3მლ ფაგი: 3მლ ადიუვანტი). ეს განზავება თითო ბოცვერს უკეთდებოდა 1მლ-ის ოდენობით. ანტისხეულების ტიტრის დასადგენად, პირველი იმუნისაციიდან ყოველ მე-10, მე-20 და 30-ე დღეს დაიგეგმა სისხლის აღება ყურის ვენიდან, რისთვისაც შეირჩა *V. cholerae*-ს მიმართ აქტიური 2 ფაგი: Vch54 და Vch10CH. მე-40

დღეს ბოცვრებს ვუღებდით სისხლს გულიდან, გამოვეყოფდით სისხლის შრატს და ვინახავდით შემდგომი კვლევებისთვის. ნეიტრალიზაციისთვის ფაგი სჭირდა 10^7 ხარისხში. უნდა დამზადდეს შრატის განზავებები: 1:50, 1:100, 1:500, 1:1000. ნეიტრალიზაციამდე ფაგი და შრატი ინახება წყლიან აბაზანაში 28°C ტემპერატურაზე განსაზღვრული დროით. სანეიტრალიზაციო ნარევის მისაღებად 0,1 მლ ფავს ემატება 0,9 მლ შესაბამისი განზავების შრატი და ინახება თერმოსტატში 37°C ტემპერატურაზე გარკვეული ხნით. ნეიტრალიზაციის დროის გავლის შემდეგ 0,1 მლ სანეიტრალიზაციო ნარევი შეგვაქვს 9,9მლ ფიზ. ხსნარში და ვტიტრავთ გრაციას მეთოდით. კონტროლი: 0,1მლ ფაგი+0,9მლ ფიზ.ხსნარი ან LB-ბულიონი გადაგვაქვს ფინჯნებზე. ფავის სეროლოგიურ ნათესაობას ვსწავლობდით ფავის ნეიტრალიზაციის ჯვარედინა რეაქციის ჩატარების გზით სხვადასხვა სპეციფიურობის ანტიფაგური შრატის გამოყენებით. ფაგი – ანტიფაგური შრატის თითოეული წყვილის შემთხვევაში ვსაზღვრავდით ნეიტრალიზაციის პროცენტს და კონსტანტას [4]. ნეიტრალიზაციის კონსტანტა გამოითვლება ფორმულით:

$$Kt=2,3xD/t \times \lg P_0/P_t$$

D-შრატის განზავება.

t-ნეიტრალიზაციის დრო.

P_0 -ფავის რაოდენობა კონტროლში.

P_t -ფავის რაოდენობა შესაბამის დროზე.

2.2.6. ბაქტერიოფაგების გამრავლება

ფაგების გამრავლება მყარ საკვებ არეზე და კონცენტრატების მიღება ხდებოდა შემდეგი მეთოდების გამოყენებით: მყარ არეზე კონცენტრატს ვიდებდით სტანდარტული მეთოდით, რომელიც გულისხმობს თხელი აგარის ფენაში მაღალკონცენტრირებული ბაქტერიული სუსპენზიის ფაგოლიზისში და მინიმალური მოცულობის თხევად არეში ფავის შემდგომ ექსტრაგირებას. ფაგური კონცენტრატის მომზადებისას 0,7%-იან LB-აგარში შეგვქონდა ბაქტერიები $1-5 \times 10^8$ და ბაქტერიოფაგები 1×10^5 ნაწ/მლ საბოლოო კონცენტრაციით. ინკუბაციას ვახდენდით 37°C -ზე 18-24 სთ, ვხსნიდით აგარის ზედა ფენას შპადელით, ვაცენტრიფუგირებდით 5000 ბრ/წთ 30 წთ და ვამოწმებდით ტიტრს გრაციას მეთოდით. მიღებული ფაგოლიზატის ტიტრი იყო $1-5 \times 10^{10}-10^{11}$ ნაწ/მლ.

თხიერ არეში ფაგოლიზატის მიღებისას კულტურას ვზრდით ბულიონიან კოლბაში სანჯღრეველაზე 37°C -ზე ლოგარითმულ ფაზამდე ($1-5 \times 10^8$ უჯ/მლ). შემდეგ ხდებოდა ფავის სუსპენზიის დამატება სხვადასხვა მრავლობითობით (1:10, 1:25, 1:50, 1:100) და კულტივირების გაგრძელება შემცირებული აერაციით. 28°C -ზე 1,5-2,0 სთ-ის შემდეგ ხდებოდა ბაქტერიების სრული ლიზისი. ქლოროფორმით დამუშავების შემდეგ, ლიზატს ვტოვებდით 14-16 სთ მაცივარში სრული ლიზისისთვის. ლიზატს ვაცენტრიფუგირებდით 5000 ბრ/წთ 20-30 წთ და ვადგენდით ტიტრს გრაციას მეთოდით. მიღებული ფაგოლიზატის ტიტრი აღწევდა $1-5 \times 10^{10}$ ნაწ/მლ კონცენტრაციას.

2.2.7. ფიზიკო-ქიმიური ფაქტორების ზემოქმედება ბაქტერიოფაგებზე

ფაგების სტაბილობა სხვადასხვა არეში შევისწავლეთ არსებულ სხვადასხვა ხსნარებში 24 სთ-ის, 1-2 კვირის, 1-3-6 თვის განმავლობაში (LB –ლურია-ბერტანის ბულიონი, LB +MgSO₄, LB+2% NaCl, PBS pH7.4, ბუფერიზებული პეპტონიანი წყალი pH7, პეპტონიანი წყალი pH7.8, ფიზიოლოგიური ხსნარი, SM-ბუფერი, ლისის ტბის წყალი, შავი ზღვის წყალი, LB +CaCl₂, ტრიპტონ მარილიანი ბულიონი (T₁N₆, T₁N₈), LB+ქლოროფორმი). ბაქტერიოფაგები 1X10⁷ ნაწ/მლ ტიტრში ინახებოდა 4⁰C t-ზე სიბნელეში და პერიოდულად ვადგენდით ტიტრს აგარის ორშრიანი ფენის მეთოდით.

ფაგების თერმინაქტივაცია შეისწავლებოდა ფიზიოლოგიურ ხსნარში. ფაგებს საბოლოო კონცენტრაციით 1X10⁸ ნაწ/მლ ვაინკუბირებდით სასურველ ტემპერატურაზე (55, 60, 65, 70⁰C) თერმოსტატიკულად კონტროლირებად წყლის აბაზანაში სხვადასხვა დროის ინტერვალით (10,20,30 წთ). დროის გასვლის შემდეგ ხდებოდა ფაგის მყისიერი განზავება და ტიტრის დადგენა აგარის ორშრიანი ფენის მეთოდით. ფაგის აქტიური ნაწილაკების პროცენტს ვადარებდით ფაგის კონტროლს საწყის დროზე. ასევე განისაზღვრა რეაქციის სიჩქარე.

წყალბადიონთა კონცენტრაციის (pH) ზეგავლენა განისაზღვრა ფაგურ ბუფერში SM (100 mMNaCl, 8 mM MgSO₄•7H₂O, 50 mMTris-Cl (1 M, pH 7.5), 0.002% (w/v) უელატინი) სხვადასხვა pH-ზე (pH=1,4,7,9,12) ფაგები საწყისი კონცენტრაციით 1X10⁸ნაწ/მლ შეგვექონდა საცდელ ხსნარში და 30-60 წთ-ის შემდეგ ხდებოდა ტიტრის დადგენა აგარის ორშრიანი ფენის მეთოდით.

UV ზეგავლენა. ფაგები საბოლოო კონცენტრაციით 1X10⁸ნაწ/მლ დაგვექონდა პეტრის ფინჯანზე UV-ის მოკლეტალღოვან გამოსხივებაზე (2546მ), 30-35სმ-ის დისტანციით, ბნელ პირობებში. აქტიურ ფაგურ ნაწილაკებს ვსაზღვრავდით დროის განსაზღვრული ინტერვალებით (30,60,90 წმ).

ოსმოსური შოკის ზემოქმედება შევისწავლეთ სტანდარტული მეთოდით [18]. ფაგი ზავდებოდა 3,5 M ნატრიუმის ქლორიდის (NaCl) ხსნარში, ინკუბაციას ვახდენდით 37⁰C t-ზე 15 წთ-ის განმავლობაში, რის შემდეგაც 0.1 მლ ოდენობის ფაგი ზავდებოდა 10 მლ დისტილირებულ წყალში და ფაგის ტიტრის დადგენა ხდებოდა აგარის ორშრიანი ფენის მეთოდით.

ნატრიუმის ციტრატის ზემოქმედება შევისწავლეთ ნატრიუმის ციტრატის ხსნარში. ფაგები ზავდებოდა ნატრიუმის ციტრატის ხსნარში, რომელიც თავდაპირველად იფილტრებოდა 0.22 მკმ ზომის ფილტრში. სიცოცხლისუნარიანი ნეგატიური კოლონიების პროცენტული რაოდენობა დგინდებოდა აგარის ორშრიანი ფენის მეთოდით.

2.2.8. ბაქტერიოფაგების გენეტიკური თვისებების შესწავლა

ფაგური დნმ-ის გამოყოფას ვახდენდით ფენოლ/ქლოროფორმით დეპროტეინიზაციის მეთოდით. ბაქტერიოფაგის გაწმენდილ კონცენტრატს (5×10^{11} ნაწ/მლ) ვუმატებდით საწყისი მოცულობის 1/10 ლიზისურ ბუფერს (1% SDS, 10mM EDTA), ვაყოვნებდით ოთახის ტემპერატურაზე 10 წუთის განმავლობაში. შემდეგ ვახდენდით სამეტაპიან დეპროტეინიზაციას ფენოლ/ქლოროფორმით. ნარევს ვუმატებდით ფენოლს (pH8.0) თანაფარდობით 1:1, ვანჯღრევდით და ვაცენტრიფუგებდით 15000ბრ/წთ 10წთ. შემდგომ ეტაპზე ვუმატებდით ფენოლ-ქლოროფორმს 1:1 შეფარდებით, კვლავ ვანჯღრევდით და ვაცენტრიფუგირებდით 15000 ბრ/წთ 10წთ. ბოლოს კი- იზოამილ-ქლოროფორმს 1:24 თანაფარდობით, ვანჯღრევდით და ვატრიალებდით იგივე რეჟიმზე. დნმ-ს გამოლექვას ვახდენდით 5M NaCl და იზოპროპანოლით. ნარევს ვაცენტრიფუგებდით იგივე რეჟიმზე, სუპერნატანტს ვამატებდით 70% ეთანოლს (2:1). ნარევის ცენტრიფუგირების შემდეგ დალექილ დნმ-ს ვაშრობდით ოთახის ტემპერატურაზე, ვუკეთებდით რესუსპენდირებას TE-ბუფერში და ვინახავდით მაცივარში შემდგომი პროცედურებისათვის [4].

ფაგური დნმ-ის რესტრიქციული ანალიზის მიზნით გამოყოფილ ფაგურ დნმ-ს ვამუშავებდით სხვადასხვა რესტრიქციული ენზიმებით (EcoRI, EcoRV, HindIII, BamH I, Pst I, Not I) მწარმოებლის მიერ მოწოდებულ პირობებში. შემდეგ სინჯები შეგვექონდა 0,8%-იან აგაროზის გელში და ვაწარმოებდით ელექტროფორეზს 1,5-2 სთ-ის განმავლობაში. მარკერულ პრეპარატად ვიყენებდით HindIII ფერმენტით დაჭრილ λ ფაგის დნმ-ს (Sigma). გელს ვღებავდით ეთიდიუმ ბრომიდით (0,5მკგ/მლ) სანჯღრევველაზე 45 წუთის განმავლობაში. შედეგს ვნახულობდით UV-ილუმინატორზე. მიღებული რესტრიქციული ფრაგმენტების მოლეკულურ მასას ვსაზღვრავდით საკალიბრაციო მრუდის საშუალებით.

მონაცემთა ანალიზი. თითოეული ნიმუშის შემთხვევაში ხდებოდა სამი სხვადასხვა ანალიზის შედეგად მიღებული მონაცემის დამუშავება, გასაშუალოება და შემდგომში სტანდარტული გადახრების დათვლა. ფაგებს შორის ნათესაური კავშირის დადგენა და ფილოგენეზური ხეების აგება ხდებოდა დაშორებული-მატრიქსული მეთოდით, კერძოდ კი UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean)-დაფუძნებული ანალიზით (FreeTree) [110] და ფილოგენეზური ხეების ვიზუალიზაციის პროგრამით (TreeView) [173]. სტატისტიკური ანალიზი ჩატარდა Microsoft Excel 2010-ის სტატისტიკურ მონაცემთა დამუშავების მეთოდის გამოყენებით, კერძოდ ვარიაციული (ANOVA) და რეგრესიული ანალიზის მეშვეობით. შედეგებში მოყვანილი კორელაციების სტატისტიკური სარწმუნოება (Pearson's r) აღწევდა < 0.05 მნიშვნელობას.

III კვლევის შედეგები

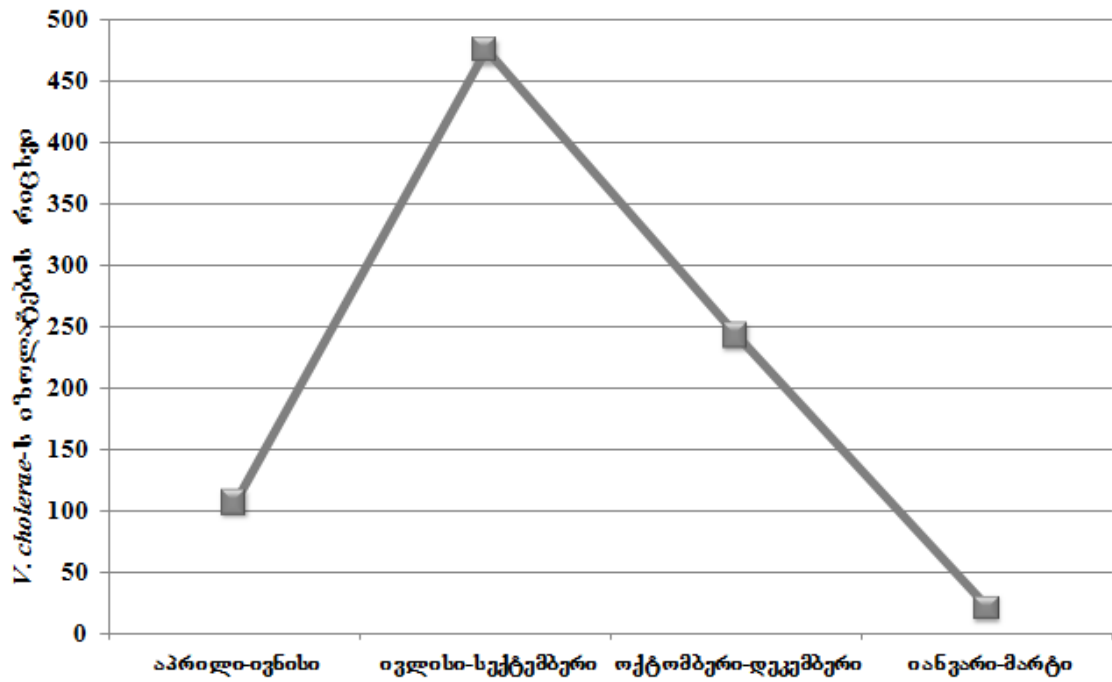
3.1. ქოლერას ჯგუფის ვიბრიონების კოლექციის შექმნა

ქოლერას ჯგუფის ვიბრიონებისა და შესაბამისი ბაქტერიოფაგების გამოყოფა ხორციელდებოდა 2006-2008 წლების განმავლობაში, 30 თვის მონიტორინგის შედეგად, შავი ზღვის სანაპირო ზოლიდან (მდ.სუფსის შესართავი, მდ.ჭოროხის შესართავი, მწვანე კონცხის სანაპირო ზოლი და ბათუმის ბულვარი), ასევე 2009 წელს 3 თვის მონიტორინგის შედეგად, თბილისის შემოგარენში არსებული ტბებიდან (კუმისის ტბა, ლისის ტბა, თბილისის ზღვა და მდ. მტკვარი) აღებული სინჯებიდან. 2006-2009 წლებში მონიტორინგის შედეგად წყლიანი გარემოდან სულ 846 *V. cholerae*-ს და 11 *V. mimicus*-ის იზოლატი გამოიყო, რომლებიც შემდგომში გამოყენებული იყო სპეციფიკური ბაქტერიოფაგების გამოსაყოფად და გასამრავლებლად. გამოყოფას ვაწარმოებდით, როგორც წყლიდან ასევე ფიტო- და ზოოპლანქტონიდან.

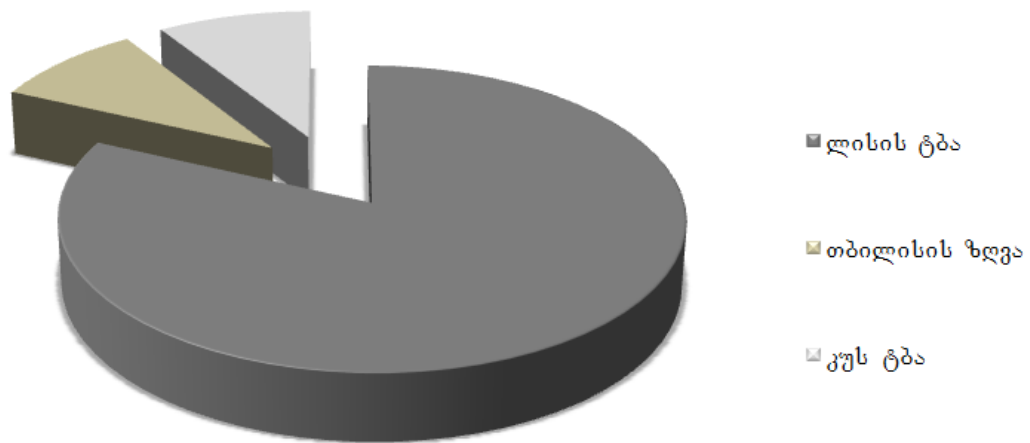
ჩვენს მიერ ჩატარებულმა მონიტორინგმა აჩვენა, რომ ქოლერას ჯგუფის ვიბრიონების გამოყოფის სეზონური ხასიათი დამოკიდებული იყო ტემპერატურაზე, როგორც პლანქტონმოცილებული წყლის, ასევე ფიტო- და ზოოპლანქტონების შემთხვევაში. მოცემული შედეგი შეიძლება დაუკავშიროთ იმას, რომ 2006-2009 წწ ჩატარებული მონიტორინგის მანძილზე, წყლის მარილიანობა, მასში გახსნილი ჟანგბადის რაოდენობა და მჟავიანობა, წყლის ეკოსისტემის, მეტნაკლებად, უცვლელ მახასიათებლებს წარმოადგენდა, განსხვავებით ტემპერატურისაგან, რომელიც სეზონის მიხედვით ცვალებადობდა.

V. cholerae-ს შტამების ინტენსიური გამოყოფა ხდებოდა ზაფხულის და ადრეული შემოდგომის თვეებში (ივლისი-სექტემბერი). სწორედ ამ პერიოდში გამოიყო *V. cholerae*-ს იზოლატების უმრავლესობა-475 იზოლატი (56.1%). მნიშვნელოვნად მცირდებოდა *V. cholerae*-ს შტამების გამოყოფის სიხშირე ზამთარის და ადრეული გაზაფხულის პერიოდში (იანვარი-მარტი). მხოლოდ 21 იზოლატი (2.5%) იყო გამოყოფილი აღნიშნულ თვეებში ჩატარებული მონიტორინგის შედეგად (სურ.3).

2006-2007 წლებში ჩატარებული მონიტორინგის შედეგად *V. mimicus*-ის სულ 11 იზოლატი (7-PCR-ით იდენტიფიცირებული) იყო გამოყოფილი. მათ შორის 9 შტამი გამოიყო ოქტომბერი-ნოემბრის თვეში აღებული ლისის ტბის წყლის სინჯებიდან, 1 შტამი ივლისის თვეში აღებული თბილისის ზღვის წყლის სინჯიდან და 1 შტამი ასევე ივლისის თვეში აღებული კუს ტბის წყლის სინჯიდან (სურ.4).

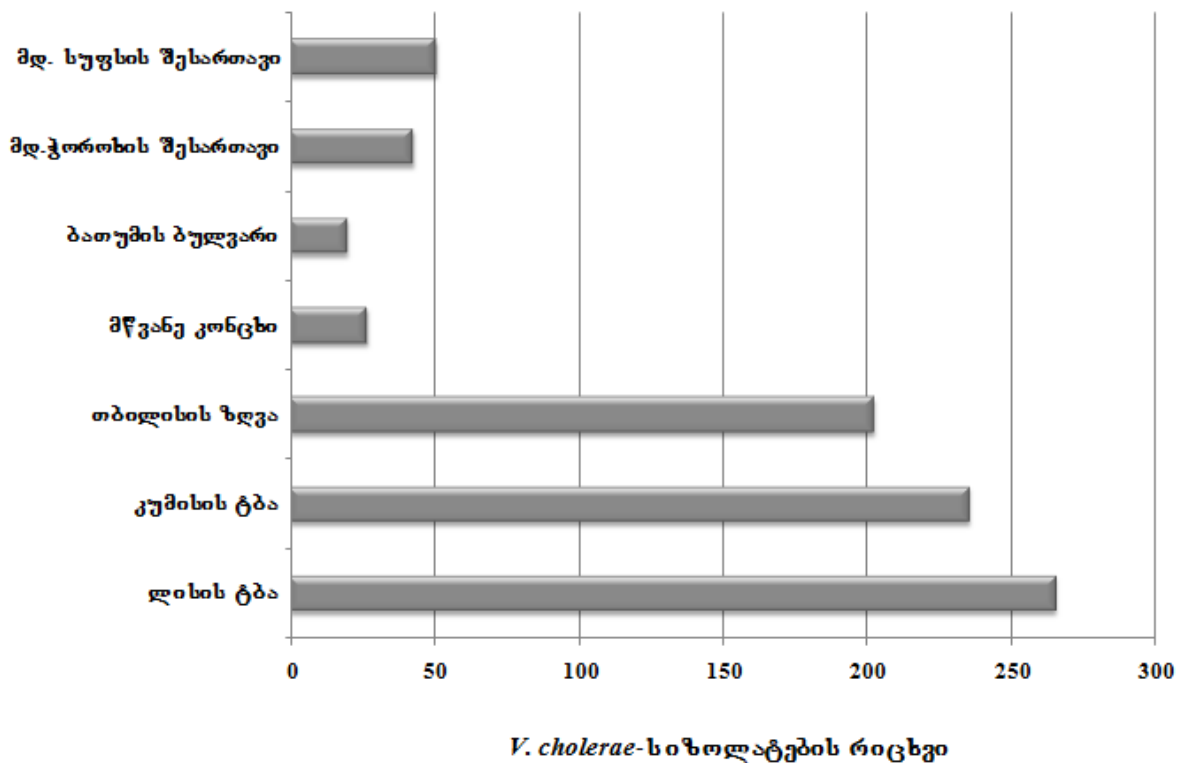


სურ.3. 2006-2009 წლებში გამოყოფილი *V. cholerae*-ს შტამების გამოყოფის სისშირე სეზონის მიხედვით



სურ.4. 2006-2007 წლებში გამოყოფილი *V. mimicus*-ის შტამების რაოდენობრივი განაწილება სეზონის მიხედვით

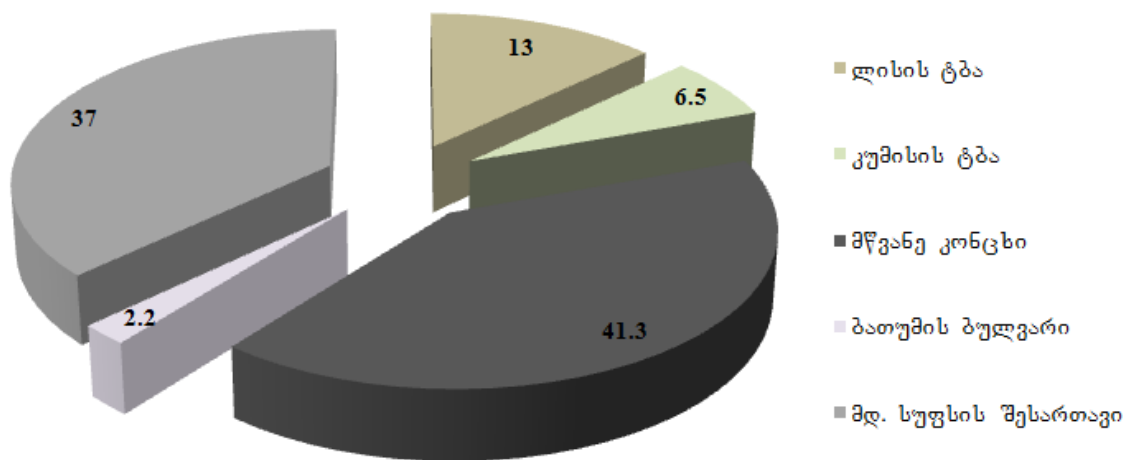
V. cholerae-ს შტამების გამოყოფაზე წყლის ტემპერატურის გარდა, ასევე მნიშვნელოვან ზეგავლენას ახდენს წყლის მარილიანობა. *V. cholerae*-ს შტამების უმრავლესობა-705 იზოლატი (83.3%) გამოიყო თბილისის შემოგარენში არსებული მტკნარი წყალსატევებიდან, სადაც შავ ზღვასთან შედარებით მარილიანობა დაბალია. შავი ზღვის სხვადასხვა საიტიდან *V. cholerae*-ს შტამების სულ 141 იზოლატი (16.7%) გამოიყო. განსხვავდებოდა გამოყოფის სისშირე თითოეული საიტის შემთხვევაში. ყველაზე დიდი რაოდენობით *V. cholerae*-ს იზოლატების გამოყოფა დაფიქსირდა ლისის ტბიდან-266 იზოლატი (31.4%), ხოლო ყველაზე მცირე რაოდენობა- 20 იზოლატი (2.4%) გამოიყო ბათუმის ბულვარიდან აღებული წყლის სინჯებიდან (სურ.5).



სურ.5. 2006-2009 წლებში გამოყოფილი *V. cholerae*-ს შტამების სისშირე გამოყოფის ადგილის მიხედვით

რაც შეეხება *V. cholerae*-ს ეპიდემიურ სეროტიპებს, 846 შტამიდან *V. cholerae* O1-ის სეროტიპად მულტიპლექს პოლიმერაზული ჯაჭვური რეაქციით (PCR) იდენტიფიცირებული იყო 46 ბაქტერიული იზოლატი. უმრავლესობა *V. cholerae* O1-ის იზოლატებისა-37 იზოლატი (80.4%) გამოყოფილი იყო შავი ზღვის წყლის სინჯებიდან. *V. cholerae* O1-ის სეროტიპის მხოლოდ 9 იზოლატი (19.6%) გამოიყო თბილისის შემოგარენში არსებული ტბებიდან. ბათუმის ბულვარიდან გამოიყო *V. cholerae* O1-ის სეროტიპის ყველაზე მცირე-1 იზოლატი (2.2%), ხოლო ყველაზე დიდი რაოდენობით *V. cholerae* O1-ის სეროტიპის იზოლატების-19 შტამი (41.3%) გამოყოფილი იყო მწვანე კონცხის სანაპირო ზოლიდან აღებული წყლის სინჯებიდან (სურ.6) *V. cholerae* O1-ის

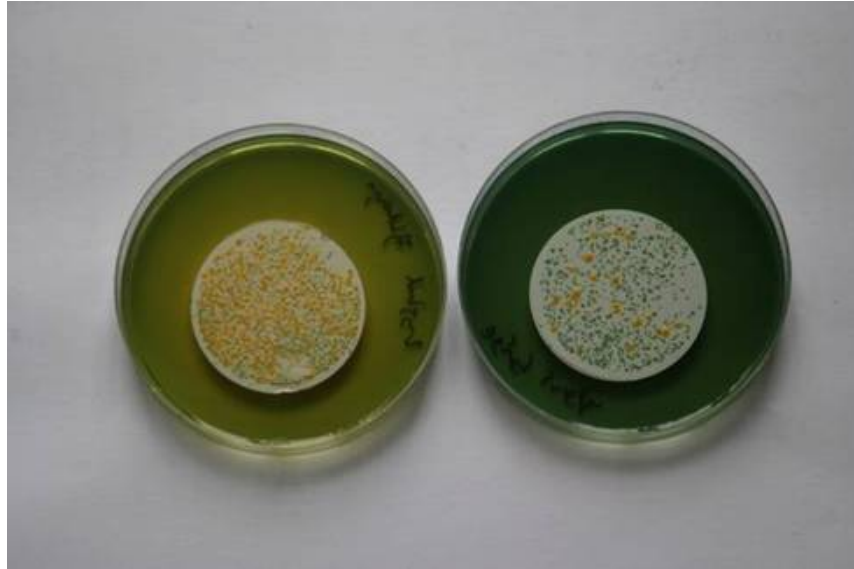
სეროტიპის ყველა იზოლატი გამოიყო ზაფხულის და ადრეული შემოდგომის თვეებში (ივლისი-სექტემბერი). შემდგომში, ბიოქიმიური პარამეტრებით *V. cholerae* O1-ის “კლასიკურ” და “El Tor” ბიოტიპს მიეკუთვნა 29 ბაქტერიული იზოლატი.



სურ.6. 2007-2008 წლებში გამოყოფილი *V. cholerae* O1-ის შტამების პროცენტული განაწილება გამოყოფის ადგილის მიხედვით

3.2. ქოლერას ჯგუფის ვიბრიონების იზოლატების ბიოლოგიური თვისებების შესწავლა

საკვლევი შტამების კულტურალურ-მორფოლოგიურ თვისებებს ვსწავლობდით ბაქტერიების ზრდის ხასიათის მიხედვით მყარ, თხევად და ნახევრადთხევად ნიადაგზე. თავდაპირველად კულტივირებას ვახდენდით სადიფერენციაციო-სადიაგნოსტიკო არეებზე 37°C-ზე. საქაროზა-დადებითი სახეობები ანუ სახეობები, რომელთაც აქვთ საქაროზას ფერმენტაციის უნარი TCBS-ის ნიადაგზე იძლევიან ყვითელი ფერის კოლონიებს, ასეთია *V. cholerae*-ს იზოლატები, ხოლო საქაროზა უარყოფითი სახეობები, როგორცაა *V. mimicus*-ის იზოლატები TCBS-ის ნიადაგზე იძლევიან მწვანე ფერის კოლონიებს (სურ.7). მყარ LB-ნიადაგზე ქოლერას ჯგუფის ვიბრიონები წარმოქმნიან 2-5 მმ ზომის, სფეროსებრ კოლონიებს. პეტონიან წყალში იზრდებიან ზედაპირულად, აპკის სახით.



სურ.7. TCBS-ის ბაქტერიულ არეზე კულტივირებული ქოლერას ჯგუფის ვიბრიონები

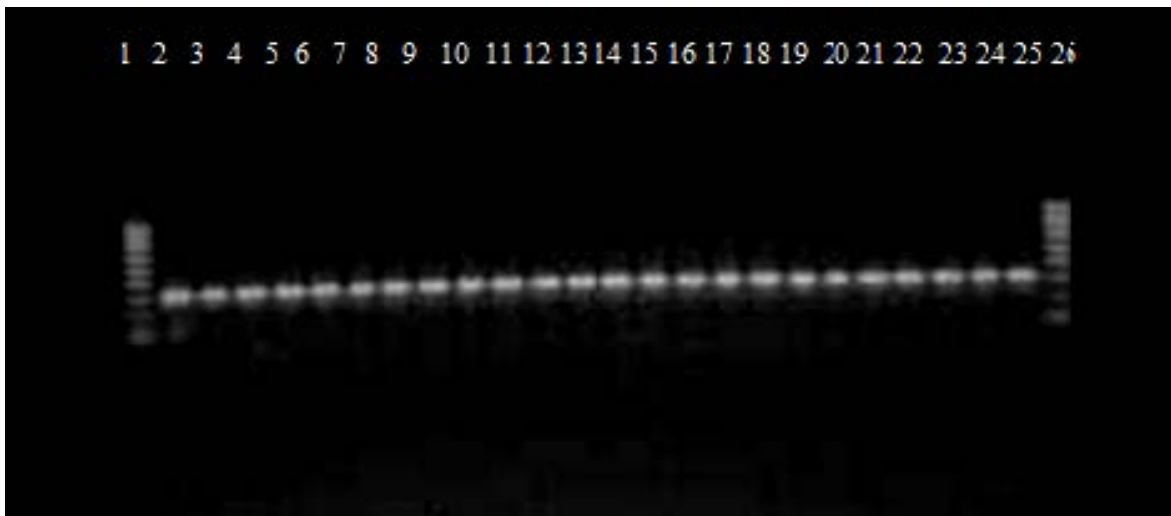
V. cholerae-ს ზოგიერთი იზოლატის მორფოლოგია შევისწავლეთ M10 (Opton-Zeiss, გერმანია) ელექტრონული მიკროსკოპის საშუალებით (სურ.8). *V. cholerae*-ს ვიბრიონები მოხრილი ჩხირის ფორმისაა, ზომით, სიგრძეში დაახლოებით 1-1,5 მკმ-ია, ხოლო სიგანეში 0,4-0,8 მკმ. შტამების ტინქტორიალურ თვისებებს ვსწავლობდით გრამის წესით შედეგების მიხედვით. *Vibrio*-ს გვარის ბაქტერიები მიეკუთვნებიან გრამ(-) ბაქტერიებს.



სურ.8. კუმისის ტბიდან გამოყოფილი *V. cholerae*-ს იზოლატის (Km16) უჯრედის მორფოლოგია

V. cholerae-ს და *V. mimicus*-ის შტამების ბიოქიმიური თვისებების შესწავლას ვაწარმოებდით სპეციალიზირებულ საკვებ არეებზე. პროტოლიზურ აქტივობას ვსწავლობდით ამ მიკრობების მიერ ქულატინის გაჯირჯეების უნარით GSA და GA-ს აგარზე. *Vibrio*-ს გვარის ბაქტერიებს აქვთ როგორც გლუკოზის ფერმენტაციის, ასევე მისი დაჟანგვის უნარი. ტრიპტონიანი თხევადი არე, ნატრიუმის ქლორიდის სხვადასხვა შემცველობით, გამოიყენებოდა მიკრობთა ზრდის უნარის დასადგენად სხვადასხვა პროცენტობის მარილიან არეში. *V. cholerae*-ს და *V. mimicus*-ის იზოლატები *Vibrio*-ს გვარის სხვა სახეობების მსგავსად იზრდებიან 1%-იან მარილიანობის ნიადაგში. ჰალოფილური ვიბრიონებისგან განსხვავებით იზრდებიან უმარილო არეში. როგორც არაჰალოფილურ სახეობებს, არ ახასიათებთ მაღალი პროცენტობის მარილის შემცველ არეში ზრდა (6-8%). შევისწავლეთ აგრეთვე ამ ბაქტერიების მიერ ამონომუავეების დეკარბოქსილირების და ნახშირწყლების ფერმენტაციის უნარი სხვადასხვა არეებში.

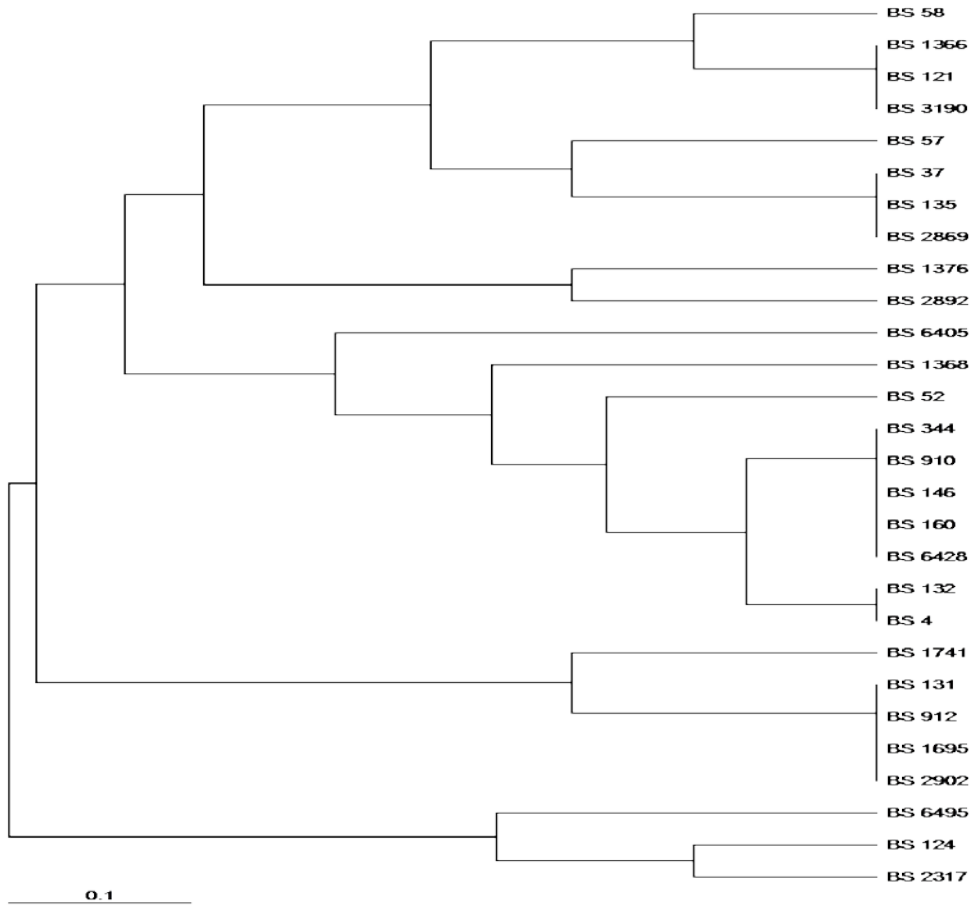
შტამების გენეტიკური გამოკვლევა განხორციელდა პოლიმერაზული ჯაჭვური რეაქციის სხვადასხვა სახეების საშუალებითაც (PCR): 1.პოლიმერაზული ჯაჭვური რეაქცია (ITS – PCR, *Internal Transcribed Spacer* PCR) სპეციფიკური პრაიმერებით (ცხრ.1). 2.მულტიპლექსური პოლიმერაზული ჯაჭვური რეაქცია (Multiplex-PCR) (ცხრ.2) *V. cholerae* O1-ის, *V. cholerae* O139-ის, ტოქსიგენური გენების აღმოსაჩენად (ctxA). გამოვლინდა ctxA+ 8 შტამი, მათ შორის 6 შტამი იყო *V. cholerae* არა-O1-ის და 2 შტამი- *V. cholerae* O1-ის წარმომადგენელი. კვლევებმა აჩვენა ბიოქიმიური იდენტიფიკაციის მაღალი სიზუსტე. იზოლატების 98.5%-თვის ბიოქიმიური იდენტიფიკაცია აღმოჩნდა ზუსტი (სურ.9).



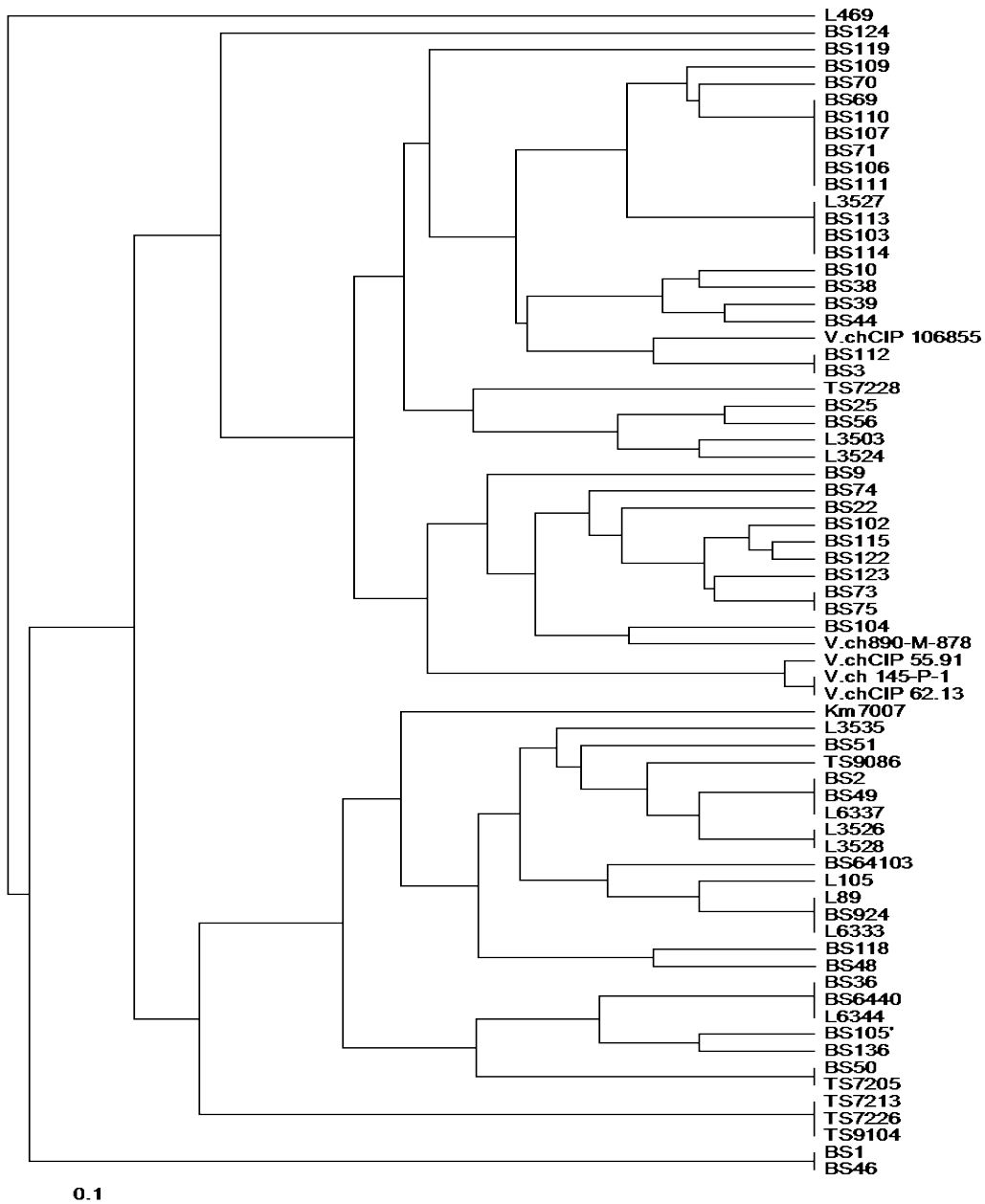
სურ.9. პოლიმერაზული ჯაჭვური რეაქცია *V. cholerae*-ს სახეობების იდენტიფიკაციისთვის

1. PCR-მარკერი; 2.V.ch 3; 3.V.ch 4.V.ch9;5.V.ch 10;6.V.ch 44; 7.V.ch 56; 8.V.ch 39; 9.V.ch46; 10. V.ch 48; 11.V.ch 69; 12.V.ch 70; 13 V.ch71; 14.V.ch73; 15.V.ch74; 16. V.ch75; 17.V.ch102; 18.V.ch103; 19.V.ch104; 20.Vch105; 21.V.ch 106; 22.V.ch 107; 23.V.ch108; 24.V.ch 109; 25.V.ch110; 26. PCR-მარკერი.

ქოლერას ჯგუფის იზოლატების ფაგომგრძობელობა. კვლევის განმავლობაში გამოყოფილი 135 *V. cholerae*-ს და 10 *V. mimicus*-ის ბაქტერიული შტამი (გ.ელიავს ბმე ინსტიტუტის კოლექცია) შემოწმდა ასევე, კვლევის ფარგლებში გამოყოფილი ბაქტერიოფაგების მიმართ მგრძობელობაზე. 135 შტამიდან (60 *V. cholerae* O1-ის და 75 *V. cholerae* არა-O1-ის იზოლატი) 81 (60%) შტამი მგრძობიარე იყო მოცემული ფაგების მიმართ. ფაგომგრძობელობის პროფილის მიხედვით ბაქტერიული შტამების შედარების და დაჯგუფების მიზნით ავაგეთ ფილოგენეზური ხე (UPGMA ანალიზი), როგორც *V. cholerae* არა-O1-ის (სურ.10), ასევე *V. cholerae* O1-ის შტამების შემთხვევაში(სურ.11).



სურ.10. UPGMA (Nei-Li დაშორებული ანალიზი) ფილოგენეზური ხე *V. cholerae* არა-O1-ის შტამების ფაგომგრძობელობის მიხედვით



სურ.11. UPGMA (Nei-Li დაშორებული ანალიზი) ფილოგენეზური ხე *V. cholerae* O1-ის შტამების ფაგომგრძობელობის მიხედვით
 * 3 ბაქტერიული იზოლატი მიეკუთვნება *V. cholerae* არა-O1-ს და წარმოადგენს მასპინძელ შტამს (Vch105, Vch89, Vch469).

V. mimicus-ის 10 შტამი შემოწმდა ფაგომგრძობელობაზე, როგორც *V. mimicus*-ის ასევე *V. cholerae* O1-ის და *V. cholerae* არა-O1-ის მიმართ სპეციფიკურ ბაქტერიოფაგებზე. 10-დან 3 შტამი იყო რეზისტენტული ყველა ბაქტერიოფაგის მიმართ, ხოლო 7 შტამი მეტნაკლებად ფაგომგრძობიარე აღმოჩნდა (ცხრ.6).

ცხრ.6. *V. mimicus*-ის ბაქტერიული იზოლატების ფაგომგრძობელობა

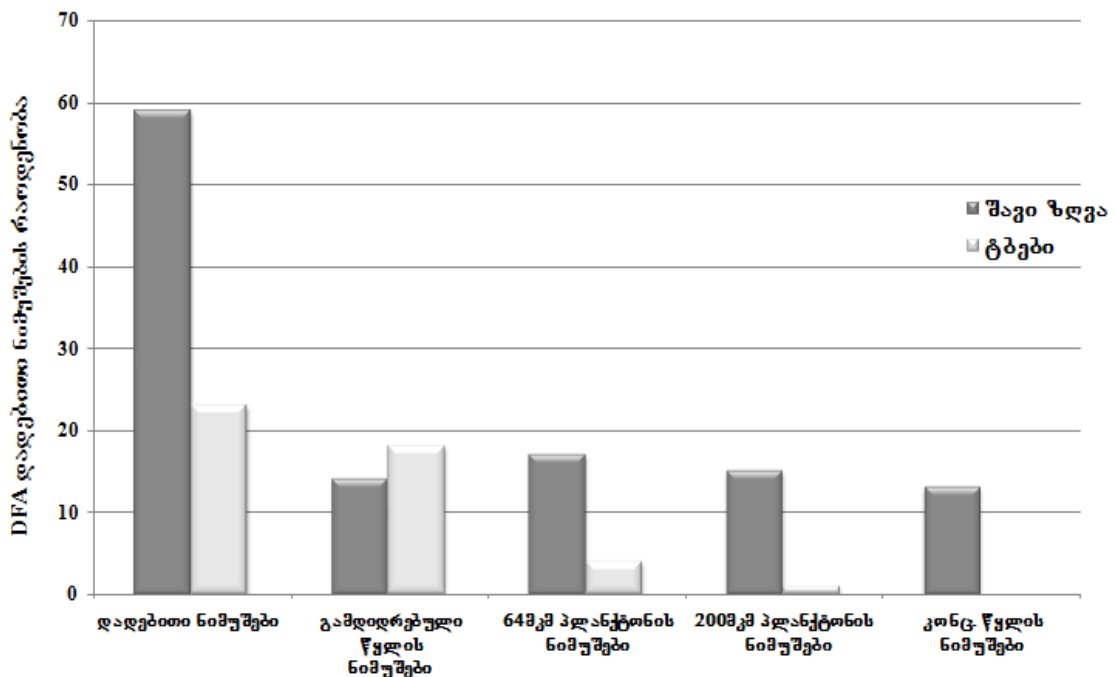
| <i>V. mimicus</i> -ის შტამები | გამოყოფის დრო/წყარო | ბაქტერიოფაგები | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-------------------------------|---------------------|--|-------------|----------|------------|----------|----------|-----------|---------|--------|---------|-------|-------|-------|-------|----------|-------|-------|--------|---|--------|--------|---------|---------|--------|---------|----------|-----------|---------|---------|-------------|
| | | <i>V. cholerae</i> -ს მიმართ სპეციფიკური შტამები | | | | | | | | | | | | | | | | | | <i>V. mimicus</i> -ის მიმართ სპეციფიკური ფაგები | | | | | | | | | | | |
| | | Vch20K-O1 | Vch20K-4805 | Vch16-O1 | Vch16-4805 | Vch54-O1 | Vch9K-O1 | VchL.VIII | Vch25MT | VchXKL | Vch83-6 | VchKP | VchKP | VchK1 | VchK3 | VchIXkum | VchB1 | VchB4 | Vch801 | Vch802 | Vch803 | Vch105 | Vch105S | Vch10CH | VchBS3 | VmimBS3 | Vmim25MT | Vmim8 07K | Vmim-K5 | Vmim-L4 | Vmim29 08 K |
| V.mimATCC33653 | ATCC/აშშ | scl | scl | | cl | scl | scl | scl | ntv | scl | scl | scl | scl | | | | | | | | | | | scl | cl | cl | cl | | | cl | cl |
| V.mim842 | ოქტ.2006/ლისის ტბა | scl | scl | | cl | scl | scl | scl | | | | scl | scl | | | | | | | | | | | | | | | cl | cl | scl | scl |
| V.mim837 | ოქტ.2006/ლისის ტბა | | | | scl | | | scl | | | | scl | scl | | | | | | | | | | | | | | | cl | cl | | scl |
| V.mim853 | ოქტ.2006/ლისის ტბა | ol | cl | scl | cl | cl | cl | ol | scl | ol | cl | cl | cl | | | | | | | | | | | scl | scl | scl | | | | scl | scl |
| V.mim843 | ოქტ.2006/ლისის ტბა | | | | scl | | | scl | | | | scl | scl | | | | | | | | | | | | | | | cl | cl | ntv | |
| V.mim720 | ივლ.2006/თბ.ზღვა | | | | scl | | | | | | | scl | scl | | | | | | | | | | | | scl | scl | | | | scl | scl |
| V.mim839 | ოქტ.2006/ლისის ტბა | scl | scl | | scl | | | scl | | | | scl | scl | | | | | | | | | | | | | | | cl | cl | | scl |
| V.mim723 | ივლ.2006/კუს ტბა | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| V.mim229 | ნოემ.2006/ლისის ტბა | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| V.mim215 | ნოემ.2006/ლისის ტბა | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

*cl – სრული ლიზისი; ol- სრული ლიზისი, ერთეული ბაქტერიული კოლონიებით; scl- არასრული ლიზისი; tv- ერთეული ნეგატიური კოლონია; ntv-მრავალი ცალკეული ნეგატიური კოლონია; ცარიელი უჯრები-უარყოფითი რეაქცია/ლიზისი არ მომხდარა

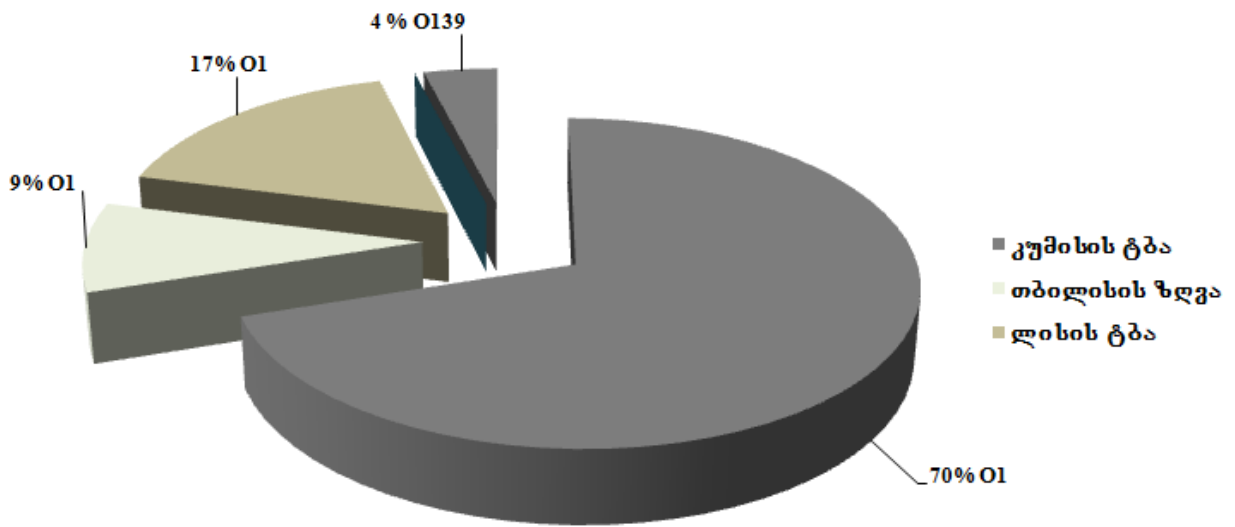
3.3. *V. cholerae*-ს ტოქსიგენური შტამების პირდაპირი გამოვლენა სხვადასხვა იმუნოლოგიური მეთოდით

V. cholerae-ს ეპიდემიური სეროტიპების გამოვლენა პირდაპირი ფლუორესცენტული ანალიზით (DFA). პირდაპირი კვლევა ფლუორესცენტული ანტისხეულებით გამოიყენებოდა შავი ზღვის სანაპირო ზოლიდან და მტკნარი ტბებიდან აღებული სინჯების გამოსაკვლევად და მათში *V. cholerae* O1-ის და O139-ის გამოსაკვლევად, როგორც გამდიდრებულ და კონცენტრირებულ წყლის ნიმუშებში, ასევე გამდიდრებულ და კონცენტრირებულ პლანქტონის ნიმუშებში. DFA-ით დამუშავდა 267 საკვლევი ნიმუში. წყლის პირდაპირმა ფლუორესცენტულმა ანალიზმა გამოავლინა *V. cholerae* O1-ის არსებობა როგორც, ზღვის, ასევე ტბების წყლის ნიმუშებში (კუმისისა და ლისის ტბები, თბ.ზღვა). გამოკვლეული სინჯებიდან 82-მა ნიმუშმა (31%) დადებითი შედეგი აჩვენა. დადებითი ნიმუშებიდან 74 (90%) ნიმუში პოზიტიური იყო *V. cholerae* O1-ის შემთხვევაში, 8(10%) ნიმუში – *V. cholerae* O139-ის (სავარაუდოდ VBNC-

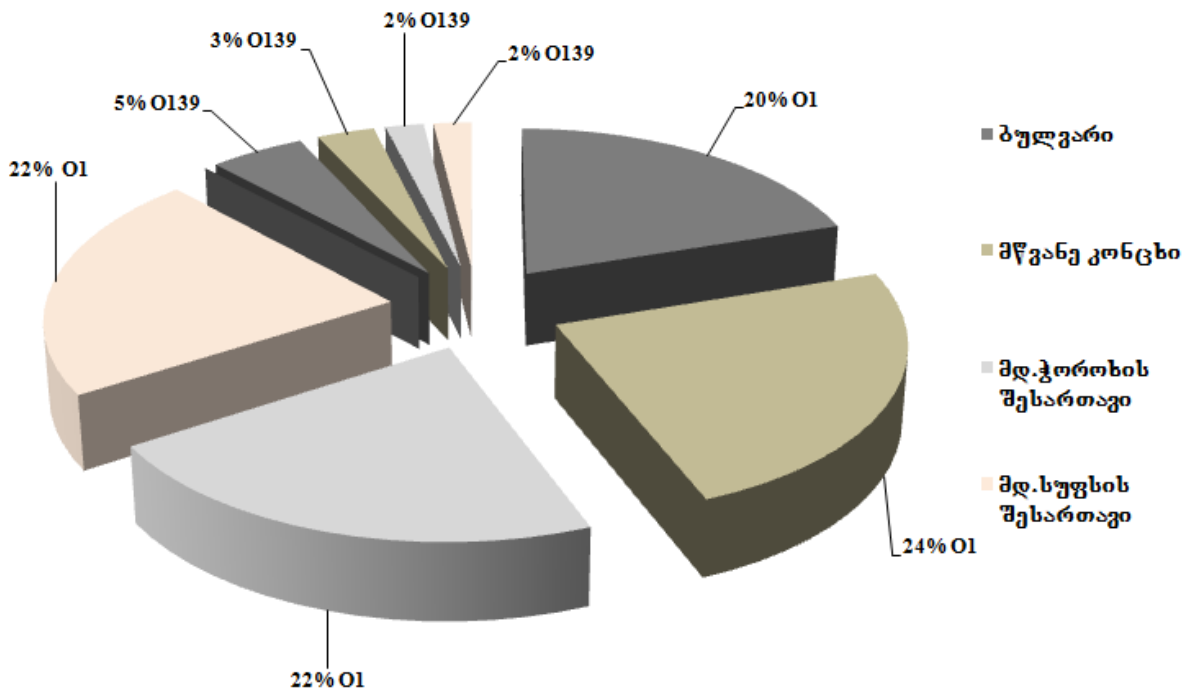
სიცოცხლისუნარიან, მაგრამ არაკულტივირებად ფორმაში) შემთხვევაში. წყალში, *V. cholerae*-ს აღნიშნული სეროჯგუფის ბაქტერიების არსებობა უმეტესად, აღინიშნებოდა ზაფხულის პერიოდში, წყლის გამდიდრებულ და პლანქტონის გამდიდრებულ ნიმუშებში. დაკონცენტრირებულ წყალში *V. cholerae* O1 მცირე რაოდენობით იყო ნანახი (სურ.12). ტბების შემთხვევაში *V. cholerae* O1-ის დადებითი ნიმუშების რაოდენობა შეადგენდა 23-ს (28%), საიდანაც *V. cholerae* O1-ის სეროტიპისთვის დადებითი შედეგი ნანახი იყო 22 ნიმუშისთვის, ხოლო ერთი მიეკუთვნებოდა *V. cholerae* O139-ის სეროტიპს (სურ.13). შავი ზღვის წყლის სინჯებში *V. cholerae* O1-ის დადებითი ნიმუშების რაოდენობა აღწევდა 59-ს (72%), ამ შემთხვევაშიც უმეტესი წილი დადებითი ნიმუშების მიეკუთვნებოდა *V. cholerae* O1-ის სეროტიპს, კერძოდ 52 ნიმუში. *V. cholerae* O139-ის სეროტიპისთვის კი დადებითი შედეგი ნანახი იყო 7 გამოკვლეული ნიმუშის შემთხვევაში (სურ.14). *V. cholerae* O1-ის და O139-ის სეროტიპების დეტექცია ხდებოდა სპეციფიკური ფლუორესცენტულად მონიშნული ანტისხეულებით (New Horizon Diagnostics, MD) ეპიფლუორესცენტული მიკროსკოპიის მეშვეობით (სურ.15-17).



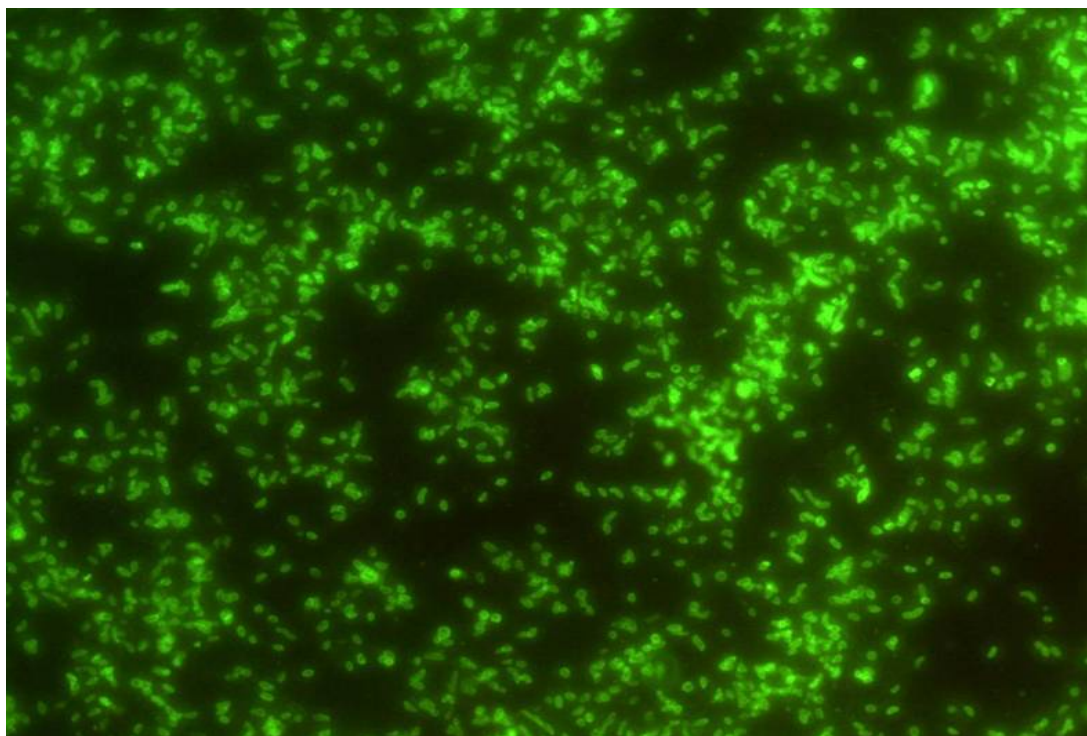
სურ.12. DFA დადებითი ნიმუშების განაწილება ნიმუშის ტიპის მიხედვით



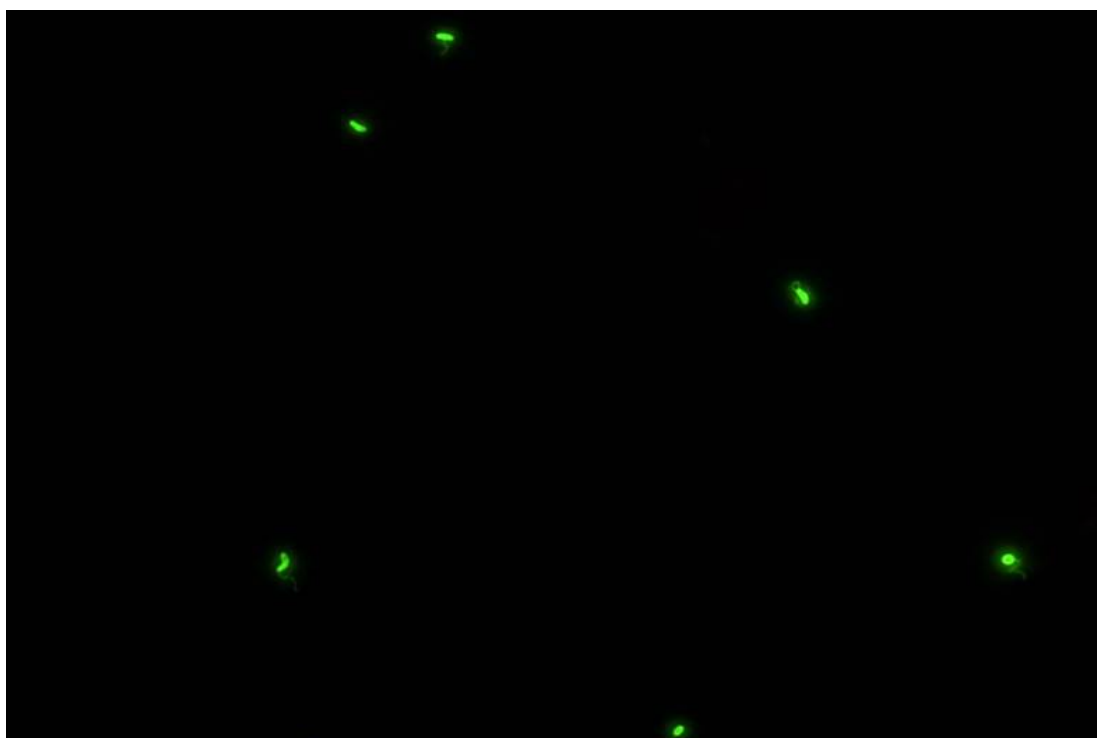
სურ.13. *V. cholerae*-ს ეპიდემიური სეროტიპების DFA დადებითი ნიმუშების განაწილება ტბებში



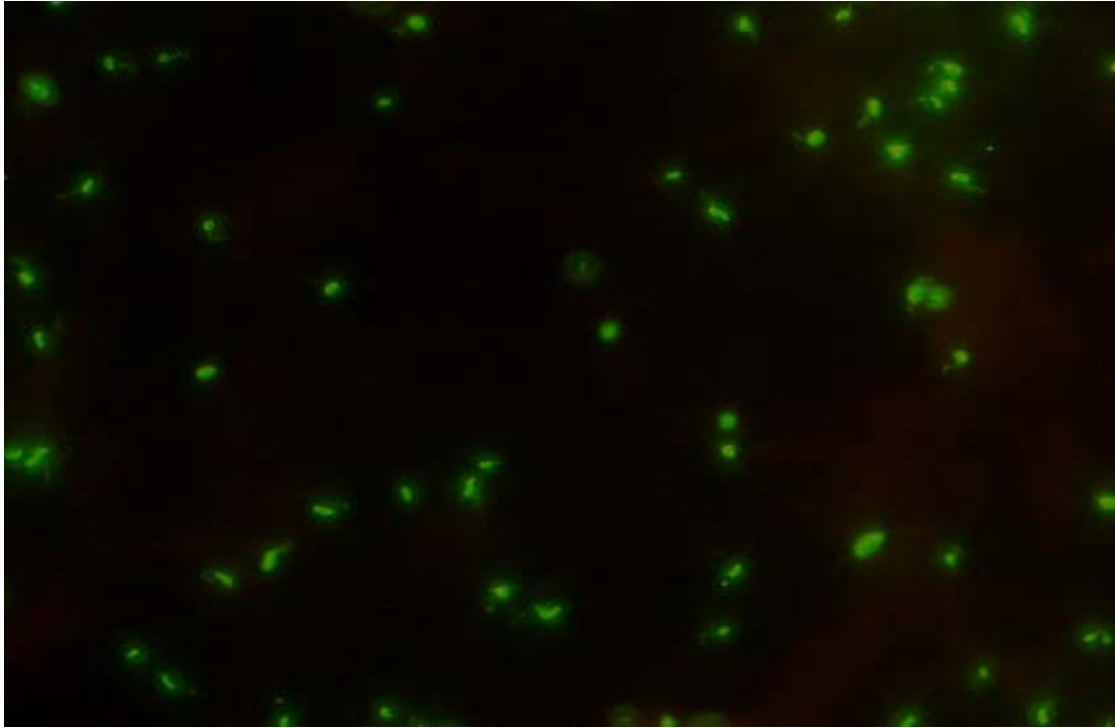
სურ.14. *V. cholerae*-ს ეპიდემიური სეროტიპების DFA დადებითი ნიმუშების განაწილება შავ ზღვაში



სურ.15. *V. cholerae* O1 სეროტიპის დადებითი DFA ნიმუში. გამდიდრებული წყლის ნიმუში შავე ზღვა, მწვანე კონცხი, ივლისი, 2008წ.

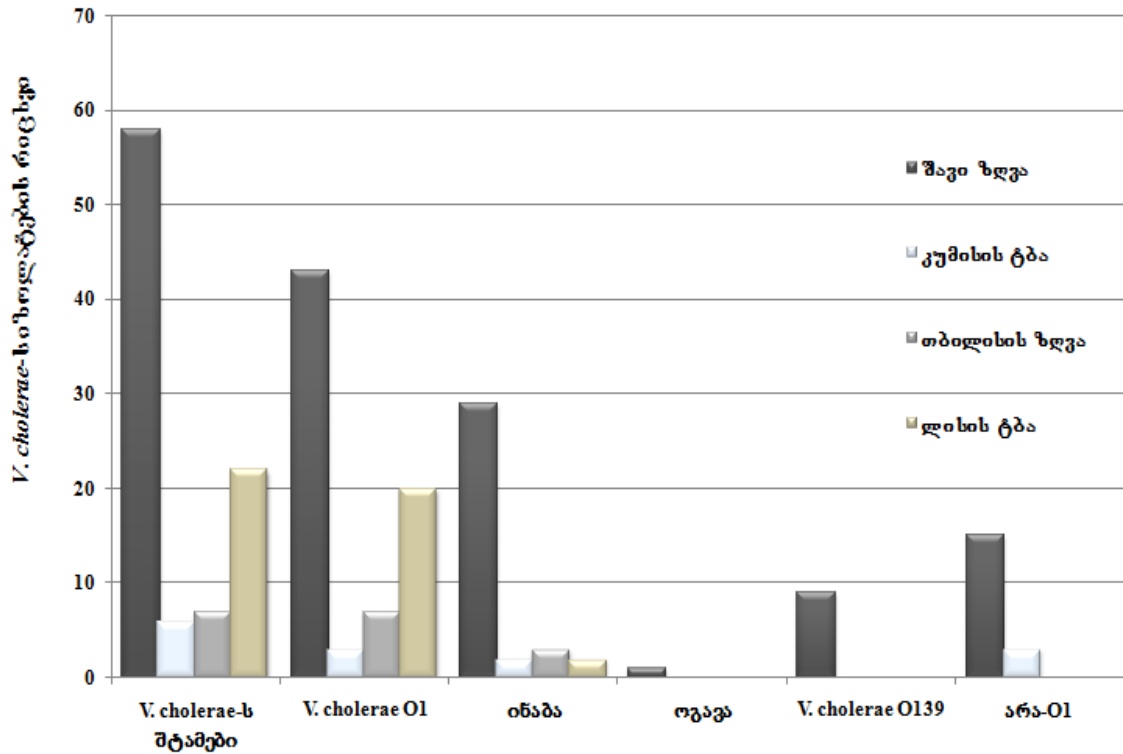


სურ. 16. *V. cholerae* O1 სეროტიპის დადებითი DFA ნიმუში. ამდიდრებული წყლის ნიმუში. კუმისი, ივნისი 2008წ.



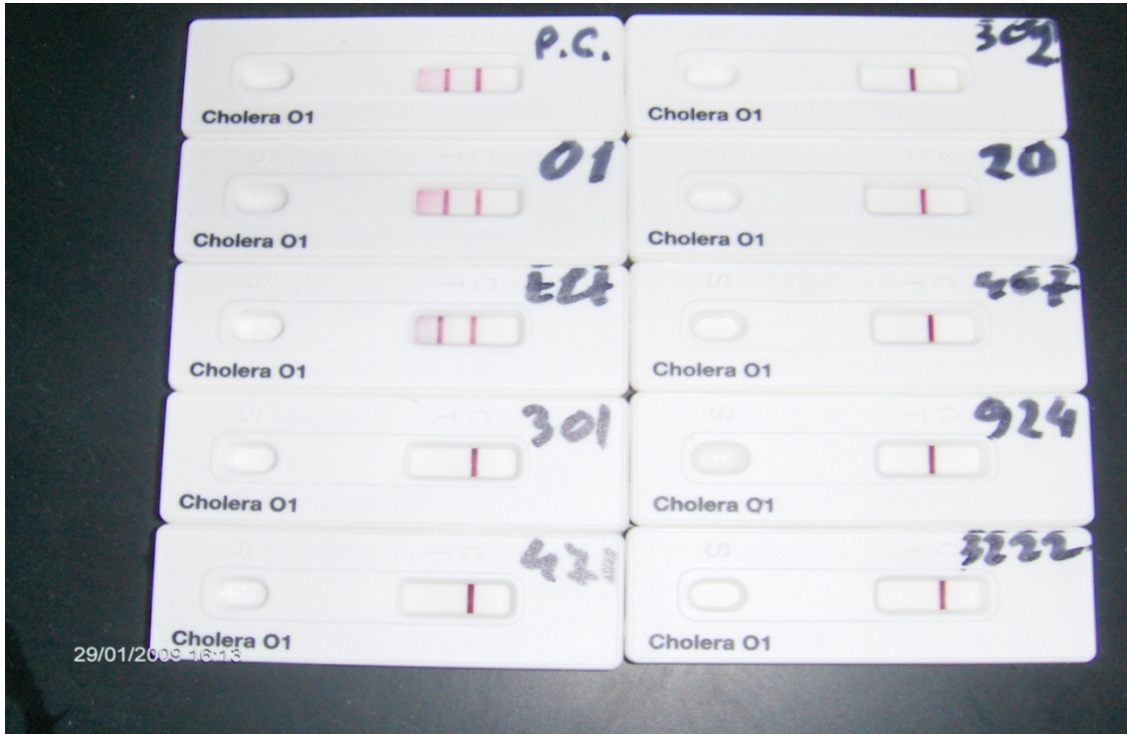
სურ.17. *V. cholerae* O1 სეროტიპის დადებითი DFA ნიმუში.64მკმ
ჰომოგენიზირებული პლანქტონის ნიმუში. თბილისის ზღვა, ივლისი 2009წ.

V. cholerae-ს ეპიდემიური სეროტიპების გამოვლენა ქოლერას პოლი-იმუნური შრატის (“**B.D.Difco™**”) გამოყენებით. *V. cholerae*-ს ანტიშრატი “პოლი” წარმოადგენს სეროლოგიური ტესტის ერთ-ერთ მაგალითს, რომელიც დაფუძნებულია აგლუტინაციის რეაქციაზე და რომლის მეშვეობითაც ხდება გარემოში *V. cholerae*-ს ტოქსიგენური იზოლატების პირდაპირი დეტექცია. აგლუტინაციის რეაქცია ტარდება B.D. Difco™ *V.cholerae*-ს ანტიშრატი “ოგავა” და B.D. Difco™ *V.cholerae*-ს ანტიშრატი “ინაბას” გამოყენებით. თესტმა 73 შტამზე აჩვენა დადებითი შედეგი. მეტესობა *V. cholera* O1-ის შტამებისა (43 შტამი) გამოყოფილი იყო შავი ზღვის სხვადასხვა საიტიდან. ასევე შავი ზღვიდან გამოყოფილმა 7-მა შტამმა სავარაუდოდ მოგვცა დადებითი შედეგი *V. cholera* O139-ის სეროტიპზე. *V. cholerae* O1-ის შტამების განაწილება კუმისისა და ლისის ტბის შემთხვევაში მეტნაკლებად მსგავსი იყო და შეადგენდა კუმისის ტბის სინჯებში 3 შტამს, თბილისის ზღვის სინჯებში 7 შტამს, ხოლო ლისის ტბის ნიმუშებში 20 შტამი იყო *V. cholerae* O1-ის სეროტიპის. სლაიდ-აგლუტინაციის დროს საკვლევე ნიმუშებში გამოვლინდა ასევე ინაბა და ოგავას სეროტიპის იზოლატები (სურ.18). აღსანიშნავია, რომ სლაიდ-აგლუტინაციის შედეგები დადებით კორელაციაში მოდიოდა პოლიმერაზული ჯაჭვური რეაქციით და პირდაპირი ფლუორესცენტული ანალიზით ჩატარებული კვლევის შედეგად მიღებულ შედეგებთან.



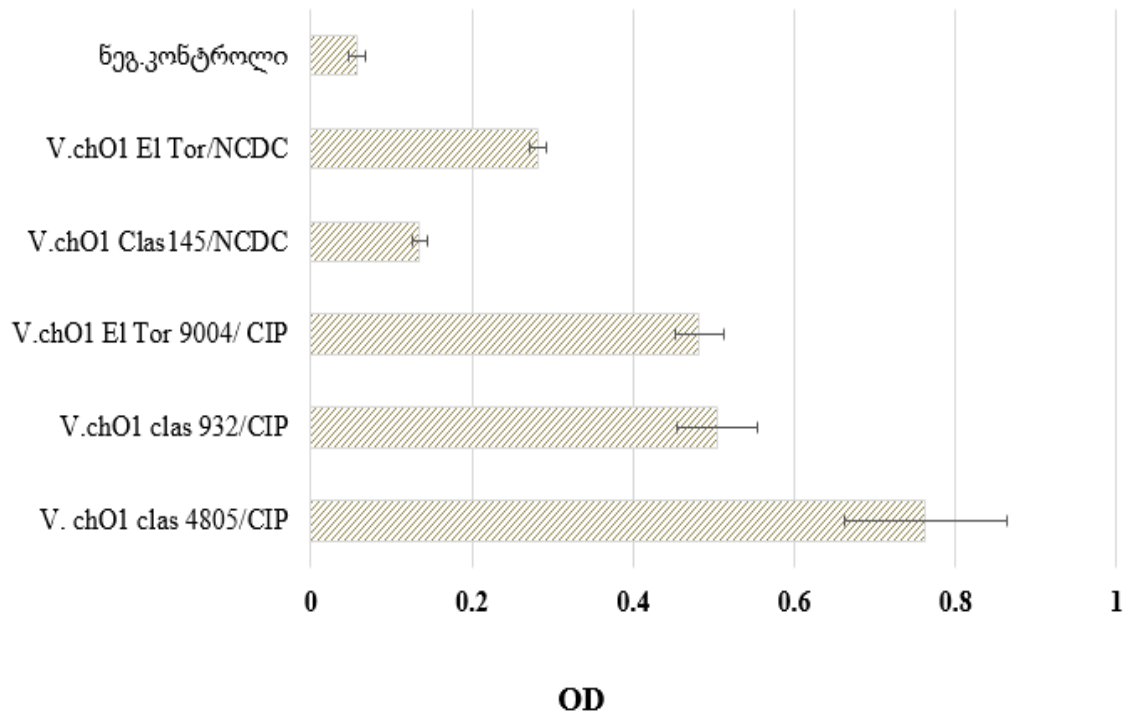
სურ.18. *V. cholerae* O1 სეროტიპის განაწილება შავ ზღვაში და ტბებში სლაიდ-აგლუტინაციის მეთოდის მიხედვით

V. cholerae-ს ეპიდემიური სეროტიპების გამოვლენა ქოლერა სმარტის გამოყენებით სეროლოგიური ტესტი-გარემოდან გამოყოფილი *V. cholerae* O1-ის სეროტიპისთვის ტარდებოდა Cholera O1 SMART™ –მგრძნობიარე, მემბრანული ანტიგენის სწრაფი ტესტის გამოყენებით. Cholera O1 SMART™ -ის სპეციალური ფორმის ჰორიზონტალურ ფირფიტებზე დატანილი მონოკლონური ანტისხეულები სპეციფიკურია *V. cholerae* O1-ის O1 ლიპოპოლისაქარიდის A ანტიგენის მიმართ. აღნიშნულ ტესტზე ხდებოდა *V. cholerae*-ს ეპიდემიური სეროტიპების გადამოწმება. ასევე შემოწმდა და დადებითი შედეგი აჩვენა *V. cholerae* O1-ის სტანდარტული შტამების (NCDC, თბილისი) შემოწმებამ (სურ.19).



სურ. 19. ქოლერა სმარტის ტესტი *V. cholerae* O1-ის სეროტიპისთვის

V. cholerae-ს შტამების მიერ ტოქსინის გამოყოფის შესწავლა GM1 განგლიოზიდ დამოკიდებული ენზიმდაკავშირებული იმუნოსორბენტული ანალიზით (GM1-ELIZA). ქოლერის ტოქსინის (CT) პროდუქციის დათვლა ხდებოდა სტანდარტულ მრუდთან შედარების მიხედვით, რომელიც ასახავდა *V. cholerae* O1-ის სტანდარტული შტამის (V.chCIP62.13, *V. cholerae* 4805-აზიატიკუსი) ფილტრატის სხვადასხვა განზავებების შემთხვევაში პროდუცირებულ ტოქსინის რაოდენობას (OD-ოპტიკური სიმკვრივე). გამოყოფილი ქოლერა ტოქსინის რაოდენობა, თითოეული შტამის შემთხვევაში ითვლებოდა სამი სხვადასხვა ანალიზის შედეგად მიღებული პასუხის გასაშუალოებით. კვლევის შედეგად განხორციელდა 55 გარემოდან გამოყოფილი *V. cholerae* O1-ის სეროტიპის იზოლატის სკრინინგი ქოლერა ტოქსინის პროდუქციაზე მათ შორის პოლიმერაზული ჯაჭვური რეაქციით იდენტიფიცირებული იყო *V. cholerae* O1-ის სეროტიპის 41 შტამი. გამოკვლეული შტამებიდან 11 იზოლატი *ctx* გენის მატარებელი იყო. კონტროლის ჯგუფი მოიცავდა *V. cholerae*-ს ტოქსიგენური შტამების 5 სტანდარტულ იზოლატს კულტურათა სხვადასხვა კოლექციიდან (NCDC-თბილისი, CIP-პასტერის ინსტიტუტის კოლექცია) (სურ.20). კვლევამ აჩვენა, რომ 6 გარემოს იზოლატი დადებითი იყო ქოლერა ტოქსინის პროდუქციაზე AKI საკვებ არეში კულტივირების შემთხვევაში. ასევე ნანახი იყო *V. cholerae* O1-ის მიმართ სპეციფიკური ბაქტერიოფაგების გარკვეული ზეგავლენა შტამების მიერ ქოლერა ტოქსინის პროდუქციაზე (იხ.თავი 3.4.5) ფაგისა და შტამის სხვადასხვა თანაფარდაბით ურთიერთქმედებისას დროის სხვადასხვა ინტერვალის შემთხვევაში.

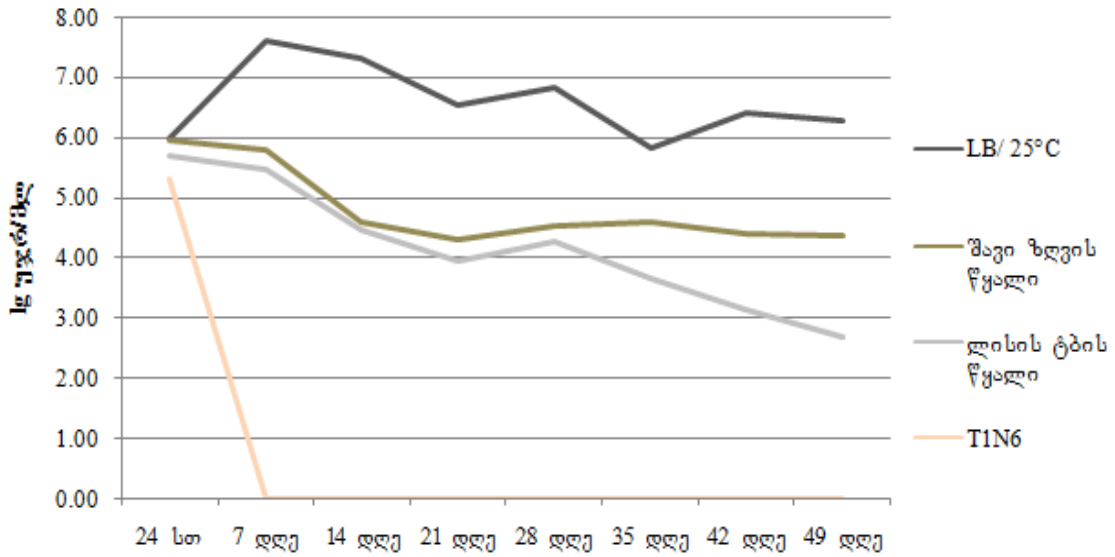


სურ.20. *V. cholerae* O1-ის სეროტიპის სტანდარტული შტამების მიერ ქოლერა ტქოსინის გამოყოფა.

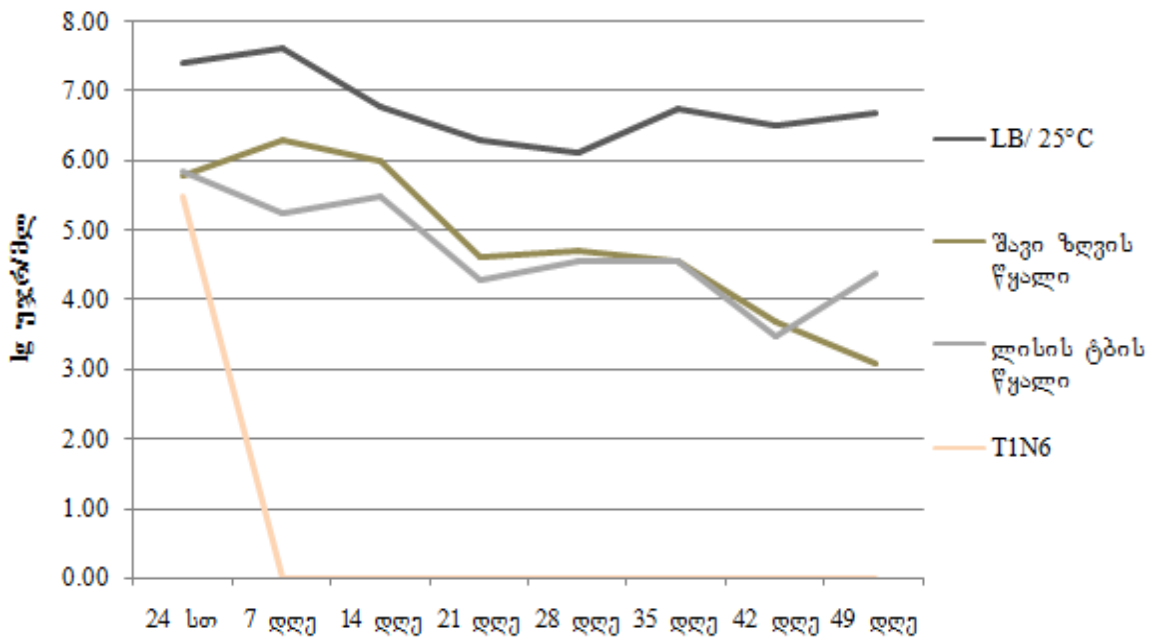
ბაქტერიების სიცოცხლისუნარიანი, მაგრამ არაკულტივირებადი მდგომარეობის (VBNC) შესწავლა მიკროკოსმების ცდებში. *V. cholerae*-ს ბაქტერიების გადასვლის უნარს VBNC-ის მდგომარეობაში ვსწავლობდით არასაკმარისი საკვების შემცველობის და არახელსაყრელი ტემპერატურული რეჟიმის შექმნით სამი შტამის მაგალითზე: V.ch O1 „კლასიკური“ (V.ch 145-P-1, NCDC თბილისი), V.ch 104 და V.ch123 (გელიავას ბმე-ს კოლექცია). ვიყენებდით ლისისა და შავი ზღვის წყლებს, ასევე, T₁N₆-ის შემცველ არეს. შესადარებლად ვიყენებდით მდიდარ საკვებ არეს LB-ნიადაგს და სელექტიურ TCBS-ის ნიადაგს. არახელსაყრელი ტემპერატურის მაგალითად შეირჩა 4⁰C-ს, კონტროლად კი ოპტიმალური ტემპერატურა-25⁰C. უჯრედები ითვლებოდა არაკულტივირებად მდგომარეობაში, როდესაც ხდებოდა 0.1 უჯ/მლ-ზე ნაკლები კულტივირებადი უჯრედის გამოვლენა, ასევე VBNC-ის მდგომარეობაში გადასულ უჯრედებს ვნახულობდით ეპიფლუორესცენტულ მიკროსკოპში DFA-ის მეთოდით მომზადებულ მასალებში.

კვლევაში აჩვენა, რომ 4⁰C-ზე ლისის ტბისა და ზღვის წყალში *V. cholerae* O1-ის ბაქტერიების ტიტრის ცვლილება მეტნაკლებად მსგავსი იყო. სამივე შტამის შემთხვევაში არაკულტივირებად მდგომარეობაში გადასვლა ხდებოდა 42 დღის შემდეგ. უნდა აღინიშნოს რომ V.ch 104 და V.ch123 შტამები შავი ზღვის სინჯებიდან არის გამოყოფილი. *V. cholerae* O1-ის ბაქტერიებისთვის კრიტიკული აღმოჩნდა T₁N₆-ის

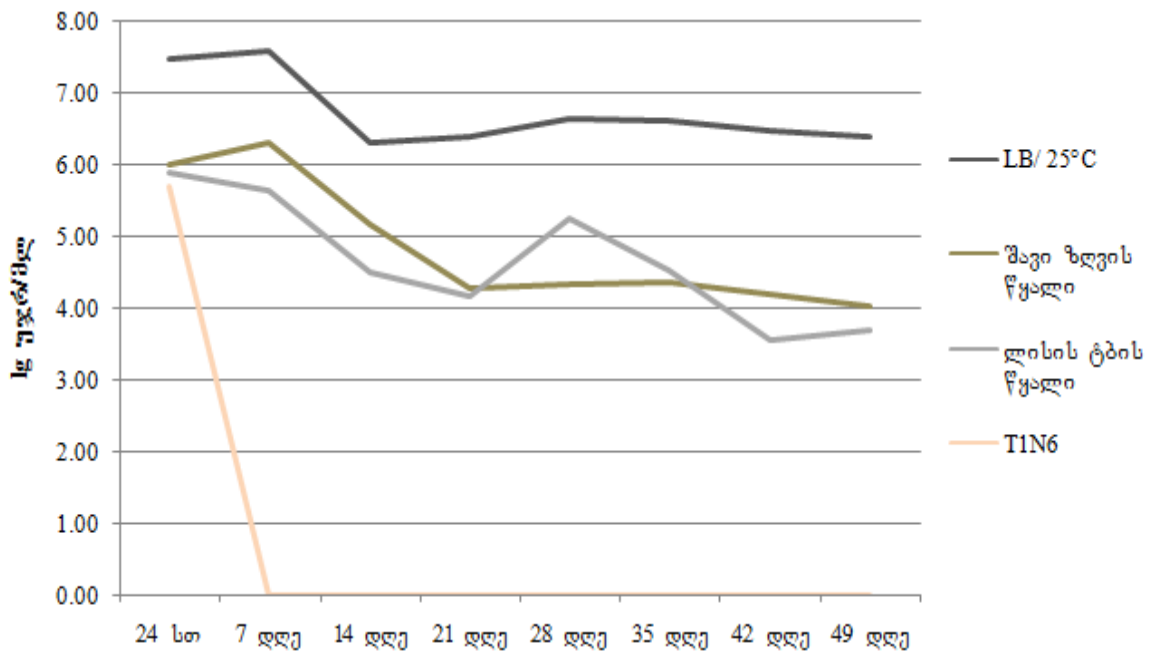
შემცველი არე, 7 დღის შემდეგ მათი ზრდა საკვებ ნიადაგზე აღარ შეინიშნებოდა. მოცემული მაჩვენებელი დაკავშირებულია *V. cholerae* O1-ის, როგორც არაპათოგენური სახეობის მიერ მარილის ნაკლებ მოთხოვნილებასთან. მდიდარ საკვებ არეში, 25°C ტემპერატურაზე, 7 კვირიანი პერიოდის განმავლობაში კულტივირებადი ბაქტერიების რაოდენობა მხოლოდ 1 log-ით შემცირდა (სურ.21) შესაბამისად, არ მოხდა არაკულტივირებად მდგომარეობაში გადასვლა. რაც შესაძლოა გამოწვეული იყოს არეში საკმარისი რაოდენობით საკვები ნივთიერებების არსებობით.



ა)



ბ)



გ)

სურ.21. *V. cholerae* O1 –ის ბაქტერიების სიცოცხლისუნარიანობის შესწავლა
 ა) *V.ch* O1 „კლასიკური“; ბ) *V.ch* 104; გ) *V.ch* 123

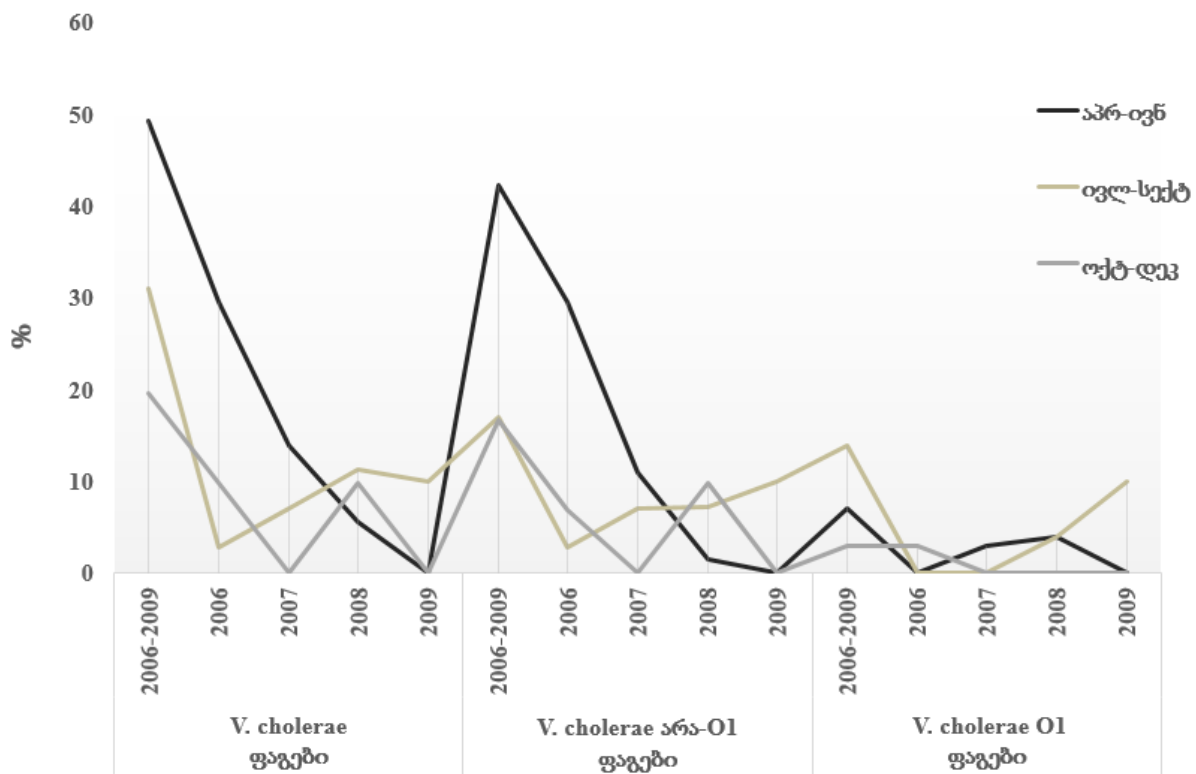
3.4. *V. cholerae*-ს და *V. mimicus*-ის მიმართ სპეციფიკური ბაქტერიოფაგების გამოყოფა და გავრცელება

2006-2009 წლების განმავლობაში, შავი ზღვის სხვადასხვა საიტის (ბულვარის სანაპირო ზოლი, მწვანე კონცხის სანაპირო ზოლი, მდ.ჭოროხის შესართავი, მდ.სუფსის შესართავი) და თბილისის შემოგარენში არსებული ტბების (კუმისის და ლისის ტბები და თბილისის ზღვა, ასევე მდ.მტკვარი) მონიტორინგის შედეგად აღებული წყლის სინჯების 882 გამდიდრებული წყლის ნიმუშიდან *V. cholerae*-ს მიმართ სპეციფიკური 71 და *V. mimicus*-ის მიმართ სპეციფიკური 7 პირველადი იზოლატი გამოიყო. გამოყოფის სიხშირე მაღალი იყო აპრილი-ივნისის პერიოდში (49.3%). ოქტომბერი-დეკემბრის პერიოდში ფაგების ყველაზე მცირე (19.7%) რაოდენობა იყო გამოყოფილი ($R^2=0.9$, $p<0.04$) (სურ.22). დაახლოებითი სიხშირე *V. cholerae*-ს მიმართ სპეციფიკური ფაგების გამოყოფისა შეადგენდა 8%-დან 15%-ს. ფაგების გამოყოფამ ცხადყო, რომ მათი უმრავლესობა (51.2%) გამოიყო თბილისის შემოგარენში არსებული მტკნარი წყალსატევებიდან. ფაგების გამოყოფის სიუხვით ხასიათდებოდა კუმისის ტბა, საიდანაც ყველაზე დიდი რაოდენობით (24.4%) ფაგური იზოლატის გამოყოფა მოხდა. ფაგები ნაკლები სიუხვით გამოირჩეოდნენ შავ ზღვაში (22%). ფაგების უმცირესი რაოდენობა გამოიყო კულტურათა სუპერნატანტებიდან (13.4%) (სურ.23). *V. mimicus*-ის მიმართ

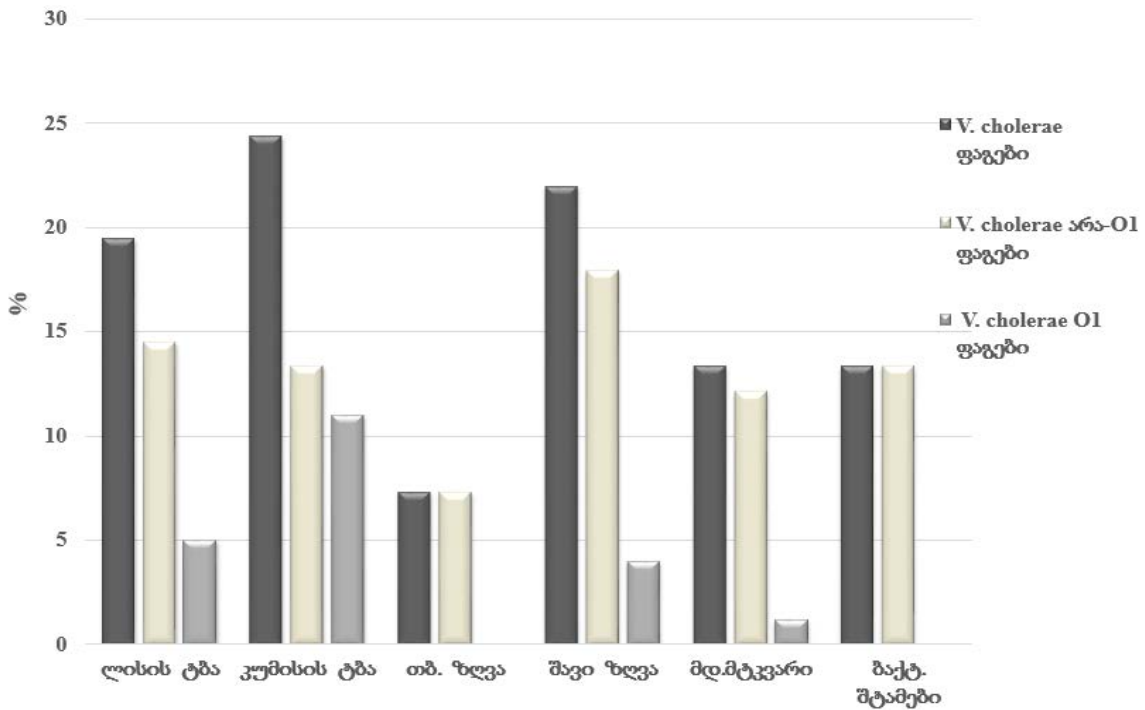
სპეციფიკური 7 პირველადი იზოლატის გამოყოფა მოხდა 2008-2009 წლების ივლისი-აგვისტოს თვეებში აღებული წყლის სინჯებიდან. 7 ფაგური იზოლატიდან 3 ფაგის გამოყოფა მოხდა კუმისის ტბიდან აღებული წყლის სინჯიდან, 1-ის ლისის ტბიდან, 2-ის მდ.მტკვრიდან და 1-ის მდ.ჭოროხის შესართავიდან აღებული წყლის სინჯიდან. 3 ფაგური იზოლატი გამოიყო ივლისის, ხოლო 4-აგვისტოს თვეში ჩატარებული მონიტორინგის შედეგად აღებული წყლის ნიმუშებიდან (ცხრ.7).

კვლევის განმავლობაში *V.cholerae* O1-ის მიმართ სპეციფიკური 17 პირველადი იზოლატი გამოიყო. გამოყოფის სიხშირე *V.cholerae* O1-ის მიმართ სპეციფიკური ფაგების შემთხვევაში მაღალი იყო (10 ფაგური იზოლატი, 58.8%) ივლისი-სექტემბრის პერიოდში. უმეტესობა ფაგებისა (13 ფაგური იზოლატი, 76.5%) გამოიყო თბილისის შემოგარენში არსებული წყალსატევებიდან აღებული წყლის სინჯებიდან (ცხრ.8).

აღსანიშნავია, რომ *V. cholerae*-ს აქვს დაბალი ფაგური პოტენციალი. მაგ.: 2009 წლის ივლისში აღებული სინჯების 24 გამიდიდრებული წყლის ნიმუშიდან მხოლოდ 5 პირველადი ფაგური იზოლატის გამოყოფა მოხერხდა. ფაგის გამოყოფის სიხშირემ აჩვენა სეზონური გამოსატულება. ფაგების გამოყოფა წინ უსწრებდა მასპინძელი ბაქტერიული შტამების გამოყოფის პიკს (სურ.24).



სურ.22. *V. cholerae*-ს მიმართ სპეციფიკური ბაქტერიოფაგების პროცენტული განაწილება სეზონის მიხედვით



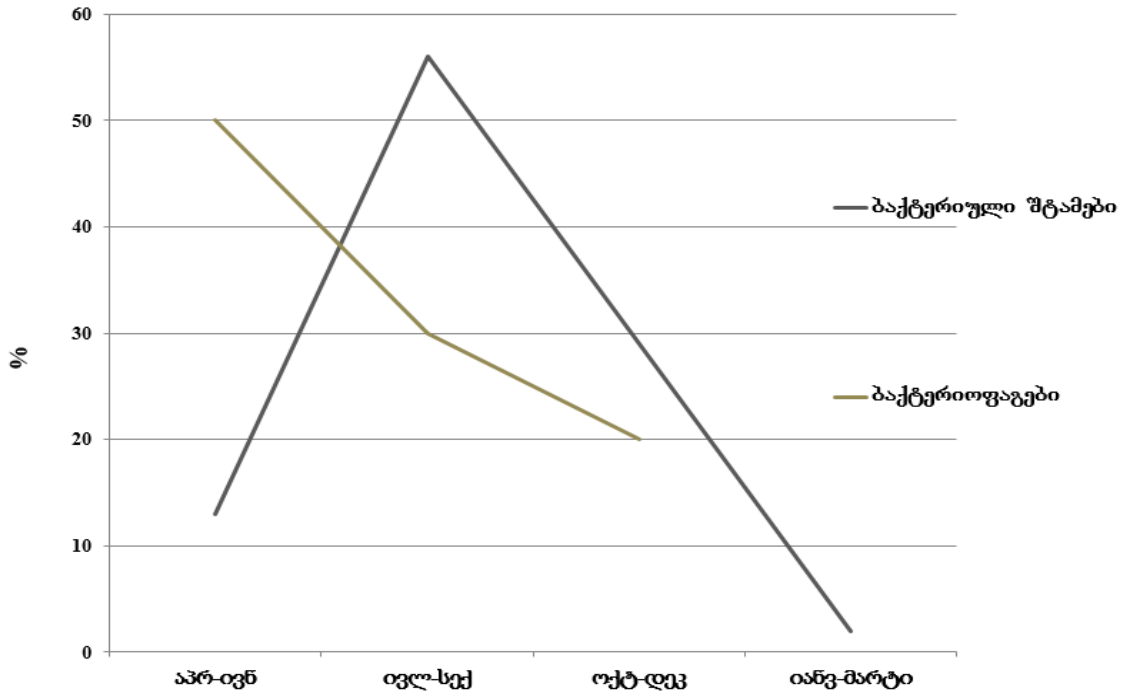
სურ. 23. *V. cholerae*-ს მიმართ სპეციფიკური ბაქტერიოფაგების პროცენტული განაწილება საქართველოს წყლის აქვატორიაში

ცხრ.7. *V. mimicus*-ის მიმართ სპეციფიკური ბაქტერიოფაგების განაწილება

| <i>V.mimiscus</i>-ის მიმართ სპეციფიკური ბაქტერიოფაგები | | | |
|---|-------------------------|-------------------------|----------------------|
| ფაგები | მასპინძელი შტამი | გამოყოფის ადგილი | გამოყოფის დრო |
| Vmim BS3 | V.mimATCC33653 | მდ.ჭოროხის შესართავი | ივლისი/2008 |
| Vmim 25MT | V.mimATCC33653 | მდ.მტკვარი | აგვისტო/2008 |
| Vmim 8.07K | V.mimATCC33653 | მდ.მტკვარი | აგვისტო/2008 |
| Vmim9K | V.mimATCC33653 | კუმისის ტბა | აგვისტო/2008 |
| Vmim 29.08K | V.mimATCC33653 | კუმისის ტბა | აგვისტო/2008 |
| VmimL4 | V.mim836 | ლისის ტბა | ივლისი/2009 |
| VmimK5 | V.mim837 | კუმისის ტბა | ივლისი/2009 |

ცხრ.8. *V. cholerae* O1-ის მიმართ სპეციფიკური ბაქტერიოფაგების განაწილება

| <i>V. cholerae</i> O1-ის მიმართ სპეციფიკური ბაქტერიოფაგები | | | |
|---|----------------------------|-------------------------|----------------------|
| ფაგები | მასპინძელი შტამი | გამოყოფის ადგილი | გამოყოფის დრო |
| Vch54 | V.ch St.O1/NCDC | კუმისის ტბა | ივნისი/2007 |
| Vch9K | V.ch St.O1/NCDC | კუმისის ტბა | აგვისტო/2008 |
| VchXKL | V.ch St.O1/NCDC | კუმისის ტბა | ივნისი/2008 |
| VchLLVIII | V.ch St.O1-4805/CIP | ლისის ტბა | ივნისი/2008 |
| Vch25MT | V.ch St.O1/NCDC | მდ.მტკვარი | აგვისტო/2008 |
| Vch83-6 | V.ch St.O1/NCDC | შავი ზღვა | აპრილი/2007 |
| Vch16K-O1 | V.ch St.O1/NCDC | მდ.ტოროხის შესართავი | სექტემბერი/2009 |
| Vch16K-4805 | V.ch St.O1-4805/CIP | მდ.ტოროხის შესართავი | სექტემბერი/2009 |
| Vch20K-O1 | V.ch St.O1/NCDC | მდ.ტოროხის შესართავი | სექტემბერი/2009 |
| Vch20K-4805 | V.ch St.O1-4805/CIP | მდ.ტოროხის შესართავი | სექტემბერი/2009 |
| VchKP-O1 | V.ch St.O1/NCDC | ლისის ტბა | ივნისი/2008 |
| VchK24 | V.ch St.O1/NCDC | ლისის ტბა | ნოემბერი/2006 |
| VchIXK | V.ch St.O1-El Tor/NCDC | კუმისის ტბა | სექტემბერი/2008 |
| VchIXK | V.ch St.O1-El Tor/9004/CIP | კუმისის ტბა | სექტემბერი/2008 |
| Vch801 | V.ch7007 | კუმისის ტბა | აგვისტო/2009 |
| Vch802 | V.ch7007 | კუმისის ტბა | აგვისტო/2009 |
| Vch803 | V.ch7007 | კუმისის ტბა | აგვისტო/2009 |
| VchK1 | V.ch7007 | კუმისის ტბა | ივლისი/2009 |
| VchK3 | V.ch7007 | კუმისის ტბა | ივლისი/2009 |



სურ.24. *V. cholerae*-ს ბაქტერიული იზოლატების და მათ მიმართ სპეციფიკური ბაქტერიოფაგების გამოყოფის პროცენტული განაწილება სეზონის მიხედვით

3.5. *V. cholerae*-ს და *V. mimicus*-ის მიმართ სპეციფიკური ბაქტერიოფაგების დახასიათება

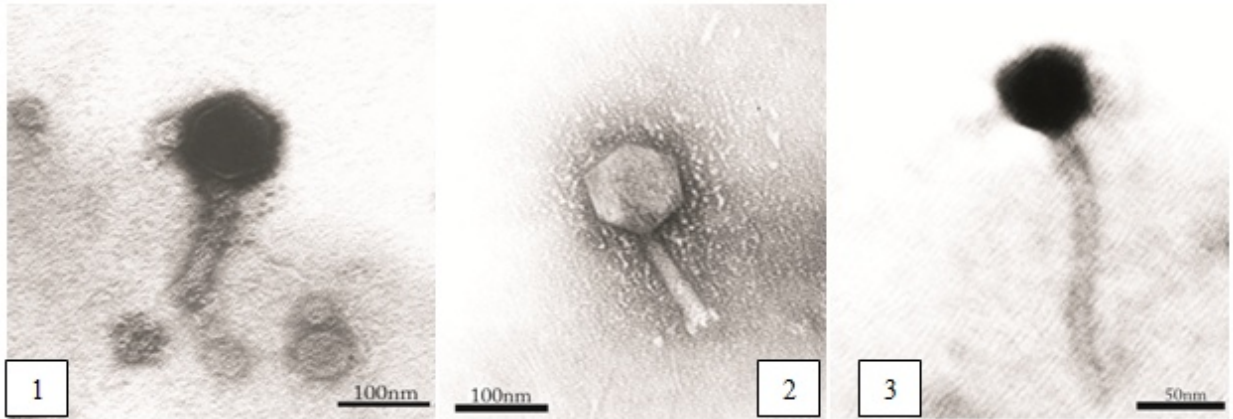
3.5.1. ბაქტერიოფაგების მორფოლოგიური პარამეტრები

ბაქტერიოფაგების ნეგატიური კოლონიის ფორმა. ბაქტერიული იზოლატების გაზონებზე მათი ფორმირებით ვახდენდით ფაგის ნეგატიური კოლონიის ფორმის შემოწმებას. სხვადასხვა ფაგს მისთვის დამახასიათებელი მორფოლოგიის ნეგატიური კოლონიები ახასიათებდა. ნეგატიური კოლონიების ზომები ვარირებდა 1-2.5 მმ დიამეტრის ფარგლებში. სუფთა ფაგური კლონების მიღება ხდებოდა მსგავსი კლონების 5-10 თანმიმდევრული კლონირების პასაჟის შედეგად. ზოგიერთ შემთხვევაში ბაქტერიოფაგები ხასიათდებიან პოლიმორფიზმით, რაც ნეგატიური კოლონიების არაერთგვაროვნებაში ვლინდება. ფაგური კლონების დაზუსტების მიზნით საკვლევი ბაქტერიოფაგები მოწმდებოდა ელექტრონული მიკროსკოპით და აგაროზის გელში ელექტროფორეზით.

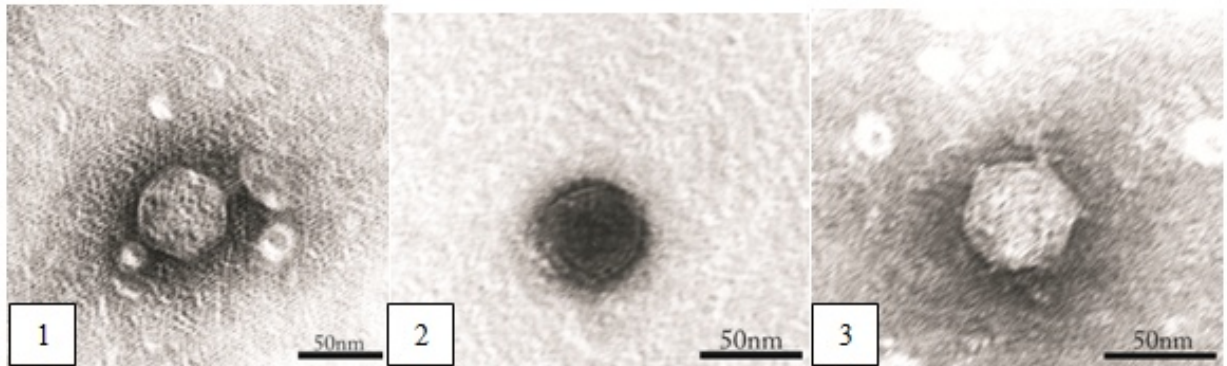
ბაქტერიოფაგების ვირიონის მორფოლოგია. ბაქტერიოფაგის ვირიონის მორფოლოგიას ვსწავლობდით ტრანსმისიული ელექტრონული მიკროსკოპით M10 (Opton-Zeiss, გერმანია) ან Jeol SX100 (Jeol, იაპონია). შესწავლამ გამოავლინა კუდიანი ფაგების სამივე მორფოტიპის არსებობა *V. cholerae*-ს მიმართ სპეციფიკური ბაქტერიოფაგების შემთხვევაში, კერძოდ: მიოვირიდე (იზომეტრული თავი და გრძელი კუმშვადი კუდი), სიფოვირიდე (არაკუმშვადი, გრძელი კუდი) და პოდოვირიდე (მოკლე არაკუმშვადი კუდი). *V. mimicus*-ის მიმართ სპეციფიკურ ბაქტერიოფაგებში ჭარბობდა სიფოვირიდეს მორფოტიპის ფაგები. განსხვავდებოდა ასევე საკვლევი ბაქტერიოფაგების ნუკლეოკაპსიდისა და მორჩის ზომები (ცხრ.9), (სურ.25-27).

ცხრილი 9. *V. cholerae*-ს და *V. mimicus*-ის მიმართ სპეციფიკური ბაქტერიოფაგების მორფოლოგია

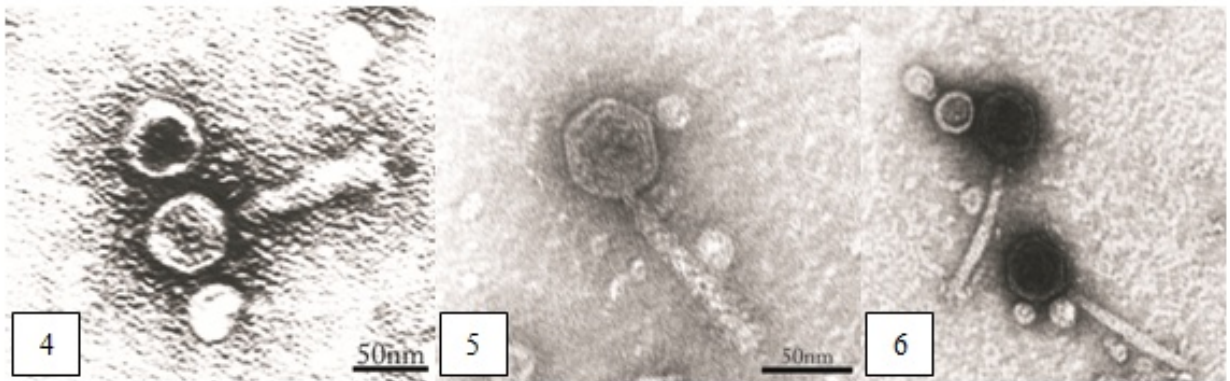
| ბაქტერიოფაგები | თჯახი | თავის დიამეტრი (ნმ) | კუდის სიგანე (ნმ) | კუდის სიგრძე (ნმ) |
|---|------------|---------------------|-------------------|-------------------|
| <i>V. cholerae</i>-ს მიმართ სპეციფიკური ფაგები | | | | |
| Vch54 | მიოვირიდე | 60±2 | 14±1 | 109±3 |
| Vch105 | მიოვირიდე | 70±2 | 13±1 | 83±3 |
| Vch9K | პოდოვირიდე | 60±2 | 8±1 | 12±1 |
| Vch105S | სიფოვირიდე | 60±2 | 9±1 | 158±3 |
| Vch25MT | მიოვირიდე | 40±1 | 18±1 | 89±3 |
| Vch10CH | მიოვირიდე | 80±2 | 14±1 | 58±2 |
| Vch12CH | მიოვირიდე | 89±2 | 19±1 | 228±3 |
| VchBS3 | სიფოვირიდე | 70±2 | 17±1 | 260±3 |
| VchK24 | პოდოვირიდე | 60±2 | 8±1 | 8±1 |
| Vch16-4805 | პოდოვირიდე | 60±2 | 8±1 | 12±1 |
| Vch20K-4805 | პოდოვირიდე | 70±2 | 10±1 | 10±1 |
| Vch20K-O1 | პოდოვირიდე | 60±2 | 8±1 | 12±1 |
| VchK1 | სიფოვირიდე | 47±1 | 10±1 | 103±1 |
| VchK3 | სიფოვირიდე | 60±2 | 13±1 | 145±3 |
| Vch801 | სიფოვირიდე | 65±2 | 116±3 | 139±3 |
| Vch803 | სიფოვირიდე | 61±2 | 116±3 | 130±3 |
| VchXKL | პოდოვირიდე | 60±2 | 12±1 | 20±1 |
| <i>V. mimicus</i>-ის მიმართ სპეციფიკური ფაგები | | | | |
| VmimBS3 | სიფოვირიდე | 60±2 | 10±1 | 213±3 |
| VmimL4 | მიოვირიდე | 80±2 | 15±1 | 95±3 |
| Vmim8.07K | სიფოვირიდე | 72±2 | 12±1 | 224±3 |
| Vmim29.08K | სიფოვირიდე | 80±2 | 12±1 | 248±3 |
| Vmim9K | სიფოვირიდე | 72±2 | 12±1 | 240±3 |



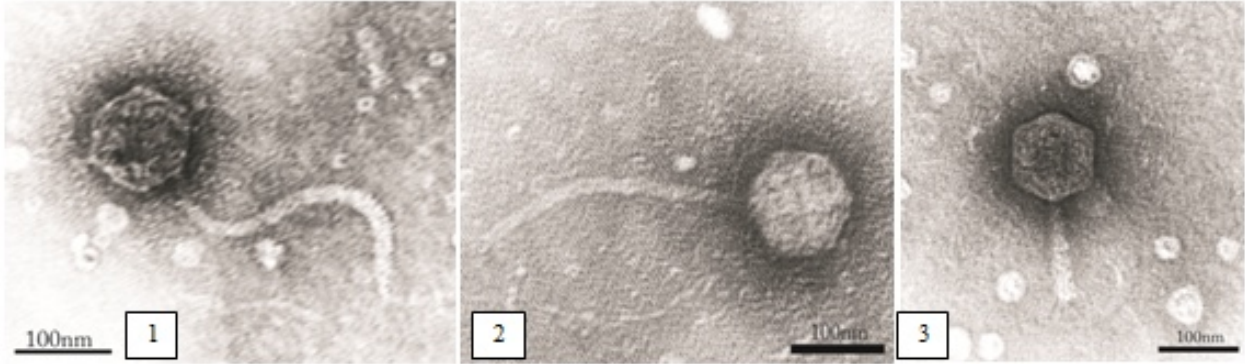
სურ.25. *V. cholerae* არა-O1-ის მიმართ სპეციფიკური ბაქტერიოფაგები:
1.Vch105; 2.Vch10CH; 3.VchBS3



სურ.26. *V. cholerae* O1-ისმიმართ სპეციფიკური ბაქტერიოფაგები:
1.Vch9K; 2.Vch16K-4805; 3.Vch20K-4805;



4.Vch25MT; 5.Vch54; 6.VchK1.



სურ.27. *V. mimicus*-ის მიმართ სპეციფიკური ბაქტერიოფაგები:
1.Vmim9K; 2. Vmim29.08K; 3. Vmim L4.

3.5.2 ფაგების ლიზისური აქტივობის სპექტრი.

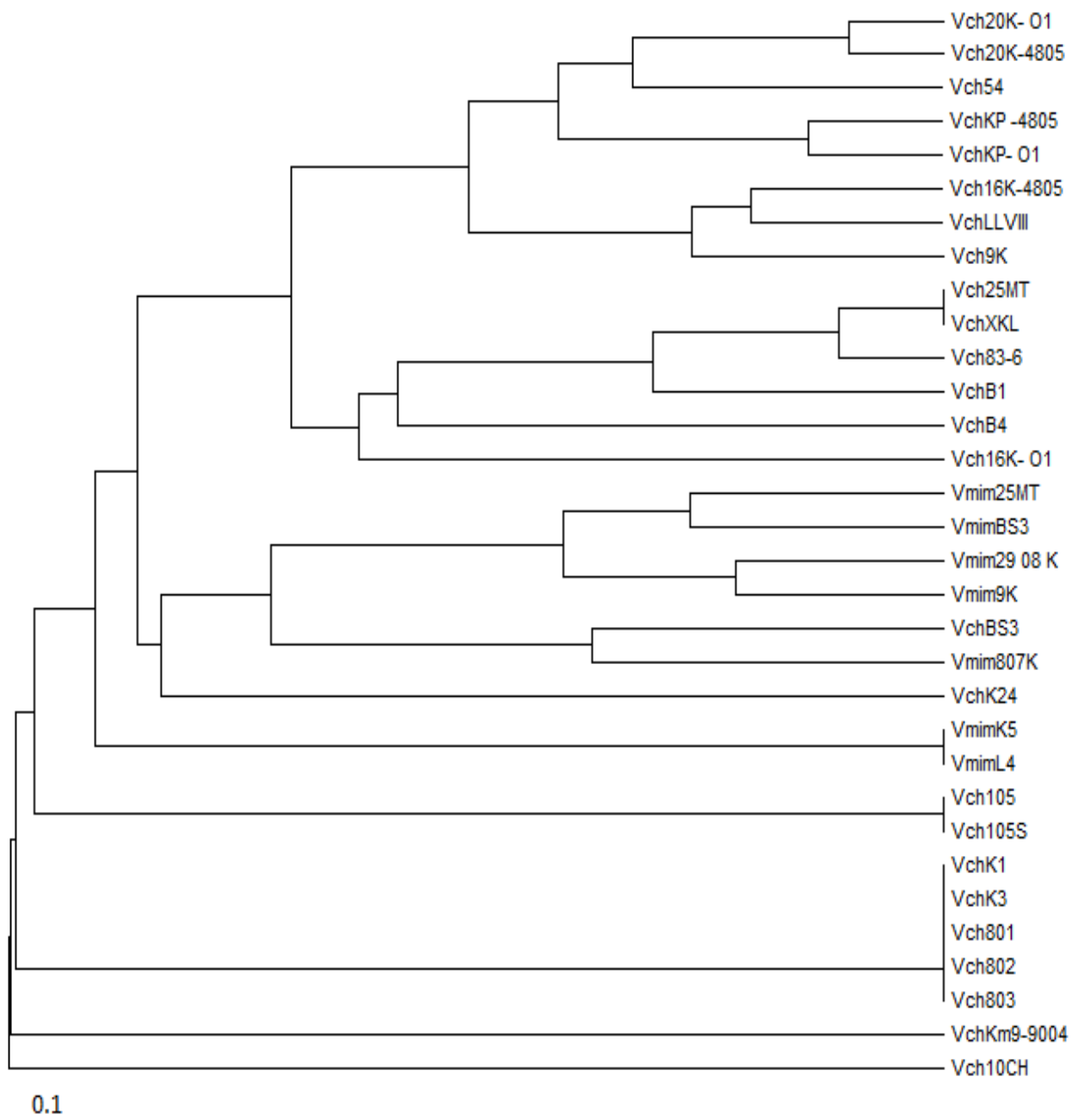
სტანდარტული პროცედურებიდან გამომდინარე მოხდა ყველა საწყისი ფაგური იზოლატის შემდგომი მომრავლება, დაკლონვა და შემოწმება ანტიბაქტერიულ აქტივობაზე. შერჩეული 32 ბაქტერიოფაგის (*V. cholerae* O1-ის მიმართ სპეციფიკური -21, *V. cholerae* არა-O1-ის მიმართ სპეციფიკური -4 და *V. mimicus*-ის მიმართ სპეციფიკური 7 ბაქტერიოფაგი) კლონების დახასიათება მოხდა პატრონ უჯრედის სპეციფიკურობის და ლიზისური სპექტრის მიხედვით. ფაგების ლიზისური სპექტრის საორიენტაციო განსაზღვრა ხდებოდა მყარ საკვებ არეზე [4]. საკვლევი ფაგის სამუშაო ტიტრი შეადგენდა 10^7 - 10^8 ნაწ/მლ. სკრინინგისთვის შეირჩა 4 *V. cholerae* არა-O1-ის და 21 *V. cholerae* O1-ის მიმართ სპეციფიკური ბაქტერიოფაგი. ფაგომგრძნობელობაზე შესამოწმებლად შეირჩა 135 *V. cholerae*-ს შტამი (60-*V. cholerae* O1 და 75 -*V. cholerae* არა-O1) გელიავას სახელობის ბმე ინსტიტუტის კოლექციიდან, მათ შორის 6 სტანდარტული შტამი სხვადასხვა კოლექციიდან (NCDC, CIP). *V. cholerae* O1-ის საცდელი ბაქტერიული იზოლატების 85% (51, 60-დან) და *V. cholerae* არა-O1-ის საცდელი ბაქტერიული იზოლატების -40 % (30, 75-დან) აღმოჩნდა მგრძნობიარე ერთი და მეტი ფაგის მიმართ. ფაგების 36%-მა (9, 25-დან) აჩვენა ვიწრო სპექტრი, აქტიურები იყვნენ მხოლოდ მასპინძელი შტამის მიმართ. მათ შორის *V. cholerae* არა-O1-ის მიმართ სპეციფიკური 3 ფაგი (4-დან) და *V. cholerae* O1-ის მიმართ სპეციფიკური 6 ფაგი (21-დან). *V. cholerae* O1-ის მიმართ სპეციფიკური ყველა სხვა ფაგი (71%) გამოირჩეოდა ლიზისური აქტივობის შედარებით ფართო სპექტრით. ფაგების გარკვეულმა ჯგუფებმა გამოავლინა მსგავსება ლიზისური სპექტრის მიხედვით.

V. mimicus-ის მიმართ სპეციფიკური 7 ბაქტერიოფაგის ლიზისური სპექტრის შემოწმება მოხდა 10 ბაქტერიულ შტამზე. მათ შორის იყო *V. mimicus*-ის 9, წყლის ნიმუშიდან გამოყოფილი იზოლატი (გელიავას ბმე ინსტიტუტის კოლექცია) და ერთი სტანდარტული შტამი (ATTC-ის კოლექცია). ფაგები აქტიურნი იყვნენ 10-დან 7 ბაქტერიულ შტამზე. უმეტესობამ გამოავლინა ფართო სპექტრი, აქტიური იყვნენ არა მარტო პატრონ-უჯრედის, არამედ სხვა ბაქტერიული იზოლატების მიმართაც. ერთი ფაგი (Vmim8.07K) იყო შტამსპეციფიკური, მოქმედებდა რა მხოლოდ მასპინძელ უჯრედზე. ბაქტერიოფაგების შედარების მიზნით *V. mimicus*-ის შტამების იმავე

ნაკრებზე მოხდა *V. cholerae* O1-ის და *V. cholerae* არა-O1-ის მიმართ სპეციფიკური ფაგების ლიზისური სპექტრის შემოწმებაც. *V. mimicus*-ის მიმართ სპეციფიკური ფაგების ლიზისური სპექტრი ასევე შემოწმდა *V. cholerae* O1-ის და *V. cholerae* არა-O1-ის შტამებზე. შედეგებმა აჩვენა, რომ *V. cholerae*-ს მიმართ სპეციფიკური ფაგები *V. mimicus*-ის მიმართ სპეციფიკური ფაგების მსგავსად ასევე აქტიური იყვნენ *V. mimicus*-ის იმავე 7 შტამის მიმართ. *V. mimicus*-ის მიმართ სპეციფიკური 7 ფაგიდან 5 იხენდა აქტივობას *V. cholerae*-ს იზოლატების მიმართ. ფაგების მოქმედების არეალი მეტ-ნაკლებად განსხვავდებოდა. შედეგებმა გამოავლინა *V. cholerae* O1-ის და *V. mimicus*-ის მიმართ სპეციფიკური ფაგების ფართო ლიზისური სპექტრი, განსხვავებით *V. cholerae* არა-O1-ის მიმართ სპეციფიკური ფაგებისა (ცხრ.10), რომლებიც ძირითადად შტამ-სპეციფიკურობით ხასიათდებოდნენ (Vch10CH, Vch105, Vch105S). ლიზისური აქტივობის შედეგებიდან გამომდინარე ფაგებს შორის ნათესაობა დადგინდა სპეციალური პროგრამის მეშვეობით (UPGMA) (სურ.28), სადაც ნაჩვენებია, რომ *V. cholerae* არა-O1-ის მიმართ სპეციფიკური ბაქტერიოფაგები: Vch105, Vch105S მცირე, დამოუკიდებელ კლასტერში ერთიანდებიან, განსხვავებით *V. cholerae* არა-O1-ის მიმართ სპეციფიკური -VchBS3 ფაგისა, რომელიც *V. mimicus*-ის მიმართ სპეციფიკურ -Vmim8.07K ფაგთან ერთად ქმნის კლასტერს და მომიჯნავეა სხვა, *V. cholerae* O1-ის და *V. mimicus*-ის მიმართ სპეციფიკური ფაგების კლასტერთა ჯგუფების. აღსანიშნავია ასევე *V. cholerae* არა-O1-ის მიმართ სპეციფიკური ფაგი -Vch10CH, რომელიც მკვეთრად არის გამიჯნული ყველა, სხვა კლასტერისგან, ისევე, როგორც *V. cholerae* O1-ის მიმართ სპეციფიკური ფაგები: VchK1, VchK3, Vch801, Vch802, Vch803, რომლებიც ერთ, დამოუკიდებელ კლასტერში ერთიანდებიან. უნდა აღინიშნოს, რომ სხვადასხვა პატრონ-უჯრედის მქონე *V. cholerae* O1-ის მიმართ სპეციფიკური ფაგები ახლომდგომ, თუმცა განსხვავებულ კლასტერთა ჯგუფებში გაერთიანდა, განსხვავებით ერთი ფაგისა, კერძოდ *V. cholerae* O1-ის მიმართ სპეციფიკური ფაგი-VchKm9-9004, რომელიც მკვეთრად არის გამიჯნული ყველა, სხვა კლასტერისგან. *V. mimicus*-ის მიმართ სპეციფიკური ფაგების კლასტერთა ჯგუფები *V. cholerae* O1-ის მიმართ სპეციფიკური ფაგების კლასტერების მომიჯნავეა.

ცხრ.10 ფაგების ლიზისური აქტივობის სპექტრი

| შტამები (%) / ფაგები | <i>V. cholerae</i> O1-ის მიმართ სპეციფიკური ფაგები | | | | | | | | | | | | | | | | <i>V. cholerae</i> არა O1-ის მიმართ სპეციფიკური ფაგები | | | <i>V. mimicus</i> -ის მიმართ სპეციფიკური ფაგები | | | | | | | | | | | | |
|---|--|-------------|-----------|-------------|----------|----------|-----------|---------|--------|---------|----------|------------|--------|-------|-------|--------|--|--------|-------------|---|-------|--------|---------|--------|---------|---------|----------|-----------|---------|---------|-------------|--------|
| | Vch20K-O1 | Vch20K-4805 | Vch16K-O1 | Vch16K-4805 | Vch54-O1 | Vch9K-O1 | VchL.VIII | Vch25MT | VchXKL | Vch83-6 | VchKP-O1 | VchKP-4805 | VchK24 | VchK1 | VchK3 | Vch801 | Vch802 | Vch803 | VchKm9-9004 | VchB1 | VchB4 | VchBS3 | Vch10CH | Vch105 | Vch105S | VmimBS3 | Vmim25MT | Vmim8.07K | Vmim-K5 | Vmim-L4 | Vmim29.08 K | Vmim9K |
| <i>V. cholerae</i> O1-ის მგრძობიარე შტამების რიცხვი (%) | 25 | 28 | 7 | 62 | 13 | 48 | 48 | 5 | 5 | 3 | 8 | 15 | 15 | 1.7 | 1.7 | 1.7 | 1.7 | 1.7 | 1.7 | 5 | 5 | 3 | 0 | 0 | 0 | 22 | 22 | 5 | 0 | 0 | 33 | 42 |
| <i>V. cholerae</i> არა O1-ის მგრძობიარე შტამების რიცხვი (%) | 0 | 0 | 12 | 5 | 3 | 5 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 15 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 8 | 4 | 1.3 | 1.3 | 1.3 | 20 | 20 | 7 | 0 | 0 | 25 | 28 |
| <i>V. mimicus</i> -ის მგრძობიარე შტამების რიცხვი (%) | 57 | 57 | 14 | 100 | 43 | 43 | 86 | 43 | 43 | 43 | 100 | 100 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 29 | 0 | 0 | 0 | 43 | 43 | 14 | 57 | 57 | 71 | 86 |



სურ.28. UPGMA (Nei-Li დაშორებული ანალიზი) ფილოგენეზური ხე ბაქტერიოფაგების ლიზისური სპექტრის მიხედვით

3.5.3. პატრონ-უჯრედთან ურთიერთქმედების ფაზები

პატრონ-უჯრედთან ურთიერთქმედება შევისწავლეთ *V. cholerae*-ს და *V. mimicus*-ის ბაქტერიების ადსორბციისთვის ოპტიმალურ 37°C ტემპერატურაზე. შემდგომ ეტაპზე შევისწავლეთ ადსორბციის სიჩქარე, ლატენტური პერიოდი და საშუალო გამოსავლი თითოეულ უჯრედზე. საკვლევ ბაქტერიოფაგებს შორის უმნიშვნელო განსხვავება დაფიქსირდა მათი უჯრედშიდა გამრავლების ციკლის მახასიათებლების მიხედვით, როგორცაა: ადსორბციის ეფექტურობა, ლატენტური პერიოდის ხანგრძლივობა და ფაგურ ნაწილაკთა გამოსავალი. ჩატარებული ექსპერიმენტების შედეგად დადგინდა, რომ ბაქტერიოფაგების უმეტესობა ხასიათდება შენელებული, თუმცა მაღალპროცენტული ადსორბციის უნარით, ხანგრძლივი ლატენტური პერიოდით და ვირუსული ნაწილაკების მაღალი გამოსავალით, განსაკუთრებით ზოგიერთი ფაგის შემთხვევაში (Vch105, Vch20K-4805, V.mim8.07K, VmimL4) (ცხრ.11).

ცხრ.11 ბაქტერიოფაგების უჯრედშიდა გამრავლების ციკლის მახასიათებლები

| ფაზები | | ადსორბციის სიჩქარე K მლ/წთ | ადსორბციის პროცენტი (%) | ლატენტური პერიოდი (წთ) | ინფექციის მრავლობითობა | გამოსავალი (1 უჯრედი) |
|---------------------------|-------------|----------------------------|-------------------------|------------------------|------------------------|-----------------------|
| <i>V. cholerae</i> არა-O1 | VchBS3 | 1.9x10 ⁻¹⁰ | 93 | 35-40 | 0.02 | 80 |
| | Vch105 | 6.9x10 ⁻¹¹ | 77 | 40-45 | 0.01 | 160 |
| | Vch10CH | 4.6x10 ⁻⁹ | 99 | 35-40 | 0.01 | 83 |
| <i>V. cholerae</i> O1 | Vch16K-4805 | 4.7x10 ⁻¹⁰ | 88 | 25-30 | 0.013 | 55 |
| | Vch20K-4805 | 3.1x10 ⁻¹⁰ | 80 | 30-35 | 0.013 | 90 |
| | Vch54 | 3.9x10 ⁻¹⁰ | 69 | 15-20 | 0.024 | 67 |
| | Vch9K | 4.5x10 ⁻¹⁰ | 64 | 15-20 | 0.017 | 80 |
| | Vch16K-O1 | 6.3x10 ⁻¹⁰ | 85 | 15-20 | 0.013 | 60 |
| | Vch20K-O1 | 4.4x10 ⁻¹⁰ | 90 | 30-35 | 0.012 | 53 |
| <i>V. mimicus</i> | Vmim8.07K | 3.2x10 ⁻¹⁰ | 82 | 30-35 | 0.037 | 200 |
| | Vmim29.08K | 2.7x10 ⁻¹⁰ | 70 | 25-30 | 0.011 | 63 |
| | VmimL4 | 7.1x10 ⁻¹¹ | 41 | 25-30 | 0.014 | 94 |

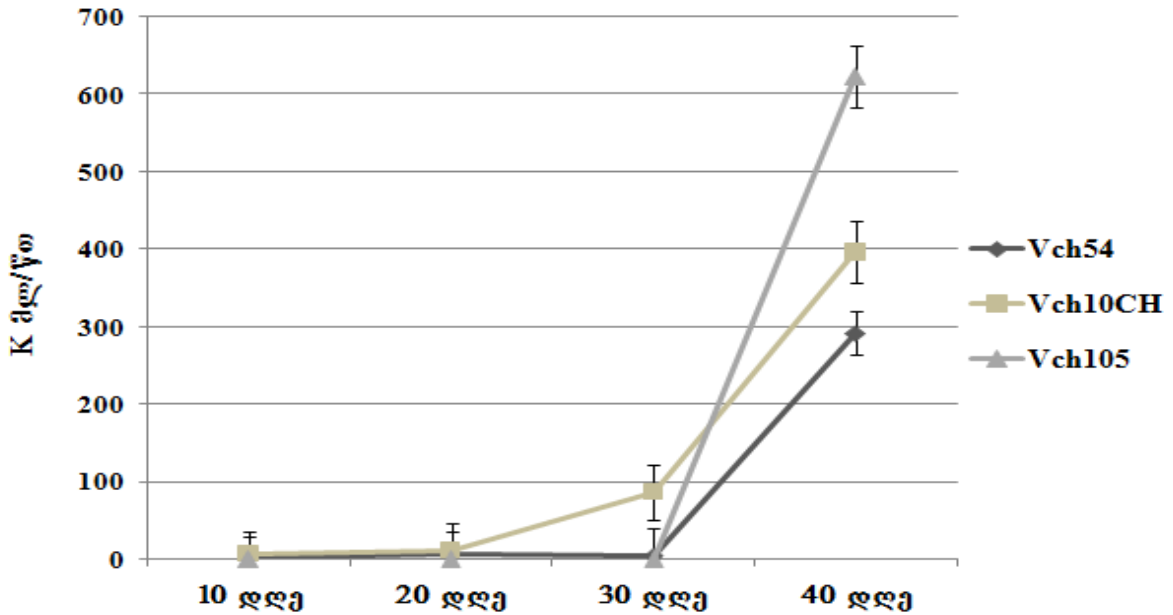
3.5.4. ბაქტერიოფაგების სეროლოგიური თვისებების შესწავლა ანტიფაგური შრატის გამოყენებით

ბაქტერიოფაგების სეროლოგიური თვისებების შესწავლას ვახდენდით სპეციფიკური ანტიფაგური შრატების გამოყენებით და შემდგომი ჯვარედინი ნეიტრალიზაციის შედეგების ანალიზით. ცნობილია, რომ ბაქტერიოფაგების დახასიათებისა და დიფერენცირებისთვის მეტად მნიშვნელოვან კრიტერიუმს წარმოადგენს მათ შორის ანტაგონისტური ნათესაობის დადგენა, რასაც საფუძვლად უდევს ჯვარედინი ნეიტრალიზაციის რეაქციები.

იმუნიზაციისთვის შეირჩა 10 ფაგი და 20 ბოცვერი, მათ შორის *V. cholerae*-ს მიმართ სპეციფიკური 3 ფაგი: ორი-*V. cholerae* არა-O1-ის მიმართ სპეციფიკური, კერძოდ :Vch105 და Vch10CH და ერთი-*V. cholerae* O1-ის მიმართ სპეციფიკური, კერძოდ:Vch54. ანტისხეულების ტიტრის დასადგენად, პირველი იმუნიზაციიდან ყოველ მე-10, მე-20 და 30-ე დღეს საკვლევი სისხლის აღება ხდებოდა ყურის ვენიდან, რისთვისაც შეირჩა *V. cholerae* არა-O1-ის და *V. cholerae* O1-ის მიმართ აქტიური 2 ფაგი:Vch10CH და Vch54. Vch105-ის ანტიფაგური შრატის შემთხვევაში მხოლოდ მე-40 დღეს მოხერხდა საკვლევი სისხლის აღება. ჰომოლოგიურ სისტემაში ჩატარებული ნეიტრალიზაციის შედეგებიდან გამომდინარე Vch54, Vch10CH –ანტიფაგურ შრატებში ყოველი 10 დღის ინტერვალით მე-40 დღის ჩათვლით შეინიშნებოდა ანტისხეულების ტიტრის მატება, რის მიხედვითაც გამოვთვალეთ ნეიტრალიზაციის სიჩქარის კონსტანტა, რაც ასახავდა ანტისხეულების ტიტრის ზრდის დინამიკას (სურ.29). მე-40 დღეს ბოცვრების გულიდან აღებული სისხლიდან გამოყოფილ შრატს ვიყენებდით ნეიტრალიზაციის რეაქციებისთვის. ფაგის სეროლოგიურ ნათესაობას ვსწავლობდით ფაგის ნეიტრალიზაციის ჯვარედინა რეაქციის ჩატარების გზით სხვადასხვა სპეციფიკურობის ანტიფაგური შრატის გამოყენებით. ფაგი-ანტიფაგური შრატის თითოეული წყვილის შემთხვევაში განვსაზღვრეთ ნეიტრალიზაციის პროცენტი და კონსტანტა. ფაგების მკვლევართა მიერ აღიარებული სქემიდან გამომდინარე, მხოლოდ 70%-ზე მეტი ნეიტრალიზაციის შემთხვევაში შეიძლებოდა გვევარაუდა ფაგებს შორის სეროლოგიურ ნათესაობაზე.

ჩვენს მიერ ჩატარებული ცდების შედეგად, მოხდა 36 ბაქტერიოფაგის გამოკვლევა. მათ შორის 16 ფაგი იყო *V. cholerae* O1-ის მიმართ სპეციფიკური (2 სტანდარტული ფაგი), 13-*V. cholerae* არა-O1-ის მიმართ სპეციფიკური, ხოლო 7-*V. mimicus*-ის მიმართ სპეციფიკური. მიღებულმა შედეგებმა საშუალება მოგვცა გვემსჯელა ამ ფაგების სეროლოგიურ ნათესაობაზე, კერძოდ, მოხდა ბაქტერიოფაგების დაჯგუფება 5 სხვადასხვა ჯგუფში (ცხრ.12), რასაც საფუძვლად დაედო ჯვარედინი ნეიტრალიზაციის შედეგად ფაგური ნაწილაკების ინფექციურობის ინჰიბიციის პროცენტული მაჩვენებლები. მიღებული შედეგების ანალიზმა გამოავლინა, რომ ანტიფაგური შრატით-Vch54-ით მოხდა *V. cholerae* O1-ის მიმართ სპეციფიკური 11 ფაგის ნეიტრალიზაცია (70% და მეტი), რის მიხედვითაც ისინი გადანაწილდნენ I ჯგუფში (ჯგუფიI/Vch54). II ჯგუფში (ჯგუფიII/Vch10CH) გაერთიანებული 9, *V. cholerae* არა-O1-ის მიმართ სპეციფიკური ფაგის ნეიტრალიზაცია (90% და მეტი) მოხდა Vch10CH ანტიფაგური შრატით. III ჯგუფში (ჯგუფიIII/Vch105) განაწილებული 5 ფაგიდან 3 ფაგი იყო *V. cholerae* არა-O1-ის ხოლო, 2-*V. cholerae* O1-ის მიმართ სპეციფიკური და მათი ნეიტრალიზაცია (70% და მეტი) მოხდა Vch105 ანტიფაგური შრატით. IV ჯგუფის ფაგები განსხვავდებოდნენ სხვა ფაგებისგან. მათი ნეიტრალიზაციის პროცენტის მაქსიმუმი აღწევდა 36 %-ს. V ჯგუფში განაწილდნენ *V. mimicus*-ის მიმართ სპეციფიკური ფაგები. მათი ნეიტრალიზაციის პროცენტის მაქსიმუმი აღწევდა 68%-ს. Vch54-ის ანტიფაგური შრატის შემთხვევაში 90% და მეტი ნეიტრალიზაციის პროცენტის არსებობისას მოხდა ნეიტრალიზაციის კონსტანტას დათვლა (K მლ/წთ) (სურ.30). სურათზე გავლებული ზღვარი მიუთითებდა ნეიტრალიზაციის კონსტანტას მაქსიმუმის (ჰომოლოგიურ სისტემაში) 70% და მეტ მაჩვენებელს. *V. cholerae* O1-ის მიმართ სპეციფიკური ფაგების ერთ ჯგუფში გაერთიანება მიუთითებს მათ სეროლოგიურ ნათესაობაზე, რაც შეესაბამება ლიზისური სპექტრის მონაცემებსაც.

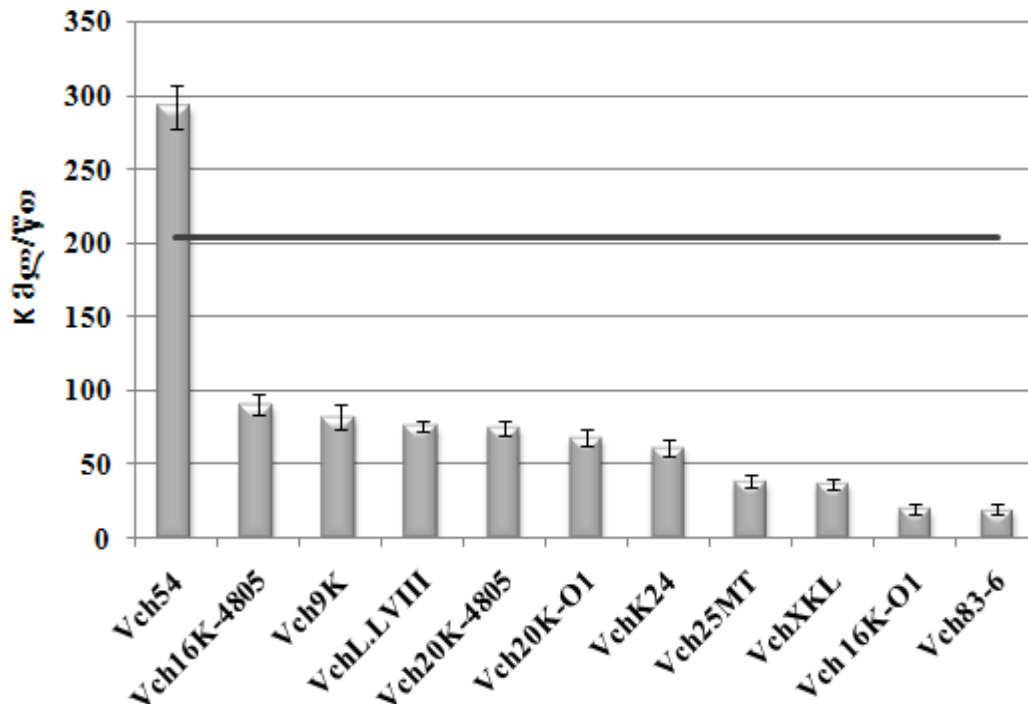
Vch105, Vch54, Vch10CH, ისევე, როგორც ღიზისური სპექტრის მიხედვით, სეროლოგიური ანალიზიდან გამომდინარე ერთმანეთისგან განსხვავებული ფაგები აღმოჩნდა. სეროლოგიური თვალსაზრისით განსხვავებული ფაგები აღმოჩნდა ასევე *V. mimicus*-ის მიმართ აქტიური ფაგები, იხენენ, რა, სეროლოგიურ ნათესაობას ერთმანეთთან, თუმცა განსხვავდებიან *V. cholerae*-ს მიმართ სპეციფიკური ფაგებისაგან. სეროლოგიურმა ანალიზმა ანახა, რომ *V. cholerae* O1-ის მიმართ სპეციფიკური ფაგები არ იხენენ ნათესაობას *V. cholerae* არა-O1-ის მიმართ სპეციფიკურ ფაგებთან.



სურ.29. ანტისხეულების ტიტრის ზრდის დინამიკა სამი ანტიფაგური შრატის კომპოლოგიურ სისტემაში

ცხრ.12. ფაგების დაჯგუფება ნეიტრალიზაციის მახასიათებლის მიხედვით

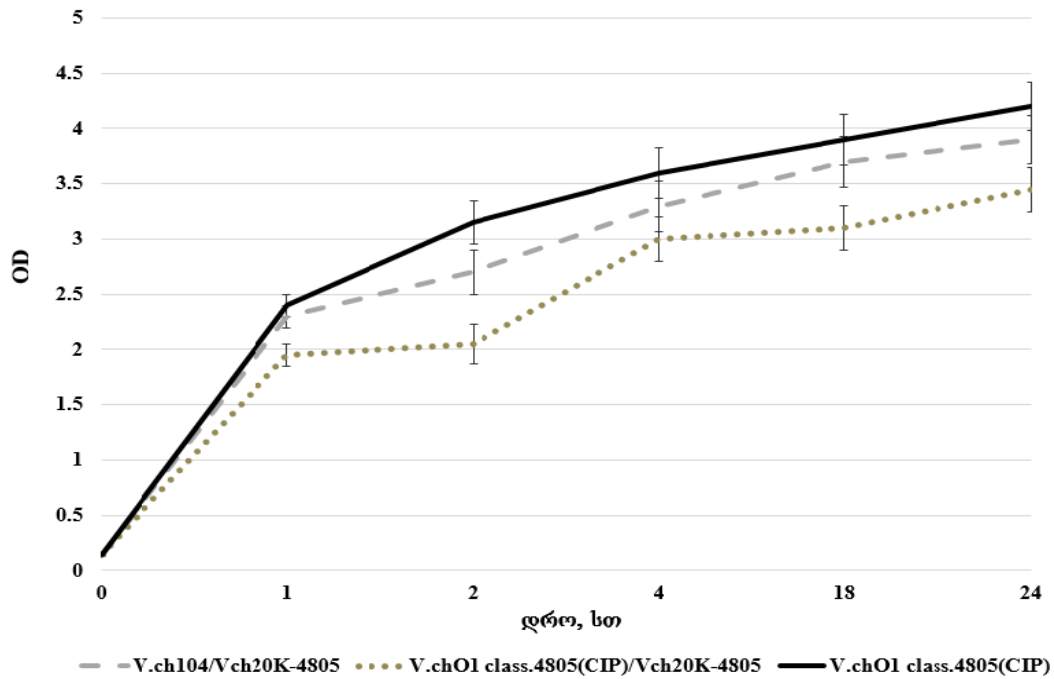
| I ჯგუფი / <i>V.ch54</i> (11 ფაგი) | II ჯგუფი / <i>V.ch10CH</i> (9 ფაგი) | III ჯგუფი / <i>V.ch105</i> (5 ფაგი) | IV ჯგუფი / სხვა (4 ფაგი) | V ჯგუფი / <i>V.mimicus</i> (7 ფაგი) |
|--------------------------------------|--|--|-----------------------------|--|
| Vch20K-O1 | Vch3 | Vch K1 | VchKm9-9004 | Vmim 25MT |
| Vch20K-4805 | Vch13 | Vch K3 | VchBS3 | Vmim 807K |
| Vch16K-O1 | Vch8 | Vch105 | VchB1 | VmimBS3 |
| Vch16K-4805 | Vch11 | Vch105S | VchB4 | Vmim9K |
| Vch54 | Vch6 | F10Ch-105 | | Vmim29.08K |
| Vch9K | Vch4 | | | VmimK5 |
| Vch83-6 | Vch12 | | | VmimL4 |
| Vch25MT | Vch9 | | | |
| VchXXL | Vch10Ch | | | |
| VchLLVIII | | | | |
| VchK24 | | | | |



სურ.30. *V. cholerae* O1-ის მიმართ სპეციფიკური ფაგების ნეიტრალიზაციის მახასიათებლები Vch54 ანტიფაგური შრატის გამოყენებით.

3.5.5. *V. cholerae* O1–ის მიმართ სპეციფიკური ბაქტერიოფაგების ზეგავლენა შტამების მიერ ქოლერის ტოქსინის პროდუქციაზე

G_{M1} განგლიოზიდ დამოკიდებული ენზიმდაკავშირებული იმუნოსორბენტული ანალიზის (G_{M1}-ELIZA) გამოყენებით ნანახი იყო *V. cholerae* O1–ის მიმართ სპეციფიკური ბაქტერიოფაგების გარკვეული ზეგავლენა შტამების მიერ ქოლერა ტოქსინის პროდუქციაზე ფაგისა და შტამის სხვადასხვა თანაფარდობით ურთიერთქმედებისას დროის სხვადასხვა ინტერვალის შემთხვევაში. ქოლერა ტოქსინის (CT) პროდუქციის დათვლა ხდებოდა სტანდარტულ მრუდთან შედარების მიხედვით, რომელიც ასახავდა *V. cholerae* O1–ის სტანდარტული შტამის (V.chCIP62.13, *V. cholerae* 4805-აზიატიკუსი) ფილტრატის სხვადასხვა განზავებების შემთხვევაში პროდუცირებულ ტოქსინის რაოდენობას (OD-ოპტიკური სიმკვრივე). ცდაში გამოყენებული იყო *V. cholerae* O1–ის მიმართ სპეციფიკური ბაქტერიოფაგი Vch20K-4805, რომლის ზემოქმედებას CT-ის პროდუქციაზე ვსწავლობდით სტანდარტული შტამის-V.ch-4805 (CIP-ის კოლექციიდან) მაგალითზე. დროის ინტერვალის გაზრდასთან ერთად შეინიშნებოდა ქოლერა ტოქსინის პროდუქციის შემცირება ($R^2=0.5$, $p<0.03$) (სურ.31).



სურ.31. CT-ის პროდუქციის შემცირება დროის ინტერვალთან დამოკიდებულებით

მიღებული შედეგებიდან გამომდინარე შემდგომი კვლევა, ბაქტერიოფაგების ბიოლოგიური თვისებების დახასიათებით გაგრძელდა 3 *-V. cholerae* არა-O1-ის, 6 *-V. cholerae* O1-ის მიმართ სპეციფიკური და 3 *-V. mimicus*-ის მიმართ სპეციფიკური ბაქტერიოფაგით.

3.6. ფიზიკო-ქიმიური ფაქტორების ზეგავლენა ბაქტერიოფაგების სიცოცხლისუნარიანობაზე

ფაგების სტაბილობის შესწავლა სხვადასხვა არეში ხორციელდებოდა 6 თვის განმავლობაში, პერიოდულად მათი ტიტრის დადგენით. ბაქტერიოფაგების პრაქტიკული გამოყენებისთვის დიდი მნიშვნელობა აქვს მათ სტაბილობას საკვლევ გარემოში, შემდგომში ფაგების სამკურნალო-პროფილაქტიკური მიზნით და ეკოლოგიური კვლევებისთვის, სხვადასხვა წყალსატევებში ტრასირების ექსპერიმენტების ჩასატარებლად. ბაქტერიოფაგების სტაბილობა ასევე შეისწავლება შენახვისა და ტრანსპორტირების პირობებში მათი აქტივობის გათვალისწინების მიზნით. ფაგების სტაბილობას ვსწავლობდით სხვადასხვა მიკრობიოლოგიურ არეებსა და ხსნარებში, ასევე ბუნებრივ წყლებში, რისთვისაც ვიყენებდით ტბისა და ზღვის წყლებს (ცხრ.13). მიღებულმა შედეგებმა გამოავლინა *V. cholerae* O1-ის მიმართ სპეციფიკური ბაქტერიოფაგების მაღალი სტაბილობა სხვადასხვა არეში, 1-დან 6 თვემდე ჩატარებულ კვლევაში. უმნიშვნელო ცვლილებებს ქონდა ადგილი საცდელი არეების უმრავლესობის შემთხვევაში. ყველაზე ნაკლებ სტაბილური *V. cholerae* არა-O1-ის

მიმართ სპეციფიკური ფაგი-Vch105 აღმოჩნდა, რომლის ტიტრის დაცემაც 1 თვის შემდეგ შემოწმებულ ცდებში აღინიშნა. *V. cholerae* O1-ის მიმართ სპეციფიკური ბაქტერიოფაგების ტიტრის დაცემა ძირითადად შეინიშნებოდა ექსპერიმენტის დაწყებიდან 6 თვის გასვლის შემდეგ. *V. cholerae* O1-ის მიმართ სპეციფიკურმა ფაგებმა: Vch16-O1 და Vch20-4805 გამოავლინეს ნაკლები სტაბილობა ფიზიოლოგიურ ხსნარში. 6 თვის შემდეგ სიცოცხლისუნარიანი ფაგური ნაწილაკების რიცხვი 2 ლოგით ეცემოდა. ორივე ტიპის ფაგებისთვის არახელსაყრელი აღმოჩნდა მარილის მაღალი პროცენტობის შემცველი არე.

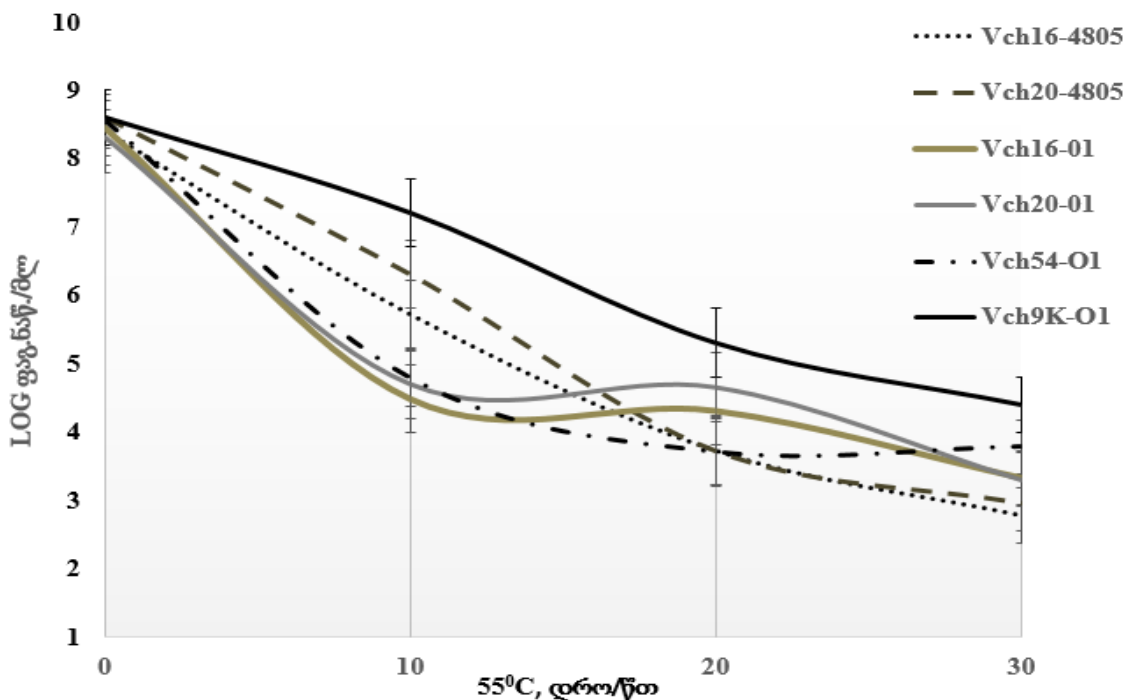
მიღებული შედეგებიდან დადგინდა, რომ *V. cholerae* O1-ის მიმართ სპეციფიკურ ბაქტერიოფაგებს აქვთ უნარი მეტად შეინარჩუნონ მდგრადობა *V. cholerae* არა-O1-ის მიმართ სპეციფიკურ ბაქტერიოფაგებთან შედარებით.

ცხრ.13. ბაქტერიოფაგების სტაბილობა სხვადასხვა არეში

| ბაქტერიოფაგები | უქნაგის ხანგრძლივობა | LB თბიერი არე | LB+MgSO4 | LB+2% NaCl | PBS pH7.4 | დაბუფებული პეპტონიანი წყალი pH7 | პეპტონიანი წყალი pH7.8 | ფიზ. ხსნარი | SM-ბუფერი | ღისის ტბის წყალი | ზუგო ზღვის წყალი | LB+CaCl2 | TIN6 | TIN8 | LB-ქლოროფორმის |
|----------------|----------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------------------|------------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| Vch54 | 24 ხთ | 2,7x10 ⁷ | 1,7x10 ⁷ | 2,1x10 ⁷ | 1,4x10 ⁷ | 1,9x10 ⁷ | 2x10 ⁷ | 1,7x10 ⁷ | 2,1x10 ⁷ | 2,2x10 ⁷ | 2,5x10 ⁷ | 1,8x10 ⁷ | 1,6x10 ⁷ | 1,8x10 ⁷ | 1,6x10 ⁷ |
| Vch16K-O1 | | 8x10 ⁷ | 8x10 ⁷ | 7,5x10 ⁷ | 7x10 ⁷ | 6,5x10 ⁷ | 6x10 ⁷ | 6x10 ⁷ | 4x10 ⁷ | 6x10 ⁷ | 6x10 ⁷ | 7x10 ⁷ | 8x10 ⁷ | 7,5x10 ⁷ | 6x10 ⁷ |
| Vch20K-4805 | | 8x10 ⁷ | 7x10 ⁷ | 6x10 ⁷ | 6x10 ⁷ | 5x10 ⁷ | 5x10 ⁷ | 6x10 ⁷ | 7x10 ⁷ | 7x10 ⁷ | 7,5x10 ⁷ | 8x10 ⁷ | 7x10 ⁷ | 7x10 ⁷ | 7,5x10 ⁷ |
| Vch105 | | 5x10 ⁷ | 4x10 ⁷ | 3x10 ⁷ | 2x10 ⁷ | 4x10 ⁷ | 3x10 ⁷ | 6x10 ⁷ | 5x10 ⁷ | 2x10 ⁷ | 2x10 ⁷ | 1x10 ⁷ | 1x10 ⁷ | 1x10 ⁷ | 2x10 ⁷ |
| VchBS3 | | 6x10 ⁷ | 5x10 ⁷ | 8,6x10 ⁷ | 3,2x10 ⁷ | 9x10 ⁷ | 6x10 ⁷ | 7x10 ⁷ | 5,5x10 ⁷ | 5,5x10 ⁷ | 8,2x10 ⁷ | 8,3x10 ⁷ | 8x10 ⁷ | 9x10 ⁷ | 7x10 ⁷ |
| Vch54 | 1 კვირა | 2,2x10 ⁷ | 1,4x10 ⁷ | 1,8x10 ⁷ | 1,7x10 ⁷ | 1,8x10 ⁷ | 1,8x10 ⁷ | 1,8x10 ⁷ | 2x10 ⁷ | 1,7x10 ⁷ | 1,9x10 ⁷ | 1,9x10 ⁷ | 1,9x10 ⁷ | 1,8x10 ⁷ | 1,9x10 ⁷ |
| Vch16K-O1 | | 5,6x10 ⁷ | 4x10 ⁷ | 6,8x10 ⁷ | 5x10 ⁷ | 6,4x10 ⁷ | 6x10 ⁷ | 6x10 ⁷ | 4x10 ⁷ | 6x10 ⁷ | 6x10 ⁷ | 6x10 ⁷ | 7x10 ⁷ | 7x10 ⁷ | 6x10 ⁷ |
| Vch20K-4805 | | 8x10 ⁷ | 8x10 ⁷ | 7x10 ⁷ | 7x10 ⁷ | 6x10 ⁷ | 6x10 ⁷ | 6x10 ⁷ | 6,8x10 ⁷ | 7x10 ⁷ | 7x10 ⁷ | 7,5x10 ⁷ | 7x10 ⁷ | 7x10 ⁷ | 7x10 ⁷ |
| Vch105 | | 5x10 ⁷ | 3x10 ⁷ | 3x10 ⁷ | 2x10 ⁷ | 2x10 ⁷ | 3x10 ⁷ | 6x10 ⁷ | 5x10 ⁷ | 2x10 ⁷ | 1x10 ⁷ | 1x10 ⁷ | 1x10 ⁷ | 1x10 ⁷ | 2x10 ⁷ |
| VchBS3 | | 6x10 ⁷ | 4,5x10 ⁷ | 7,5x10 ⁷ | 3x10 ⁷ | 8x10 ⁷ | 6x10 ⁷ | 6x10 ⁷ | 5x10 ⁷ | 5x10 ⁷ | 8x10 ⁷ | 8x10 ⁷ | 7x10 ⁷ | 9x10 ⁷ | 7x10 ⁷ |
| Vch54 | 2 კვირა | 2,1x10 ⁷ | 1,5x10 ⁷ | 2x10 ⁷ | 1,3x10 ⁷ | 1,6x10 ⁷ | 1,6x10 ⁷ | 1,7x10 ⁷ | 2x10 ⁷ | 1,6x10 ⁷ | 1,9x10 ⁷ | 1,7x10 ⁷ | 1,5x10 ⁷ | 1,7x10 ⁷ | 1,9x10 ⁷ |
| Vch16K-O1 | | 4x10 ⁷ | 3,5x10 ⁷ | 4x10 ⁷ | 4x10 ⁷ | 3,8x10 ⁷ | 4,3x10 ⁷ | 4x10 ⁷ | 3,7x10 ⁷ | 4x10 ⁷ | 4,2x10 ⁷ | 4,5x10 ⁷ | 5x10 ⁷ | 4,7x10 ⁷ | 4x10 ⁷ |
| Vch20K-4805 | | 6x10 ⁷ | 6x10 ⁷ | 5x10 ⁷ | 5,5x10 ⁷ | 5x10 ⁷ | 5x10 ⁷ | 4x10 ⁷ | 5x10 ⁷ | 5x10 ⁷ | 5x10 ⁷ | 6x10 ⁷ | 5,5x10 ⁷ | 5,5x10 ⁷ | 5x10 ⁷ |
| Vch105 | | 5x10 ⁷ | 3x10 ⁷ | 3x10 ⁷ | 2x10 ⁷ | 1x10 ⁷ | 3x10 ⁷ | 6x10 ⁷ | 5x10 ⁷ | 1x10 ⁷ | 1x10 ⁷ | 1x10 ⁷ | 1x10 ⁷ | 1x10 ⁷ | 1x10 ⁷ |
| VchBS3 | | 6x10 ⁷ | 4x10 ⁷ | 7x10 ⁷ | 2x10 ⁷ | 5x10 ⁷ | 5x10 ⁷ | 4,5x10 ⁷ | 4,5x10 ⁷ | 5x10 ⁷ | 8x10 ⁷ | 7,5x10 ⁷ | 7x10 ⁷ | 4x10 ⁷ | 4x10 ⁷ |
| Vch54 | 1 თვე | 2x10 ⁷ | 1,2x10 ⁷ | 2x10 ⁷ | 1,1x10 ⁷ | 1,5x10 ⁷ | 1,5x10 ⁷ | 1,7x10 ⁷ | 2x10 ⁷ | 1,6x10 ⁷ | 1,8x10 ⁷ | 1,7x10 ⁷ | 1,4x10 ⁷ | 1,7x10 ⁷ | 1,8x10 ⁷ |
| Vch16K-O1 | | 4x10 ⁷ | 3x10 ⁷ | 4x10 ⁷ | 4x10 ⁷ | 3x10 ⁷ | 4x10 ⁷ | 3,4x10 ⁷ | 3x10 ⁷ | 4x10 ⁷ | 4x10 ⁷ | 4x10 ⁷ | 4x10 ⁷ | 4x10 ⁷ | 4x10 ⁷ |
| Vch20K-4805 | | 2x10 ⁷ | 2,5x10 ⁷ | 2x10 ⁷ | 2,2x10 ⁷ | 2,3x10 ⁷ | 4x10 ⁷ | 4x10 ⁷ | 5x10 ⁷ | 5x10 ⁷ | 5x10 ⁷ | 5,5x10 ⁷ | 5x10 ⁷ | 5x10 ⁷ | 4x10 ⁷ |
| Vch105 | | 2x10 ⁷ | 1x10 ⁷ | 2x10 ⁶ | 9x10 ⁶ | 1x10 ⁷ | 1x10 ⁷ | 4x10 ⁷ | 1x10 ⁷ | 6x10 ⁶ | 4x10 ⁶ | 8x10 ⁶ | 4x10 ⁶ | 2x10 ⁶ | 1x10 ⁷ |
| VchBS3 | | 3,2x10 ⁷ | 3,2x10 ⁷ | 4x10 ⁷ | 2x10 ⁷ | 4x10 ⁷ | 3x10 ⁷ | 3x10 ⁷ | 3,5x10 ⁷ | 5x10 ⁷ | 5x10 ⁷ | 3,2x10 ⁷ | 2x10 ⁷ | 2x10 ⁷ | 1,5x10 ⁷ |
| Vch54 | 3 თვე | 1x10 ⁷ | 1x10 ⁷ | 1,5x10 ⁷ | 1x10 ⁷ | 1x10 ⁷ | 1,3x10 ⁷ | 1,5x10 ⁷ | 1,5x10 ⁷ | 1,3x10 ⁷ | 1,3x10 ⁷ | 1,2x10 ⁷ | 1,1x10 ⁷ | 1,2x10 ⁷ | 1,5x10 ⁷ |
| Vch16K-O1 | | 3x10 ⁷ | 2,8x10 ⁷ | 2x10 ⁷ | 2,2x10 ⁷ | 2x10 ⁷ | 3x10 ⁷ | 3x10 ⁶ | 2,2x10 ⁷ | 2x10 ⁷ | 3x10 ⁷ | 4x10 ⁷ | 4x10 ⁷ | 4x10 ⁷ | 4x10 ⁷ |
| Vch20K-4805 | | 1x10 ⁷ | 1x10 ⁷ | 1x10 ⁷ | 1,5x10 ⁷ | 1,6x10 ⁷ | 2,5x10 ⁷ | 3x10 ⁶ | 4x10 ⁷ | 5x10 ⁷ | 5x10 ⁷ | 5,5x10 ⁷ | 5,5x10 ⁷ | 4,5x10 ⁷ | 6x10 ⁷ |
| Vch105 | | 9x10 ⁶ | 8x10 ⁶ | 1x10 ⁶ | 4x10 ⁶ | 6x10 ⁶ | 7,4x10 ⁶ | 8x10 ⁶ | 7x10 ⁶ | 2x10 ⁶ | 2x10 ⁶ | 4x10 ⁶ | 3x10 ⁶ | 1x10 ⁶ | 8x10 ⁶ |
| VchBS3 | | 6x10 ⁶ | 9x10 ⁶ | 8x10 ⁶ | 2x10 ⁶ | 3x10 ⁶ | 4x10 ⁶ | 3x10 ⁶ | 4x10 ⁶ | 5x10 ⁶ | 5x10 ⁶ | 2x10 ⁶ | 6x10 ⁶ | 2x10 ⁶ | 2x10 ⁶ |
| Vch54 | 6 თვე | 2,4x10 ⁶ | 2,1x10 ⁶ | 2,2x10 ⁶ | 1,8x10 ⁶ | 1x10 ⁶ | 2x10 ⁶ | 1,5x10 ⁶ | 1,9x10 ⁶ | 2x10 ⁶ | 2x10 ⁶ | 1,8x10 ⁶ | 1,7x10 ⁶ | 1,8x10 ⁶ | 2x10 ⁶ |
| Vch16K-O1 | | 7x10 ⁶ | 6,8x10 ⁶ | 5,8x10 ⁶ | 6x10 ⁶ | 5,4x10 ⁶ | 5,2x10 ⁶ | 8x10 ⁵ | 7x10 ⁶ | 7,2x10 ⁶ | 7x10 ⁶ | 6,8x10 ⁶ | 6x10 ⁶ | 5,4x10 ⁶ | 6,2x10 ⁶ |
| Vch20K-4805 | | 5,6x10 ⁶ | 5x10 ⁶ | 5x10 ⁶ | 4,8x10 ⁶ | 5,4x10 ⁶ | 4x10 ⁶ | 4,8x10 ⁵ | 5,8x10 ⁶ | 4,8x10 ⁶ | 5,2x10 ⁶ | 5x10 ⁶ | 5x10 ⁶ | 4x10 ⁶ | 4,5x10 ⁶ |
| Vch105 | | 2x10 ⁶ | 1x10 ⁶ | 6x10 ⁵ | 1x10 ⁶ | 1x10 ⁶ | 8x10 ⁵ | 3x10 ⁵ | 1x10 ⁶ | 2x10 ⁵ | 1x10 ⁵ | 1x10 ⁵ | 1x10 ⁵ | 1x10 ⁵ | 1x10 ⁶ |
| VchBS3 | | 1x10 ⁵ | 1x10 ⁵ | 5x10 ⁵ | 1x10 ⁵ | 5x10 ⁵ | 1x10 ⁵ | 1x10 ⁵ | 1x10 ⁵ | 1x10 ⁵ | 3x10 ⁵ | 4x10 ⁵ | 1x10 ⁵ | 1x10 ⁵ | 1x10 ⁵ |

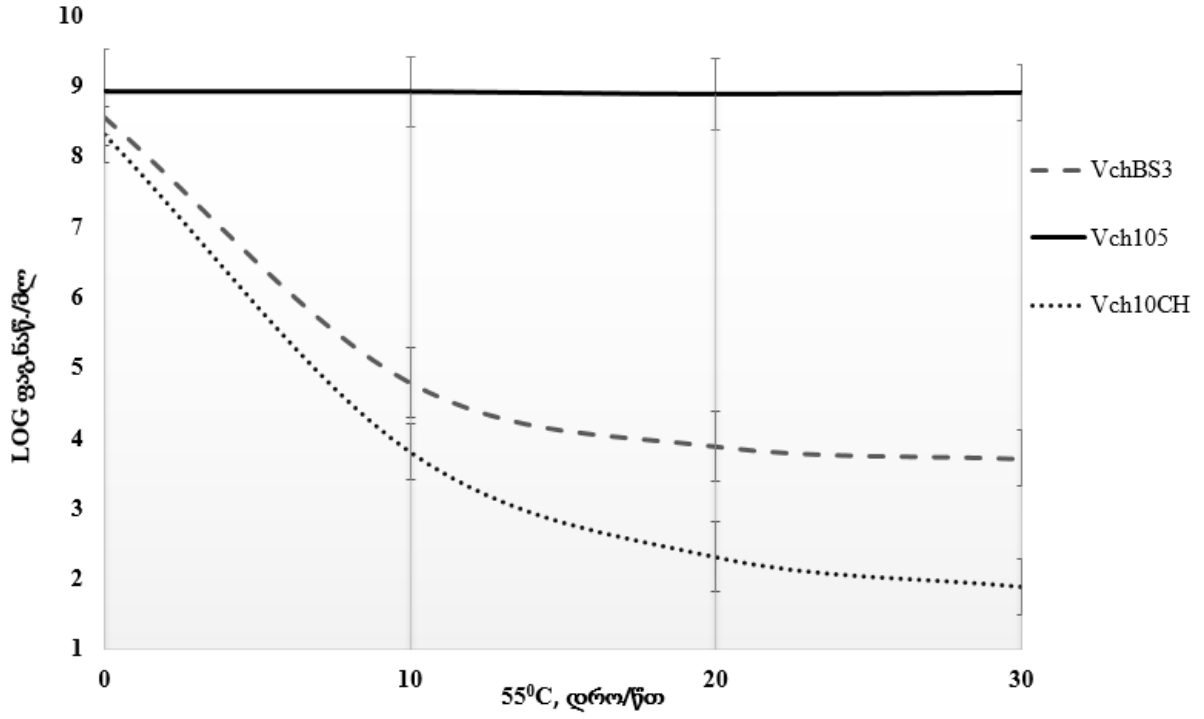
*მონიშნული უჯრები მიუთითებს აქტიური ფაგური ნაწილაკების 1-დან 2 ლოგ.-მდე დაცემას

ფაგების თერმონაქტივაციის ექსპერიმენტი ტარდებოდა 10,20,30 წთ-ის ინტერვალით 55°C, 60°C, 65°C და 70°C ტემპერატურაზე. სიჩქარის მუდმივა (K) განისაზღვრა *V. cholerae* არა-O1-ის მიმართ სპეციფიკური 3 ფაგის, *V. cholerae* O1-ის მიმართ სპეციფიკური 6 ფაგის და *V. mimicus*-ის მიმართ სპეციფიკური 3 ფაგის შემთხვევაში. სიჩქარის მუდმივას სიდიდე განსხვავდებოდა თითოეული ფაგისთვის ტემპერატურიდან და დროის ინტერვალისგან გამომდინარე. *V. cholerae*-ს მიმართ სპეციფიკური 9 არსებული ფაგიდან 8 ფაგი (Vch105-ის გამოკლებით) და *V. mimicus*-ის მიმართ სპეციფიკური ყველა ფაგი ინაქტივირებული იყო 55°C-ზე 10 წთ-ის ექსპოზიციის პირობებში. ნაქტივირებული ფაგური ნაწილაკების რიცხვი აღემატებოდა 70%-ს (სურ.32-34).

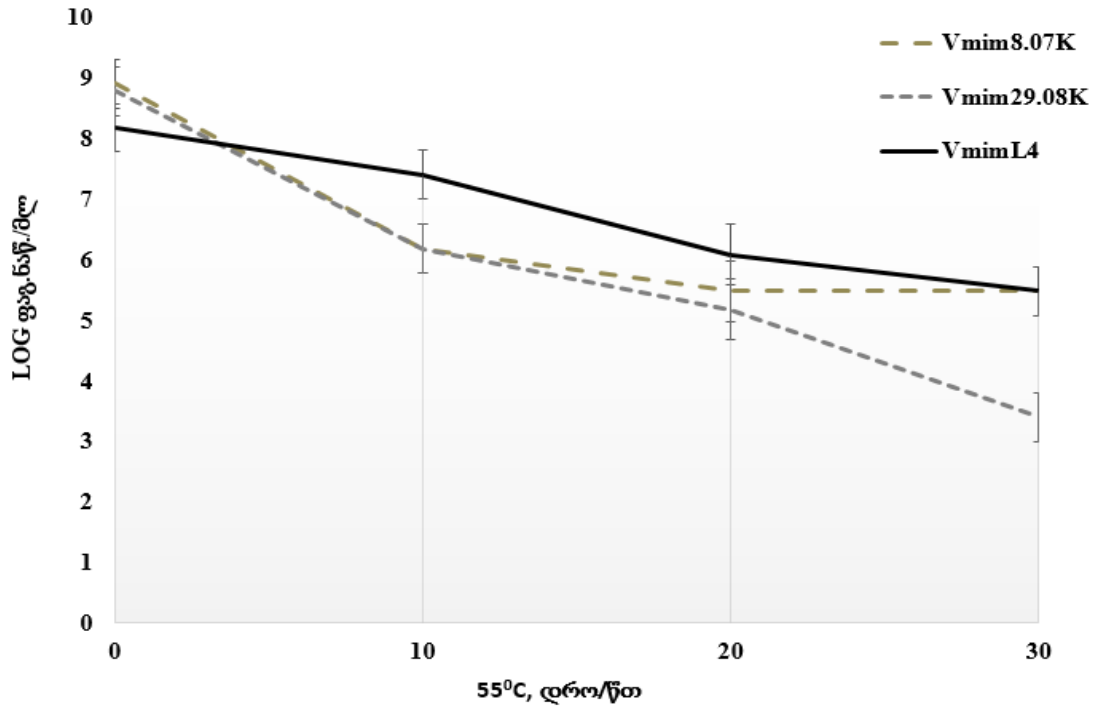


სურ.32. *V. cholerae* O1-ის მიმართ სპეციფიკური ფაგების თერმონაქტივაცია

მხოლოდ Vch105 ფაგის შემთხვევაში სიცოცხლიუნარიანი ფაგური ნაწილაკების რიცხვის მნიშვნელოვანი დაცემა (90%-ზე მეტი) შეინიშნა 70°C t-ზე 10 წთ-ის ინტერვალში და სიჩქარის მუდმივას მაქსიმუმი მიღწეული იყო 70°C t-ზე 30 წთ-ის ექსპოზიციის დროს (სურ.35). 60°C-დან 70°C-მდე ჩატარებულმა ცდებმა აჩვენა, რომ ხუთი ფაგი სრულად ინაქტივირდა 30 წთ-ზე ნაკლებ დროში. მათ შორის: *V. cholerae* არა-O1-ის მიმართ სპეციფიკური ფაგი Vch10CH-60°C-ზე, *V. cholerae* O1-ის მიმართ სპეციფიკური ფაგები: Vch20K-4805, Vch20K-O1, Vch16K-O1- 65°C-ზე და *V. cholerae* არა-O1-ის მიმართ სპეციფიკური ფაგი-VchBS3 70°C-ზე.

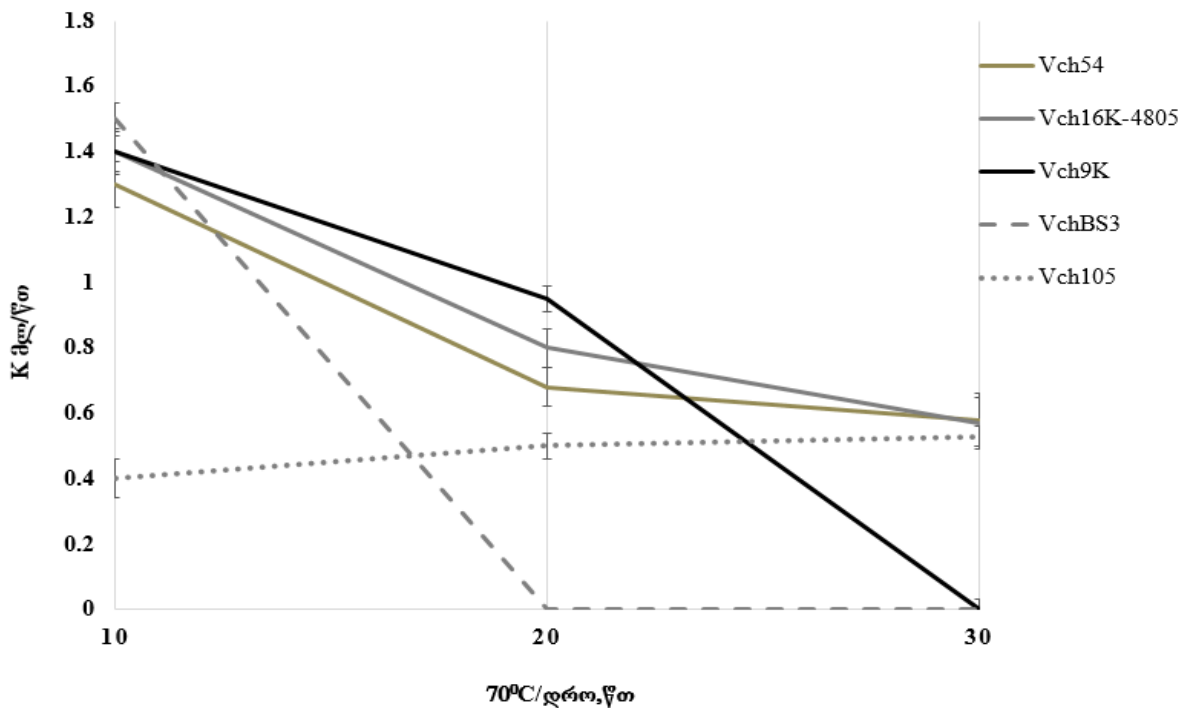


სურ.33. *V. cholerae* არა-O1-ის მიმართ სპეციფიკური ფაგების თერმონაქტივაცია

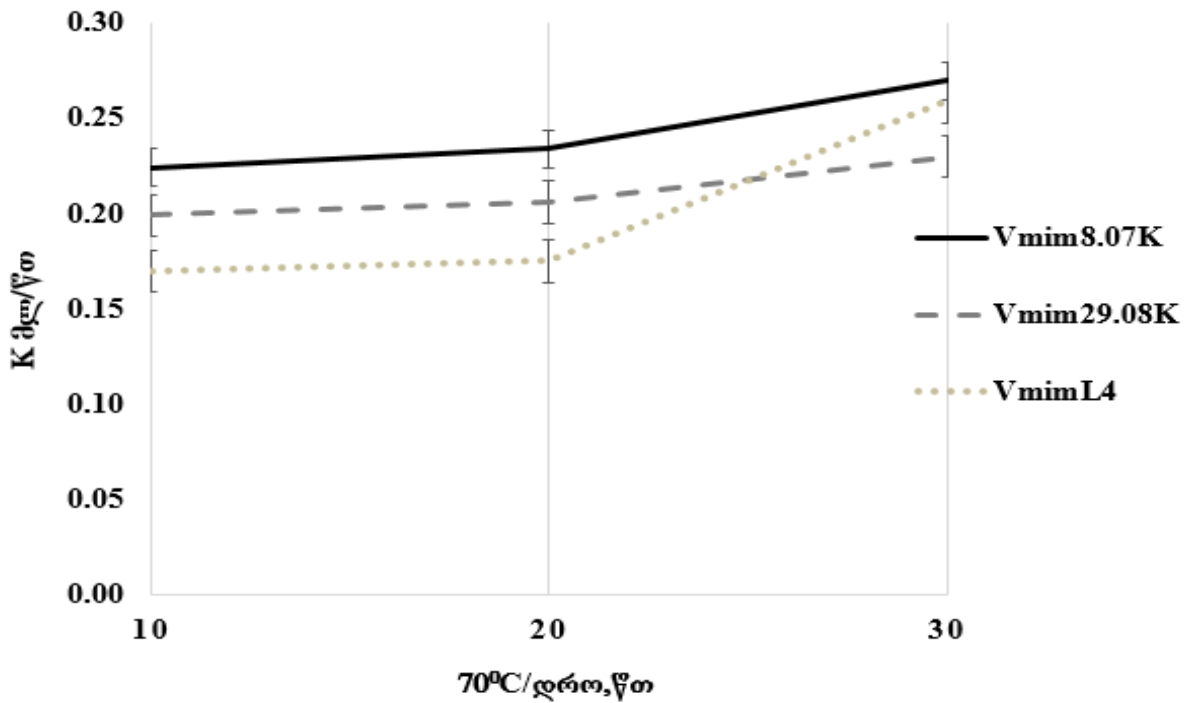


სურ.34. *V. mimicus*-ის მიმართ სპეციფიკური ფაგების თერმონაქტივაცია

გამოკვლევული ბაქტერიოფაგების ერთმანეთისგან განსხვავებული თერმომგრძობელობა მიუთითებს მათი ცილოვანი სტრუქტურების განსხვავებაზე. *V. cholerae* O1-ის მიმართ სპეციფიკური ფაგების თერმომგრძობელობა განსხვავდებოდა, როგორც *V. cholerae* არა-O1-ის მიმართ სპეციფიკური ფაგების, ასევე ერთმანეთის თერმომგრძობელობისგან. *V. cholerae* არა-O1-ის მიმართ სპეციფიკური სამივე ფაგი ამ პარამეტრის მხრივ ერთმანეთისგან განსხვავებული აღმოჩნდა. ამრიგად ფაგი Vch105-ის ცილოვანი სტრუქტურა სხვა ფაგების ცილოვან სტრუქტურაზე მეტად თერმოსტაბილური აღმოჩნდა. *V. mimicus*-ის მიმართ სპეციფიკური ფაგების შემთხვევაში რეაქციის სიჩქარის პიკი დაფიქსირდა 70°C ტემპერატურაზე 30 წთ-ის ექსპოზიციის შემდეგ (სურ.36). ამრიგად, ეს უკანასკნელი, *V. cholerae*-ს მიმართ სპეციფიკურ ფაგებისგან განსხვავებით მეტად თერმოსტაბილურები აღმოჩნდნენ.



სურ.35. *V. cholerae* არა-O1 და O1-ის მიმართ სპეციფიკური ფაგების თერმონაქტივობის სიჩქარე



სურ.36. *V. mimicus*-ის მიმართ სპეციფიკური ფაგების თერმონაქტივაციის სიჩქარე

წყალბად-იონთა კონცენტრაციის ზეგავლენას ფაგებზე ესწავლობდით pH-ის სხვადასხვა კონცენტრაციის პირობებში: 1-დან 12-მდე, 30 და 60 წთ-ის ინტერვალზე, რის შემდეგაც ვსაზღვრავდით სიცოცხლისუნარიანი ფაგური ნაწილაკების რიცხვს. ბაქტერიოფაგების უმრავლესობა საკმაოდ სტაბილურია pH-ის შუალედურ დიაპაზონში, რომელიც სტანდარტულ პირობებში (32°C-37°C) შეადგენს pH-5-9-ს. საკვები არის გატუტონება იწვევს ვირიონების თანდათანობით დეგრადაციას, თავდაპირველად ხდება მორჩების დაშლა, შემდეგ კი იწყება დნმ-ის გამოსვლა. კაფსიდის სტრუქტურული ელემენტების დაშლას იწვევს, როგორც მაღალი ტუტიანობის პირობები (pH-12), ასევე pH-ის ექსტრემალურად დაბალი მაჩვენებელი. (<pH-2). pH-ის ზომიერად დაბალი მაჩვენებლის დროს ბაქტერიოფაგების გამოლექვა შესაძლოა ინფექციურობის დაკარგვის გარეშეც მოხდეს. pH-ის გამოხატულად მაღალი ან დაბალი მნიშვნელობის დროს გამოვლენილი ფაგური ნაწილაკები შესაძლოა მუტანტურ ფორმებს წარმოადგენენ, რომელთა გადარჩევა ცვალებად პირობებში მიმდინარეობს.

ჩვენს მიერ ჩატარებულმა ცდებმა აჩვენა, რომ ფაგებისთვის კრიტიკული აღმოჩნდა pH-ის ექსტრემალურად დაბალი (pH-1) მაჩვენებელი, რომლის დროსაც გადარჩენილი ფაგური ნაწილაკების რიცხვი მხოლოდ 1%-ს უტოლდებოდა. pH-4-9-ს შორის ინტერვალში *V. cholerae* არა-O1-ის მიმართ სპეციფიკურ ფაგებში (3 ფაგი) შეინიშნებოდა ტიტრის მცირე დაცემა *V. cholerae* O1-ის მიმართ სპეციფიკურ ფაგებთან (6 ფაგი) შედარებით. მხოლოდ ორი *V. cholerae* არა-O1-ის მიმართ სპეციფიკური ფაგი: Vch105 და Vch10CH ინარჩუნებდა აქტივობას pH 12-ზე 30 და 60 წთ-ის

ინტერვალზე. *V. cholerae* O1-ის მიმართ სპეციფიკური ყველა ფაგი ინაქტივირდა pH-12-ზე. *V. mimicus*-ის მიმართ სპეციფიკური ფაგებისთვის (3 ფაგი) ისევე, როგორც დანარჩენებისთვის კრიტიკული აღმოჩნდა pH-1-ის მაჩვენებელი, *V. cholerae* არა-O1-ის მიმართ სპეციფიკური ფაგების მსგავსად ინარჩუნებდნენ სრულ აქტივობას pH-4-9 მაჩვენებელზე. pH-12-ის შემთხვევაში ფაგი VmimL4-ის სიცოცხლისუნარიანი ფაგური ნაწილაკების მაჩვენებელი 40%-ზე მეტს შეადგენდა, განსვავებით დანარჩენი ორი ფაგისგან (Vmim8.07K და V.mim29.08K), რომლებიც *V. cholerae* O1-ის მიმართ სპეციფიკური ფაგების მსგავსად ნაკლებად რეზისტენტული აღმოჩნდნენ მაღალი ტუტიანობის პირობებში (ცხრ.14). დადგინდა, რომ *V. cholerae* O1-ის მიმართ სპეციფიკური ფაგები იჩენდნენ ნაკლებ რეზისტენტობას pH-ის სხვადასხვა კონცენტრაციის მიმართ *V. cholerae* არა-O1-ის და *V. mimicus*-ის მიმართ სპეციფიკურ ფაგებთან შედარებით.

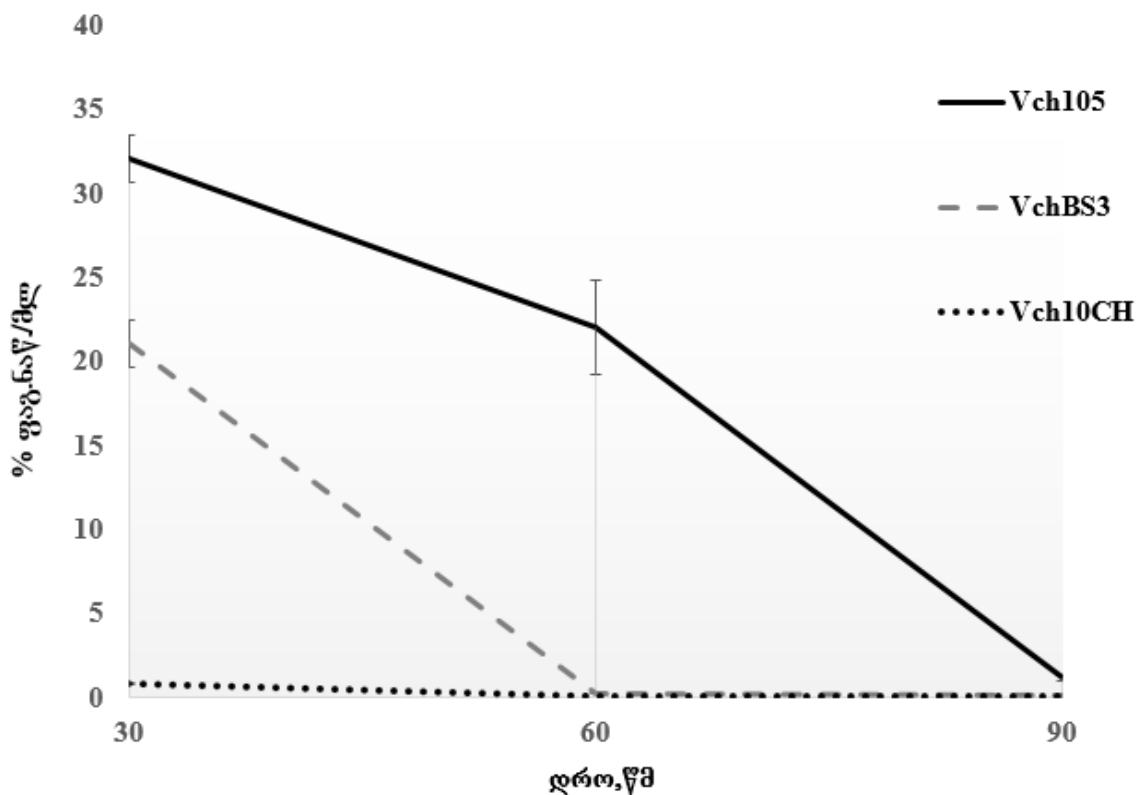
ცხრ.14. წყალბად-იონთა კონცენტრაციის მინაქტივირებელი ზემოქმედება ფაგებზე

| ბაქტერიოფაგები | | სიცოცხლისუნარიანი ფაგური ნაწილაკების რაოდენობრივი განაწილება (log) | | | | | | | | | |
|------------------------------|-------------|--|---------|---------|---------|---------------|---------|---------|---------|---------|---------|
| | | pH1 | | pH4 | | pH7(კონტროლი) | | pH9 | | pH12 | |
| | | 30წთ | 60წთ | 30წთ | 60წთ | 30წთ | 60წთ | 30წთ | 60წთ | 30წთ | 60წთ |
| <i>V. cholerae</i> არა-O1 | VchBS3 | 2±0.1 | 2±0.1 | 8.6±0.6 | 8.3±0.4 | 8.6±0.6 | 8.6±0.5 | 8.5±0.5 | 8±0.4 | 7.8±0.4 | 6±0.3 |
| | Vch105 | 2±0.1 | 2±0.1 | 8.6±0.5 | 8.3±0.5 | 8.8±0.5 | 8.8±0.6 | 8.7±0.4 | 8.3±0.5 | 8.6±0.5 | 8.5±0.4 |
| | Vch10CH | 2±0.1 | 2±0.1 | 8.5±0.6 | 8±0.4 | 8.9±0.6 | 8.9±0.5 | 8.7±0.4 | 8.6±0.4 | 8.6±0.5 | 8.5±0.4 |
| <i>V. cholerae</i> O1 | Vch16K-4805 | 4.5±0.2 | 3±0.1 | 7.6±0.5 | 7.3±0.5 | 8.3±0.6 | 8.3±0.4 | 7.7±0.3 | 7.3±0.4 | 7.6±0.3 | 7.1±0.3 |
| | Vch20K-4805 | 2.8±0.2 | 2.7±0.2 | 7.9±0.5 | 7.7±0.5 | 8.7±0.5 | 8.7±0.4 | 7.5±0.4 | 7.5±0.4 | 7.5±0.4 | 7.3±0.3 |
| | Vch54 | 2.3±0.1 | 2±0.1 | 7.8±0.5 | 7.3±0.5 | 8.3±0.6 | 8.3±0.5 | 7.5±0.4 | 7.1±0.4 | 7.6±0.3 | 6.9±0.4 |
| | Vch9K | 3.6±0.2 | 3±0.2 | 7.6±0.5 | 7.2±0.5 | 8.3±0.6 | 8.3±0.4 | 7.7±0.4 | 6.8±0.3 | 7.6±0.4 | 7.8±0.4 |
| | Vch16K-O1 | 3±0.2 | 2±0.1 | 6.9±0.4 | 6.7±0.4 | 8.5±0.5 | 8.5±0.6 | 7.3±0.4 | 7.1±0.3 | 7.3±0.4 | 7±0.4 |
| | Vch20K-O1 | 5±0.3 | 3.5±0.2 | 7.7±0.4 | 7±0.5 | 8.8±0.6 | 8.8±0.5 | 7.9±0.4 | 7.7±0.4 | 7.6±0.4 | 7.5±0.4 |
| <i>V. mimicus</i> | Vmim8.07K | 2±0.1 | 2±0.1 | 8.6±0.6 | 8.0±0.3 | 8.7±0.5 | 8.7±0.4 | 8.6±0.6 | 8.2±0.3 | 7.3±0.3 | 6.3±0.2 |
| | Vmim29.08K | 2±0.1 | 2±0.1 | 8.1±0.3 | 8.0±0.3 | 8.3±0.6 | 8.3±0.5 | 8.0±0.3 | 7.9±0.3 | 6.7±0.2 | 6.3±0.2 |
| | VmimL4 | 2±0.1 | 2±0.1 | 8.6±0.6 | 8.2±0.3 | 8.3±0.6 | 8.3±0.4 | 8.6±0.6 | 8.4±0.5 | 8.4±0.5 | 8.1±0.3 |

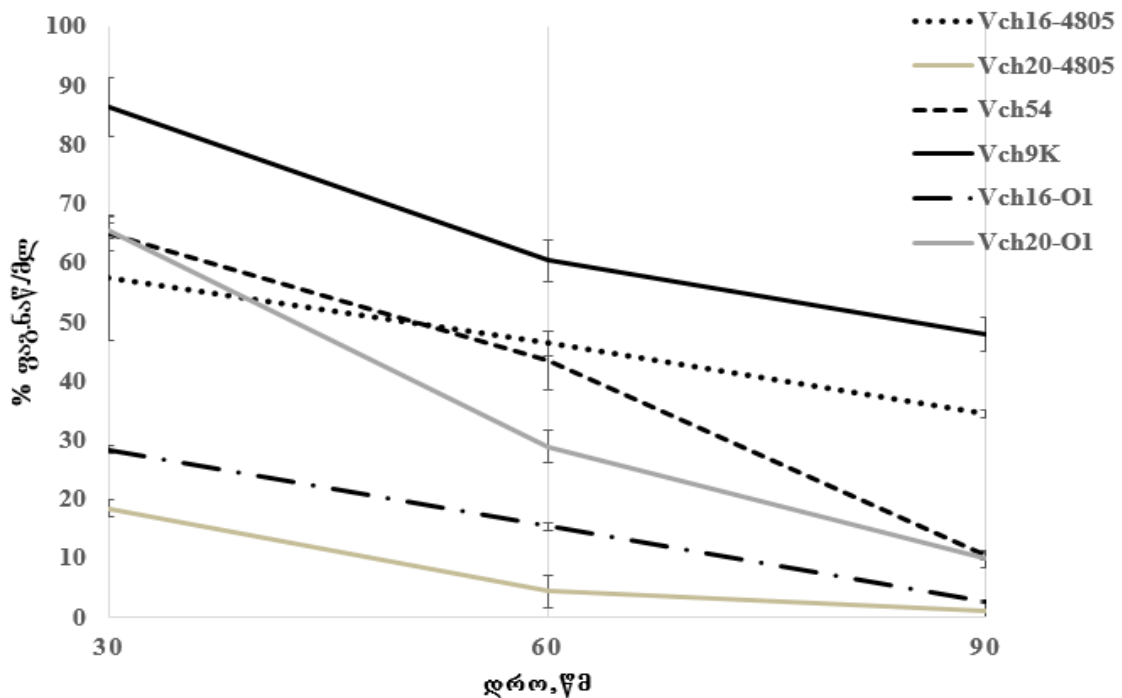
ბაქტერიოფაგების მგრძობელობა UV სხივების მიმართ. ბუნებრივ პირობებში ფაგების პოპულაციის შენარჩუნებისათვის დიდი მნიშვნელობა აქვს ბაქტერიოფაგების ულტრაიისფერი სხივებისადმი გამძლეობას. UV გამოსხივებას დამაზიანებელი ეფექტი აქვს ფაგებზე, ამცირებს რა მათ ლიტიურ აქტივობას. გამოკვლეული 12 ფაგიდან (6-*V. cholerae* O1-ის და 3 არა-O1-ის მიმართ სპეციფიკური, 3-*V. mimicus*-ის მიმართ სპეციფიკური) ყველაზე ნაკლებად რეზისტენტული UV გამოსხივების მიმართ აღმოჩნდა *V. cholerae* არა-O1-ის მიმართ სპეციფიკური ფაგი-Vch10CH, რომლის შემთხვევაშიც აქტიური ფაგური ნაწილაკების რიცხვი 30 წამის ექსპოზიციის დროს აღწევდა 0.8%-ს (სურ.37). *V. cholerae* O1-ის მიმართ სპეციფიკური 6 ფაგიდან ყველაზე

ნაკლები მედეგობით გამოირჩეოდა 2 ფაგი: Vch20K-4805 და Vch16K-O1, რომელთა აქტიური ფაგური ნაწილაკების სიხშირეც 30 წამის ინტერვალზე უტოლდებოდა 19 და 28%-ს, განსხვავებით სხვა *V. cholerae* O1-ის მიმართ სპეციფიკური ფაგებისა, რომელთა შემთხვევაშიც აქტიური ფაგური ნაწილაკების პროცენტული მაჩვენებელი 30 წამის ინტერვალზე აღწევდა 70%-ს (სურ.38).რაც შეეხება *V. mimicus*-ის მიმართ სპეციფიკურ ფაგებს, მაღალი მედეგობით გამოირჩეოდა ფაგი- VmimL4, განსხვავებით დანარჩენი 2 *V. mimicus*-ის მიმართ სპეციფიკურ ფაგისა.

ცდებმა გამოვალინა, რომ ფაგების ლიტიური აქტივობა მცირდებოდა UV გამოსხივების ზემოქმედების დროის გაზრდასთან ერთად. *V. cholerae* არა-O1-ის მიმართ სპეციფიკური ფაგები ნაკლებ მედეგობას იჩენდნენ UV გამოსხივების მიმართ, *V. cholerae* O1-ის მიმართ სპეციფიკურ ფაგებითან შედარებით. *V. mimicus*-ის მიმართ სპეციფიკური ფაგები *V. cholerae* არა-O1-ის მიმართ სპეციფიკური ფაგების მსგავსად ნაკლებად რეზისტენტული აღმოჩნდნენ UV გამოსხივების დამაზიანებელი ეფექტის მიმართ.



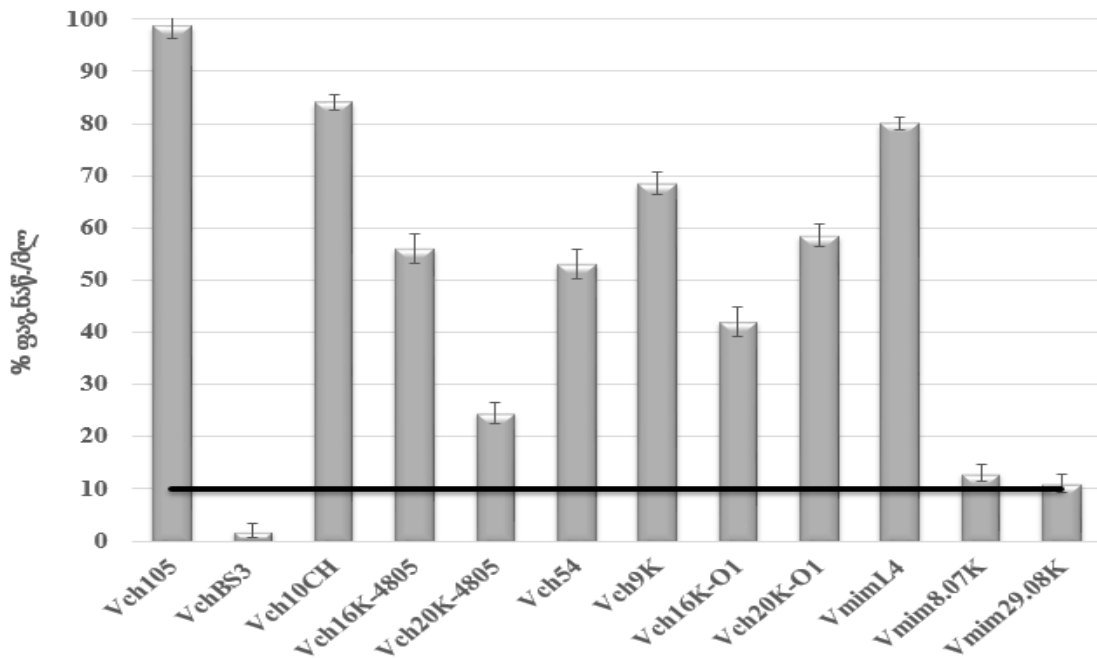
სურ.37. UV გამოსხივების ზემოქმედება *V. cholerae* არა-O1-ის მიმართ სპეციფიკური ფაგების სიცოცხლისუნარიანობაზე



სურ.38. UV გამოსხივების ზემოქმედება *V. cholerae* O1-ის მიმართ სპეციფიკური ფაგების სიცოცხლისუნარიანობაზე

ფაგების მგრძობელობა ნატრიუმის ციტრატის მიმართ გამოკვლეული იყო 12 ფაგზე (6-*V. cholerae* O1-ის და 3 არა-O1-ის მიმართ სპეციფიკური, 3-*V. mimicus*-ის მიმართ სპეციფიკური). ნატრიუმის ციტრატის ზემოქმედება მაღალი იყო *V. cholerae* არა-O1-ის მიმართ სპეციფიკური ფაგის -VchBS3 და *V. cholerae* O1-ის მიმართ სპეციფიკური ფაგის -Vch20K-4805 მიმართ. სიცოცხლისუნარიანი ფაგური ნაწილაკების რაოდენობა უტოლდებოდა 1 და 24%-ს. საერთოდ არ შეინიშნებოდა ტიტრის ცვლილება *V. cholerae* არა O1-ის მიმართ სპეციფიკური ფაგის -Vch105-ის შემთხვევაში და ტიტრის მცირე დაცემა აღინიშნა *V. cholerae* არა O1-ის მიმართ სპეციფიკური ფაგისთვის-Vch10CH (აქტიური ფაგური ნაწილაკების რიცხვი უტოლდებოდა 83%-ს). *V. mimicus*-ის მიმართ სპეციფიკურ ფაგების გამოკვლევამ კი ცხადყო, რომ მაღალი მედეგობით გამოირჩეოდა ფაგი-VmimL4, განსხვავებით დანარჩენი ორი-*V. mimicus*-ის მიმართ სპეციფიკური ფაგისა, რომელთა გადარჩენილი ფაგური ნაწილაკების პროცენტული მაჩვენებელი დაბალი იყო, მსგავსად *V. cholerae* არა-O1-ის მიმართ სპეციფიკური ფაგისა-VchBS3 და უტოლდებოდა 11 და 13%-ს (სურ.39).

უმნიშვნელო ხარისხის ინაქტივაცია არაპირდაპირად მიუთითებს იმაზე, რომ ბაქტერიოფაგები არ არიან დამოკიდებულნი Ca^{++} -ის ორვალენტიან იონებზე, როგორც აღსორბციის კოფაქტორებზე.

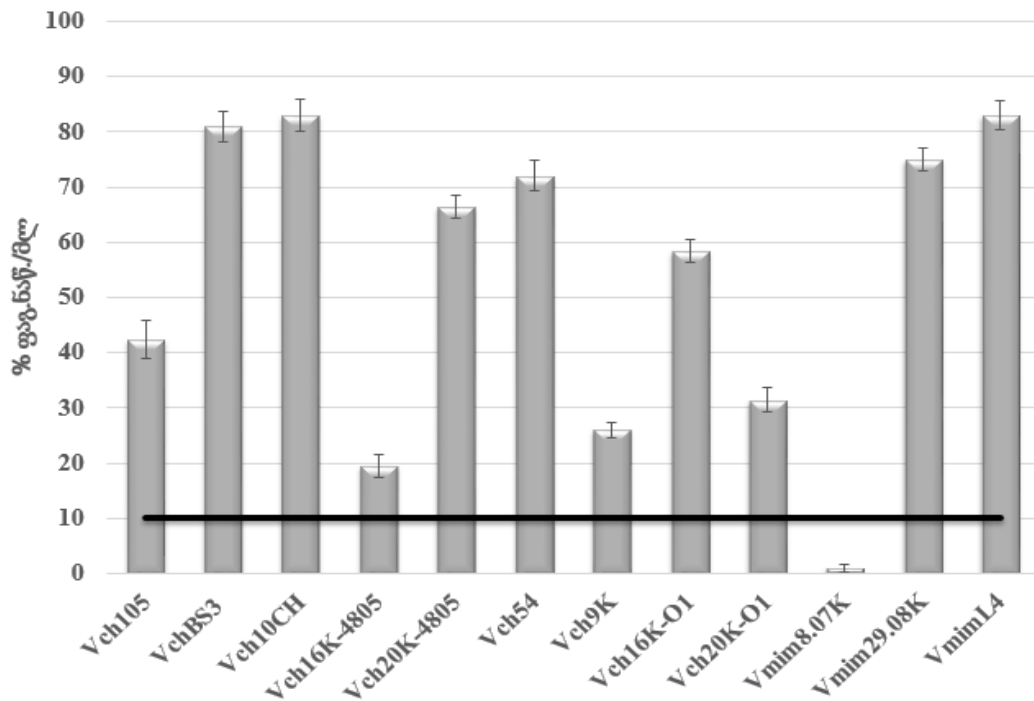


სურ.39. სიცოცხლისუნარიანი ფაგური ნაწილაკების პროცენტული განაწილება ნატრიუმის ციტრატის ზემოქმედებიდან 15 წთ-ისექსპოზიციის შემდეგ

*გაველებული ზღვარი მიუთითებს აქტიური ფაგური ნაწილაკების 1 ლოგ.-ით დაცემას

ფაგების მგრძობელობა ოსმოსური შოკის მიმართ ასევე შევისწავლეთ აღნიშნულ 12 ფაგზე (6-*V. cholerae* O1-ის და 3 არა-O1-ის მიმართ სპეციფიკური, 3-*V. mimicus*-ის მიმართ სპეციფიკური). კვლევამ აჩვენა, რომ *V. cholerae* არა-O1-ის მიმართ სპეციფიკური ფაგები იჩენდნენ მეტ მედეგობას ოსმოსური შოკის ზემოქმედების მიმართ *V. cholerae* O1-ის მიმართ სპეციფიკურ ფაგებთან შედარებით. *V. cholerae* არა-O1-ის მიმართ სპეციფიკური ფაგების: VchBS3 და Vch10CH-ის აქტიური ფაგური ნაწილაკების პროცენტული რაოდენობა 15 წუთიანი ექსპოზიციის შემდეგ 83%-მდე აღწევდა განსხვავებით ფაგი-Vch105-სგან (42.5%), რომლის მედეგობის მაჩვენებელიც სხვადასხვა ფაქტორების მიმართ უფრო მაღალი იყო ზემოთ ხსენებულ ორ ფაგთან შედარებით. *V. cholerae* O1-ის მიმართ სპეციფიკური ფაგების: Vch16K-4805, Vch9K, Vch20K-O1-ის შემთხვევაში გადარჩენილი ფაგური ნაწილაკების პროცენტული მაჩვენებელი უტოლდებოდა მხოლოდ 19.5, 26 და 31.5%-ს. უნდა აღინიშნოს, რომ ხსენებული 3 ფაგი მეტი მედეგობით გამოირჩეოდა ნატრიუმის ციტრატის მიმართ. *V. mimicus*-ის მიმართ სპეციფიკურ ფაგების კვლევამ, ისევე, როგორც სხვა პარამეტრების მხრივ გამოავლინა VmimL4 ფაგის მაღალი მედეგობის უნარი მაინაქტივირებელი ფაქტორის მიმართ. ოსმოსური შოკის ზემოქმედების შემდეგ, 15წთ-იანი ექსპოზიციისას გადარჩენილი ფაგური ნაწილაკების რიცხვი 83%-ს აღწევდა. ასევე მაღალი იყო ფაგის-V.mim29.08K-ის მედეგობის მაჩვენებელი (75%). ყველაზე ნაკლები რეზისტენტობით, როგორც *V.*

mimicus-ის ასევე *V. cholerae*-ს მიმართ სპეციფიკურ ფაგებთან შედარებით გამოირჩეოდა ფაგი Vmim8.07K (1%) (სურ.40).



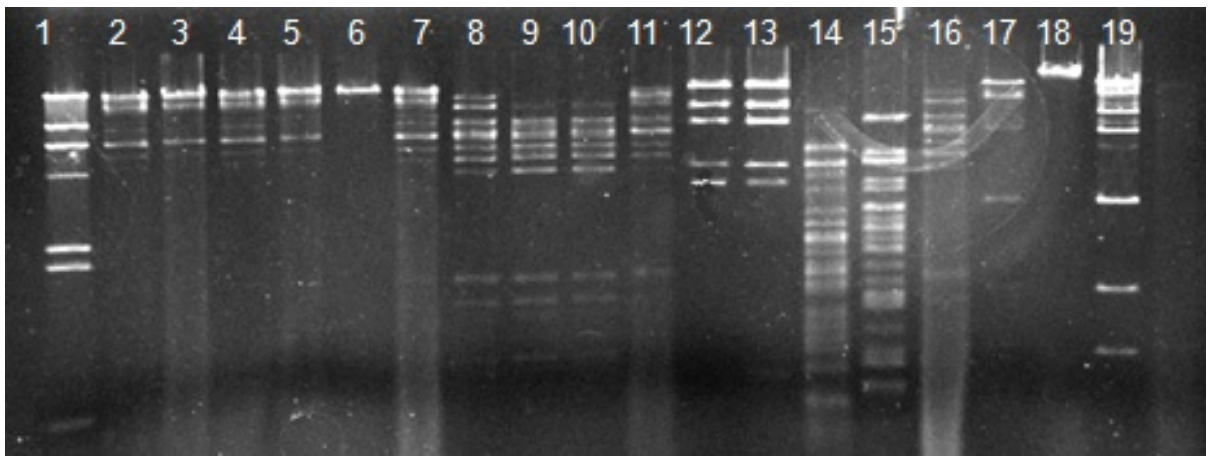
სურ.40. სიცოცხლისუნარიანი ფაგური ნაწილაკების პროცენტული განაწილება ოსმოსური შოკის ზემოქმედებიდან 15 წთ-ის ექსპოზიციის შემდეგ

*გაელებული ზღვარი მიუთითებს აქტიური ფაგური ნაწილაკების 1 ლოგ.-ით დაცემას

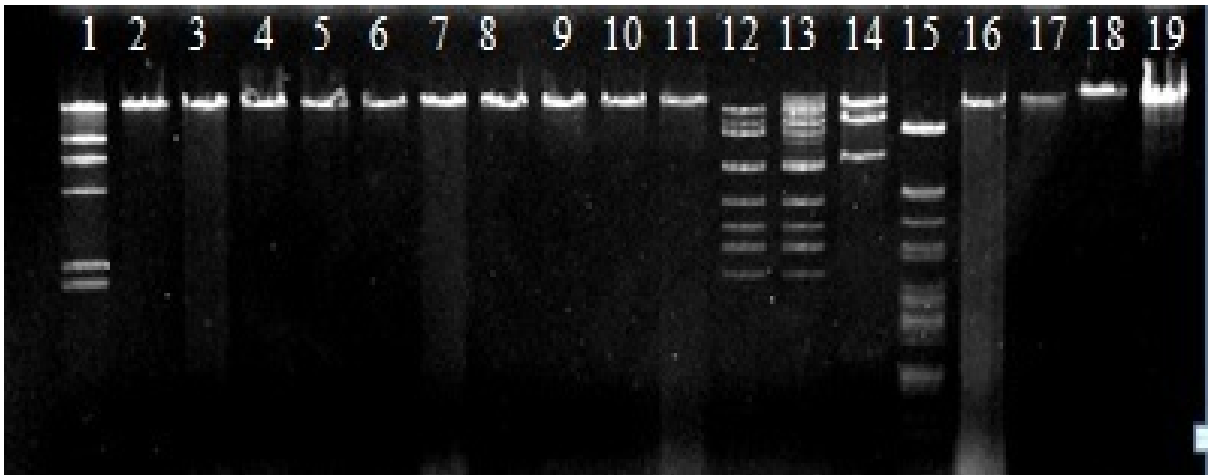
3.7. ბაქტერიოფაგების გენეტიკური მახასიათებლები

V. cholerae-ს მიმართ სპეციფიკური ფაგების დნმ-ის რესტრიქციული ანალიზისთვის შევარჩიეთ რამოდენიმე ენდონუკლეაზა, კერძოდ: EcoR I, EkoR V, Hind III, BamH I, Pst I, Not I (სურ.41-43). ჩვენს მიერ შესწავლილი ბაქტერიოფაგების დნმ ორჯაჭვიანია და მგრძობიარე აღმოჩნდა შეწავლილი რესტრიქციული ენდონუკლეაზების უმრავლესობის მიმართ. ფაგების დნმ-ების მოლეკულური წონის დასათვლელად გამოვიყენეთ Hind III ენდონუკლეაზით დაჭრილი ლამბდა(λ) დნმ, როგორც მარკერი და შესაბამისად ვიხელმძღვანელებთ ამავე დნმ-ის სტანდარტული მრუდით. შესწავლილი ფაგების დნმ-ების ყველაზე მსხვილი ფრაგმენტები 22.5 kb-ს აღწევდა. ენდონუკლეაზებით ფაგური დნმ-ების რესტრიქცია ძირითადად წვრილ ფრაგმენტებად მოხდა და უმეტესობა ფრაგმენტებისა დაბალი მოლეკულური წონის იყო (1.1 kb). *V. mimicus*-ის მიმართ სპეციფიკური ფაგების რესტრიქციულმა პროფილმა გამოავლინა მათი შედარებით დაბალი მგრძობიარეობა ენდონუკლეაზების მიმართ. მხოლოდ 2 ფაგი

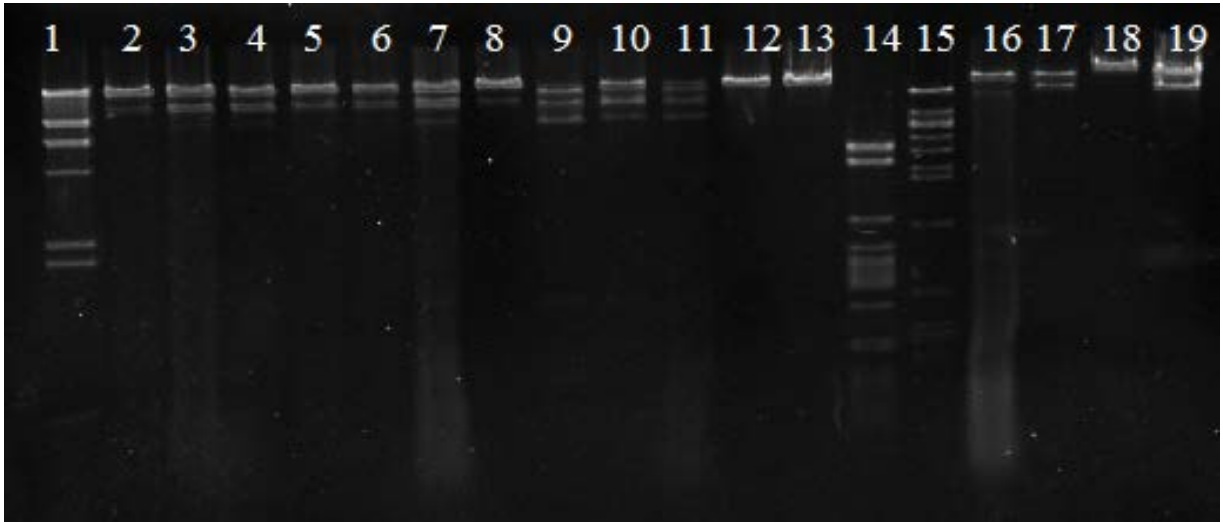
აღმოჩნდა მერძნობიარე *EcoR* V და *BamH* I ფერმენტების მიმართ (*VmimL4* და *V.mimK5*). რესტრიქციული პროფილი საშუალებას გვაძლევს ვიმსჯელოთ ფაგების გენეტიკურ მრავალფეროვნებაზე. გენეტიკური მახასიათებლის მიხედვით ფაგების დაჯგუფებისთვის ავაგეთ ფილოგენეზური ხე (სურ.44).



სურ.41. *EcoR* I ფერმენტით დაჭრილი *V. cholerae*-ს მიმართ სპეციფიკური ფაგების რესტრიქციული პროფილი

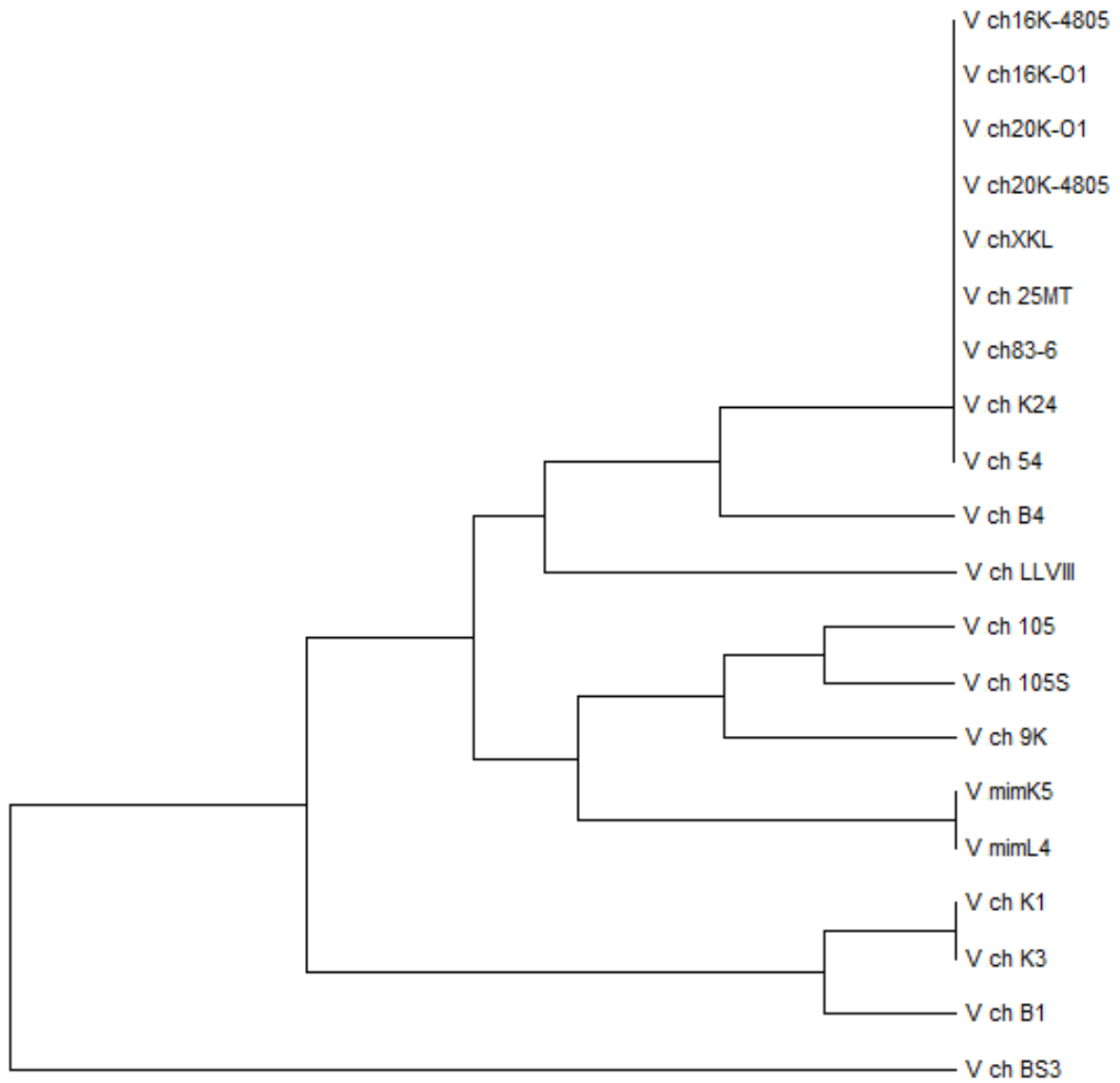


სურ.42. *Hind* III ფერმენტით დაჭრილი *V. cholerae*-ს მიმართ სპეციფიკური ფაგების რესტრიქციული პროფილი



სურ.43. EcoR V ფერმენტით დაჭრილი *V. cholerae*-ს მიმართ სპეციფიკური ფაგების რესტრიქციული პროფილი

- | | |
|----------------------------|-------------|
| 1. λ -DNA+Hind III | 12. VchK1 |
| 2. Vch16K-O1 | 13. VchK3 |
| 3. Vch16K-4805 | 14. VchB1 |
| 4. Vch20K-O1 | 15. VchB4 |
| 5. Vch20K-4805 | 16. Vch54 |
| 6. VchLLVIII | 17. Vch105 |
| 7. VchXKL | 18. VchBS3 |
| 8. Vch25MT | 19. Vch105S |
| 9. Vch83-6 | |
| 10. VchK24 | |
| 11. Vch9K | |



სურ.44. UPGMA (Nei-Li დაშორებული ანალიზი) ხე *V. cholerae*-ს და *V. mimicus*-ის მიმართ სპეციფიკური ფაგების დაჯგუფება რესტრიქციული პროფილის მიხედვით

IV შედეგების განხილვა

სასმელი წყლის და სარეკრეაციო მიზნით გამოყენებული წყალსატევების მიკრობული დაბინძურება საზოგადოებრივი ჯანდაცვის მთავარ საკითხად განიხილება. უკანასკნელ წლებში კლიმატის ცვლილებასთან დაკავშირებით განსაკუთრებულ ინტერესს იწვევს ადამიანის პათოგენი არაჰალოფილური, ქოლერას ჯგუფის ვიბრიონების *V. cholerae*-ს და *V. mimicus*-ის ეკოლოგიასა და ბიომრავალფეროვნებასთან დაკავშირებული საკითხები. *V. cholerae*-ს ეპიდემიური სეროტიპები მწვავე ინფექციური დაავადების-ქოლერას გამომწვევი აგენტებია. საქართველოს თბილი, სუბტროპიკული კლიმატი ხელსაყრელ პირობას ქმნის ვიბრიონების გამრავლებისა და განვითარებისთვის. დაბალი და საშუალო მარილიანობა, ასევე ტემპერატურა, რომელიც 18°C-ს აღემატება, ქმნის მათთვის სასურველ ზრდის პირობებს.

გარემო-კლიმატური პირობები და მათი სეზონური ცვლილება დიდ ზეგავლენას ახდენს პათოგენური ვიბრიონების, ასევე მათი მიმართ სპეციფიკური ბაქტერიოფაგების გავრცელებაზე. ბაქტერიოფაგებს დიდ როლი ენიჭებათ ბაქტერიული პოპულაციის რეგულაციასა და გენეტიკურ მრავალფეროვნებაში. ბაქტერიოფაგებს გამორჩეული ანტიბაქტერიული მოქმედება ახასიათებთ. აღწერილია მათი ინდიკატორებად და ტრასერებად, ბუნებრივი ღია წყალსატევების დაბინძურების ხარისხის, წყაროსა და გავრცელების გზების დადგენის მიზნით გამოყენება. *V. cholerae* O1-ის მიმართ სპეციფიკური ბაქტერიოფაგები ოდითგანვე ინტერესის სფეროს წარმოადგენდა-ინფექციების სადიაგნოსტიკოდ. მისი ბაქტერიოფაგების სპეციფიკური ნაკრებები დღემდე გამოიყენება *V. cholerae* O1-ის სეროტიპის “კლასიკური” და “El Tor” ბიოტიპების განსასხვავებლად.

ჩამდინარე წყლებში პათოგენური შტამებისა და შესაბამისი ფაგების დეტექცია შესაძლოა იყოს სპეციფიკური საშუალება ქოლერას აფეთქებების წინასწარ განჭვრეტისა. დაავადება ქოლერა მისი აღმოცენების ადგილიდან საკმაოდ სწრაფად ვრცელდება. ეპიდემიოლოგიური თვალსაზრისით მნიშვნელოვანია დაავადების გავრცელების თვალყურის დევნება. *V. cholerae*-ს მიმართ სპეციფიკური ბაქტერიოფაგების ინტენსიური დახასიათება საშუალებას იძლევა დაგროვდეს ინფორმაცია პათოგენური ვიბრიონების პოპულაციის სტრუქტურის ცვლილებაზე და პათოგენურობის მექანიზმების გაგებაზე. ფაგების პროფილი და სიუხვე წყლიან გარემოში ზემოქმედებს წყლისმიერი ინფექციების ეთიოლოგიურ სტრუქტურაზე და ინფორმაციას იძლევა პათოგენების შესახებ, ამ უკანასკნელთა არარსებობის შემთხვევაშიც კი. საქართველოს წყლის აქვატორიის რეგულარული მონიტორინგის შედეგად დაგროვილი ინფორმაცია საშუალებას იძლევა დაიგეგმოს პრევენციული ზომები წყლისმიერი ინფექციური დაავადებების გავრცელების თავიდან ასაცილებლად. ჩვენი კვლევის ძირითად მიზანს წარმოადგენდა საქართველოს წყლიან გარემოში არაჰალოფილური (ქოლერის ჯგუფის) ვიბრიონების მიმართ სპეციფიკური ბაქტერიოფაგების გამოყოფა და დახასიათება, ასევე ქოლერას ჯგუფის ვიბრიონების, როგორც ბაქტერიოფაგების მასპინძელი შტამების წინასწარი კოლექციის შექმნა.

2006-2009 წლებში შავი ზღვის სანაპირო ზოლში და თბილისის შემოგარენში არსებულ მტკნარ წყალსატევებში ჩატარებულმა მონიტორინგმა აჩვენა, რომ საქართველოს წყლიანი გარემო და კლიმატი ხელსაყრელ პირობებს ქმნის არაჰალოფილური, ქოლერას ჯგუფის ბაქტერიების და შესაბამისი ბაქტერიოფაგების

ცხოველმყოფელობისთვის. ბაქტერიებისა და შესაბამისი ბაქტერიოფაგების გამოყოფა სეზონურ ხასიათს ატარებდა და დამოკიდებული იყო გამოყოფის წყაროზე. *V. cholerae*-ს შტამების ინტენსიური გამოყოფა მოხდა ზაფხულის და ადრეული შემოდგომის თვეებში (ივლისი-სექტემბერი). სწორედ ამ პერიოდში გამოიყო *V. cholerae*-ს იზოლატების უმრავლესობა-56.1%. მნიშვნელოვნად მცირდებოდა *V. cholerae*-ს შტამების გამოყოფის სიხშირე ზამთარის და ადრეული გაზაფხულის პერიოდში (იანვარი-მარტი). მხოლოდ 2.5% იყო გამოყოფილი აღნიშნულ თვეებში. შავი ზღვის სხვადასხვა საიტიდან *V. cholerae*-ს შტამების სულ 16.7% გამოიყო. *V. cholerae*-ს შტამების უმრავლესობა-83.3% გამოიყო თბილისის შემოგარენში არსებული მტკნარი წყალსატევებიდან, სადაც შავ ზღვასთან შედარებით მარილიანობა დაბალია და შესაბამისად შავი ზღვა შესაძლოა წარმოადგენდეს არახელსაყრელ გარემოს არაჰალოფილური ვიბრიონების გამრავლებისთვის. არახელსაყრელ გარემო პირობებში *V. cholerae* ინარჩუნებს რა სასიცოცხლო თვისებებს გადადის არაკულტივირებად მდგომარეობაში. ეს მოვლენა ლიტერატურაში სიცოცხლისუნარიანი, მაგრამ არაკულტივირებადი მდგომარეობის (VBNC) სახელწოდებით არის ცნობილი. *V. cholerae*-ს ბაქტერიების არაკულტივირებად მდგომარეობაში გადასვლა დაკავშირებულია, როგორც მაღალ მარილიანობასთან ასევე წყლის დაბალ ტემპერატურასთან. ექსპერიმენტულად ჩატარებულმა კვლევებმა, სადაც VBNC-მდგომარეობაში *V. cholerae*-ს ბაქტერიების გადასვლა იყო ნაჩვენები ცხადყო, რომ არახელსაყრელი პირობები, როგორცაა: მაღალი მარილიანობა, დაბალი ტემპერატურა და საკვები ნივთიერებების ნაკლებობა, სასიცოცხლო პროცესების დაქვეითებასა და კულტივირების უნარის დაკარგვას იწვევს. ლამი და თანაავტორები (2007) სწავლობდნენ ცოცხალ და არაკულტივირებად *V. cholerae* O1-ის შტამებს წყლის გარემოს ბიოფილმებში და მათ როლს ქოლერას გადაცემაში. ამ ექსპერიმენტის შედეგად დაგინდა, რომ არსებული შტამები ინარჩუნებდნენ სიცოცხლისუნარიანობას 495 დღის განმავლობაში, მატბარიას (ბანგლადეში) წყალსატევაში.

მნიშვნელოვანია გარემოდან გამოყოფილი *V. cholerae*-ს ეპიდემიური სეროტიპების ზუსტი იდენტიფიკაცია რაც განხორციელდა პოლიმერაზული ჯაჭვური რეაქციის სხვადასხვა სახის საშუალებითაც (PCR): 1. პოლიმერაზული ჯაჭვური რეაქცია (ITS – PCR, *Internal Transcribed Spacer* PCR) სპეციფიკური პრაიმერებით. 2. მულტიპლექსური პოლიმერაზული ჯაჭვური რეაქცია (Multiplex-PCR) *V. cholerae* O1-ის, *V. cholerae* O139-ის, ტოქსიგენური გენების აღმოსაჩენად (ctxA). გამოვლინდა ctxA+ 8 შტამი, მათ შორის 6 შტამი იყო *V. cholerae* არა-O1-ის და 2 -*V. cholerae* O1-ის. კვლევებმა აჩვენა ბიოქიმიური იდენტიფიკაციის მაღალი სიზუსტე. იზოლატების 98.5%-თვის ბიოქიმიური იდენტიფიკაცია აღმოჩნდა ზუსტი.

გარემოში *V. cholerae*-ს ეპიდემიური სეროტიპების პირდაპირი დეტექცია მნიშვნელოვანია ამ პათოგენის მიერ გამოწვეული დაავადების კონტროლისა და თავიდან არიდებისთვის. პირდაპირი ფლუორესცენტული მეთოდის (DFA) გამოყენებით საქართველოს წყლის აქვატორიაში აღმოჩენილ იქნა *V. cholerae*-ს ეპიდემიური სეროტიპები. წყლის პირდაპირმა ფლუორესცენტულმა ანალიზმა გამოავლინა *V. cholerae* O1-ის არსებობა როგორც, ზღვის, ასევე ტბების წყლის ნიმუშებში (კუმისისა და ლისის ტბები, თბ.ზღვა). გამოკვლეული სინჯებიდან 31% დადებითი იყო. დადებითი ნიმუშებიდან 90% ნიმუში პოზიტიური იყო *V. cholerae* O1-ის შემთხვევაში, 10%–*V.*

cholerae O139-ის (სავარაუდოდ VBNC-სიცოცხლისუნარიან, მაგრამ არაკულტივირებად ფორმაში) შემთხვევაში.

V. cholerae-ს ანტიშრატი -“პოლი” წარმოადგენს სეროლოგიური ტესტის ერთ-ერთ მაგალითს, რომელიც დაფუძნებულია აგლუტინაციის რეაქციაზე და რომლის მეშვეობითაც მოხდა გარემოში *V. cholerae*-ს ტოქსიგენური იზოლატების პირდაპირი დეტექცია. აღსანიშნავია, რომ სლაიდ-აგლუტინაციის შედეგები დადებით კორელაციაში მოდიოდა პოლიმერაზული ჯაჭვური რეაქციით და პირდაპირი ფლუორესცენტული ანალიზით ჩატარებული კვლევის შედეგად მიღებულ შედეგებთან. *V. cholerae* O1-ის ეპიდემიური სეროტიპების გადამოწმების მიზნით გამოყენებული სეროლოგიური ტესტის-მგრძობიარე, მემბრანული ანტიგენის სწრაფი ტესტის (Cholera O1 SMART™) შედეგები ასევე დადებით კორელაციაში მოდიოდა სხვა, ჩატარებული სეროლოგიური ტესტების შედეგებთან.

V. cholerae O1-ის შტამების მიერ ტოქსინის პროდუქცია შემოწმდა GM1 განგლიოზიდ დამოკიდებული ენზიმდაკავშირებული იმუნოსორბენტული ანალიზით (GM1-ELIZA). შემოწმდა, როგორც სტანდარტული შტამების (კულტურათა სხვადასხვა კოლექცია, NCDC, CIP) მიერ ასევე გარემოდან გამოყოფილი ეპიდემიური შტამების მიერ ტოქსინის გამოყოფა. შედეგად რამოდენიმე (6), გარემოდან გამოყოფილმა შტამმა დადებითი შედეგი ანახა ტოქსინის პროდუქციაზე.

V. cholerae-ს 81 (135-დან) იზოლატი და *V. mimicus*-ის 7 (7-დან) იზოლატი მგრძობიარე აღმოჩნდა მათ მიმართ სპეციფიკური საკვლევი ბაქტერიოფაგების მიმართ. ფაგოტიპირების შედეგები გათვალისწინებული უნდა იქნას ამ პათოგენებით გამოწვეული ინფექციების სამკურნალო პრეპარატის შექმნის პროცესში.

2006-2009 წლებში საქართველოს წყლიან აქვატორიაში ჩატარებული მონიტორინგის შედეგად გამოყოფილი ბაქტერიოფაგების გამოყოფის სიხშირე მაღალი იყო აპრილი-ივნისის პერიოდში (49.3%). ოქტომბერი-დეკემბრის პერიოდში ფაგების ყველაზე მცირე (19.7%) რაოდენობა იყო გამოყოფილი. ფაგების გამოყოფამ ცხადყო, რომ მათი უმრავლესობა (51.2%) გამოიყო თბილისის შემოგარენში არსებული მტკნარი წყალსატევებიდან. ფაგების გამოყოფის სიუხვით ხასიათდებოდა კუმისის ტბა, საიდანაც ყველაზე დიდი რაოდენობით (24.4%) ფაგური იზოლატის გამოყოფა მოხდა. ფაგები ნაკლები სიუხვით გამოირჩეოდნენ შავ ზღვაში (22%). ფაგების უმცირესი რაოდენობა გამოიყო კულტურათა სუპერნატანტებიდან (13.4%). *V. mimicus*-ის მიმართ სპეციფიკური 7 ფაგური იზოლატიდან მხოლოდ 1-ის გამოყოფა მოხდა შავი ზღვის წყლის სინჯებიდან. შულ *V. cholerae* O1-ის მიმართ სპეციფიკური 17 პირველადი იზოლატი გამოიყო. გამოყოფის სიხშირე *V. cholerae* O1-ის მიმართ სპეციფიკური ფაგების შემთხვევაში მაღალი იყო (58.8%) ივლისი-სექტემბრის პერიოდში. უმეტესობა ფაგებისა (76.5%) გამოიყო თბილისის შემოგარენში არსებული წყალსატევებიდან აღებული წყლის სინჯებიდან. კვლევებმა ცხადყო, რომ *V. cholerae*-ს აქვს დაბალი ფაგური პოტენციალი. მაგ.: 2009 წლის ივლისში აღებული სინჯებიდან 24 გამიდიდრებული წყლის ნიმუშიდან მხოლოდ 5 პირველადი ფაგური იზოლატის გამოყოფა მოხერხდა. ფაგის გამოყოფის სიხშირემ აჩვენა სეზონური გამოხატულება. ფაგების გამოყოფა წინ უსწრებდა მასპინძელი ბაქტერიული შტამების გამოყოფის პიკს.

შედეგებმა გამოავლინა *V. cholerae* O1-ის და *V. mimicus*-ის მიმართ სპეციფიკური ფაგების ფართო ლიზისური სპექტრი, განსხვავებით *V. cholerae* არა-O1-ის მიმართ

სპეციფიკური ფაგებისა, რომლებიც ძირითადად შტამ-სპეციფიკურობით ხასიათდებოდნენ. ფაგების 36%-მაჩვენა ვიწრო სპექტრი, აქტიურები იყვნენ მხოლოდ მასპინძელი შტამის მიმართ. *V. cholerae* O1-ის მიმართ სპეციფიკური ყველა სხვა ფაგი (71%) გამოირჩეოდა ლიზისური აქტივობის საშუალო და ფართო სპექტრით. ფაგების გარკვეულმა ჯგუფებმა გამოავლინა მსგავსება ლიზისური სპექტრის მიხედვით. ლიზისური აქტივობის შედეგებიდან გამომდინარე აგებულ ფილოგენეზური ხის სურათში ნახვენებია, რომ *V. cholerae* არა-O1-ის და *V. cholerae* O1-ის მიმართ სპეციფიკური ფაგები დამოუკიდებელ დიდ კლასტერებში ერთიანდებიან. უნდა აღინიშნოს, რომ სხვადასხვა პატრონ-უჯრედის მქონე *V. cholerae* O1-ის მიმართ სპეციფიკური ფაგები ახლომდგომ, თუმცა განსხვავებულ მცირე კლასტერთა ჯგუფებში გაერთიანდა. *V. mimicus*-ის მიმართ სპეციფიკური ფაგების კლასტერთა ჯგუფები *V. cholerae* O1-ის მიმართ სპეციფიკური ფაგების კლასტერების მომიჯნავეა. გამომდინარე ზედაპირული ცილოვანი სტრუქტურების-ფაგოსპეციფიკური რეცეპტორების მრავალფეროვნებიდან, გამოკვლულმა ბაქტერიოფაგებმა მეტი მრავალფეროვნება ანახეს მოქმედების დიაპაზონის მიხედვით, განსხვავებით სხვა მასპინძლებებისგან. ლიზისური აქტივობის ფართო სპექტრი თერაპიული ფაგებისთვის სასურველი მასპინძელია, თუმცა მასპინძელი შტამის მიმართ მაღალი სპეციფიკურობის მქონე ფაგები წარმატებით გამოიყენება შტამების ფაგოტიპირებისთვის.

ფაგების ელექტრონული მიკროსკოპით შესწავლამ გვიჩვენა, რომ ჩვენს მიერ გამოყოფილი *V. cholerae*-ს და *V. mimicus*-ის მიმართ სპეციფიკური ბაქტერიოფაგები ხასიათდებიან მორფოლოგიური მრავალფეროვნებით. გამოვლინდა კუდიანი ფაგების სამივე მორფოტიპის არსებობა. *V. cholerae*-ს მიმართ სპეციფიკური ბაქტერიოფაგების შემთხვევაში ჭარბობდა მიოვირიდე (იზომეტრული თავი და გრძელი კუმშვადი კუდი) და სიფოვირიდეს (არაკუმშვადი, გრძელი კუდი) ოჯახის წარმომადგენლები, ასევე გამოვლინდა მცირე რაოდენობით პოდოვირიდეს (მოკლე არაკუმშვადი კუდი) მორფოტიპის ფაგები. *V. mimicus*-ის მიმართ სპეციფიკურ ბაქტერიოფაგებში ჭარბობდა სიფოვირიდეს მორფოტიპის ფაგები. განსხვავდებოდა ასევე საკვლევი ბაქტერიოფაგების ნუკლეოკაპსიდისა და მორჩის ზომები. სამკურნალო პრეპარატების შემადგენლობაში არსებული ბაქტერიოფაგების უმრავლესობა კუდიანი ფაგებია და, ძირითადად, მიოვირიდეს და სიფოვირიდეს ოჯახებს მიეკუთვნება. ამდენად, ჩვენსმიერ შესწავლილი ბაქტერიოფაგების უმეტესობა სავარაუდოდ ატარებს თერაპიულ პოტენციალს.

ბაქტერიოფაგსა და მასპინძელ ბაქტერიულ უჯრედს შორის ურთიერთქმედების მექანიზმების გაგება საშუალებას იძლევა უკეთ იქნეს შეცნობილი მოლეკულური მექანიზმები, რამაც შესაძლოა მიგვიყვანოს ბაქტერიული ინფექციების საწინააღმდეგო მკურნალობის მეთოდების გაუმჯობესებამდე. თერაპიული მიზნით ბაქტერიოფაგების გამოყენებისთვის მნიშვნელოვანია მათი სწრაფი და ეფექტური გამრავლების უნარი. ელისმა და დელბრუკმა [69] მოახდინეს პოსტულირება, რომ გამოსავლიანობის სიდიდე იზრდება ინფექციის დროსთან მიმართებაში. გამოსავალი, რომელიც შედეგია მოკლე ინკუბაციური პერიოდის იქნება მცირე დიდ ინკუბაციურ პერიოდთან შედარებით. თუმცა კვლევებმა, რომლებიც ჩატარებულია ერთსა და იმავე პერიოდის ხანგრძლივობით, ცხადყო, რომ ფაგის გამოსავალი შესაძლოა სხვადასხვა იყოს. ამავე ავტორებმა გამოთქვეს ჰიპოთეზა, რომ ფაგური ნაწილაკების გამოთავისუფლება არ ხდებოდა ერთდროულად, რაც მიზეზი იყო განსხვავებული გამოსავლიანობის

სიდიდისა. ჩიო და თანაავტორები [52] სწავლობდნენ რა უჯრედის სიდიდის გავლენას გამოსავალზე, გამოთქვეს მოსაზრება, რომლის მიხედვითაც არსებობს უჯრედის ზომის კრიტიკული მაჩვენებელი, რომლის იქითაც კორელაცია უჯრედის სიდიდესა და გამოსავალს შორის წყდება. გამოსავლიანობის სხვადასხვაობა დღემდე სრულყოფილად შესწავლილი არ არის. ჩვენს მიერ ჩატარებულმა ექსპერიმენტებმა აჩვენა, რომ ლატენტური პერიოდის ხანგრძლივობა დადებით კორელაციაში იყო ფაგური ნაწილაკების გამოსავალთან, განსაკუთრებით კი რამოდენიმე ფაგის შემთხვევაში სადაც ერთ ბაქტერიულ უჯრედზე 200-მდე ფაგური ნაწილაკი აღინიშნა (Vch105 და V.mim8.07K). აქვე უნდა აღინიშნოს, რომ *V. cholerae* O1-ის მიმართ სპეციფიკური 3 ფაგის შემთხვევაში აღინიშნებოდა ლატენტური პერიოდის მოკლე მონაკვეთი, რომლის შემდეგაც ფაგური გამოსავალი ერთ ბაქტერიულ უჯრედზე უტოლდებოდა ხანგრძლივი ლატენტური პერიოდის მქონე ფაგების გამოსავალს.

ბაქტერიოფაგების დახასიათებისა და დიფერენცირებისთვის მეტად მნიშვნელოვან კრიტერიუმს წარმოადგენს მათ შორის ანტაგონისტური ნათესაობის დადგენა, რასაც საფუძვლად უდევს ჯვარედინი ნეიტრალიზაციის რეაქციები. მიღებულმა შედეგებმა საშუალება მოგვცა გვემსჯელა ამ ფაგების სეროლოგიურ ნათესაობაზე, კერძოდ, მოხდა ბაქტერიოფაგების დაჯგუფება 5 სხვადასხვა ჯგუფში. *V. cholerae* O1-ის მიმართ სპეციფიკური ფაგების ერთ ჯგუფში გაერთიანება მიუთითებს მათ სეროლოგიურ ნათესაობაზე, რაც შეესაბამება ლიზისური სპექტრის მონაცემებსაც .ისევე, როგორც ლიზისური სპექტრის მიხედვით, სეროლოგიური ანალიზიდან გამომდინარე ერთმანეთისგან განსხვავებული ფაგები აღმოჩნდა *V. cholerae* არა-O1-ის მიმართ სპეციფიკური ფაგები. სეროლოგიური თვალსაზრისით განსხვავებული ფაგები აღმოჩნდა ასევე *V. mimicus*-ის მიმართ აქტიური ფაგები, იჩენდენ, რა, სეროლოგიურ ნათესაობას ერთმანეთთან, თუმცა განსხვავდებოდნენ *V. cholerae*-ს მიმართ სპეციფიკური ფაგებისაგან.სეროლოგიურმა ანალიზმა ანახა, რომ *V. cholerae* O1-ის მიმართ სპეციფიკური ფაგები არ იჩენდენ ნათესაობას *V. cholerae* არა-O1-ის მიმართ სპეციფიკურ ფაგებთან.

GM1-განგლიოზიდ დამოკიდებული ენზიმდაკავშირებული იმუნოსორბენტული ანალიზით (GM1-ELIZA) ნანახი იყო *V. cholerae* O1-ის მიმართ სპეციფიკური ბაქტერიოფაგების ანტიბაქტერიული ზეგავლენა შტამების მიერ ქოლერა ტოქსინის პროდუქციაზე ფაგისა და შტამის სხვადასხვა თანაფარდაბით ურთიერთქმედებისას დროის სხვადასხვა ინტერვალის შემთხვევაში. ცდებმა გამოავლინა ქოლერის ტოქსინის პროდუქციის შემცირება დროის ინტერვალის გაზრდასთან ერთად.

ბაქტერიოფაგების სტრუქტურული კომპონენტების შენებისა და ფუნქციონირების შეფასებისათვის შეისწავლება მათზე ფიზიკო-ქიმიური ფაქტორების მაინაქტივირებელი მოქმედება. შესწავლილ იქნა საკვლევი ბაქტერიოფაგების მდგრადობა სხვადასხვა მიკრობიოლოგიურ არეებსა და ხსნარებში, ასევე ბუნებრივ წყლებში (ტბისა და ზღვის წყლები), ასევე დამოკიდებულება ისეთი ფაქტორების მიმართ, როგორცაა ულტრაიისფერი გამოსხივება, ტემპერატურა, წყალბად იონთა მაღალი ან დაბალი მაჩვენებლები, მაღალი იონური ძალა და ა.შ.

ბაქტერიოფაგების პრაქტიკული გამოყენებისთვის დიდი მნიშვნელობა აქვს მათ სტაბილობას საკვლევ გარემოში, შემდგომში ფაგების სამკურნალო-პროფილაქტიკური მიზნით და ეკოლოგიური კვლევებისთვის, სხვადასხვა წყალსატევებში ტრასირების ექსპერიმენტების ჩასატარებლად. ბაქტერიოფაგების სტაბილობა ასევე შეისწავლება შენახვისა და ტრანსპორტირების პირობებში მათი აქტივობის გათვალისწინების მიზნით.

მიღებულმა შედეგებმა გამოავლინა *V. cholerae* O1-ის მიმართ სპეციფიკური ბაქტერიოფაგების მაღალი სტაბილობა სხვადასხვა არეში, 1-დან 6 თვემდე ჩატარებულ კვლევაში. უმნიშვნელო ცვლილებებს ქონდა ადგილი საცდელი არეების უმრავლესობის შემთხვევაში. მიღებული შედეგებიდან დადგინდა, რომ *V. cholerae* O1-ის მიმართ სპეციფიკურ ბაქტერიოფაგებს აქვთ უნარი, მეტად, შეინარჩუნონ მდგრადობა *V. cholerae* არა-O1-ის მიმართ სპეციფიკურ ბაქტერიოფაგებთან შედარებით. *V. cholerae*-ს მიმართ სპეციფიკური ბაქტერიოფაგების მდგრადობა ისეთი ორგანული გამხსნელის მიმართ, როგორცაა ქლოროფორმი, შესაძლოა მიუთითებდეს ვირიონებში ლიპიდური კომპონენტის არსებობაზე.

თერმოინაქტივაციის შესწავლამ გამოავლინა გამოკვლეული ბაქტერიოფაგების ერთმანეთისგან განსხვავებული თერმომგრძობელობა, რაც მიუთითებს მათი ცილოვანი სტრუქტურების განსხვავებაზე. *V. cholerae* O1-ის მიმართ სპეციფიკური ფაგების თერმომგრძობელობა განსხვავდებოდა, როგორც *V. cholerae* არა-O1-ის მიმართ სპეციფიკური ფაგების, ასევე ერთმანეთის თერმომგრძობელობისგან. *V. cholerae* არა-O1-ის მიმართ სპეციფიკური სამივე ფაგი ერთმანეთისგან განსხვავებული აღმოჩნდა ამ პარამეტრის მხრივ, მათი ცილოვანი სტრუქტურა სხვა ფაგების ცილოვან სტრუქტურაზე მეტად თერმოსტაბილური აღმოჩნდა. 55°C-ზე 10 წთ-ის ექსპოზიციის პირობებში ჩატარებული ცდების შედეგად *V. cholerae*-ს მიმართ სპეციფიკური 9 ფაგიდან 8 ფაგის (ფაგი -Vch105-ის გარდა) ინაქტივირებული ფაგური ნაწილაკების რიცხვი შეადგენდა 70%-ს. 60°C-დან 70°C-მდე ჩატარებულმა ცდებმა აჩვენა, რომ ხუთი ფაგი სრულად ინაქტივირდა 30 წთ-ზე ნაკლებ დროში. *V. mimicus*-ის მიმართ სპეციფიკური ფაგები *V. cholerae*-ს მიმართ სპეციფიკური ფაგებისგან განსხვავებით მეტად თერმოსტაბილურები აღმოჩნდნენ, ინარჩუნებდნენ რა სიცოცხლისუნარიანობას 70°C ტემპერატურის პირობებშიც.

წყალბად-იონთა კონცენტრაციის ზემოქმედების შესწავლამ გამოავლინა, რომ ბაქტერიოფაგების უმრავლესობა საკმაოდ სტაბილურია pH-ის შუალედურ (pH-4-9) დიაპაზონში. ჩვენს მიერ გამოკვლეული ფაგებისთვის კრიტიკული აღმოჩნდა pH-ის ექსტრემალურად დაბალი (pH-1) მაჩვენებელი, რომლის დროსაც გადარჩენილი ფაგური ნაწილაკების რიცხვი მხოლოდ 1%-ს უტოლდებოდა. pH-4-9-ს შორის ინტერვალში შეინიშნებოდა ტიტრის მცირე დაცემა. უნდა აღინიშნოს, რომ *V. mimicus*-ის მიმართ სპეციფიკური ფაგები *V. cholerae* არა O1-ის მიმართ სპეციფიკური ფაგების მსგავსად ინარჩუნებდნენ სრულ აქტივობას pH-4-9 მაჩვენებელზე. მხოლოდ ორი *V. cholerae* არა-O1-ის მიმართ სპეციფიკური ფაგი (Vch105 და Vch10CH) ინარჩუნებდა აქტივობას pH 12-ზე. *V. mimicus*-ის ისევე, როგორც *V. cholerae* O1-ის მიმართ სპეციფიკური ფაგები ნაკლებად რეზისტენტული აღმოჩნდნენ მაღალი ტუტეანობის პირობებში. კვლევა აჩვენა, რომ *V. cholerae* O1-ის მიმართ სპეციფიკური ფაგები იხედნენ ნაკლებ რეზისტენტობას pH-ის სხვადასხვა კონცენტრაციის მიმართ *V. cholerae* არა-O1-ის და *V. mimicus*-ის მიმართ სპეციფიკურ ფაგებთან შედარებით. pH-ის ექსტრემალურად მაღალი ან დაბალი მნიშვნელობისას გადარჩენილი ფაგური ნაწილაკები შესაძლოა მუტანტურ ფორმებს წარმოადგენენ. საკვები არის ამგვარი pH-ის მაჩვენებლები იწვევს ვირიონის დეგრადაციას და ინფექციურობის დაკარგვას.

ბუნებრივ პირობებში ფაგების პოპულაციის შენარჩუნებისათვის დიდი მნიშვნელობა აქვს ბაქტერიოფაგების ულტრაიისფერი სხივებისადმი გამძლეობას. UV გამოსხივებას დამაზიანებელი ეფექტი აქვს ფაგებზე, ამცირებს რა მათ ლიტიურ აქტივობას. ცდებმა

გამოავლინა, რომ ფაგების ლიტიური აქტივობა მცირდებოდა UV გამოსხივების ზემოქმედების დროის გაზრდასთან ერთად. *V. cholerae* არა-O1-ის მიმართ სპეციფიკური ფაგები ნაკლებ მედეგობას იჩენდნენ UV გამოსხივების მიმართ, *V. cholerae* O1-ის მიმართ სპეციფიკურ ფაგებთან შედარებით. *V. mimicus*-ის მიმართ სპეციფიკური ფაგები *V. cholerae* არა-O1-ის მიმართ სპეციფიკური ფაგების მსგავსად ნაკლებად რეზისტენტული აღმოჩნდნენ UV გამოსხივების დამაზიანებელი ეფექტის მიმართ.

ბაქტერიოფაგების ურთიერთქმედების შესწავლამ ადსორბციის კოფაქტორებთან, მაგალითად, 2%-იანი ნატრიუმის ციტრატთან, გამოავლინა, რომ ნატრიუმის ციტრატის ზემოქმედება მაღალი იყო მხოლოდ ერთეული ფაგების შემთხვევაში (VchBS3, Vch20K-4805, Vmim8.07K და V.mim29.08K). უმნიშვნელო ხარისხის ინაქტივაცია არაპირდაპირად მიუთითებს იმაზე, რომ ბაქტერიოფაგები არ არიან დამოკიდებული ორვალენტიან იონებზე (Ca^{++}), როგორც ადსორბციის კოფაქტორებზე.

კვლევამ გამოავლინა, *V. cholerae* არა-O1-ის მიმართ სპეციფიკური ფაგების მედეგობა ოსმოსური შოკის ზემოქმედების მიმართ რაც მიუთითებს, იმაზე, რომ მათი ცილოვანი გარსი ადვილად ატარებს წყლის მოლეკულებს და იონებს. *V. cholerae* O1-ის ისევე, როგორც *V. mimicus*-ის მიმართ სპეციფიკური (Vmim8.07K, V.mim29.08K) ბაქტერიოფაგები ნაკლებად მდგრადი აღმოჩნდა ოსმოსური შოკის მიმართ. ოსმოსური შოკისადმი მგრძობელობა შესაძლოა დამოკიდებული იყოს ფაგების ცილოვანი კაფსიდის სიმკვრივეზე, ანუ კაფსომერების შეფუთვის კომპაქტურობაზე. ანდერსონის მიერ, T-ფაგები სწორედ ამ ნიშნის მიხედვით იქნა დაჯგუფებული მგრძობიარე (T-წყვილი ფაგები) და რეზისტენტულ (T3, T5, T7) ჯგუფებად. აღსანიშნავია, რომ ჩვენმა კვლევამ გამოავლინა პოდოვირიდეს ოჯახის წარმომადგენელი ფაგების ნაკლები რეზისტენტობა ოსმოსური შოკის მიმართ, მიოვირიდეს და სიფოვირიდეს ოჯახის წარმომადგენელ ფაგებთან შედარებით.

ფაგების გენეტიკური მრავალფეროვნება შესწავლილი იყო მათი რესტრიქციული პროფილის საშუალებით. გენეტიკური მახასიათებლის მიხედვით ფაგების დაჯგუფებისთვის აგებულმა ფილოგენეზურმა ხემა *V. cholerae* არა-O1-ის მიმართ სპეციფიკური ფაგები, როგორც ერთმანეთისგან, ასევე *V. cholerae* O1-ის მიმართ სპეციფიკური ფაგებისგან განსხვავებულ კლასტერებში მოაქცია. რამოდენიმე მონათესავე კლასტერში გადანაწილდა *V. cholerae* O1-ის მიმართ სპეციფიკური ფაგები. *V. mimicus*-ის მიმართ სპეციფიკური ფაგები განსხვავებული აღმოჩნდა *V. cholerae*-ს მიმართ სპეციფიკური ფაგებისგან რესტრიქციული პროფილის მიხედვით. მიღებული შედეგები მსგავსი იყო ლიზისური სპექტრის და სეროლოგიის მიხედვით ჩატარებული ექსპერიმენტებით მიღებულ შედეგებთან.

კლიმატის ტემპერატურული მაჩვენებლის მომატებასთან დაკავშირებით შესაძლოა გაფართოვდეს ქოლერას აფეთქებების გეოგრაფიული არეალი, იმ რეგიონების ჩათვლით, რომლებიც არ წარმოადგენენ ენდემურ გარემოს ქოლერასთვის. ბაქტერიოფაგები ბაქტერიების არსებობის ეფექტურ ინდიკატორებად გვევლინებიან. წარმომადგენელ პოტენციურ მასალას პათოგენური ვიბრიონების დეტექციისა და ბიოკონტროლისათვის. შესაძლებელია მათი გამოყენება როგორც პროფილაქტიკური და სამკურნალო, ასევე მსგავსი სეროტიპის ბაქტერიული იზოლატების დიფერენცირების მიზნით.

V დასკვნები

1. *V. cholerae*-ს და *V. mimicus*-ის მიმართ სპეციფიკური ბაქტერიოფაგები ფართოდ არის გავრცელებული როგორც საქართველოს შიდა, მტკნარ და მცირემარილიან წყალსატევებში, ასევე შავი ზღვის სანაპირო ზოლში.
2. ბაქტერიოფაგების გავრცელება და სეზონურობა ძირითადად კორელირებს პატრონი ბაქტერიების სივრცულ-დროით განაწილებასთან.
3. *V. cholerae*-ს და *V. mimicus*-ის ფაგების წყლიან გარემოში გავრცელებისათვის მნიშვნელოვან გარემო ფაქტორს წარმოადგენს ტემპერატურა, ხოლო მარილიანობის ცვლილება არსებულ გავლენას არ ახდენს.
4. გამოვლინდა სპეციფიკური ბაქტერიოფაგების გავლენა *V. cholerae*-ს ტოქსიგენური შტამების მიერ ქოლერის ტოქსინის პროდუქციაზე, რაც გამოიხატა ტოქსინის რაოდენობრივი მაჩვენებლის შემცირებით.
5. შეირჩა *V. cholerae*-ს და *V. mimicus*-ის მიმართ სპეციფიკური, მაღალი თერაპიული პოტენციალის მქონე ბაქტერიოფაგები მათი ბიოლოგიური თვისებების საფუძველზე.
6. *V. cholerae*-ს და *V. mimicus*-ის ფაგების შერჩეული ნაკრებები შეიძლება მაღალი ეფექტურობით იქნას გამოყენებული *V. cholerae*-ს ეპიდემიური და არაეპიდემიური შტამების დიფერენცირებისათვის.

VI გამოყენებული ლიტერატურა

1. ნათიძე მ., ჭანიშვილი თ., გომართელი გ. ბაქტერიოფაგები, თბილისი, 1989, 77.
2. ჭანიშვილი თ. “ბაქტერიული ვირუსები-ბაქტერიოფაგები.” სოროსის საგანმანათლებლო ჟურნალი, 2002. 79-94.
3. Адамс М. Бактериофаги. Москва, изд-во «Иностранная Литература», 1961г.
4. Габрилович И.М. Основы бактериофагии. Минск, «Вимеймая школа», 1973.
5. Ершов Ф.И. Биологическая характеристика и классификация дизинтерийных бактериофагов Ньюкестл. *ЖМЭИ*, 1959, №7, с. 34-40.
6. Жилин С.И. Бактериофаги *Pseudomonasaeruginosa*, Сообщение I выделение, морфология негативных колоний, диапазон литического действия и антигенные свойства бактериофагов. *ЖМЭИ*, 1973, №3, стр. 40-43.
7. Чанишвили Т.Г. Дизинтерийно-диагностические бактериофаги Докт. Дис. 1969.
8. Abd. H., Weintraub. A., and Sandstrom, G. (2005). Intracellular survival and replication of *Vibrio cholerae* 0139 in aquatic free-living amoebae. *Environmental Microbiology* 7: 1003-1008.
9. Abedon ST, Kuhl SJ, Blasdel BG, Kutter EM. 2011. Phage treatment of human infections *Bacteriophage*. 1:66-85.
10. Ackermann H.W., Dubov M.S., Jarvis A.W. et al. The species concept and its application to tailed phages//Arch. Virol.1992.v.124.p.69-82
11. Ackermann H.W. Bacteriophage taxonomy. *J. Microbiol. Sci.* 1987, v.4, №7, p. 214-218.
12. Alam, M., Sultana, M., Nair, G.B.K., Sack R.B., Sack D.A., Siddique, A.K., Ali, A., Huq, A., and Colwell, R.R. (2006). Toxigenic *Vibrio cholerae* in the aquatic environment of Mathbaria, Bangladesh. *Applied and Environmental Microbiology*, 72:2849-2855.
13. Alam, M., Sultana, M., Nair, G.B., Siddique. A.K., Hasan, N.A., Sack, R.B., Sack, D.A., Ahmed, K.U., Sadique, A., Watanabe, H., Grim, C.J., Huq, A., and Colwell, R.R. (2007). Viable but Nonculturable *Vibrio cholerae* O1 in biofilms in the aquatic environment and their role in cholera transmission. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* , 104: 1 7801 -1 7806.
14. Albert. MJ., Siddique. A.K., Islam, M.S., Faruque, A.S., Ansaruzzaman, M., Faruque S.M., and Sack. R.B. (1993). Large outbreak of clinical cholera due to *Vibrio cholerae* non-O1 in Bangladesh. *Lancet*. 341-704.

15. Albert, M.J., Neira, M., and Motarjemi, Y. (1997). The role of food in epidemiology of cholera. *World Health. Statistics Quarterly*, 50:111-118.
16. Aldova, E., and Lazniokova, K. (1968). Isolation of NAG Vibrios from an enteritis outbreak in Czechoslovakia. *Journal of Infectious Diseases*, 118:25-31 .
17. Alemida, R.J., Cameron, D.N., Cook, W.L. and Wachsmuth, I.K. Vibriophage VcA-3 as an epidemic strain marker for the U.S. gulf coast *Vibrio cholerae*. *J Clin Microbiol* 30: 300,1992.
18. Anderson T.F., Rapport C., Muscarite N.A. On the structure and osmotic properties of phage particles. *Ann.Inst.Pasteur.*, 1953, v.84,pp.5-14
19. Baker, R.M., Singleton. F.L., and Hood, M.A. (1983). Effects of nutrient deprivation on *Vibrio cholerae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 46:930-940.
20. Barbieri, E., Falzano, L., Fiorentini, C ., Pianetti, A., Baffone, W., Fabbri, A., Matarrese P., Casiere, A., Katouli, M., Kuhn, I., Mollby, R., Bruscolini, F., Donelli, G.(1999). Occurrence, diversity, and pathogenicity of halophilic *Vibrio* spp. And non-O1 *Vibrio cholerae* from estuarine waters along the Italian Adriatic coast. *Applied and Environmental Microbiology*, 65:2748-2753.
21. Barrow, P.A. and Soothill, J.S. Bacteriophage therapy and prophylaxis: Rediscovery and renewed assessment of the potential. *Trends microbial* 5: 268, 1997.
22. Barua. D., and Paguio. A.S. (1977). ABO blood groups and cholera. *Annals of Human Biology*, 4:489—492.
23. Bashford D.J., Donovan T.J., Furniss A.L., and Lee J.V. (1979). *Vibrio cholerae* in Kent. *Lancet*, 313.436-437.
24. Basu S, Mukerjee S: Bacteriophage typing of *Vibrio* ElTor. *Experimenta* 1968, 24:299-300.
25. Baumann, P., Furniss, A.L., and Lee, J.U. (1984). Genus I. *Vibrio*. In: *Bergey's Manual Systematic Bacteriology*, 1st edn, (Kreig and Holt, editors) The Williams and Wilkins Co, Baltimore, USA, pp 518-538.
26. Bavalova , E.G., Katsitadze, K.T., Sulakvelidze, L.A., Imnaishvili, N.S., Sharshidze, T.G., Badashvili, V.A., Kiknadze, G.P., Meipariani, A.N., Gendzekhadze, N.D., Machavariani, E.V., Gogoberidze, K.I., Gozalov, E.I. and Dekanosidze, N.G. Preventive value of dried dysentery bacteriophage. *Zh Microbiol Epidemiol Immunobiol* 2: 143, 1968.
27. Berche, P., Poyart, C., Abachin, E., Lelievre, H., Vandepitte, J., Dodin, A., and Fournier, J.M. (1994). The novel epidemic strain O139 is closely related to pandemic strain O1 of *Vibrio cholerae*. *Journal of Infectious Diseases*, 170:701-704.

28. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (2005). Brenner, D.J., Krieg, N .R. and Staley, J.T. Eds. 2 edn. Volume 2, Part B, Springer, New York, USA.
29. Bhattacharya, S.K., Bhattacharya. M.K., Nair, G.B., Dutta, D., Deb, A., Ramamurthy, T.,Garg, Saha, P.K., Dutta, P., Moitra, A., Mandel, B.K., Shimada, T., Takeda,Y., and Deb, BC. (1993). Clinical profile of acute diarrhoea cases infected with the new epidemic strain of O139: designation of disease as cholera. *Journal of Infectious Diseases*, 27:11-15.
30. Bhanumathi, R., Sabeena, E, Isac, S.R., Shukla, B.N., and Singh, D.V. (2003). Molecular characterization of *Vibrio cholerae* 0139 Bengal isolated from water and the aquatic plant *Eichornia crassipes* in the River Ganga, Varanasi, India. *Applied and Environmental Microbiology*, 69:2389-2394.
31. BlakeP.A., Allegra D.T., and Snyder J.D. (1980). Cholera - a possible endemic focus in the United States. *New England Journal of Medicine* 302:305-309.
32. Blake and Weaver R.W. (1980). Diseases of humans (other than cholera) caused by vibrios. *Annual Review of Microbiology*, 34:341-367.
33. Blake PA. (1993). Epidemiology of cholera in the Americas. *Gastroenterology Clinics of North Aniorica*, 22:639-660.
34. Bogovazova GG, Voroshilova NN, Bondarenko VM. The efficacy of Klebsiella pneumoniae bacteriophage in the therapy of experimental Klebsiella infection. *Zh Microbiol Epidemiol Immunobiol* 1991 Apr;(4):5-8.
35. Bonner J.R., Coker A.S., Berryman. C.R., and Pollock H.M. (1983). Spectrum of *Vibrio* infections in a Gulf Coast community. *Annals of Internal Medicine*, 99:464-469.
36. Botstein D.A. Theory of modular evolution for bacteriophages. *Ann. №4. Acad. Sci.* 1980. v. 354. p. 484-490.
37. Bredley D. E. Ultrastructure of bacteriophages and bacteriocins. *J. Bacteriol. Rev.*1967, v.31.pp.230-314.
38. Bruynoghe, R. and Maisin, J. Essais de therapeutique au moyen du bacteriophage. *Compt Rend Soc Biol* 85:1120, 1921.
39. Burgasov PN, Sumarokov AA, Lelikov VL, Marcuk LM, Fedenev VG, Dzaparidze MN, Karaeva LT, Derteva II. Comparative study of reactions and serological response to cholera vaccines in a controlled field trial conducted in the USSR. *Bull World Health Organ.* 1976;54(2):163-70.
40. Calendar, R. 2006, *The Bacteriophages*. OXFORD, University Press.

41. Canchaya C, Fournous G, Chibani-Chennoufi S, Dillmann ML, Brussow H. 2003. Phage as agents of lateral gene transfer *Curr. Opin. Microbiol.* 6:417-24
42. Casas V., 2011. Role of bacteriophage-encoded exotoxins in the evolution of bacterial pathogens.
43. Castro-Rosas J., and Escartin E.F. (2002) Adhesion and colonization of *Vibrio cholerae* O1 on shrimp and crab carapaces. *Journal of Food Protection*, 65:492-498.
44. Ceccarelli D, Colwell RR *Vibrio* ecology, pathogenesis, and evolution. *Front Microbiol.* 2014 May 28;5:256. doi: 10.3389/fmicb.2014.00256. eCollection 2014.
45. Centers for Disease Control and Prevention. Cholera in Haiti: One Year Later http://www.cdc.gov/haiticholera/haiti_cholera.htm
46. Chakrabarti, A.K., Chosh, A.N., Nair, G.B., Niyogi, S.K., Bhattacharya, S.K. and Sarker, B.L. Development and evaluation of a phage typing scheme for *Vibrio cholerae* O139. *J Clin Microbiol* 38: 44, 2000
47. Chakraborty, S., Nair, G.B., and Shimada, S. (1997). Pathogenic vibrios in the natural aquatic environment. *Reviews on Environmental Health*, 12:63-80
48. Chambers J.S. (1938). *The conquest of cholera*, pp: 24-44. Macmillan, New York, N.Y
Chakraborty, S., Mukhopadhyay, AK., Bhadra, R.K., Ghosh, A.N., Mitra, R., Shimada, T., Yamasaki, S., Faruque, S.M., Takeda, Y., Colwell, R.R., and Nair. G.B. (2000). Virulence genes in environmental strains of *Vrbrio cholerae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 66:4022—4028.
49. Chanishvili N., Chanishvili T., Tediashvili M., Barrow P.A. Phages and their application against drug- resistant bacteria .Review. *J.Che. Technol. Biotechnol*, 2001, 76, p. 689-699.
50. Chanishvili N. 2012. Phage therapy--history from Twort and d'Herelle through Soviet experience to current approaches *Adv. Virus Res.* 83:3-40.
51. Chattopadhyay DJ, Sarkar BL, Ansari MQ, Chakrabarti BK, Roy MK, Ghosh AN, Pal SC: New phage typing scheme for *Vibrio cholerae*O1 biotype El Tor strains. *J Clin Microbiol* 1993, 31:1579-1585
52. Choi C, Kuatsjah E, Wu E, Yuan S.2010. The effect of cell size on the burst size of T4 bacteriophage infections of *Escherichia coli* B23. *J. Exp. Microbiol. Immunol.* 14:85-91. David A.SACK, S.HUDA, P.K.B. NEOGI, RICHARD R. DANIEL, and WILLIAM M. SPIRA. "Microtiter Ganglioside Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for *Vibrio* and *Escherichia coli*

- Heat-Labile Enterotoxins and Antitoxin". *Journal of Clinical Microbiology*, Jan. 1980, p.35-40. Vol.11, No.1
53. Cholera Working Group - International Centre for Diarrhoeal Diseases Research, Bangladesh. (1993). Large epidemic of cholera-like disease in Bangladesh caused. by *Vibrio cholerae* O139 synonym Bengal. *Lancet*. 342:387—390
 54. Colwell. R.R., Kaper,J.,and Joseph. S.W. (1977). *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*.and other vibrios: occurrence and distribution in Chesapeake Bay. *Science*, 198:394-396.
 55. Colwell,R.R., Seidler,R.J., Kaper,J., Joseph,S.W.,Garges, S., Lockman, H., Maneval,D., Bradford, H., Roberts,N., Remmers, E., Huq, I., and Huq, A. (1981) Occurrence of *Vibrio cholerae* serotype O1 in Maryland and Louisiana estuaries. *Applied and Environmental Microbiology*, 41:555-558.
 56. Colwell. R.R., West. P.A., Maneval, D., Remmers, E.F., Elliot, E.L., and Carlson, NE. (1984). Ecology of pathogenic vibrios in Chesapeake Bay. pp: 367-387. In R.R. Colwell (ed.), *Vibrios in the environment*. John Wiley & Sons, Inc., New York
 57. Colwell,R.R., and Spira, W.M. (1992). The ecology of *Vibrio cholerae*, p.107-127. IN. D.Barua and W.B.I. Greenough (ed.), *Cholera*. Plenum, New York.
 58. Colwell. R.R., and Huq, A. (1994). Environmental reservoir of *Vibrio cholerae*, the causative agent of cholera. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 740:44-54
 59. Colwell. R.R..and Huq. A. (1994a). Vibrios in the environment: viable but nonculturable *Vibrio cholerae*, p. 117-133. In I.K. Wachsmuth, P.A. Blake, and.Olsvik (ed.). *Vibrio cholerae* and *cholerae* molecular to global perspectives ASM Press. Washington. D.C.
 60. Colwell. R.R. (1996). Global climate and infectious disease: the cholera paradigm. 253 *Science*, 274:2025—2031.
 61. Cottingham, K.L., Chiavelli, D.A., and Taylor, R.K. (2003). Environmental microbe and human pathogen: the ecology and microbiology of *Vibrio cholerae*. *Frontiers in Ecology and the Environrnent*, 1:8 0-86.
 62. David A.SACK,S. HUDA, P.K.B. NEOGI, RICHARD R. DANIEL, and WILLIAM M. SPIRA.Microtiter Ganglioside Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for *Vibrio* and *Escherichia coli* Heat-Labile Enterotoxins and Antitoxin. *Journal of Clinical Microbiology*, Jan.1980,p.35-40. Vol.11.No.1

63. Daniel,s, N.A., and Shafaie, A. (2000). A review of pathogenic *Vibrio* infections for clinicians. *Infection and Immunity*, 17:665-685.
64. Dakin, W.P.H., Howell, D.I., Sutton. R.G.A.. O'Keefe, M.F., and Thomas, P. (1974). Gastroenteritis due to nonagglutinable (noncholera) vibrios. *The Medical Journal of Australia*, 2:487-490
65. DePaola. A. (1981). *Vibrio cholerae* in marine foods and environmental waters: a literature review. *Journal of Food Science*, 46:66-70
66. Deresinski S. 2009. Bacteriophage therapy: exploiting smaller fleas *Clin. Infect. Dis.* 48:1096-1101.
67. D'Herelle, F., and Smith, G.H. *The Bacteriophage and its Clinical Applications*. Charles C. Thomas, Springfield , Illinois, p.165, 1930.
68. E.Jaiani, T.Kokashvili, N.Mitaishvili, T.Elbakidze, N.Janelidze, N. Lashkhi, R.Kalandadze, E.Mikashavidze, G.Natroshevili, C.A.Whitehouse, A.Huq, M.Tediashvili. "Microbial water quality of recreational lakes near Tbilisi, Georgia " *Journal of Water and Health*. 2013 Jun. Vol 11 No2, pp 333-345.
69. Ellis EL, Delbrück M. 1939. The growth of bacteriophage. *J. Gen. Physiol.* **22**: 365-384.
70. Epstein, P.R. (1993). Algal blooms in the spread and persistence of cholera. *BioSystems*. 31:209-221
71. Farmer.J.J Hickman-Brenner., F.W and Kelly, M.T. (1985). *Vibrio*, p.282-301. In E.H Lennette, A. Balows, W. J. Hausler, Jr., and H. J. Shadomy (ed.), *Manual of Clinical Microbiology*, 4th ed. American Society for Microbiology Press, Washington, D.C.
72. Farmer, I., James, J., Janda, J.M. and Birkhead, K. (2003). *Vibrio*, p. 706-718. In P. R. Murray (ed), *Manual of Clinical Microbiology*. 8th ed, vol. 1., American Society for Microbiology Press, Washington D.C.
73. Farmer I., James J., Janda J.M, Brenner FW, Cameron DN, Birkhead KM. Genus I. *Vibrio* Pacini 1854, 411AL. In: Brenner DJ, Krieg NR, Staley JT, editors. *Bergey's manual of systematic Bacteriology*. The Proteobacteria. Part B. The Gammaproteobacteria. 2nd ed. New York: Springer; 2005. v. 2, p. 494-546.
74. Faruque, A.S.. Mahalanabis, D., Hoque, S.S., and Albert, M.J. (1994). The relationship between ABO blood groups and susceptibility to diarrhea due to *Vibrio cholerae* -O139. *Clinical Infectious Diseases*, 18:827-8 28.

75. Faruque, S.M., Albeit, M.J., and Mekalanos, J .I . (1998). Epidemiology, genetics, and ecology of toxigenic *Vibrio cholerae*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews.*, 62:1301-1314
76. Faruque S.M., Siddique A.K, Saha, M.N., Asadulghani, M., Rahman, M., Zaman, K., Albert M J Sack, D.A., and Sack, R.B. (1999). Molecular Characterization of a New Ribotype of *Vibrio cholerae* 0139 Bengal Associated with an Outbreak of Cholera in Bangladesh. *Journal of Clinical Microbiology*, 37:1313-1318.
77. Faruque S.M., Asadulghani A.R., Rahman M.M., Waldor M.K., and Sack D.A. (2000). Sunlight-induced propagation of the lysogenic phage encoding cholera toxin. *Infection and Immunity*, 68:4795—4801 .
78. Faruque S.M., Saha A.M.N., Sack D.A., Sack R.B., Takeda Y., and Nair G. B. (2000a). The 0139 serogroup of *Vibrio cholerae* comprises diverse clones of epidemic and non-epidemic strains derived from multiple *V. cholerae* O1 or nonO1 progenitors. *Journal of Infectious Diseases*, 182:1161-1168.
79. Faruque S. M ., and Nair G. B. (2002). Molecular ecology of toxigenic *Vibrio cholerae* *Microbiology and Immunology*, 46:59-66.
80. Faruque SM, Mekalanos JJ. 2012. Phage-bacterial interactions in the evolution of toxigenic *Vibrio cholerae* *Virulence*. 3.
81. Filetici E., Bonadonna L., Ciccozzi M., Anastasio M.P., Fantasia M., and Shimada T. (1997). Phenotypic and Genotypic Biotyping of Environmental Strains of *Vibrio cholerae* Non-O1 Isolated. in Italy. *Applied Environmental Microbiology*, 4102-4106
82. Fleisher J. M., Jones F., Kay D., Stawell-Smith R., Weyer M. & Morano R. 1993 Water and non-water-related risk factors for gastroenteritis among bathers exposed to sewagecontaminated marine waters. *Int. J. Epidemiol.* 22, 698–708.
83. Gil A., Louis V., Rivera I., Lipp E., Huq A., Lanata C., Taylor D., Russek-Cohen E., Choopun N., Sack R., and Colwell R.R. (2004). Occurrence and distribution of *Vibrio cholerae* in the coastal environment of Peru. *Environmental Microbiology*, 6:699-706.
84. Glass R.I., and Black R.E. (1992). The epidemiology of cholera, pp.129-154. *In* D. Barua and W.B.I. Greenough (ed.), *Cholera*. Plenum Press, Inc., New York, N.Y.
85. Golubovskaya E. K. 1978 *Biological Basics of Water Treatment*. ‘Vishaya Schkola’, Moscow, USSR.

86. Grimes D.J., Brayton P., Colwell R.R., and Gmber S.H. (1985). Vibrios as autochthonous flora of neritic sharks. *Systematic and Applied Microbiology*, 6:221-226
87. Greenough W.B.III. (1995). *Vibrio cholerae* and cholera. In: Mandell G.L., Bennett J.E., Dolin R, (eds), *Principles and Pracrfices of infectious Diseases*. 4th ed., New York, Churchill Livingstone.
88. Grimes D.J., Atwell R.A., Brayton P.R., Palmer L.M., Rollins D.M., Roszak D.B., Singleton F.L., Tamplin M.L., and Colwell R.R. (1986). The fate of enteric pathogenic bacteria in estuarine and marine environment. *Microbiological Sciences*, 3:324 -329.
89. Grim C., Jaiani E., Kokashvili T. Janelidze N., C. Whitehouse , M. Tediashvili, A.Huq. 2010. Detection of toxigenic *Vibrio cholerae* O1 from freshwater environments in the Former Soviet Republic of Georgia: a potential source of disease *Environ. Microbiol. Reports*, 2(1), pp. 2–6
90. Guerinot M.L., and Patriquin D.G. (1981). N2-fixing vibrios isolated from the gastrointestinal tract of sea urchins. *Canadian Journal of Microbiology*, 27:31 1317.
91. Han W.Q., and Webster P.l . (2002). Forcing mechanisms of sea level interannual variability in the Bay of Bengal. *Journal of Physicial Oceanography*, 32:216-239.
92. Hankin E.H. L'action bactericide des Eaux de la Jumna et du Gange sur le vibriion du cholera. *Ann Inst Pasteur* 10: 511, 1896.
93. Hatfull GF, Hendrix RW. 2011. Bacteriophages and their genomes *Curr. Opin. Virol.* 1:298-303.
94. Heidelberg J.F., Heidelberg K.B., and Colwell R.R. (2002). Bacteria of the —subclass *Proteobacteria* associated with zooplankton in Chesapeake Bay. *Applied and Environmental Microbiology*, 68:5498—5507
95. Hirschhorn N., Kinzie J.L., and Sachar D.B. (1968). Decrease in net stool output in cholera during intestinal perfusion with glucose-containing solutions. *New England Journal of Medicine*, 279: 176-181
96. Hood M.A., Ness G.B., Rodrick G.B., and Blake N.J. (1984). The ecology of *Vibrio cholerae* in two Florida estuaries. In Colwell R.R., (ed) *Vibrios in the environment*. John Wiley and Sons, New York, pp 399-409.
97. Hood M.A.. and Ness G.E. (1982). Survival of *Vibrio cholerae* and *Escherichia coli* in estuarine waters and sediments. *Applied and Environmental Microbiology*, 43:578-584
98. Holmberg S.D. (1992). *Vibrio*. In: Gorbach S.L., Bartlett J.G., Blacklow N.R., (ed.s.), *Infectious Diseases*. Philadelphia, WB Saunders Company.

99. Housby JN, Mann NH. 2009. Phage therapy *Drug Discov. Today* 14:536-40.
100. Hughes J.M., Dannie,M.D., Hollis G., Eugene. M.S., Gangarosa M.D. and Weaver R.E. (1978). Noncholera vibrio infections in the United States. *Annals of Internal Medicine*, 88:602-606.
101. Huq A., Small E.B., West P.A., Huq M.I., Rahman R., and Colwell R.R. (1983). Ecological relationships between *Vibrio cholerae* and planktonic crustacean copepods. *Applied and Environmental Microbiology*,45:275-283.
102. Huq A., West P., Small E.B., HuqM., and Colwell R.R. (1984). Influence of water temperature, salinity and pH on survival and growth of toxigenic *Vibrio cholerae* serovar O1 associated with live copepods in laboratory microcosm. *Applied and Environmental Microbiology*, 48:420-424.
103. Huq A., Colwell R.R., Rahman R., Ali A., Chowdhury M., Parveen, S., Sack D., and Russek-Cohen, E. (1990). Detection of O1 in the aquatic environment by fluorescent monoclonal antibody and culture method. *Applied and Environmental Microbiology*,56:2370-2373.
104. Huq A., Colwell R.R., Chowdhury M.A., Xu B., Monimzzamar S.M., Islam M.S., Yunus M., and Albert M.J. (1995). Coexistence of *Vibrio cholerae* O1 and O139 Bengal in plankton in Bangladesh. *Lancet*, 345: 1 249.
105. Huq A., Sack R., and Colwell R.R. (2001). Cholera and global ecosystems, p. 327-347. In J. Aron and J. Patz (ed). *Ecosystem change and public health: a global perspective*. Johns Hopkins University Press, Baltimore, Md.
106. Huq A., Sack R.B., Nizam A., Longini I.M., Nair G.B., Ali A., Morris Jr.J.G., Khan M.N.H., Siddique A.K., Yunus M., Albert M.J., Sack D.A., and Colwell R.R. (2005). Critical Factors Influencing the Occurrence of *Vibrio cholerae* in the Environment of Bangladesh. *Applied and Environmental Microbiology*,71:3464-3465.
107. Huq A, Grim C, Colwell RR, Nair GB. "Detection, isolation, and identification of *Vibrio cholerae* from the environment".*Curr Protoc Microbiol*. 2006 Sep; Chapter 6:Unit6A.5.
108. Islam M.S., Rahim Z., Alam M.J., Begum S., Moniruzzaman S., Umeda A., Albert, M.J., Sack R.B., Huq A., and Colwell R.R.(1999). Association of *Vibrio cholerae* O1 with the cyanobacterium *Anabaena* sp., elucidated by polymerase chain reaction and transmission electron microscopy. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 93:36-40.
109. Islam M.S., Tasmin R., Khan S.I., Bakht H.B.M., Mahmood Z.H., Rahman M.Z., Bhuiyan N., Nishibuchi M., Nair G.B., Sack R.B., Huq A., Colwell R.R.. Pandemic strains of O3:K6 *Vibrio*

- parahaemolyticus* in the aquatic environment of Bangladesh. Canadian Journal of Microbiology. 2004,50(10):827-834,10. 1139/w 04072.
110. IJSEM. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. FreeTree application program (Freetree.exe).<http://ijs.sgmjournals.org/content/51/3/731/suppl/DC1>.
 111. Jaiani E., Tediashvili M., Janelidze N., Chanishvili N., Ivanova A., Mdzinarashvili T., Mrevlishvili G., Tushishvili D. Study of the Peculiarities of the Phage-Host Cell Interactions and DNA ejection processes in Different Conditions on the model of Cb and Un Phages. (2001) Evergreen International phage biology Meeting Evergreen,USA, (2001) p.42.
 112. Janda J.M., Powers, Bryant R.G. and Abbott S. (1988). Current perspectives on the epidemiology and pathogenesis of clinically significant *Vibrio* spp. Clinical Microbiology Reviews, 1 :245-267.
 113. Jesudason M.V., Balaji V., Mukudan U., and Thomas C.J.(2000). Ecological study of *Vibrio cholerae* in Vallore. *Epidemiology and infection*,124:201-206.
 114. Kamal A.M.(1974). The seventh pandemic of cholera,p. 1-14. In D. Barua and W.Burrows (ed.), Cholera. The W.B Saunders Co., Philadelphia.
 115. Kaneko T., and Colwell, R.R. (1978). The annual cycle of *Vibrio parahaemolyticus* in Chesapeake Bay. *Microb. Ecol.* 4:135-156.
 116. Kaper J Lockman, H., Colwell R.R. and Joseph S.W. (1979). Ecology, serology and enterotoxin production of *Vibrio cholerae* in Chesapeake Bay. Applied and *Environmental Microbiology*, 37:91-103.
 117. Kaper J.B., Moseley S.L., and Falkow S. (1981). Molecular characterization of environmental and nontoxigenic strains of *Vibrio cholerae*. Infection and Immunity, 32:661 -667.
 118. Kaper J.B., Morris Jr. J.G., and Levine M.M. (1995). Cholera. *Clinical Microbiology Reviews*, 8:48-86.
 119. Kaysner C.A., Abeyta Jr.C., Wekell M.M., DePaola Jr.A., Stott R.F., and Leitch J.M (1987). Incidence of *Vibrio cholerae* from estuaries United States West Coast. *Applied and Environmental Microbiology*. 53:1344-1348.
 120. Kierek K.,and Watnick P.I. (2003). Environmental Determinants of *Vibrio cholerae* biofilm development. *Applied and Environmental Microbiology*,69:5079-5088
 121. Kirschner A.K.T., Schlesinger J., Farnleitner A.H., Hornek. R., Su B., Golda B., Herzig A., and Reitner B. (2008). Rapid growth of planktonic *Vibrio cholerae* Non-O1/Non-O139 strains in a

- large alkaline lake in Austria: Dependence on temperature and dissolved organic carbon quality. *Applied and Environmental Microbiology*, 74:2004-2015
122. Klontz K.C. (1990). Fatalities associated with *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio cholerae* non-O1 infections in Florida (1981-1988). *Southern Medical Journal*, 83:500-502.
 123. Koch R. (1984). An address on cholera and its bacillus. *Br. Med. J.*, 1884:403-407.
 124. Kokashvili T, Elbakidze T, Jaiani E, Janelidze N, Kamkamidze G, Whitehouse C, Huq A, Tediashvili M. “Comparative phenotypic characterization of *Vibrio cholerae* isolates collected from aquatic environments of Georgia” *Journal of Georgian Med News*. 2013 Nov; (224):55-62.
 125. Khvedelidze M., Mdzinarashvili T., Ivanova A., Tediashvili M., Tushishvili D., Mrevlishvili G. The influence of pH on thermal and hydrodynamic properties of DDVI phage and on DNA ejection from phage induced by bacterial membrane fragments. *J. Biol. Phys. Chem.* 2004, 4, pp.209-213.
 126. Krylov V.N., Tolmachova T.Q., Akhverdian V.Z. DNA homology in species of bacteriophages active on *Pseudomonas aeruginosa* *J.Arch. Virol.* 1993. v. 131. №1-2. p. 141-151.
 127. Kutateladze M, Adamia R. 2010. Bacteriophages as potential new therapeutics to replace or supplement antibiotics *Trends Biotechnol.* 28:591-5.
 128. Kutter Elizabeth, Alexander sulakvelidze. Bacteriophages: biology and applications. Burton Guttman, Raul Raua Elizabeth Kutter. Basic Phage Biology. 2005.
 129. Kutter Elizabeth Alexander Sulakvelidze. Bacteriophages: biology and applications. Hans-W.Ackermann. Bacteriophage classification. 2005.
 130. Kutter E, De VD, Gvasalia G, Alavidze Z, Gogokhia L et al. 2010. Phage therapy in clinical practice: treatment of human infections *Curr. Pharm. Biotechnol.* 11:69-86.
 131. Laval E. (1989). El colera en Chile : 1886 to 1888. *Revista chilena de infectologia*, 6:96-99.
 132. Lee.J .V., Bashford D.J., Donovan T.J., Furniss A.L., and West P.A. (1982). The incidence of *Vibrio cholerae* in water animals and birds in Kent, England. *Journal of Applied Bacteriology*, 52 :281-291 .
 133. Lin C.J., Chiu C.T., Lin D.Y., Sheen I.S., and Lien .I.M. (1996). Non-O1 *Vibrio cholerae* bacteremia in patients with cirrhosis : 5 year experience from a single medical center. *American Journal of Gastroenterology*, 91:336-340.
 134. Lipp E.K., Huq A., and Colwell R.R. (2002). Effects of global climate on infectious disease: the cholera model. *Clinical Microbiology Reviews*, 15:757-770.

135. Lipp E.K., Rivera N.G., Gil A.I., Espeland E.M., Choopun N., Louis V.R., Russek-Cohen, E., Huq A., and Colwell R.R. (2003). Direct Detection of *Vibrio cholerae* and *ctxA* in Peruvian Coastal Water and Plankton by PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 69:3676-3680.
136. Lobitz B., Beck L., Huq A., Wood B., Fuchs G., Faruque A.S. and Colwell R.R. (2000). Climate and infectious disease: use of remote sensing for detection of *Vibrio cholerae* by indirect measurement. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97: 1438-1443.
137. Martha R.T. Clokie, Andrew M. Kropinski; Bacteriophages: Methods and Protocols, Volume 1: Isolation, Characterization and Interactions; 2010, Vol. 501, pp. 141-149.
138. Matsuzaki S., Rashel M., Uchiyama J., Sakurai S., Ujihara T. et al. 2005. Bacteriophage therapy: a revitalized therapy against bacterial infectious diseases *J. Infect. Chemother.* 11:211-9.
139. McIntyre O.R., and Feeley J.C. (1965). Characteristics of non-cholera vibrios isolated from cases of human diarrhoea. *Bulletin of the World Health Organization*. 32:627-632.
140. McCarthy S.A., and Khambaty F.M. (1994). International dissemination of epidemic *Vibrio cholerae* by cargo ship ballast and other nonpotable waters. *Applied and Environmental Microbiology*, 60:2597-2601
141. Miedzybrodzki R, Borysowski J, Weber-Dabrowska B, Fortuna W, Letkiewicz S et al. 2012. Clinical aspects of phage therapy *Adv. Virus Res.* 83:73-121.
142. Morris J.G., Wilson R., Davis B.R., Wachsmuth I.K., Riddle C.F., Wathen H.G., Pollard R.A., and Blake P.A. (1981). Non-O group 1 *Vibrio cholerae* gastroenteritis in the United States: clinical, epidemiologic, and laboratory characteristics of sporadic cases. *Annals of Internal Medicine*, 94:656-658.
143. Morris J, and Black R. (1985). Cholera and other vibrioses in the United States. *New England Journal of Medicine*, 312:343-350.
144. Morris J.G., Takeda T., Tall B.D., Losonsky G.A., Bhattacharya S.K., Forrest B.D., Kay B.A., and Nishibuchi M. (1990). Experimental non-O group 1 *Vibrio cholerae* gastroenteritis in humans. *Journal of Clinical Investigation*, 85:697-705.
145. Morris Jr. J.G., Losonsky G.E., Johnson J.A., Tacket C.O., Nataro J.P., Panigrahi P., and Levine M.M. (1995). Clinical and immunological characteristics of *Vibrio cholerae* 0139 Bengal infection in North American volunteers. *Journal of Infectious Diseases*, 171: 903 -908

146. Mooi and Bik E.M. (1997). The evolution of epidemic *Vibrio cholerae* strains. *Trends in Microbiology* 4:161-165.
147. M.Tediashvili, E. Jaiani, N. Janelidze, T. Kokashvili, T.Elbakidze,C. A. Whitehouse, A. Huq, R.Colwell. "8th ASM Biodefense and Emerging Diseases Research Meeting". Feb 21-24, 2010. Abstract book, p.83."Epidemic Strains of Toxigenic *Vibrio cholerae* in Recreational and Drinking Water Reservoirs in Georgia". Baltimore,MD. USA.
148. Mukerjee S., Guha D.K. and Guha Roy U.K. Studies on typing of cholera by bacteriophage.I. Phage-typing of *Vibrio cholerae* from Calcutta epidemics. *Ann Biochem Exp Med* 17: 161, 1957
149. Onishenko G., V. Ganin and E. Golubinsky. 2001. Vibrios of Non-O1 serological group and their importance in human pathology. Russian Ministry of Health, Moscow.
150. Padmavathi D., and Satyanarayana D. (1999). Distribution of nutrients and major elements in riverine, estuarine and adjoining coastal waters of Godavari, Bay of Bengal. *Indian Journal of Marine Sciences*, 28:345-354. Patel, M.,Isaacson, M., and Koomhof. H.J. (2004). Survival of *Vibrio cholerae* in industrially polluted water, with particular reference to iron concentrations. *Water S.A.* 30:65-69.
151. Pierce N.F., Sack R.B..and Mitra R.C. (1969). Replacement of water and electrolyte losses in cholera by an oral glucose-electrolyte solution. *Annals of Internal Medicine*, 70:1173- 1181.
152. Pollitzer R.(1959). History of the disease, pp. 11-50. In R. Pollitzer, (ed.) *Cholera*. World Health Organization, Geneva, Switzerland
153. Rabbani G.H., and Greenough III W.B. (1999). Food as a vehicle of transmission of cholera. *Journal of Diarrhoeal Diseases Research* 17: 1-9.
154. Ramamurthy T, Garg R, Sharma R, Bhattacharya SK, Nair GB, Simada T, Takeda T, Karasawa T, Kurazano H, Pal A, Takeda Y: Emergence of novel strain of *Vibrio cholerae* with epidemic potential in southern and eastern India. *Lancet* 1993, 314:704
155. Sakandelidze VM, Meipariani AN. Use of combined phages in suppurative-inflammatory diseases. *Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol*. 1974 Jun;51(6):135-6.
156. Schuster BM, Tyzik AL, et al. Ecology and genetic structure of a northern temperate *Vibrio cholerae* population related to toxigenic isolates. *Appl Environ Microbiol*. 2011;77(21):7568–7575. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)]

157. Safrin S., Morris Jr.J.G. Adams. M., Pons, V., Jacobs, R.. And Conte, Jr.J.E. (1988). Non-O1 *Vibrio cholerae* bacteremia: case report and review. *Reviews of Infectious Diseases*, 10:1012-1017.
158. Shimada T., Arakawa E., Itoh K., Okitsu T., Matsushima A., Asai Y., Yamai S., Nakazato T., Nair, G.B., Albert M.J., and Takeda Y.. (1994). Extended serotyping scheme for *Vibrio cholerae*. *Current Microbiology*, 28:175-178.
159. Siddique A.K., Zaman , Baqui A.H., Akram K., Mutsuddy P., Eusof A., Haider K., Islam M.S., and Sack R.B. (1992). Cholera epidemics in Bangladesh: 1985-1991. *Journal of Diarrhoeal Diseases Research*, 10:79-86.
160. Siddique A.K., Zaman K., Akram K., Mutsuddy P., Eusof A., and Sack R.B. (1994). Emergence of a new epidemic strain of *Vibrio cholerae* in Bangladesh. *Tropical and Geographical Medicine*, 46: 147-150.
161. Simidu U., Kaneko E., and Taga N. (1977). Microbial studies of Tokyo Bay. *Microbial Ecology*, 3:173-191.
162. Simidu U., and Tsukamoto K. (1985). Habitat segregation and biochemical activities of marine members of the family Vibrionaceae. *Applied and Environmental Microbiology*, 50:781-790.
163. Slopek S, Durlakowa I, Weber-Dabrowska B, Kucharewicz-Krukowska A, Dabrowski M, Bisikiewicz R. Results of bacteriophage treatment of suppurative bacterial infections. I. General evaluation of the results. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 1983;31(3):267-91.
164. Soothill J.S. Treatment of experimental infections of mice with bacteriophages. *J. Med Microbiol* 37:258, 1992.
165. Spira W.M., Daniel R.R., Ahmed Q.S., Huq A., Yusuf A., and Sack D.A. (1978). Clinical features and pathogenicity of 0 group 1 non-agglutinating *Vibrio cholerae* and other vibrios isolated from cases of diarrhoea in Dacca, Bangladesh, p. 137-153. In *Proceedings of the 14th Joint Cholera Research Conference*. U.S.-Japan Cooperative Medical Science Program. U.S. Cholera Panel. NIH publication no. 80-200030. U.S. Government Printing Office, Washington, D.C.
166. Spira W.M., Huq A., Ahmed Q.S., and Yusuf A.S. (1981). Uptake of *Vibrio cholerae* biotype Eltor from contaminated water by water hyacinth (*Eichornia crassipes*). *Applied and Environmental Microbiology*, Sept. 1981, p. 550-553 Vol. 42, No. 3

167. Strocher U.H., and Manning P.A. (1997). *Vibrio cholerae* serotype O139: swapping genes for surface polysaccharide biosynthesis. *Trends in microbiology*, 5:178-180. 834.
168. Sulakvelidze A. 2005. Phage therapy: an attractive option for dealing with antibiotic-resistant bacterial infections *Drug Discov. Today* 10:807-9.
169. Sulakvelidze A, Alavidze Z, Morris JG, Jr. 2001. Bacteriophage therapy *Antimicrob. Agents Chemother.* 45:649-59.
170. Summers W.C. Cholera and plague in India: The bacteriophage inquiry of 1927-1936. *J Hist Med All Sci* 48:275, 1993.
171. Talledo M., Irma N. G., Rivera Lipp E. K., Neale A., Karaolis D., Hug A., Colwell R. Characterization of a *Vibrio cholerae* phage isolated from the coastal water of Peru. *J.Envir.Microb.* 2003, 5(5), p. 350-354.
172. T.Elbakidze, T.kokashvili, E.Jaiani, N.Janelidze, T.Koberidze, G.Tsertsvadze, C.A. Whitehouse, A.Huq, M.Tediashvili. Jun21-25, 2010. Abstract book, p.172.Conference:“Virusis of microbes”,“Bacteriophages specific to environmental isolates of *V. cholerae*-ecology and diversity.” Pasteur Institute, Paris, France.
173. TreeView X. <http://darwin.zoology.gla.ac.uk/~rpage/treeviewx/history.html>. Page last updated 2005.
174. Tinatin Elbakidze, Ekaterina Jaiani, Tamar Kokashvili, Marina Tediashvili .Georgian Congress of Allergology and Immunology, IV International Congress “Health and Drug”. European Board for Accreditation in Pneumology (EBAP), Oct 1-3 , 2010. Abstarct book, p203.“Application of immunological methods for detection, identification and characterization of environmental *Vibrio cholerae* “.
175. T.Elbakidze, N.Janelidze, E.Jaiani, T.kokashvili, N.Mitaishvili, T. Koberidze, K. Porchkhidze, M.Tediashvili. 2010. I international conference-“The main ecological problems of modernity and Caucasus”. Chemical journal. “Occurrence of epidemic strains of *Vibrio cholerae* in recreational and drinking water reservoirs in Georgia”. Tbilisi, Georgia. v.10, pp.120-122, N4.
176. Thompson JA, Oliveira RA, Xavier KB. Can chatter between microbes prevent Cholera? *Trends Microbiol.* 2014 Dec;22(12):660-2. doi: 10.1016/j.tim.2014.10.006. Epub 2014 Nov 4.
177. Thompson F.L., Iida T., and Swings J. (2004). Biodiversity of vibrios. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 68:403-431 .

178. Thompson F.L., Karl K.E. and the AVIB Group. (2006). Vibrio2005: the First International Conference on the Biology of Vibrios. *Journal of Bacteriology*. 188:4592-4596.
179. Tolkacheva T.V, Abakumov EM, Martynova V.A, Golosova T.V. Correction of intestinal dysbacteriosis with biological preparations in acute leukemia. *Probl Gematol Pereliv Krovi*. 1981 Jul;26(7):29-33.
180. Tominaga A., Enomoto M. Magnesium-dependent plaque formation by bacteriophage P1 (cinc9-) on *Scherchia coli* and *Shigella sonnei*. *J. Virology*, 1986, v. 155, №1, pp. 284-284.
181. Thampuran N., Sreeranga K., and Surendran P.K. (2006). Effect of chlorine on the survival of *Vibrio cholerae* on shrimp. *Fishery Technolj*, 43:180-185.
182. Twedt R.M., Madden J.M., Hunt J.M., Francis D.W., Peeler J.T., Duran A.P., Hebert W.O., McCay S.G., Roderick C.N., Spite G.T., and Wazenski T.J. (1981). Characterization of *Vibrio cholerae* isolated from oysters. *Applied and Environmental Microbiology*, 41:1475-1478.
183. Twort F.W. An Investigation on the nature of Ultramicroscopic viruses. *Lancet* ii: 1241, 1915.
184. Venkateswaran K, Horiuchi H, Nakano H, Matsuda H, Hashimoto H. *Vibrio* virulence factors and the quantitative analysis of cytotoxicity elaborated by environmental isolates. *Cytobios*. 1991;66(266-267):143-51
185. Venkateswaran, Kiiyukia C., Takaki M., Nakano H., Matsuda H., Kawakami H. and Hashimoto H. (1989). Characterization of toxigenic *Vibrios* isolated from the freshwater environment of Hiroshima. Japan. *Applied and Environmental Microbiology*, 55:2613-2618.
186. Venkateswaran K., Takai T., Navarro I.M., Nakano H., Hashimoto H., and Siebeling R.J. (1989a). Ecology of *Vibrio cholerae* non-O1 and *Salmonella* spp. and role of zooplankton in their seasonal distribution in Fukuyama coastal waters, Japan. *Applied and Environmental Microbiology*, 55:1591-1598.
187. Vugia D.J. Cholera surveillance. In: *Vibrio cholerae and Cholera: Molecular to Global Perspectives*. Eds. I.K. Wachsmuth, P.A. Blake and O. Olksvik, American Society for Microbiology, Washington, D.C, p 371, 1994.
188. Wade T. J., Pai N., Eisenberg J. N. S. & Colford J. M. 2003 Do U.S. Environmental Protection Agency water quality guidelines for recreational waters prevent gastrointestinal illness? A systematic review and meta-analysis. *Environ. Health Perspect.* 8, 1102-1109.
189. World Health Organization. Global Alert and Response (GAR). Cholera <http://www.who.int/csr/don/archive/disease/cholera/en/>

190. Wilson R., Lieb S., and Roberts A. (1981). Non- group 1 *Vibrio cholerae* gastroenteritis associated with eating raw oysters. *American Journal of Epidemiology*, 114:293-298.
191. Wommack E.K., Colwell R.R., 2000, Virioplankton: Viruses in Aquatic Ecosystems *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, Vol. 64, No. 1 pp. 69–114.
192. Worden A.Z., Seidel M., Smriga S., Wick A., Malfatti F., Bartlett D., and Azam F. (2006). Trophic regulation of *Vibrio cholerae* in coastal marine waters. *Environmental Microbiology*,8:21-29.
193. World Health Organization. 2001. *Weekly Epidemiol. Record*. 76:117-124
194. Yamai S., Okitsu T., Shimada T., and Katsube Y.(1997) Distribution of serogroups of *Vibrio cholerae* non-O1 non-O139 with specific reference to their ability to produce cholera toxin, and addition of novel serogroups. *Japanese Journal of infectious Diseases*, 71 :1037-1045
195. Young R. Bacteriophage lysis: mechanism and regulation. *J. Microbiol Rev.* 1992,vol. 56, №3, p. 430-481

პუბლიკაციები

1. **Elbakidze T.**, Kokashvili T., Janelidze N., Porchkhidze K., Koberidze T., Tediashvili M. „Biological characterization of *V.cholerae* -specific bacteriophages isolated from water sources in Georgia“. Journal of Georgian Med News. 2015 Mar; (240):65-72
2. Kokashvili T, **Elbakidze T**, Jaiani E, Janelidze N, Kamkamidze G, Whitehouse C, Huq A, Tediashvili M. “Comparative phenotypic characterization of *Vibrio cholerae* isolates collected from aquatic environments of Georgia” Journal of Georgian Med News. 2013 Nov; (224):55-62.
3. E.Jaiani, T.Kokashvili, N.Mitaishvili, **T.Elbakidze**, N.Janelidze, N. Lashkhi, R.Kalandadze, E.Mikashavidze, G.Natroshvili, C.A.Whitehouse, A.Huq, M.Tediashvili. “Microbial water quality of recreational lakes near Tbilisi, Georgia “Journal of Water and Health. 2013 Jun. Vol 11 No2, pp 333-345.
4. Mitaishvili N., Tskhvediani A., **Elbakidze T.**, Kokashvili T., Natroshvili G., Kajaia G., Tediashvili M. 2011. “Biological series B” Proceedings of the Georgian Academy of Sciences. “The abundance and diversity of *Vibrio* species not pathogenic to humans in Georgian aquatic environment”. Tbilisi. Georgia. v.9 No.1-4.pp43-49.
5. **T.Elbakidze**, N.Janelidze, E.Jaiani, T.kokashvili, N.Mitaishvili, T. Koberidze, K. Porchkhidze, M.Tediashvili. 2010. I international conference-“The main ecological problems of modernity and Caucasus”. Chemical journal. “Occurrence of epidemic strains of *Vibrio cholerae* in recreational and drinking water reservoirs in Georgia”. Tbilisi, Georgia. v.10, pp.120-122, N4.

საერთაშორისო სამეცნიერო კონფერენციებზე წარმოდგენილი თეზისები :

1. **Tinatin Elbakidze**, Tamar kokashvili, Nino Janelidze, Marina Tediashvili, Anwar Huq. July 14-18, 2014. Swiss Federal Institute of Technology (ETH). Zurich, Switzerland. Embo Conference on Viruses of Microbs III: Structure and Function-from Molecules to Communities, Abstract book, Poster N209. “Specific phages with potential for subtyping and biocontrol of *V. cholerae*”
2. **Tinatin Elbakidze**, Ekaterine Jaiani, Tamar Kokashvili, Tamar Koberidze, Ketevan Porchkhidze, Marina Tediashvili. Abstract of VII International Scientific Conference for Graduate and PhD Students *YOUTH AND THE PROGRESS OF BIOLOGY*, Abstract book, p.252. April 5 – 8, 2011. Ivan Franko National University of Lviv. Faculty of Biology. “Isolation and characterization of environmental *Vibrio cholerae* corresponding bacteriophages by use of immunological method”. Lviv, Ukraine
3. Kokashvili T., Jaiani E., Janelidze N., **Elbakidze T.**, Tediashvili M. Abstract of VII International Scientific Conference for Graduate and PhD Students *YOUTH AND THE PROGRESS OF BIOLOGY*, Abstract book, p.256. April 5 – 8, 2011. Ivan Franko National University of Lviv. Faculty of Biology. “Ecology and diversity of *V. cholerae* in Georgia water environment”. Lviv, Ukraine.
4. **Tinatin Elbakidze**, Ekaterina Jaiani, Tamar Kokashvili, Marina Tediashvili. Georgian Congress of Allergology and Immunology, IV International Congress “Health and Drug”. European Board for Accreditation in Pneumology (EBAP), Oct 1-3, 2010. Abstract book, p.203. “Application of immunological methods for detection, identification and characterization of environmental *Vibrio cholerae*”.
5. **T. Elbakidze**, T. kokashvili, E. Jaiani, N. Janelidze, T. Koberidze, G. Tsertsvadze, C.A. Whitehouse, A. Huq, M. Tediashvili. Jun 21-25, 2010. Abstract book, p.172. Conference: “Virusis of microbes”, “Bacteriophages specific to environmental isolates of *V. cholerae*-ecology and diversity.” Pasteur Institute, Paris, France.
6. M. Tediashvili, E. Jaiani, N. Janelidze, T. Kokashvili, **T. Elbakidze**, C. A. Whitehouse, A. Huq, R. Colwell. “8th ASM Biodefense and Emerging Diseases Research Meeting”. Feb 21-24, 2010. Abstract book, p.83. “Epidemic Strains of Toxigenic *Vibrio cholerae* in Recreational and Drinking Water Reservoirs in Georgia”. Baltimore, MD. USA.