

საქართველოს წყლიან გარემოში გავრცელებული *Vibrio parahaemolyticus* -  
ის და მის მიმართ სპეციფიკური ბაქტერიოფაგების გამოყოფა,  
დახასიათება და ბიოლოგიური თვისებების შესწავლა

ანა ცხვედიანი

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

*სადისერტაციო ნაშრომი შესრულებულია გ.ელიავას სახელობის ბაქტერიოფაგის,  
მიკრობიოლოგიისა და ვირუსოლოგიის ინსტიტუტში საბუნებისმეტყველო  
მეცნიერებათა დოქტორის აკადემიური ხარისხის მოსაპოვებლად*

სამეცნიერო ხელმძღვანელი: მარინე თედიაშვილი, ბმდ

ნინო გაჩეჩილაძე, ბმდ

თბილისი 2014

## ანოტაცია

ბოლო ათწლეულში აღინიშნა ჰალოფილური ვიბრიონებით გამოწვეული ინფექციების სიხშირის ზრდა. *Vibrio parahaemolyticus* განიხილება როგორც მძიმე გასტროენტერიტების და ჭრილობით ინფექციების გამომწვევი ყველაზე მნიშვნელოვანი სახეობა (არაქოლერულ ვიბრიონებს შორის). ეს ბაქტერია ასევე ასოცირდება ზღვის ორგანიზმების ინფექციებთან. საქართველოს შავი ზღვის სანაპირო ზოლის კლიმატი და საშუალოდ მარილიანი წყალი ჰალოფილური ვიბრიონებისთვის ხელსაყრელ გარემოს წარმოადგენს. ჰალოფილური ვიბრიონების და შესაბამისი ბაქტერიოფაგების შესწავლა დიდ ინტერესს იწვევს მათი პათოგენობის მექანიზმების დასადგენად და შტამების დიფერენციაციისათვის. გარდა ამისა, ბაქტერიოფაგები შეიძლება განვიხილოთ, როგორც ალტერნატიული საშუალება, ამ პათოგენებით გამოწვეული დაავადებების პროფილაქტიკისა და მკურნალობისთვის.

მოცემული კვლევის ძირითად მიზანს წარმოადგენდა საქართველო წყლიან გარემოში *V.parahaemolyticus* –ის გამოვლენა, გამოყოფა და დახასიათება მის მიერ გამოწვეული ინფექციების რისკის შეფასებისა და ბიომრავალფეროვნების დადგენის მიზნით. აგრეთვე *V.parahaemolyticus* –ის მიმართ სპეციფიკური ბაქტერიოფაგების გამოყოფა და დახასიათება გამომწვევის იდენტიფიკაციისა და სუბტიპირების, ასევე სამკურნალო და პრევენციული მიზნით მათი შემდგომი გამოყენებისთვის.

კვლევის ფარგლებში საქართველოს შავი ზღვის სანაპირო ზოლის წყლებიდან გამოიყო *V.parahaemolyticus*-ის 200-მდე იზოლატი, მოხდა მათი დახასიათება სეროტიპებისა და ვირულენტობის ფაქტორების შემცველობის მიხედვით. გამოვლინდა *V.parahaemolyticus*-ის შავი ზღვის იზოლატების მნიშვნელოვანი მრავალფეროვნება, მათ შორის პანდემური კლონების არსებობა.

გამოყოფილი და დახასიათებული იყო *V.parahaemolyticus*-ის მიმართ სპეციფიკური 70 –მდე ბაქტერიოფაგი, მათგან 12 ბაქტერიოფაგი შერჩეულ იქნა სეროტიპისა და გენეტიკური სტრუქტურის მიხედვით ახლოს მდგომი *V.parahaemolyticus*-ის ბაქტერიული შტამების დიფერენცირებისთვის. *V.parahaemolyticus*–ის რამდენიმე ბაქტერიოფაგმა გამოავლინა მაღალი თერაპიული პოტენციალი.

## Abstract

The prevalence of infections caused by halophilic *Vibrio* species appears to be increased in the last decade. *V. parahaemolyticus* is the most important non-cholerae *Vibrio* causing serious gastroenteritis and wound infections. Bacteria may be also pathogenic for marine organisms. Climate and water of Black Sea coastal zone in Georgia provide favorable conditions for survival and propagation of halophilic vibrios. Research about halophilic vibrios and corresponding bacteriophages of *V. parahaemolyticus* is of special importance for study pathogenicity mechanisms and strain differentiation. Besides lytic bacteriophages can be discussed as an alternative approach for the prevention and treatment of infections caused by these pathogens.

The aim of the study was to detect, isolate and characterize *V. parahaemolyticus* and its bacteriophages in order to assess infection risk in this region and to study the strain biodiversity, also to select specific bacteriophages for diagnostic, subtyping and therapeutic purpose.

Up to 200 bacterial strains were collected from Black Sea coastal waters in Georgia. Characterization by serological properties and virulence factors was performed. High diversity of Black Sea isolates, also presence of pandemic strains was revealed.

Up to 70 *V. parahaemolyticus*-specific bacteriophages were isolated and characterized. Twelve out of them were selected for subtyping of strains of the same serotype and genetic structure. Numbers of bacteriophages with high therapeutic potential have been selected.

## შინაარსი

თავეურცელი-----	1
ანოტაცია-----	2
შინაარსი-----	3
შესავალი-----	6
I. ლიტერატურული მიმოხილვა-----	9
1. <i>Vibrio parahaemolyticus</i> -ის ზოგადი დახასიათება-----	9
1.1. ისტორიული ცნობები-----	9
1.2. <i>Vibrio parahaemolyticus</i> -ის კლასიფიკაცია და ტაქსონომია-----	10
1.3. <i>V. parahaemolyticus</i> -ის უჯრედისა და კოლონიის მორფოლოგია-----	11
1.4. <i>V. parahaemolyticus</i> -ის კულტივირება და ბიოქიმიური იდენტიფიკაცია-----	13
1.5. <i>Vibrio parahaemolyticus</i> -ის გენომი-----	13
1.6. <i>V. parahaemolyticus</i> -ის ვირულენტობის ფაქტორები-----	14
1.7. <i>V. parahaemolyticus</i> -ის იზოლატების სეროლოგიური თვისებების შესწავლა-----	16
1.8. <i>Vibrio parahaemolyticus</i> -ით გამოწვეული ინფექციები და მათი ეპიდემიოლოგია---	17
1.9. <i>Vibrio parahaemolyticus</i> -ის ეკოლოგია-----	17
2. ბაქტერიოფაგები-----	20
2.1. კლასიფიკაცია და ტაქსონომია-----	20
2.2. ბაქტერიოფაგების ბიოლოგია-----	22
2.2.1. ვირულენტური ბაქტერიოფაგების სასიცოცხლო ციკლი-----	22
2.2.2. ზომიერი ბაქტერიოფაგების სასიცოცხლო ციკლი-----	24
2.3. ბაქტერიოფაგების გამოყენება თერაპიული მიზნით (ფაგოთერაპია)-----	25
2.4. ბაქტერიოფაგების დახასიათებისა და იდენტიფიკაციის მეთოდები-----	26
2.5. <i>Vibrio parahaemolyticus</i> -ის მიმართ სპეციფიკური ბაქტერიოფაგები-----	27
II. მასალები და მეთოდები-----	31
1. საკვლევი მასალა-----	31
2. კვლევაში გამოყენებული მეთოდები-----	35
2.1. ღია წყალსატევებში წყლის სინჯების აღება და დამუშავება-----	35
2.2. <i>Vibrio</i> -ს გვარის ბაქტერიების გამოყოფა-----	35

2.3 ბაქტერიული შტამების ბიოლოგიური თვისებების შესწავლა-----	37
2.4. მიკროკოსმების ექსპერიმენტი VBNC-უჯრედებზე-----	39
2.5. ბაქტერიოფაგების გამოყოფა-----	39
2.6. ბაქტერიოფაგების ბიოლოგიური თვისებების შესწავლა-----	39
2.7. ფაგების მგრძობელობა ფიზიკური და ქიმიური ფაქტორების მიმართ-----	41
2.8. ფაგის გამრავლება და კონცენტრირება-----	42
2.9. ბაქტერიოფაგების გენეტიკური თვისებების შესწავლა-----	43
III. მიღებული შედეგები-----	44
1. <i>Vibrio parahaemolyticus</i> -ის გამოყოფა და ეკოლოგია-----	44
2. <i>Vibrio parahaemolyticus</i> -ის ბაქტერიების გამოვლენა პირდაპირი დეტექციის მეთოდით-- -----	48
3. ბაქტერიული შტამების ბიოლოგიური თვისებების შესწავლა-----	49
4. არაკულტივირებადი, მაგრამ სიცოცხლისუნარიანი მდგომარეობაში ( VBNC)-----	61
5. <i>Vibrio parahaemolyticus</i> -ის მიართ სპეციფიკური ბაქტერიოფაგების გამოყოფა და ეკოლოგია-----	63
6. <i>Vibrio parahaemolyticus</i> -ის მიართ სპეციფიკური ბაქტერიოფაგების დახასიათება-----	64
7. ფაგების მგრძობელობა ფიზიკური და ქიმიური ფაქტორების-----	71
8. პროტეოლიტური ფერმენტების მოქმედების შესწავლა ბაქტერიოფაგებზე-----	78
9. ბაქტერიოფაგების გენეტიკური თვისებების შესწავლა-----	78
IV. შედეგების განხილვა-----	81
V. დასკვნები-----	89
VI. გამოყენებული ლიტერატურა-----	90

## შ ე ს ა ვ ა ლ ი

საქართველოში, ისევე როგორც მსოფლიოში, ინფექციური დაავადებები, მათ შორის წყლისმიერი ინფექციები, ერთ-ერთი აქტუალური პრობლემაა. ეს დაავადებები დაბინძურებულ წყალთან სხვადასხვა სახის კონტაქტითაა გამოწვეული და მათი რისკი დღითიდღე მატულობს. ბოლო პერიოდში ჩატარებული გამოკვლევების მიხედვით გამოვლინდა საქართველოში რეკრეაციულ წყალსატევებში, კერძოდ, შავ ზღვასა და შიდა ტბებში, წყლის ხარისხის თანდათანობითი გაუარესება [90]. მზარდ ანთროპოგენურ დაბინძურებასთან ერთად მნიშვნელოვანია გლობალური დათბობის პროცესთან დაკავშირებული კლიმატის ცვლილება. კლიმატური პირობები განსაზღვრავს წყალში ავტოქტონური ორგანიზმების არსებობას, რომლებიც ინფექციური აგენტების გადატანას უზრუნველყოფენ. ამდენად, სასმელი წყლის და რეკრეაციული წყალსატევების დაბინძურება და არაადეკვატური დაცვა შესაძლოა ინფექციური აფეთქებების მიზეზი გახდეს. დაბინძურებულ წყლებში შესაძლოა გავრცელდეს წყლისმიერი ინფექციების ისეთი გამომწვევები, როგორცაა: *Salmonella spp.*, *Shigella spp.*, *Vibrio spp.*, ენტეროპათოგენური *E. coli* და სხვა ბაქტერიები, გარდა ამისა 100-ზე მეტი ტიპის პათოგენური ვირუსი, უმარტივესები და სხვა [47, 118].

საყოველთაოდ მიღებულია, რომ წყლისმიერი ინფექციური დაავადებების გავრცელების თავიდან აცილებისთვის მეტად მნიშვნელოვანია რეკრეაციულ წყალსატევებში და ზღვის სანაპირო ზოლში რეგულარული მონიტორინგის ჩატარება. ეს ღონისძიებები საშუალებას გვაძლევს გამოვლინდეს წყლისმიერი პათოგენები და დადგინდეს ინფექციის წყარო და მისი გავრცელების გზები.

ბოლო პერიოდში განსაკუთრებით იმატა ჰალოფილური ვიბრიონებით გამოწვეული ინფექციების სიხშირემ. ეს დაავადებები ძირითადად ასოცირებულია უმი და ცუდად დამუშავებული ზღვის პროდუქტების მოხმარებასთან ან წარმოადგენს დაბინძურებულ წყლებთან კონტაქტით გამოწვეულ ჭრილობით ინფექციებს. ჰალოფილური ვიბრიონები ასევე პათოგენურია ზღვის ორგანიზმებისთვის და მნიშვნელოვან ზარალს აყენებს აქვაკულტურის მეურნეობებს. არაქოლერულ ვიბრიონებს შორის *V. parahaemolyticus* ყველაზე მნიშვნელოვანი სახეობაა, რომელიც ხშირად იწვევს სერიოზულ გასტროენტერიტებს. ბაქტერიის გამოყოფა გამოყოფა ჩვეულებრივ ხდება ზღვისა და ესტუარიების წყლებიდან, მტკნარი წყლების ეკოსისტემებში მისი აღმოჩენა კი დროებითია და დამოკიდებულია ბიოლოგიურ მასპინძელზე. საშუალო და მაღალი მარილიანობა, აგრეთვე 18°C-ზე მაღალი ტემპერატურა, ოპტიმალურ პირობებს წარმოადგენს არაქოლერული ვიბრიონების ზრდისა და გამრავლებისთვის. ამ თვალსაზრისით, საქართველოში არსებული სუბტროპიკული კლიმატი და წყლიანი გარემო, განსაკუთრებით შავი ზღვის სანაპირო, ჰალოფილური ვიბრიონებისთვის ხელსაყრელ გარემოს წარმოადგენს. გარემო-კლიმატური პირობები და მათი სეზონური ცვლილებები მნიშვნელოვანწილად აისახება როგორც პათოგენური ვიბრიონების, ასევე მათი სპეციფიური ბაქტერიოფაგების გავრცელებაზე.

ბაქტერიული ვირუსები (ბაქტერიოფაგები) სიცოცხლის ყველაზე გავრცელებული ფორმებია დედამიწაზე. ბუნებრივ პირობებში ბაქტერიოფაგები მონაწილეობენ ბაქტერიული პოპულაციის რეგულაციაში [173] და პოპულაციების

გენეტიკურ მრავალფეროვნებაში, რაც გენეტიკური გაცვლის გზით ხორციელდება ბაქტერიულ შტამებს და სახეობებს შორის [173].

ბაქტერიოფაგებს დიდი მნიშვნელობა ენიჭება, როგორც ანტი-ინფექციურ აგენტებს მედიცინასა და ვეტერინარიაში. დ'ერელის მიერ ფაგის აღმოჩენიდან მალევე მოხდა მისი გამოყენება დიზენტერიის სამკურნალოდ [36]. დღეისთვის ვირულენტური ბაქტერიოფაგები განიხილება, როგორც ანტიბიოტიკების ერთ-ერთი ალტერნატიული საშუალება სხვადასხვა ეთიოლოგიის მქონე ინფექციების პრევენციისათვის და სამკურნალოდ. ფაგების მიმართ მაღალი ინტერესი განპირობებულია, ერთის მხრივ, ანტიბიოტიკების მიმართ მულტირეზისტენტული ბაქტერიული შტამების გავრცელებით, მეორეს მხრივ კი ფაგების მოქმედების მაღალი სპეციფიკურობის, ეფექტურობისა და უვნებლობის ფაქტორით [32, 36, 111, 162, 163].

ინფექციურ პათოლოგიაში ბაქტერიოფაგის გამოყენების რეკომენდაციები დაფუძნებულია იმ გამოცდილებაზე, რაც დაგროვდა მრავალი წლის მანძილზე. დღეისათვის ბაქტერიოფაგები წარმატებით გამოიყენება ჩირქოვან-ანთებითი ინფექციების, ნაწლავური ინფექციების, შარდ-სასქესო გზების ანთებითი პროცესების სამკურნალოდ.

ბაქტერიოფაგები განსხვავდება ლიზისური სპექტრის მიხედვით: სპეციფიკური ბაქტერიოფაგები, ვიწრო სპექტრის ბაქტერიოფაგები და მოქმედების ფართო სპექტრის მქონე ბაქტერიოფაგები. თითოეულ მათგანს პრაქტიკული გამოყენების თავისი არეალი აქვს. მთელ რიგ შრომებში აღწერილია ბაქტერიოფაგების გამოყენება ინდიკატორებად და ტრასერებად ბუნებრივი ღია წყალსატევების დაბინძურების ხარისხის, წყაროსა და გავრცელების გზების დადგენის მიზნით. ხანგრძლივი პრაქტიკული გამოცდილებით ნაჩვენებია, რომ ფაგური პრეპარატები ხასიათდებიან უვნებლობით და გამომწვევისადმი მაღალი სპეციფიკურობით. მათი მიღების და ტირაჟირების შედარებით დაბალი ეკონომიკური დანახარჯების გათვალისწინებით შესაძლებელია მაღალტიტრიანი, კონცენტრირებული პრეპარატების მარტივი მიღება [93].

ჰალოფილური ვიბრიონების ბაქტერიოფაგები დიდ ინტერესს იწვევს, როგორც პათოგენობის მექანიზმების შესასწავლად და შტამების დიფერენციაციისათვის, ასევე როგორც ალტერნატიული საშუალება, ამ პათოგენებით გამოწვეული დაავადებების პროფილაქტიკისა და მკურნალობისთვის.

მოცემული კვლევის ძირითად მიზანს წარმოადგენდა საქართველო წყლიან გარემოში *V.parahaemolyticus* –ის გამოყოფა და დახასიათება მის მიერ გამოწვეული ინფექციების რისკის შესფასებისა და ბიომრავალფეროვნების შესწავლის მიზნით. აგრეთვე *V.parahaemolyticus* –ის მიმართ სპეციფიკური ბაქტერიოფაგების დახასიათება მათი შემდგომი გამოყენებისთვის სამკურნალო და პრევენციული მიზნით.

აქედან გამომდინარე წარმოდგენილი კვლევის ძირითადი ამოცანები იყო:

1. საქართველოს წყლიან გარემოში ( შავი ზღვა, ლისის ტბა, კუმისის ტბა, თბილისის ზღვა) *V.parahaemolyticus* –ის გამოვლენა და შესაბამისი ბაქტერიული შტამების შეგროვება;
2. *V.parahaemolyticus* –ის შტამების იდენტიფიკაცია, დახასიათება და ბიომრავალფეროვნების შესწავლა;
3. *V.parahaemolyticus* –ის მიმართ სპეციფიკური ბაქტერიოფაგების გამოყოფა და სელექცია;

4. ფაგების მორფოლოგიისა და ბიოლოგიური თვისებების შესწავლა (მოქმედების დიაპაზონი, გამრავლების ერთჯერადი ციკლის პარამეტრები, სეროლოგიური მახასიათებლები);

5. ფაგების სტაბილურობის შესწავლა გარემოს სხვადასხვა პირობებში (ტემპერატურა, pH, ქლოროფორმი, პროტეოლიტური ფერმენტები);

6. *V. parahaemolyticus* –ის მიმართ სპეციფიკური ბაქტერიოფაგების გენეტიკური დახასიათება და მრავალფეროვნების შესწავლა.

7. *V. parahaemolyticus* –ის მიმართ სპეციფიკური ბაქტერიოფაგების შესწავლა მათ მიერ გამოწვეული ინფექციების ბიოკონტროლის მიზნით.



# I. ლიტერატურული მიმოხილვა

## 1. *Vibrio parahaemolyticus*-ის ზოგადი დახასიათება

### 1.1. ისტორიული ცნობები

1950 წელს ფუჯინომ და მისმა თანამშრომლებმა იაპონიაში, ოსაკაში, არასათანადოდ დამუშავებული ზღვის პროდუქტისგან პირველებმა გამოიყვეს *Vibrio parahaemolyticus*, როგორც კვებითი წარმოშობის გასტროენტერიტების გამომწვევი. ამ ინციდენტის შედეგად დაზარალდა 272 ადამიანი, 20- დაიღუპა. ბაქტერია გამოიყვეს აგრეთვე 1953 წელს *Proteus morganii*-თან შერეული ინფექციის დროს პაციენტების ფეკალიებიდან და ნაწლავური მასიდან. ამ დროიდან ბაქტერიას ეწოდა *Pasteurella parahaemolyticus*. 1958 წელს *V. parahaemolyticus* გამოიყვეს იოკოჰამას ჰოსპიტალში კვებითი ინფექციის მქონე პაციენტებიდან [165]. 1960 წელს ჰალოფილური, გლუკოზის ფერმენტატორი ბაქტერია - *Oceanomonas parahaemolyticus*, გამოიყვეს პაციენტებიდან და აგრეთვე ზღვის წყლის ნიმუშიდან. იაპონიის ჯანდაცვის სამინისტროს კვლევების მიხედვით, მორფოლოგიური, კულტურალური და ქიმიური მახასიათებლებით *P. parahaemolyticus* და *O. parahaemolyticus* იდენტიფიცირდა, როგორც ერთი და იგივე ორგანიზმი. 1974 წელს იაპონიაში, ტოკიოს საერთაშორისო სიმპოზიუმზე ბაქტერია მიაკუთვნეს *Vibrio*-ს გვარს როგორც სახეობა *Vibrio parahaemolyticus* [65].

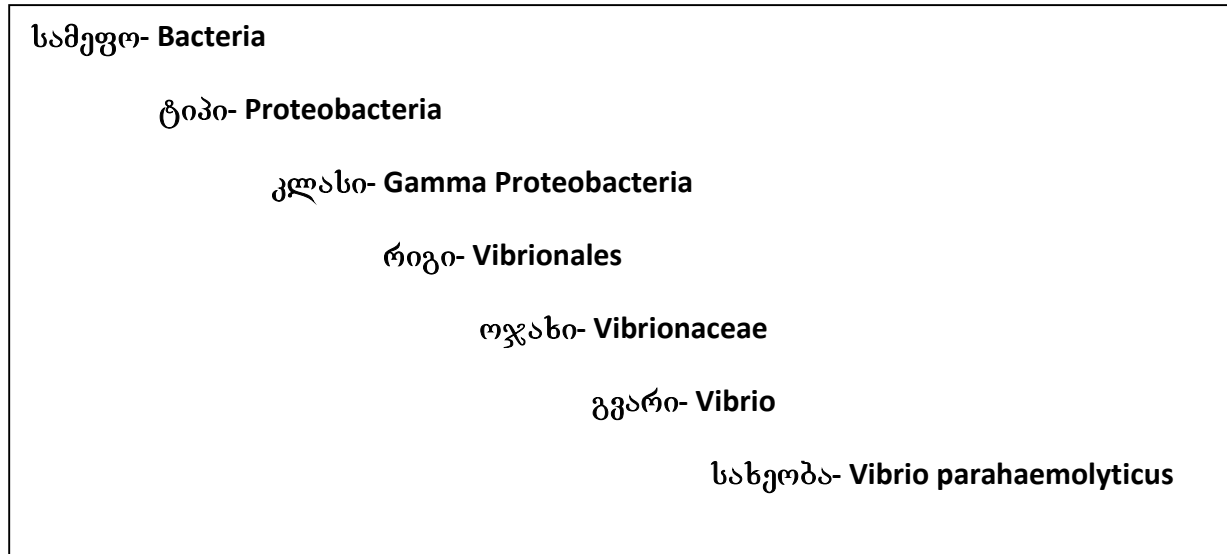
მას შემდეგ *Vibrio parahaemolyticus* გამოყოფა არაერთხელ დაუკავშირდა მსოფლიოს მრავალ ქვეყანაში გასტროენტერიტების აფეთქებებსა და ცალკეულ სპორადულ შემთხვევებს [81, 100]. ამჟამად *Vibrio parahaemolyticus* მიიჩნევა მსოფლიოში გასტროენტერიტების ერთ-ერთ მთავარ გამომწვევად [81, 94, 100]. განსხვავებით *Vibrio cholerae*-გან, რომლის მსოფლიო ორი სეროტიპია დაკავშირებული ეპიდემიებსა და პანდემიებთან, *Vibrio parahaemolyticus*-ის მიერ გამოწვეული გასტროენტერიტები ასოცირდება O და K-სეროტიპების 76 სხვადასხვა კომბინაციასთან. უკანასკნელ ათწლეულში *Vibrio parahaemolyticus*-ის რამდენიმე სპეციფიკური სეროტიპის შტამმა, რომლებიც სავარაუდოდ წარმოიშვა საერთო წინაპარი კლონისგან, გამოიწვია გასტროენტერიტების პანდემია [10, 15, 21, 40, 42, 43, 44, 45, 52, 54, 68, 73, 88, 89, 104, 137, 138, 143, 144, 171, 174].

## 1.2. *Vibrio parahaemolyticus*-ის კლასიფიკაცია და ტაქსონომია

*Vibrio parahaemolyticus* მიეკუთვნება *Proteobacteria*-ს ტიპს, *Gamma Proteobacteria*-ს კლასს, *Vibrionales* რიგს, *Vibrionaceae*-ს ოჯახს და *Vibrio*-ს გვარს [62] (სურათი 1).

ოჯახი *Vibrionaceae* პირველად აღწერილ იქნა 1965 წელს [94]. მოცემულ ოჯახი აერთიანებს ადამიანისა და ცხოველების ოპორტუნისტულ პათოგენებს [52, 166] და ასევე თავისუფლად მცხოვრებ ქემოპეტროტროფებს და ზღვის ფაუნის კომენსალებს [69, 70]. ეს არის გრამ უარყოფითი ჰალოფილური ბაქტერიები, ჩვეულებრივ მოძრავი ჩხირები, მეზოფილურები, ქემოორგანოტროფები და ახასიათებთ ფაკულტატური ფერმენტული მეტაბოლიზმი.

გვარი *Vibrio* 65 სახეობას აერთიანებს [19]. მათგან 12 სახეობა, ჩვეულებრივ, გამოიყოფა კლინიკური ნიმუშებიდან და მათ მიერ გამოწვეული დაავადებები მოიცავს დიარეებს, სეპტიცემიებს და ჭრილობით ინფექციებს [80, 94]. 12 კლინიკური სახეობიდან 11 ადამიანის დიარეულ და სხვა ნაწლავურ ინფექციებთან არის ასოცირებული. ადამიანის ვიბრიოზების უმეტესობა დაკავშირებულია გვარის სამ მნიშვნელოვან წარმომადგენელთან: *V.cholerae*, *V.parahaemolyticus* და *V.vulnificus*, რომელთაგანც ორი სახეობა (*V.parahaemolyticus* და *V.vulnificus* ) ჰალოფილებს მიეკუთვნება.



სურ.1. *V. parahaemolyticus*-ის ტაქსონომია

### 1.3. *V. parahaemolyticus* –ის უჯრედისა და კოლონიის მორფოლოგია

*V. parahaemolyticus* გრამ (-), ჩხირის ფორმის ზომა 0.5-0.8/1.4-2.6 მკმ-ია. ზრდის ოპტიმალური პირობებია 35-37°C, pH 7.5-8.0 და მარილის შემცველობა დაახლოებით 0.5 M NaCl [100]. არსებობს *V. parahaemolyticus* –ის სხვადასხვა ფენოტიპური ვარიანტები, კერძოდ, კოლონიების მორფოლოგიური ტიპები. ერთი კოლონიისგან მიღებულ უჯრედულ კულტურაში შესაძლოა იყოს გამჭვირვალობის მიხედვით განსხვავებული ორი ტიპის-გაუმჭვირვალე და გამჭვირვალე კოლონიები (OP და TR). opaR-გენის ექსპრესია კორელაციაშია გაუმჭვირვალე კოლონიების წარმოქმნასთან. ეს გენები ტრანსკრიბირდება გაუმჭვირვალე კოლონიებში (OP), მაგრამ არ გვხვდება TR-გამჭვირვალე უჯრედებში [124].

*V. parahaemolyticus* შეგუებულია სიცოცხლის სხვადასხვაგვარ სტილთან, როგორცაა: პლანქტონთან ასოცირებული, თავისუფალ მდგომარეობაში, სხვადასხვა მიკრობულ თანასახოგადობებთან ასოცირებული (ბიოფილმები), მიკროორგანიზმებთან კომენსალურ ურთიერთობაში ან პატრონ ორგანიზმთან პათოგენურ დამოკიდებულებაში. *V. parahaemolyticus*-ის უჯრედები ხასიათდება ბიოფილმების წარმოქმნის მაღალი უნარით. ბიოფილმების წარმოქმნის უნარი ქიტინ-დამოკიდებული პოლუსითა (ChiRP) და მანოზის მიმართ მგრძობიარე ჰემაგლუტინინით (MSHA) რეგულირდება [159]. *V. parahaemolyticus*-ის გამჭვირვალე და გაუმჭვირვალე კოლონიები სხვადასხვაგვარ ბიოფილმებს წარმოქმნიან [59]. გამჭვირვალე კოლონიების მიერ წარმოქმნილი ბიოფილმები მეტად ერთგვაროვანია და უჯრედები მჭიდრობაა განლაგებული, განსხვავებით გაუმჭვირვალე კოლონიებისგან წარმოქმნილი ბიოფილმისა, სადაც უჯრედებს შორის უფრო დიდი ნაპრალებია და, შესაბამისად, ბიოფილმი უფრო გამჭვირვალეა.

იმისათვის, რომ გადარჩეს ცვალებად პირობებში, *V. parahaemolyticus*-ს გააჩნია სხვადასხვა ადაპტორული მექანიზმები-შეცვალოს ქცევითი და გენეტიკური პასუხები გარემოს და ინტრაუჯრედული ფაქტორების საპასუხოდ.

*V. parahaemolyticus* –ის თავისუფლად მცხოვრები ფორმა კარგადაა შეგუებული თხიერ გარემოში მოძრაობასთან. ჩხირის ფორმის ბაქტერია შეიარაღებულია ერთი პოლარული შოლტით. ენერჯის წყარი შოლტის სამოძრაოდ Na- დამოკიდებული მექანიზმია [14]. ამ ტიპის ენერჯის წყაროს უპირატესობა აქვს ზღვის წყალში არსებობისთვის, რადგან წყლის pH დაახლოებით 8.0-ის ტოლია [108]. ამ ტიპის მოძრაობა ძალზე სწრაფია. 300 მილიმოლი NaCl –ის შემცველ არეში ბაქტერია მოძრაობს 60 მკმ/წმ სიჩქარით.

პოლარული შოლტი რთული აგებულებისაა და ორ ლოკუსში ორგანიზებული ფლაგელინის ექვსი გენით კოდირდება [124]. იგი დაფარულია შალითით, რომელიც უჯრედის გარეთა მემბრანის გაგრძელებას წარმოადგენს [7]. შალითიანი ფლაგელინის მოძრაობის ზუსტი მექანიზმი არ არის ცნობილი. სავარაუდოდ შოლტის ფილამენტები მოძრაობენ შალითის შიგნით ან შალითა და ფილამენტები მოძრაობენ, როგორც ერთი მთლიანი წარმონაქმნი [64]. შოლტი გადამწყვეტ როლს თამაშობს ბაქტერიის ზედაპირზე მიმაგრებაში. მთელმა რიგმა კვლევებმა სხვადასხვა ბაქტერიებზე აჩვენა,

რომ მოძრაობის უნარი მნიშვნელოვანია არა მხოლოდ ადსორბციის, არამედ პათოგენების თვალსაზრისითაც [148].

მყარ ზედაპირზე ან ბლანტ გარემოში ზრდა იწვევს *V.parahaemolyticus* –ის უჯრედების დიფერენცირებას კოლონიების სახით. უჯრედის გაყოფა წყდება და იზრდება სიგრძეში დაახლოებით 30 ნმ-მდე. იწყება მეორადი სამოდრო აპარატის - ლატერალური სისტემის ფორმირება, რომელიც პერიტრიქულად განლაგებული მრავალი შოლტისგან შედგება. ამ ტიპის უჯრედები ადაპტირებული არიან მყარ ზედაპირებზე და ბლანტ არეში მოძრაობასთან. პოლარული შოლტები მყარ არეზე სუსტად ვითარდება, მაშინ როდესაც, ლატერალური შოლტები ეფექტურად მოქმედებენ ამ ტიპის გარემოში. ლატერალური აპარატის მქონე უჯრედების მოძრაობის სიჩქარე მუდმივია და 25 მკმ/წმ-ს შეადგენს პოლივინილპიროლიდონის (10% PVP-360) დამატებისას. ეს არის გრძელი, დატოტვილი პოლიმერი, რომელიც ზედაპირის სიმყარეს ზრდის. ამგვარ პირობებში პოლარული შოლტის მქონე უჯრედების მოძრაობის სიშირე კლებულობს [14].

ლატერალური შოლტები არაა დაფარული შალითით და ფილამენტ ფლაგელების ერთი სუბერთეულისგან შედგება [125]. ისინი აბსოლუტურად განსხვავდებიან პოლარული შოლტებისგან. გენეტიკურმა კვლევებმა აჩვენა, რომ მათ სამოდრო აპარატებში არ გააჩნიათ საერთო სტრუქტურული კომპონენტები. შოლტით მოძრაობის სისტემას, ჩვეულებრივ, აკონტროლებს 40 გენი მაინც. ამასთან, ეს გენები ორ საკმაოდ დაცილებულ გენების ნაკრებს ეკუთვნის.

პოლარული და ლატერალური შოლტები არა მარტო სტრუქტურულად, ენერჯის წყაროს მიხედვითაც განსხვავდებიან ერთმანეთისგან. პოლარული შოლტებისგან განსხვავებით ლატერალური შოლტები სამოდროდ იყენებენ პროტონების წყაროს [14]. გარდა იმისა, რომ ზედაპირზე მიმაგრებაში მონაწილეობს, პოლარული შოლტები მოქმედებს, როგორც სენსორები. იგი წარმოიქმნება ყველა შემთხვევაში-როგორც თხიერ არეში, ასევე ზედაპირთან ასოცირებული ზრდის პირობებში.

გარემოში რაიმე სახის სტრეს-ფაქტორის არსებობის საპასუხოდ (მაგ. არახელსაყრელი ტემპერატურა, ჟანგბადის ნაკლებობა, ოსმოსური სტრესი) ბაქტერიის კოლონიის წარმომქმნელი ერთეულების რაოდენობა კლებულობს- *V.parahaemolyticus* –ის უჯრედები გადადის სიცოცხლისუნარიან, მაგრამ არაკულტივირებად- VBNC-მდგომარეობაში. VBNC-მდგომარეობაში გადასვლისას ადგილი აქვს მთელ რიგ მეტაბოლურ ცვლილებებს-მცირდება საკვები ნივთიერებებზე მოთხოვნილება, სუნთქვის ინტენსივობა, მაკრომოლეკულების სინთეზი. VBNC-მდგომარეობაში მყოფი ბაქტერიები არ იზრდებიან მიკრობულ საკვებ არეზე, სადაც ჩვეულებრივ წარმოქმნიან კოლონიებს, მაგრამ უჯრედები ცოცხალია და აქვთ მეტაბოლური აქტივობის განახლების უნარი [145].

#### 14. *V.parahaemolyticus*-ის კულტივირება და ბიოქიმიური იდენტიფიკაცია

*Vibrio*-ების გამოყოფისა და კულტივირებისთვის გამოიყენება სპეციფიკური TCBS-აგარი (Thiosulfate-Citrate-Bile-Sucrose). სხვა ნიადაგებს შორის ის მაღალი შერჩევითობით ხასიათდება. საფუარის ექსტრაქტი და პეპტონი წარმოადგენს აზოტის და ვიტამინების წყაროს; ნატრიუმის ციტრატი, ნატრიუმის თიოსულფატი და ნაღვლის მარილები განაპირობებენ ტუტე pH –ს გრამ-დადებითი ორგანიზმების დასათრგუნად და კოლიფორმების რიცხვის შესამცირებლად. საქაროზა განიცდის ფერმენტაციას, ხოლო ნატრიუმის ქლორიდი ასტიმულირებს მიკრობთა ზრდას. საქაროზა -დადებითი შტამები, ჩვეულებრივ იძლევა ყვითელი ფერის, ხოლო საქაროზა-უარყოფითები-მწვანე ფერის კოლონიებს.

სახეობის დონეზე *Vibrio*-ების ბიოქიმიური იდენტიფიკაციის ყველაზე გავრცელებული სქემა [8] განკუთვნილია გრამ-უარყოფითი, ფაკულტატური ანაერობი ბაქტერიებისთვის, რომლებიც TCBS-აგარზე იზრდებიან. იგი მოიცავს 28 ტესტს, რომელთაგან მაქსიმუმ 10 საკმარისია ყველაზე რთული იდენტიფიკაციისთვისაც კი. მათ შორის არის ლიზინ- და ორნიტინ- დეკარბოქსილაზების და არგინინ დეჰიდროლაზას, სხვადასხვა ნახშირწყლების ფერმენტაციის და მარილის სხვადასხვა კონცენტრაციაზე ზრდის უნარის ტესტები.

*V.parahaemolyticus*-ის ბიოქიმიური იდენტიფიკაცია შედარებით რთულია წყლიდან და ზღვის პროდუქტებიდან გამოყოფილი შტამების შემთხვევაში. ასეთ შემთხვევებში ნიმუშები შეიცავს *Vibrio*-ს მონათესავე სახეობებს და სხვა ანალოგიური ბიოქიმიური თვისებების მქონე ბაქტერიებს [98].

#### 15. *Vibrio parahaemolyticus*-ის გენომი

ერთ-ერთი კლინიკური შტამის სეკვენირების მაგალითზე ჩატარებულ იქნა *Vibrio parahaemolyticus*-ის გენომის ანალიზი [117]. დადგინდა, რომ გენომი წარმოდგენილია ორი წრიული ქრომოსომით [176]. სიცოცხლისა და ზრდისთვის აუცილებელი გენების უმეტესობა, ასევე რიბოსომული ცილების მაკოდირებელი გენები და ტ-რნმ-ის გენის მინიმუმ 1 ასლი მოთავსებულია პირველ ქრომოსომაში, რომელიც ზომით აღემატება მეორე ქრომოსომას. თუმცა მეორე ქრომოსომაში მოთავსებულია მეტაბოლიზმის პროცესის მაკოდირებელი გენები და, ამდენად, ვერ ვიტყვით, რომ ის არ არის ჩართული სასიცოცხლო თვისებების და ზრდის პროცესების კონტროლში. როგორც აღმოჩნდა, მეორე ქრომოსომა პირველ ქრომოსომაზე მეტადაა ჩართული ტრანსკრიფციულ და ნივთიერებათა ტრანსპორტის რეგულაციის პროცესებში. *V.cholerae*-სა და *V.parahaemolyticus*-ის გენომების შედარებამ აჩვენა, რომ პირველი ქრომოსომები თითქმის არ განსხვავდება ზომაში, მაშინ როდესაც, მეორე ქრომოსომა *V.parahaemolyticus*-ის შემთხვევაში არის გაცილებით დიდი. ეს ფაქტი შესაძლოა დაკავშირებული იყოს ევოლუციის მანძილზე

*V.parahaemolyticus*-ის გენომში ზოგიერთი გენის უფრო მეტ დუბლიკაციასთან ან გენების ჰორიზონტალურ ტრანსფერთან ან, პირიქით, *V.cholerae*-ს შემთხვევაში დელეციის მეტი პროცესით. *V.parahaemolyticus*-ის მეორე ქრომოსომაში გვხვდება რამდენიმე სახის მობილური ელემენტი, როგორცაა მაგალითად, ტრანსპოზონები, ბაქტერიოფაგები ან გ+ც შემცველი თანმიმდევრობები (რაც გენების ლატენტურ ტრანსფერზე მიგვანიშნებს.). ამით შეგვიძლია დავასკვნათ, რომ უცხო დნმ-ის ჰორიზონტალური გადატანა არ არის *V.cholerae*-სა და *V.parahaemolyticus*-ის გენომების ზომაში განსხვავების ძირითადი ფაქტორი [66].

## 1.6. *V. parahaemolyticus*-ის ვირულენტობის ფაქტორები

*V. parahaemolyticus*-ის ვირულენტობის ფაქტორები მოიცავს: ჰემოლიზინებს, ვირულენტობის გენებს, მესამე ტიპის სეკრეციულ სისტემას (TTSSs), კოლონიზაციის ფაქტორებს და მემბრანულ პროტეინებს.

**ჰემოლიზინები.** 1968 წელს ვაგაცუმამ შექმნა ახალი სისხლიანი ნიადაგი, რომლითაც განსაზღვრავდნენ *Vibrio parahaemolyticus*-ის ჰემოლიზურ თვისებებს და ამგვარად, შტამები დაიყო ორ ჯგუფად: ჰემოლიზურ და არაჰემოლიზურ შტამებად [100, 134]. ღიარეიანი პაციენტების ფეკალური მასალიდან გამოყოფილი შტამები, ჩვეულებრივ, ჰემოლიზურია, ხოლო საკვებიდან გამოყოფილი შტამები- არაჰემოლიზური. საკაზაკის მიერ მრავალრიცხოვან იზოლატებზე ჩატარებულმა ექსპერიმენტებმა (1968) აჩვენა, რომ ამ ორგანიზმების უნარი, მოახდინონ ჰემოლიზი ვაგაცუმა-აგარზე- რაც ცნობილია კანაგავას ფენომენის სახელწოდებით-მჭიდროდაა დაკავშირებული გასტროინტესტინალური დაავადებების გამოწვევასთან [121].

კანაგავას ფენომენის ასახსნელად ჩატარებულმა მრავალრიცხოვანმა ექსპერიმენტებმა საბოლოო ჯამში მეცნიერები მიიყვანა პირდაპირი თერმოსტაბილური ჰემოლიზინის ( პოჰ TDH) აღმოჩენამდე [81]. გვიან 1970-იან წლებში ჰემოლიზინი გამოიყო, გასუფთავდა და დადგინდა, რომ იგი წარმოადგენს ჰომოდიმერული სტრუქტურის ცილას. ჰემოლიზინი წარმოადგენს ენტეროტოქსინს და ამჟღავნებს სხვადასხვა ბიოლოგიურ აქტივობას [60, 81, 86, 155] , მაგ. იწვევს სხვადასხვა ცხოველური წარმოშობის სისხლის წითელი უჯრედების ლიზისს. ის აგრეთვე ციტოტოქსიურია სხვადასხვა კულტივირებული უჯრედების მიმართ [81].

1988 წელს ჰონდამ და თანაავტორებმა აღმოაჩინეს, რომ კანაგავა-უარყოფითი კლინიკური იზოლატები, რომლებიც გამოყოფილ იქნა მალდიველი მოგზაურებისგან, შეიცავდა სხვა ტოქსინს და მას უწოდეს თერმოსტაბილურ ჰემოლიზინთან მონათესავე ჰემოლიზინი(TRH) [83]. მოცემული ტოქსინის ამინომჟავური თანმიმდევრობა 67%-ით ემთხვევა თერმოსტაბილურ ჰემოლიზინის ამინომჟავურ თანმიმდევრობას და ახასიათებს მსგავსი ბიოლოგიური თვისებები [81]. ზემოთხსენებული ტოქსინების მაკოდირებელი გენების კლონების მიღებამ შესაძლო გახადა მათი არსებობის შემოწმება კლინიკურ და გარემოდან გამოყოფილ იზოლატებში [53, 81, 139, 147, 164] . დადგინდა, რომ უმრავლეს კლინიკურ იზოლატებს აქვთ tdh-გენი, თუმცა მოცემული გენი გვხვდება ზოგიერთ გარემოდან გამოყოფილ იზოლატშიც. trh-დადებითი შტამების უმრავლესობა გარემოდანაა გამოყოფილი ( ზღვის წყლიდან და ზღვის

პროდუქტებიდან) და უმრავლესობა პათოგენური შტამებია. დამტკიცებულია, რომ ეს ორი გენი *Vibrio parahaemolyticus*-ის ძირითადი ვირულენტობის ფაქტორებია, რადგან მათ არმქონე მუტანტებში ენტეროტოქსიური თვისებები დაქვეითებულია.

**მესამე ტიპის სეკრეციული სისტემა.** *V.parahaemolyticus*-ის პათოგენობასთან დაკავშირებული ყველაზე მნიშვნელოვანი აღმოჩენა იყო მის გენომში მესამე ტიპის სეკრეციის სისტემასთან დაკავშირებული გენთა ორი ნაკრების აღმოჩენა [117]. ეს იყო პირველი შემთხვევა, როდესაც *Vibrio*-ს გვარის წარმომადგენელში აღმოჩნდა ამ ტიპის სეკრეციული სისტემა. მესამე ტიპის სეკრეციული სისტემა არის გრამ უარყოფითი ბაქტერიებისთვის დამახასიათებელი აპარატი, რომელიც მონაწილეობს ვირულენტობის ფაქტორი ცილების გამოყოფასა და ტრანსლოკაციაში ეუკარიოტული უჯრედის ციტოზოლში [85]. მსგავსი ტიპის სეკრეციული სისტემა დამახასიათებელია იმ ბაქტერიული პათოგენებისთვის, რომლებიც იწვევენ დაავადებებს ეუკარიოტულ უჯრედებთან პირდაპირი კონტაქტით, ასეთებია: *Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia*, მცენარეთა პათოგენები.

იმის განსასაზღვრად, არის თუ არა *V.parahaemolyticus*-ის მესამე ტიპის სეკრეციული სისტემის გენების ორი ნაკრები ფუნქციონირებადი, შეიქმნა მუტანტური შტამები, რომელთაც *tdh*-ის ორივე გენი ჰქონდათ ამოჭრილი გენომიდან. ჩვეულებრივ, *V.parahaemolyticus*-ს შეუძლია ეუკარიოტული უჯრედების სწრაფად მოკვლა (დაახლოებით 5 საათში). მოცემული კვლევა კი მიმართული იყო იმის დასადგენად, ახდენს თუ არა გავლენას TTSS1 და TTSS2 - გენების ამოჭრა მოცემული ბაქტერიის ციტოტოქსიურ ეფექტზე. დადგინდა, რომ TTSS1 მონაწილეობს ციტოტოქსიურ აქტივობებში, მაშინ როცა TTSS2 არ მონაწილეობს ამ პროცესებში.

მეორე ძალზედ მნიშვნელოვანი კვლევა დაკავშირებული იყო მესამე ტიპის სეკრეციული სისტემის გენების- TTSS1 და TTSS2 -ის ენტეროტოქსიურობასთან კავშირის დადგენასთან, რომელიც აგრეთვე მუტანტური შტამების გამოყენებით ჩატარდა ბოცვრის ქსოვილების მაგალითზე [168]. აღმოჩნდა, რომ პათოგენობისგან განსხვავებით ენტეროტოქსიურობის თვისება დაკავშირებულია TTSS2-გენთან და არა- TTSS1-თან. დამტკიცდა აგრეთვე ისიც, რომ TTSS1 და TTSS2- გენები აკონტროლებს სხვადასხვა, არამონათესავე ცილების სეკრეციას. TTSS2- სისტიემა სპეციფიკურად დაკავშირებულია კანაგავა დადებით კლინიკურ იზოლატებთან და არა გარემოდან გამოყოფილ იზოლატებთან [117], რაც კიდევ ერთხელ ადასტურებს მის მონაწილეობას შტამების პათოგენური თვისებების ჩამოყალიბებაში. სხვადასხვა შტამებში TTSS2- გენების თანაარსებობა *tdh*-გენებთან, რომლებიც ვირულენტობის მთავარ ფაქტორს წარმოადგენენ [81], კიდევ ერთი საბუთია იმის, რომ მოცემული სისტემა პათოგენობის მექანიზმებშია ჩართული. განსხვავებით TTSS2-გან TTSS1 გეხვდება ნებისმიერ იზოლატში, განურჩევლად იმისა კლინიკური წარმოშობისაა თუ გარემოდან არის გამოყოფილი. აქედან გამომდინარე ზუსტი პასუხი იმაზე, არის თუ არა იგი პათოგენობაზე პასუხისმგებელი არ არსებობს [149]. თუმცა არსებობს ვერსია, რომ შესაძლოა იგი აქტიურია მხოლოდ TTSS2-თან თანაარსებობის პირობებში [29].

ის ფაქტი, რომ *V.parahaemolyticus* შეიცავს TTSS- სისტიემას, რომელიც არაა დამახასიათებელი *V.cholerae*-თვის, მეტყველებს იმაზე, რომ ინფექციის მექანიზმები ამ ორი პათოგენისთვის არის არამონათესავე. *V.parahaemolyticus* იწვევს ანთებით

დიარეასთან ასოცირებულ გასტროენტერიტებს, მაშინ როდესაც, *V.cholerae*-ს ინფექცია სეკრეციულ დიარეასთანაა დაკავშირებული [23, 52].

### 1.7. *V. parahaemolyticus*-ის იზოლატების სეროლოგიური თვისებების შესწავლა

ადრეულ სეროლოგიურ კვლევებში [165, 169] ვიბრიოს იზოლატები დაყოფილი იყო სეროტიპებად, მაგრამ ვიბრიო-სპეციფიკური ანტიგენები არ იყო იდენტიფიცირებული. მოგვიანებით, საკაზაკიმ [157]. აღწერა თერმოსტაბილური სომატური O- ანტიგენი, თერმოლაბილური კაფსულარული K-ანტიგენი და ფლაგელარული H-ანტიგენი. ომორიმ და თანაავტორებმა [146]. გასუფთავებული K-ანტიგენის იმუნოქიმიურ კვლევაში აჩვენეს, რომ ანტიგენური მასალა ძლებდა 100°C-ზე გახურებისას 2 საათის განმავლობაში, მაგრამ თერმული დამუშავების შედეგად სცილდებოდა უჯრედის ზედაპირს. საკაზაკიმ მოახდინა *V. parahaemolyticus*-ის შტამების კლასიფიცირება 10 O- ანტიგენის და 32 K-ანტიგენის მიხედვით. მისი აზრით რუტინულად მხოლოდ K-ანტიგენის ტიპირება ხდება, რადგან O- ანტიგენის განსაზღვრა გახანგრძლივებული პროცესია და K-ანტიგენი სპეციფიკურია თითოეული O- ჯგუფისთვის. თუმცა ბაქტერიული იზოლატების მნიშვნელოვანი ნაწილი, გამოყოფილი თევზებიდან და ზღვის წყლიდან [6, 12, 140, 158 ], ისევე როგორც კლინიკური წყაროებიდან [75, , 133, 161] არ ავლუტინირდებოდა K-ანტიგენით. შედეგად მრავალი ახალი O- და K-ანტიგენი იქნა აღმოჩენილი [75, 158 ], ზოგიერთი კი გამოირიცხა [110 ]. ანტიგენური სქემა, რომელიც ითვალისწინებს ამ ცვლილებებს, აღწერილ იქნა ზენ-იოჯის და თანაავტორთა მიერ და მოიცავს 12 O- ანტიგენს და 48 K-ანტიგენს. თანამედროვე სქემის მიხედვით არსებობს 75 სეროვარიანტი 13 O- ანტიგენის და 71 K-ანტიგენის სხვადასხვა კომბინაციების მიხედვით. თუმცა ვიბრიონების საკმაოდ მზარდ რიცხვს მოცემული სქემა ზუსტად არ მიესადაგება, რაც კვლევის ამ მიმართულებით გაგრძელების აუცილებლობაზე მიანიშნებს [168].

### 1.8. *Vibrio parahaemolyticus*-ით გამოწვეული ინფექციები და მათი ეპიდემიოლოგია

*Vibrio parahaemolyticus*-ის გასტროენტერიტებისათვის დამახასიათებელი ძირითადი სიმპტომებია დიარეა (წყლიანი, ლორწოვანი, სისხლიანი ან სისხლიან-ლორწოვანი) და აბდომინალური ტკივილი; აგრეთვე ცხელება, პირღებინება და ზოგადი სისუსტე, შესაძლოა თან სდევდეს გაუწყლოვება და კოლაფსი. ინფექცია თვითდასრულებადია და, როგორც წესი, გრძელდება 2-10 დღე. დაავადების ერთ-ერთი გართულება უკავშირდება კარდიო-ვასკულარულ სისტემას. იმუნოდეფიციტურ პირებში შესაძლოა სისტემური ინფექციების, მაგ. სეფსისის განვითარება.

ინფექციის ძირითადად წყაროს წარმოადგენს დაუმუშავებელი ან ცუდად დამუშავებული ზღვის პროდუქტები. *Vibrio cholerae*-ს მიერ გამოწვეული ინფექციისგან



განსხვავებით, რომელიც ჩვეულებრივ სიდარბესა და ცუდ სანიტარულ პირობებს უკავშირდება, *Vibrio parahaemolyticus*-ის ინფექცია ხშირია აგრეთვე კარგი სოციო-ეკონომიკური პირობების მქონე ქვეყნებში, სადაც ზღვის პროდუქტები კვების მრეწველობის წამყვანი კომპონენტია [52].

*Vibrio parahaemolyticus* ფართოდაა გავრცელებული ესტუარიებში, ზღვებში და სანაპირო წყლებში მთელ მსოფლიოში [16, 52, 100, 170] და წარმოადგენს ინფექციებისა და გარემოს დაბინძურების წყაროს ჩრდილოეთ ამერიკაში, აფრიკაში და ხმელთაშუა ზღვის სანაპიროზე. წყლის ტემპერატურა, მარილიანობა, ზოოპლანქტონის შემცველობა და გახსნილი ჟანგბადის რაოდენობა გავლენას ახდენს პათოგენის სივრცესა და დროში გავრცელებაზე [102]. წყლის ტემპერატურის მნიშვნელობაზე ინფექციის ეპიდემიოლოგიაში მიუთითებს ის ფაქტი, რომ უმეტესი აფეთქებები სწორედ თბილი თვეების დროს იჩენს თავს [167].

დაავადებებს, რომელთა გამომწვევია *Vibrio*-ს გვარის ერთი რომელიმე კონკრეტული სახეობა ან რამდენიმე სახეობის გამომწვევთა ერთობლიობა, მოიხსენიებენ ვიბრიოზებად. ზოგადად, ვიბრიოზების სამკურნალოდ რეკომენდირებულია დიდი რაოდენობით სითხის მიღება ან ინტრავენურად გადასხმა, ასევე დამატებით შესაძლებელია ანტიბიოტიკებით (ტეტრაციკლინი, დოქსიციკლინი, აგრეთვე ცეფტაზიდინი) მკურნალობა /პროფილაქტიკა.

## 19. *Vibrio parahaemolyticus* -ის ეკოლოგია

ჰალოფილური ვიბრიონები უმეტესად გვხვდება წყლიან გარემოში-ესტუარიებში, ზღვის სანაპირო წყლებში, აგრეთვე სხვა წყალსატევებში, რომლებიც საირიგაციო წყლებით, ჩამდინარე წყლებით და ნიადაგის სასუქების ჩანარეცხებით ბინძურდება. ჰალოფილური სახეობები გავრცელებულია ძირითადად ზღვებში და მარილიან წყალსაცავებში, თუმცა მათი ნახვა შეიძლება აგრეთვე მტკნარ წყლებში.

წყლიან გარემოში *V.parahaemolyticus* -ის გავრცელების სიხშირეზე გავლენას ახდენს სხვადასხვა ეკოლოგიური ფაქტორები. ასეთი ფაქტორებია ტემპერატურული ცვლილებები, წყლის მარილიანობა, გახსნილი ნაწილაკების რაოდენობა და სიმღვრივე, ქლოროფილი *a* –ს რაოდენობა და ა.შ.

წყლის ტემპერატურასა და *V.parahaemolyticus*-ს შორის ურთიერთკავშირის არსებობა განსაზღვრავს ბაქტერიის გავრცელების გეოგრაფიულ არეალს ამერიკაში. ევროპასა და აზიაში [87]. ტემპერატურა მნიშვნელოვან გავლენას ახდენს, ზოგადად, *vibrio*-ების სიხშირეზე, თუმცა პირდაპირი კავშირი ტემპერატურასა და პათოგენური *V.parahaemolyticus*-ის სიხშირეს შორის არ არსებობს. კვლევებმა აჩვენა, რომ პათოგენური *V.parahaemolyticus*-ის რაოდენობა საერთო რაოდენობასთან შედარებით მაღალია დაბალი ტემპერატურის პირობებში. ამგვარად, პათოგენური იზოლატები ტემპერატურის ცვლილებაზე განსხვავებულად რეაგირებენ. დადასტურებულია აგრეთვე გარემო ფაქტორების გავლენა სელიმენტებში *vibrio*-ების გავრცელებაზე. კერძოდ, კანეკო და კოლველი [102] აღნიშნავენ ზამთრის თვეებში სელიმენტებში *vibrio spp.*-ბაქტერიების სასიცოცხლო ციკლზე ტემპერატურის გავლენას. ერთ-ერთი ახალი კვლევის შედეგების მიხედვით [56], მოცემული ბაქტერია სელიმენტებში გვხვდება

ხანგრძლივი დროის განმავლობაში, ზამთრის თვეებშიც კი, თუმცა წლის განმავლობაში მათი გამოყოფა სედიმენტებიდან არ ხდება.

წყლის სიმღვრივე, თუმცა ნაკლებად მნიშვნელოვან ეკოლოგიურ ფაქტორად მიიჩნევა, ხშირად დაკავშირებულია საკვები ნივთიერებების (ორგანული სუბსტრატის) დიდი რაოდენობით შემცველობასთან, რაც თავის მხრივ ბაქტერიების ზრდას და სედიმენტებზე მათ მიმაგრებას ასტიმულირებს და, ამასთან, მზის გამოსხივების განაწილებას უშლის ხელს [22, 99]. ბლექველმა და ოლივერმა გამოავლინეს ტემპერატურისა და სიმღვრივის გავლენა *V. parahaemolyticus*-ის ბაქტერიების სიხშირეზე და გამორიცხეს მარილიანობის, როგორც ეკოლოგიური ფაქტორის, როლი მოცემული მახვენებლის ფორმირებაში.

სხვა კვლევების მიხედვით დამოკიდებულება მარილიანობასა და ვიბრიონების სიხშირეს შორის არახაზობრივია და მარილიანობის მახვენებელი ცვალებადობს საკმაოდ დიდ ფარგლებში. თუმცა არსებობს საწინააღმდეგო მოსაზრებაც, უკანასკნელი კვლევების მიხედვით, მარილიანობა გაცილებით დიდ გავლენას ახდენს, ვიდრე ტემპერატურა. არსებითი კავშირი წყლის მარილიანობასა და *V. parahaemolyticus*-ის რაოდენობას შორის სედიმენტებში, შეიძლება დავუკავშიროთ მარილიანობის პირდაპირ გავლენას ან მტკნარ და სხვადასხვა წყლების ჩადინებას. რაც უფრო მაღალია წყლის მარილიანობა, მით ნაკლებად მნიშვნელოვანია მტკნარი წყლის დინებები და მით ნაკლები იქნება მათი გავლენა. ამასთან მაღალი მარილიანობა განაპირობებს ბაქტერიების უკეთეს სედიმენტაციას. წყლის მარილიანობის დადებითი გავლენა ვიბრიონების გავრცელებაზე ვლინდება, ძირითადად, მაშინ, როცა მარილიანობის მახვენებლები ვარირებს ფართო საზღვრებში და ნიმუშების რაოდენობა არის საკმარისად დიდი [54, 120].

ქლოროფილი *a*, ტემპერატურის მსგავსად, სხვადასხვაგვარ დამოკიდებულებაშია პათოგენური და, ზოგადად, *V. parahaemolyticus* –ის იზოლატების საერთო სიხშირესთან. ქლოროფილის მომატებული მნიშვნელობა მიჩნეულია ქოლერის ეპიდემიის წინაპირობად [46]. შესაძლოა არსებობდეს კავშირი ქლოროფიდ *a* –ს, ფიტოპლანქტონს და ზოოპლანქტონს შორის. *Vibrio*–ს სახეობებზე ზოოპლანქტონის არსებობისა და სიხშირის გავლენა ნახვენები იყო უფრო ადრინდელ შრომებში. ქლოროფილი *a*– ს გავლენა არ უკავშირდება ფიტოპლანქტონის რომელიმე სახეობის ყვავილობას, არამედ მთლიანობაში ფიტოპლანქტონს ან მას ზოოპლანქტონთან ერთობლიობაში.

კვლევებმა აჩვენა, რომ *V. parahaemolyticus* –ის რაოდენობა წყლიან გარემოში ზღვის სხვადასხვა ორგანიზმების, თევზების, მოლუსკების, ღრუბელების, სხვადასხვა ზოოპლანქტონის რაოდენობაზეა დამოკიდებული [48]. სედიმენტებში და წყლის სხვადასხვა ორგანიზმებში [97], *Vibrio spp.* ბაქტერიები ძირითადად გვხვდება ზომიერ და სუბტროპიკულ წყლებში, მათი რაოდენობა წყალში კორელაციაში მოდის წყლის ტემპერატურასთან, ზამთრის თვეებში ისინი უმეტესწილად გვხვდება სედიმენტებში [13]. გაზაფხულის დადგომისას, როცა ტემპერატურა არის 13-15<sup>0</sup> C, სედიმენტებში გამოზამთრებული ვიბრიონები იწყებენ გამოთავისუფლებას და ზოოპლანქტონზე მიმაგრებას, ტემპერატურის მატებასთან ერთად კი გამრავლებასაც [95]. პლანქტონთან ასოცირებული ვიბრიონები გამოვლენილ იქნა წყლის ნიმუშებში, რომელთა ტემპერატურა იყო 19<sup>0</sup> C. ზოოპლანქტონზე არსებული ბაქტერიების რაოდენობა დამოკიდებულია აგრეთვე ტემპერატურაზე, ძირითადად თავმოყრილია ზედაპირებზე და არის სპეციფიკური, განსხვავებულია სედიმენტებში ნაპოვნი პოპულაციისაგან

[102]. გარემო სტრესების საპასუხოდ ვიბრიონები ხშირად წარმოქმნიან ბიოფილმებს კიბოსნაირთა და ზღვის სხვა ორგანიზმთა ეგზოსკელეტონთან ასოციაციაში. ამგვარ ასოციაციაში ბაქტერიებს შეუძლიათ რეზისტენტულნი იყვნენ ანტიბიოტიკების მიმართ და ხელსაყრელი ურთიერთობა დაამყარონ სხვა ბაქტერიებთან ან მასპინძელთან [48].

**სიცოცხლისუნარიანი, მაგრამ არაკულტივირებადი მდგომარეობა (VBNC).** დაახლოებით 30 სხვადასხვა გვარის ბაქტერიას აქვს უნარი არახელსაყრელი პირობების დროს (ტემპერატურის, ჟანგბადის შემცველობის ან ოსმოსური წნევის ცვლილება, საკვების დეფიციტი) გადავიდეს სიცოცხლისუნარიან, მაგრამ არაკულტივირებად (VBNC) მდგომარეობაში. ამ ორგანიზმებს მიეკუთვნებიან ისეთი ბაქტერიები, როგორიცაა: *Escherichia coli*, *Pseudomonas fluorescens*, *Salmonella typhimurium* და *Vibrio spp.* ზოგადად, VBNC უჯრედები ხასიათდება უჯრედის ზომის შემცირებით, ღნმ-ის, რნმ-ის და ცილის სინთეზის შემცირებით [145]. ამასთან იცვლება უჯრედების ლიპიდური პროფილიც-სავარაუდოდ მემბრანის თხევადი სტრუქტურის შენარჩუნების გამო ტემპერატურის კლების დროს [120; 145]. იმისათვის, რომ მოცემული მდგომარეობა ჩაითვალოს ფიზიოლოგიურ, „თავის გადამრჩენ“ მექანიზმად, VBNC უჯრედებს უნდა შეეძლოთ ამ მდგომარეობიდან უკან დაბრუნება ისე, რომ შესაძლო იყოს სტანდარტული მიკრობიოლოგიური მექანიზმებით მათი ხელახალი გამოვლენა.

*V.parahaemolyticus*-ისთვის დამახასიათებელი სეზონური ვარიაბელობა- ის რომ უფრო ხშირად ითვლება ზაფხულის თვეებში, ვიდრე ცივ თვეებში [44; 102], აგრეთვე *V.parahaemolyticus* -ის ინფექციების მაღალი სიხშირე აპრილი-ოქტომბრის პერიოდში [52]. სხვადასხვა ავტორთა მიერ აიხსნება ტემპერატურისა და საკვების ნაკლებობის დროს *V. parahaemolyticus* -ის VBNC-მდგომარეობაში გადასვლით [96]. ამ მდგომარეობაში გადასვლისას კულტივირებადი უჯრედების რაოდენობა მცირდება მანამ, სანამ არ გახდება არაკულტივირებადი სტანდარტული მიკრობიოლოგიური მეთოდების გამოყენებით. თუმცა ამ არაკულტივირებად უჯრედთა მნიშვნელოვანი პოპულაცია იბრუნებს ცხოველყოფელობის უნარს [145].

VBNC- მდგომარეობაში გადასვლა სხვადასხვა შემზღუდველ ფაქტორს შეიძლება უკავშირდებოდეს, მაგრამ უჯრედული მდგომარეობის დინამიკა დამოკიდებულია თითოეულის ინტენსივობაზე. დაბალი ტემპერატურის ან დაბალი მარილიანობის გავლენა *V. parahaemolyticus*-ზე კულტივირების უნარიის დაკარგვას იწვევს. უჯრედების ფიზიოლოგიურმა მდგომარეობამ აჩვენა, რომ არაკულტივირებადი უჯრედები ინარჩუნებენ რესპირაციულ და მემბრანულ მთლიანობას. მათ მიიჩნევენ სიცოცხლის უნარიან, მაგრამ არაკულტივირებად უჯრედებად (VBNC) [47; 145].

მარილიანობის დეფიციტით გამოწვეული სტრესი ზამთრის პერიოდში იწვევს *V. parahaemolyticus*-ის VBNC-მდგომარეობაში გადასვლას, მაშინ როდესაც, ზაფხულის თვეებში მცირე რაოდენობით უჯრედები კულტივირების უნარს ინარჩუნებენ. სიცივისგან გამოწვეულმა სტრესმა, ნაწილობრივ, შესაძლოა უჯრედები დაიცვას მარილიანობის დეფიციტით განპირობებული სტრესისგან, საშუალება მისცეს რა, გადავიდნენ VBNC მდგომარეობაში. ის რომ ერთი სახის სტრესი დამცველობით როლს თამაშობს მეორენაირი სტრესისგან უჯრედების გადასარჩენად, ძველ კვლევებშიც იქნა ნაჩვენები [52].

## 2. ბაქტერიოფაგები

### 2.1. კლასიფიკაცია და ტაქსონომია

ბაქტერიული ვირუსები ანუ ბაქტერიოფაგები ცოცხალი სამყაროს ერთ-ერთ ყველაზე მრავალფეროვან ჯგუფს წარმოადგენენ. მათი გავრცელების არეალი ფართოა. მათი ნახვა შესაძლებელია ჰაერში, წყალსა და ნიადაგში, აგრეთვე ცხოველური ორგანიზმების, მათ შორის ადამიანის, სხეულის სხვადასხვა ღრუებსა და ნაწლავებში. ბაქტერიოფაგების აღმოჩენა მე-20 საუკუნის ერთ-ერთი უმნიშვნელოვანესი მოვლენა იყო, რომელიც ორი მეცნიერის, ბრიტანელი ფ.ტუორტის (1915 წ.) და კანადელი მეცნიერის ფ.დერელის (1917წ.) სახელებს უკავშირდება. სახელწოდება ბაქტერიოფაგი პირველად ფ.დერელმა უწოდა დიზენტერიის გამომწვევი მიკრობის საწინააღმდეგო ვირუსს. აღსანიშნავია აგრეთვე ქართველი მეცნიერის, გიორგი ელიაშვილის, დამსახურება, რომელმაც 1917 წელს მტკვრის წყალში ვიბრიონის აღმოჩენასთან ერთად აღწერა ბაქტერიოფაგის ფენომენი [33].

ბაქტერიოფაგების პირველი კლასიფიკაცია [112] ეფუძნებოდა პატრონი ბაქტერიული უჯრედების ტიპებს და მათ მიერ გამოწვეული დაავადებების სიმპტომებს. 1962 წელს ლვოვის, ჰორნის და ტუნიერის კლასიფიკაციას საფუძვლად დაედო ვირიონის მორფოლოგია, კერძოდ, ნუკლეინის მუხავის ტიპი, კაფსიდის ფორმა და კაფსომერების რაოდენობა [5, 33, 112]. ეს სქემა მოგვიანებით ცნობილი იყო LHT-სისტემის სახელწოდებით, რომლის შემადგენლობაშიც შედიოდა X174 და ორი კუდიანი ფაგი.

მოგვიანებით, პრაქტიკულმა აუცილებლობამ მეცნიერები მიიყვანა იმ დასკვნამდე, რომ ბაქტერიოფაგების კლასიფიკაციას საფუძვლად უნდა დაედოს მორფოტიპი და გენეტიკური თვისებები.

მორფოტიპების მიხედვით ცნობილია ბრედლის და ა. ტიხონენკოს კლასიფიკაციის სქემები. ბრედლის კლასიფიკაციის მიხედვით ფაგები დაიყო 6 ჯგუფად: ფაგები კუმშვადი წანაზარდით, მოკლე წანაზარდიანი ფაგები, კუბური ფორმის ფაგები, ერთბაფიანი დნმ-ის შემცველი, რნმ-ის შემცველი და ძაფისებური (ფილამენტური) ფაგები.

აკერძანა კლასიფიკაციის დახუსტებისათვის შემოიღო მორფოლოგიური ქვეტიპები, 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.

1) კუდიანი (2 ჯაჭვიანი დნმ-ით) ფაგების ტიპი შედგება 3 ოჯახისაგან: I - მიოვირიდე; II- სიფოვირიდე; III- პოდოვირიდე [5, 28]

მორფოლოგიური კრიტერიუმში აუცილებელია, მაგრამ არასაკმარისია, რადგან არსებობენ მორფოლოგიურად იდენტური ფაგები, რომელთაც მასპინძლის განსხვავებული სპექტრი აქვთ და პირიქით.

თანამედროვე კლასიფიკაციის მიხედვით (1992 ICTV) ბაქტერიოფაგები გაერთიანებულია *Caudovirales* კლასის 13 ოჯახში და 31 გვარში. კლასიფიკაცია დამყარებულია შემდეგ კრიტერიუმებზე:

1) ვირიონის ულტრასტრუქტურა: ბინალური სიმეტრიის (წანაზარდიანი), კუბური, ჰელიკალური (სპირალური), ფილამენტური ან პლეომორფული

- 2) ნუკლეინის მუცის ტიპი
- 3) შემადგენლობა და ანტიგენური თვისებები
- 4) მოლეკულური მასა
- 5) პატრონ-უჯრედების წრე

ელექტრონული მიკროსკოპით გამოკვლეულ 5100 ბაქტერიოფაგს შორის 4950 (96%) წანაზარდიანი( კუდიანი) ფაგებია. ისინი მიეკუთვნებიან 3 დიდ ფილოგენეტიკურ ოჯახს.

1) *Myoviridae*- ფაგები გრძელი კუმშვადი წანაზარდით. ამ ოჯახში შედის წანაზარდიანი ფაგების 25%.

2) *Siphoviridae*- ფაგები გრძელი, მოქნილი კუდით, რომლის შაღითაც არ გააჩნია შეკუმშვის უნარი. ამ ოჯახს მიეკუთვნება კუდიანი ფაგების 61% [5]. ტიპური წარმომადგენლებია: T1, T5, L5, ფაგები და სხვა. ოჯახი მოიცავს 6 გვარს.

3) *Podoviridae*- მოკლე წანაზარდიანი ფაგებია. ტიპური წარმომადგენლები არიან: P22, T7 ფაგები და სხვა. ამ ოჯახში გაერთიანებულია 3 გვარის, კუდიანი ფაგების 14 %.

წანაზარდიან ფაგებს გააჩნიათ იკოსაედრის ან ოქტაედრის ფორმის თავი. აგი შედგება თავის, კუდის და ფაგულტატური სტრუქტურებისგან, როგორცაა თავის ან კუდის ფიბრილები, საყელო, ბაზალური ფირფიტა, ტერმინალური ბოლოები. კაფსიდში მოთავსებულია სუპერსპირალიზებული ორბაფიანი დნმ. წანაზარდიანი ფაგები შესაძლოა იყოს ვირულენტური ან- ზომიერი (50%-50%) [33].

ზემოთ ჩამოთვლილი სამი ოჯახიდან დიდი ზომის კაფსიდით და დნმ-ის მაღალი შემცველობით ხასიათდება *Myoviridae*, ხოლო *Podoviridae* და *Siphoviridae*, ამ მახასიათებლებით უფრო ახლო მსგავსებას ავლენენ [33].

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 არქებაქტერიები. 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 მსგავსას საიტსპეციფიკურ რეკომბინაციებს, ხოლო T4 ლითიური ბაქტერიული ვირუსია. მათი გენომის ზომები ვარირებს 30000 ნწ-დან 17000 ნწ-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-დნმ ჰომოლოგიის მქონე რძემუაგური სტრეპტოკოკური ფაგები განსხვავდებოდნენ მხოლოდ საყელოს მორფოლოგიური შენებით.

ამგვარად, 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, რომელთაგან თითოეული

აკონტროლებს გარკვეულ ფუნქციას და დაკავშირებულია სხვა მოდულებთან განსაზღვრული თანმიმდევრობით (რომელიც დამახასიათებელია მოცემული ოჯახის ფაგებისათვის) [25].

## 2.2. ბაქტერიოფაგების ბიოლოგია

ბაქტერიოფაგის ურთიერთქმედება ბაქტერიულ უჯრედთან მკაცრად სპეციფიკურია, ანუ ბაქტერიულ ვირუსებს აქვთ უნარი მოახდინონ მხოლოდ გარკვეული სახეობის ბაქტერიების ინფიცირება [33, 76, 112]. ბაქტერიოფაგის და უჯრედის ურთიერთობის მიხედვით ფაგები შეიძლება დაიყოს 3 ტიპად, კერძოდ:

ჭეშმარიტად ვირულენტური ფაგები, ზომიერი ფაგები და 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 სინქარე

ბაქტერიოფაგები, რომლებიც იწვევენ პროდუცირულ ინფექციას და ფაგის სიცოცხლისუნარიან შთამომავლობას გვაძლევენ, იწოდებიან არადეფექტურ ფაგებად. ყველა არადეფექტური ფაგისათვის ცნობილია 2 ან 3 მდგომარეობა: 1) არაუჯრედული (თავისუფალი, მომწიფებული ფაგის მდგომარეობა); 2) ვეგეტაციური ფაგი და 3) ზომიერი ფაგისათვის არსებობს კიდევ პროფაგის მდგომარეობა [113].

### 2.2.1. ვირულენტური ბაქტერიოფაგების სასიცოცხლო ციკლი

განვითარების ლიზისური ციკლი იწყება ფაგის ბაქტერიულ უჯრედზე ადსორბციით [33, 76]. 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 სპეციფიურ წარმონაქმნებს ე.წ. პილებს. ადსორბციის პროცესი, მისი კინეტიკა სხვადასხვა ფაგის შემთხვევაში განსხვავებულია. ადსორბციის სისშირე ხშირად დამოკიდებულია მრავალ გარემო ფაქტორზე და მასპინძელი მიკრობის ფიზიოლოგიურ მდგომარეობაზე. მაგალითად, λ რეცეპტორების ექსპრესია ხდება მხოლოდ მალტოზის შაქრის თანაარსებობისას [113]. 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. ფაგების უმეტესობისთვის ადსორბციის პროცესი შეუქცევადია, რომელიც უჯრედში ფაგის გენომის ექვეყნით მთავრდება.

ბაქტერიოფაგის გენომი კუდის გავლით შედის უჯრედში. ეს პროცესი არ განიხილება როგორც დნმ-ის მარტივი ინექცია, არამედ ამ პროცესში ჩართულია დნმ-ის ტრანსფერის რამდენიმე მექანიზმი [113]. 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 [33, 113].

ნაჩვენებია, რომ შესაძლებელია ზოგიერთი ფაგისათვის ექვეცდის 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 [91, 92].

ხშირად ფაგის აღსორბციული აპარატის მოქმედებით ხდება უჯრედის მემბრანული შეღწევადობის პოტენციალის ცვლილება. ამ დროს შეიძლება დაირღვეს უჯრედის ბიოქიმიური აქტივობა, რომლის თავიდან ასაცილებლად ფაგს გააჩნია გენები, რომლებიც ახორციელებენ ინფიცირებული უჯრედის მემბრანის მთლიანობის და დაურღვევლობის კონტროლს [105].

უჯრედში ფაგის დნმ-ის ინჟექციის შემდეგ საწყის საფეხურს წარმოადგენს მასპინძელი უჯრედის რნმ-პოლიმერაზას მიერ ფაგის პრომოტორის შეცნობა და ადრეული გენების ტრანსკრიფცია [105]. ამ გენების პროდუქტები იცავენ ფაგურ დნმ-ს და ახდენენ მასპინძელი უჯრედის რესტრუქტურის ახალი 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 ასაწობ სტრუქტურებს. ახალი ფაგების თავმოყრას უჯრედში ეწოდება ფაგის მომწიფება. ფაგის დნმ-ის ინჟექციიდან ფაგების ახალი შთამომავლობის გამოთავისუფლებამდე დროის ინტერვალს ეწოდება ლატენტური პერიოდი [112]. ლატენტური პერიოდი დამოკიდებულია მასპინძლის ფიზიოლოგიაზე და მერყეობს 20 წთ-დან 30-40 წთ-მდე.

ფაგის სასიცოცხლო ციკლის საბოლოო საფეხური, რომელიც მოჰყვება ბაქტერიოფაგით ინფექციას, არის ფაგის ახალი თაობის გამოთავისუფლება და მასპინძელი უჯრედის ლიზისი [113, 123]. კუდიან ბაქტერიოფაგებს ამგვარ პროცესში სჭირდებათ ფაგით კოდირებული ორი ცილის მოქმედება. პირველი არის ე.წ. ჰოლინინი, პატარა ტრანსმემბრანული პროტეინი, რომელიც წარმოშობს მცირე ზომის დაზიანებებს ციტოპლაზმურ მემბრანაში. ეს დაზიანებები ფორების ფუნქციას ასრულებს და აძლევენ საშუალებას განთავისუფლდეს მეორე ცილა – ენზიმი-ლიზინი, რომელსაც აქვს პეპტიდოგლიკანის ჰიდროლიზის უნარი. სხვადასხვა ფაგის შვილეულ პოპულაციებში ვირიონების რაოდენობა მეტ-ნაკლებად მუდმივია და იწოდება, როგორც ფაგის გამოსავლიანობა, ანუ ფაგის გამოსავალი.

ვირულენტური ფაგი შესაძლებელია აღმოჩნდეს ე.წ. ფსევდოლიზოგენურ მდგომარეობაში, რომელსაც ზოგჯერ მატარებლობას უწოდებენ [113]. 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 ენერგია იმისთვის, რომ ფაგმა განახორციელოს თავისი სასიცოცხლო ციკლი და ფაგის გენომი მასპინძელი უჯდერის შიგნით არის არააქტიურ მდგომარეობაში.

## 2.2.2. ზომიერი ბაქტერიოფაგების სასიცოცხლო 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 [33, 112]. 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 [33, 112].

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 [33, 112]. შემდგომში ნახეს, რომ ეს უჯრედები მრავლდებოდნენ ფაგის პროდუქციის გარეშე, თუმცა გარკვეულ შემთხვევაში მათ შეამჩნიეს უჯრედის სპონტანური ლიზისი და არეში თავისუფალი ფაგი. ლვოფმა ფაგის უჯდერშიდა მდგომარეობას პროფაგი უწოდა და მოგვიანებით აჩვენა, რომ ლიზოგენური უჯრედის ულტრაიისფერი დასხივებით ადგილი ჰქონდა პროფაგის ლიტიური ზრდის ინიციაციას და შედეგად ფაგის ინდუქციას [112].

ლიზოგენიის მოვლენას ხშირად თან ახლავს ე.წ. ლიზოგენური კონვერსია, რომლის დროსაც აღინიშნება ვირუსული დნმ-ით გამოწვეული ბაქტერიული უჯრედის გენეტიკური თვისებების ცვლილება [38, 61]. ლიზოგენურ ფაგებს უნარი აქვთ გადაიტანონ მასპინძელი უჯრედის გენები ერთი ბაქტერიიდან მეორეში (ტრანსდუქცია) [34, 112]. 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 [112].

ფაგების როლი ბუნებაში, როგორც გენების ჰორიზონტალურად გადამტანებისა, საკმაოდ დიდია, განსაკუთრებით ბაქტერიების ევოლუციის თვალსაზრისით [34]. 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 წარმოადგენს და მონაწილეობს 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 [96].

### 2.3. ბაქტერიოფაგების გამოყენება თერაპიული მიზნით (ფაგოთერაპია)

დ' ერელლე-ს მიერ ფაგის აღმოჩენიდან მალევე დაიწყო მისი გამოყენება დიზენტერიის სამკურნალოდ. სწორედ ეს იყო ფაგის პირველადი თერაპიული გამოყენება [36]. მოცემული კვლევა მიმდინარეობდა პარიზში 1919 წელს. პირველი ექსპერიმენტები საკმაოდ ეფექტური აღმოჩნდა, თუმცა წარმატებული შედეგები მაშინვე არ გამოქვეყნებულა, უფრო მეტიც, პირველი ანგარიში, სადაც მითითებულია ფაგოთერაპიის წარმატებული შემთხვევა, გამოიცა 1921 წელს, როცა ფაგი გამოიყენეს კანის სტაფილოკოკური დაავადების სამკურნალოდ [36]. 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.

დ' ერელლე-ს ლაბორატორია უშვებდა 5 სამკურნალო კომერციულ პრეპარატს სხვადასხვა ბაქტერიული ინფექციების სამკურნალოდ [4]. სამკურნალო ფაგების წარმოება ასევე მიმდინარეობდა ამერიკის შეერთებულ შტატებშიც. ეს პრეპარატები გამოიყენებოდა ისეთი ინფექციების სამკურნალოდ, როგორცაა აბსცესები, ჭრილობები, ვაგინიტები, ქრონიკული ინფექციები, ზედა რესპირატორული ტრაქტის ინფექციები და ა.შ. მაგრამ ანტიბიოტიკების ერთად აღვილად ჩაანაცვლა ფაგოთერაპია, განსაკუთრებით დასავლეთ ევროპაში. თუმცა ფაგების გამოყენება სამკურნალო მიზნით გაგრძელდა აღმოსავლეთ ევროპაში და ყოფილ საბჭოთა კავშირის ქვეყნებში [36, 55, 84, 111, 114, 123]. ერთ-ერთი მნიშვნელოვანი ინსტიტუტი, რომელიც აქტიურად იყო ჩართული ფაგების კვლევასა და წარმოებაში, იყო გ. ელიავას სახელობის ბაქტერიოფაგის, მიკრობიოლოგიისა და ვირუსოლოგიის ინსტიტუტი.

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 [32, 84, 114, 128, 162, 163].

## 2.4. 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.

**ფაგის ერთჯერადი გამრავლების ციკლი.** ფაგის ერთჯერადი გამრავლების დროს უნდა იქნეს უზრუნველყოფილი ფაგის განვითარების დაწყება ერთდროულად ინფიცირებული ბაქტერიების უჯრედების უმრავლესობაში. ამის მიღწევა შეიძლება სხვადასხვა მეთოდით. ფაგები, რომლებიც კარგად აღსორბირდება, თხევად არეში მაქსიმალურ აღსორბციას აღწევენ დაახლოებით 5წთ-ის განმავლობაში.

ერთჯერადი გამრავლების ციკლი მოიცავს განვითარების თითოეული პერიოდის ხანგრძლივობას. ფაგის უჯრედშიდა გამრავლების პროცესს ყოფენ 3 პერიოდად: ეკლიპსი (ფარული პერიოდი), ლატენტური პერიოდი და ლიზისის დრო. ფარულ პერიოდში (დრო ინფექციის დაწყებიდან ანუ ფაგის გენომის ბაქტერიაში შეღწევიდან პირველი მომწიფებული ფაგური ნაწილაკის წარმოქმნამდე) ხორციელდება უჯრედშიდა განვითარების ყველა ეტაპი, რომელიც ფაგის მომწიფებისათვის არის აუცილებელი. ფარული და ლატენტური პერიოდების ხანგრძლივობა ერთ-ერთი შედარებით მდგრადი 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, რადგან მათზე მოქმედებს გარემო არის ბევრი ფაქტორი და სხვა.

**ნეგატიური კოლონიის მორფოლოგია (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 სიდიდე, სიმღვრივე, ორეოლის არსებობა, მისი ფორმა და ზომა, ოპალესენციის უნარი და სხვა. თუმცა, მხოლოდ ნეგატიური კოლონიების შედარებით არ შეიძლება შეფასდეს ფაგების მსგავსება, მაგრამ თუ ორი ფაგის ნეგატიური კოლონია ერთმანეთისაგან განსხვავდება, ეს ფაგები არ შეიძლება იდენტურნი იყვნენ.

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

ა) აღებულ იქნეს პოტენციური მასპინძლების ფართო ჯგუფი და აგრეთვე მათი სხვა ნათესაური სახეობების ბაქტერიები;

ბ) აუცილებლად უნდა შემოწმდეს ფაგის აქტივობა სხვადასხვა მუტანტურ შტამებზე, რომლებიც სხვა ფაგების მიმართ რეზისტენტულნი არიან;

გ) სადაც შესაძლებელია, დადგინდეს, თუ რატომ არ არის ფაგი აქტიური ამა თუ იმ შტამის მიმართ; მისი განვითარების რომელი პერიოდის დათრგუნვა ხდება მასპინძელ უჯრედში (აღსორბცია, უჯრედშიდა გამრავლება) [5, 41].

**ანტიფაგური შრატის გამოყენება ბაქტერიოფაგების იდენტიფიკაციისათვის.** სპეციფიკური ანტიფაგური შრატები ერთ-ერთი უმთავრესი საშუალებაა ფაგების იდენტიფიკაციისა და კლასიფიკაციისათვის. ანტიფაგური შრატების მომზადების მეთოდი მარტივია, თუმცა საკმაოდ შრომატევადი, 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 გამოყოფილ იქნა 2 ფაგი, რომელთაც აქვთ ერთნაირი მგრძობელობა ანტიფაგური შრატის მიმართ, მაგრამ განსხვავდებიან ლიზისური აქტივობის სპექტრით, მიუთითებს, რომ გვიან აღმოჩენილი ფაგი, წარმოადგენს პირველი ფაგის მუტანტს (გაფართოვებული ლიზისური სპექტრით). სხვადასხვა მაჩვენებლების მიხედვით მსგავსი ფაგები შეიძლება აღმოჩნდნენ სხვადასხვა სეროტიპებშიც.

**ფაგური ნაწილაკების ფიზიკო-ქიმიური თვისებები.** ფაგის ვირიონის მორფოლოგიური პარამეტრები, რომლებიც შეისწავლება ელექტრონული მიკროსკოპიის საშუალებით, არის ფაგის ერთ-ერთი მნიშვნელოვანი დამახასიათებელი თვისებებურება, მაგრამ არა გადამწყვეტი.

ბაქტერიოფაგების დახასიათებისათვის მეტად მნიშვნელოვან მაჩვენებლებს წარმოადგენს სხვადასხვა ფიზიკურ-ქიმიური ფაქტორების მოქმედება, როგორცაა: ქლოროფორმის და სხვა ორგანული გამხსნელების მოქმედება, თერმონაქტივაცია, UV გამოსხივება, არის სხვადასხვა pH და მრავალი სხვა.

## 2.5. *Vibrio parahaemolyticus*-ის მიმართ სპეციფიკური ბაქტერიოფაგები

*Vibrio*-ს გვარის მიმართ სპეციფიკური ბაქტერიოფაგები პირველად იდენტიფიცირებულ იქნა დერელის მიერ 1926 წელს და 1950 წლისთვის აღწერილ იქნა *V.cholerae*-ს მიმართ სპეციფიკური რამდენიმე ბაქტერიოფაგი. *V.cholerae*-ს ბაქტერიოფაგების შესახებ კვლევებს გადახედა პოლიტზერმა. 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 გავრცელებასთან და 1960-იან წლებში EL.TOR-ის ბიოტიპის აღმოჩენასთან ერთად. ამჟამად კვლევებს უკვე ორი მიმართულება მიენიჭა, ერთის მხრივ ფაგოტიპირების სქემის შექმნა ლითიური ფაგების და მეორეს მხრივ, კლასიფიკაციის- 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 მორფოლოგიურად საინტერესო ვირუსებს. ზოგიერთი ფაგი ახლოს დგას სხვა გრამ (-) ბაქტერიათა ფაგებთან, რაც შესაძლოა მათ ფილოგენეზურ ნათესაობაზეც მიანიშნებდეს.

ბაქტერიოფაგები, რომლებიც გვხვდება ოკეანეებში, მოქმედებენ მასპინძელი ბაქტერიის წინააღმდეგ და მნიშვნელოვან გავლენას ახდენენ ზღვის ბაქტერიების სიხშირესა და მრავალფეროვნების ჩამოყალიბებაზე [30, 173]. ბაქტერიოფაგები გარკვეულ როლს თამაშობს დიარეულ აფეთქებებში, რომლის მიზეზიც არის ზღვის სხვადასხვა მიკროორგანიზმი, მათ შორის *Vibrio parahaemolyticus*-იც. ბაქტერიოფაგების ყველაზე მნიშვნელოვანი როლია ბაქტერიების კონცენტრაციის შემცირება მათი პირდაპირი მოკვლის გზით [26]. გარდა ამისა ისინი შესაძლოა მონაწილეობდნენ ლიზოგენურ გარდაქმნებში და გენების ლატენტურ გადატანაში [31]. ბაქტერიოფაგებს, რომლებიც წამყვან როლს თამაშობენ ბაქტერიული გენომის მრავალფეროვნებაში, შეუძლიათ წარმოქმნან მოცემული შტამების სხვადასხვა ვარიანტები.

ზღვის ბაქტერიოფაგების გენომის სეკვენირებამ აჩვენა, რომ მათი უმრავლესობის ათვლის ჩარჩო ნაკლებად გავს გენების ბანკში არსებულ უკვე შესწავლილ სხვა გენომებს. უნიკალური ათვლის ჩარჩოების ასეთი მაღალი პროცენტული მაჩვენებელი განასხვავებს მათ კარგად შესწავლილი ფაგებისგან (კოლიფაგები და სტრეპტოკოკური ფაგები), რომელთა გენების 80% ადრე გამოყოფილი ფაგების გენების ჰომოლოგიურია. თუმცა ვიბრიოფაგი HSIC (მასპინძელი ბაქტერია *Listonella pelagia*) შეიცავს ათვლის ჩარჩოს, რომელიც სხვადასხვა ბაქტერიების მიმართ სპეციფიკური ფაგების ათვლის ჩარჩოების მსგავსია: მაგ. *Streptococcus pyogenes*-ის და *Yersinia pestis*-ის პროფაგების და *Bordetella pertussis*-ის, *Bordetella bronchioseptica*-ს და *Cyanobacter*-ის ბაქტერიოფაგების.

ზღვის ბაქტერიოფაგების თითქმის 1/3, რომელთა სეკვენირებაც დღემდე გაკეთებულა, ვიბრიოფაგებია. მრავალი მათგანი განსაზღვრავს მასპინძლის პათოგენურ თვისებებს, მაგ. როგორც ტოქსინ-ასოცირებული გენები. ზოგიერთი მათგანი ლიზოგენურ ან ფსევდოლიზოგენურ ურთიერთობაშია თავის მასპინძელთან.

ხშირ შემთხვევაში მორფოლოგიურად განსხვავებული ფაგები გენომის ორგანიზაციით მსგავსია და ემსგავსებიან Siphoviridae-ს ზომიერ წარმომადგენლებს. ვიბრიოფაგების 4 სხვადასხვა Myoviridae-ს წარმომადგენლის გენომის შედარებითა ანალიზმა აჩვენა [150], რომ გენომის სტრუქტურით ყველა მათგანი გავდა Siphoviridae-ს ზომიერ ფაგებს. მათ გააჩნიათ გარკვეულწილად კონსერვატიული ორგანიზაციის გენომი, თუნდაც მხოლოდ იმ კლასტერის მიხედვით, რომელიც ვირიონის შემადგენელ პროტეინებს აკოდირებს [150]. ათვლის ჩარჩოთა გარკვეული ნაწილი მოცემული ფაგებისთვის ერთნაირია. გარდა ამისა გენომში დაცულია შემდეგი თანმიმდევრობა: ტერმინაზა, სტრუქტურული, კაფსიდის და კუდის ცილების გენები. შესწავლილი ოთხივე ფაგი უფრო მეტად გავდა Siphoviridae-ს ზომიერ ფაგებს, ვიდრე ვირულენტურ Myoviridae-ს.

*V. parahaemolyticus*-ის მიმართ სპეციფიკური ბაქტერიოფაგები წყლიდან პირველად გამოყვეს 1996 წელს ნაკანიში და თანაავტორებმა. ეს იყო სამი განსხვავებული ბაქტერიოფაგი, რომლებიც გამოყოფილ იქნა ზღვის წყლიდან, ადამიანთა ფეკალიებიდან და ლიზოგენური შტამიდან, რომელიც აღმოჩნდა ძალზედ განსხვავებული ნეგატიური კოლონიის მორფოლოგიის მიხედვით. ამას მოჰყვა

ბაროშისა და თანაავტორების მიერ ზღვის ნიმუშებიდან სხვა ბაქტერიოფაგების გამოყოფა. დღეისათვის ცნობილია ბაქტერიოფაგები, რომლებიც აინფიცირებენ და კლავენ *V. parahaemolyticus* სხვადასხვა შტამებს, მაგრამ ლიტიური ფაგი პანდემური შტამის წინააღმდეგ არ არის ცნობილი. ცნობილია *V. parahaemolyticus*-ის ფაგების სიხშირე ზღვის ცხოველებში [17], და გენეტიკური მრავალფეროვნება ოსტერებსა და ზღვის წყალში [49, 50].

ვიბრიოფაგები ზოოპლანქტონისა და წყლის ნიმუშებში გვხვდება კონცენტრაციით  $10^4$  ვირუსი სმ<sup>3</sup> -ში. *V. parahaemolyticus*-ის ფაგების დიდი ნაწილი საკმაოდ დეტალურადაა დახასიათებული. მათი უმრავლესობა მიეკუთვნება სიფოვირიდებს, რაოდენობრივად მათ მოსდევთ პოდოვირიდეს ოჯახის წარმომადგენლები. VpV262 ბაქტერიოფაგი, რომლის გენომი შედგება 46012 ნუკლეოტიდური წყვილისაგან, სავარაუდოდ, არის T7-ბაქტერიოფაგის შორეული ნათესავი [74]. სრულადაა განსაზღვრული აგრეთვე T4-მსგავსი, ფართო სპექტრის მქონე ვიბრიოფაგის KVP40-ის გენომი [132]. *V. parahaemolyticus*-ის ყველა ბაქტერიოფაგი, გარდა ინოვირიდეს ოჯახის რამდენიმე ფილამენტური ფაგისა, მიეკუთვნება კუდიან ფაგებს: მიოვირიდეს, სიფოვირიდეს ან პოდოვირიდეს ოჯახიდან. ეს ფაგები, ძირითადად, სახეობა-სპეციფიკური, ხანდახან კი შტამ-სპეციფიკურია, თუმცა ზოგიერთი მათგანი ამჟღავნებს მოქმედების შედარებით ფართო სპექტრს ვიბრიოს და მონათესავე გვარის ფოტობაქტერიუმის წინააღმდეგ [122]. *V. parahaemolyticus*-ის მიმართ სპეციფიკური ბაქტერიოფაგების გამოყენება შესაძლოა აგრეთვე შტამების ტიპირებისთვის; თუმცა ჩვეულებრივ მათი გამოყენება ამ მიზნით არც ისე ხშირია ნაკლები სპეციფიკურობის გამო. ზომიერი ფაგები *V. parahaemolyticus*-ის წინააღმდეგ გამოყოფილია მიტომიცინ C -ს და ულტრაიისფერი სხივების საშუალებით [106, 142]. ერთ-ერთი კვლევის თანახმად *V. parahaemolyticus*-ის იზოლატების 10% შეიცავს ლიზოგენურ ფაგს [136]. აღმოჩნდა, რომ ზომიერი ფაგი ინოვირიდეს ოჯახიდან- f237 ჩართულია უმრავლესი პანდემური შტამების გენომში orf8-ათვის ჩარჩოს სახით და ითვლება პანდემური შტამების მარკერად [88, 138]. ორი სხვა, მოგვიანებით გამოყოფილი ზომიერი ფაგი მიოვირიდეს ოჯახიდან მიაკუთვნეს ფაგების სრულიად ახალ - ტელომერულ ჯგუფს. ამ ფაგთაგან ერთ-ერთი აძლიერებს ლიზოგენური მასპირტლის ულტრაიისფერი სხივების მიმართ მგრძობიანობას და შესაძლოა ამით მნიშვნელოვნად ამცირებდეს პანდემური შტამის ოკეანეში გადარჩენისა და გამრავლების უნარს. ბოლო წლებში ჩატარებული ერთ-ერთი კვლევის შედეგად, აღმოჩნდა, რომ არსებობს *V. parahaemolyticus*-ის მიმართ სპეციფიკური ფაგების გარკვეული ჯგუფი, რომლებიც მრავლდებიან პანდემურ შტამებში ყოველგვარი ზიანის მოტანის გარეშე და შესაძლოა მათი კო-კულტივირება მასპინძელთან ერთად, ლიზოგენიზაციის გამოწვევის გარეშე [150].

მნიშვნელოვანია *V. parahaemolyticus*-ის მიმართ სპეციფიკური ფაგების განსაკუთრებული ჯგუფი- ეს არის ფილამენტური ფაგები- ბაქტერიოფაგების ჯგუფი, რომელიც ხასიათდება ჩხირის ან ფილამენტის ფორმით, ჩვეულებრივ ერთჯაჭვიან დნმ-ს შეიცავს და ძირითადად, გრამ-უარყოფით ბაქტერიებს აინფიცირებს.

ფილამენტური ფაგები ორ კლასად იყოფა. პირველ კლასს მიეკუთვნება *Escherichia coli* -ის ფაგები M13, fd, f1, If1 და Ike. მეორე კლასში კი შედიან Pf1 და Pf3,

რომლებიც აინფიცირებს *Pseudomonas aeruginosa*-ს, აგრეთვე *Xanthomonas oryzae*-ის ფაგი Xf. როგორც წესი მათი დნმ ერთჯაჭვიანი და წრიულია, მაგრამ შეუძლიათ იარსებონ ინფიცირებულ უჯრედში ორჯაჭვიანი დნმ-ის მსგავსად, რომელიც შეიძლება გამოიყოს ექსტრაქრომოსომული პლაზმიდის სახით. ზოგიერთ მათგანს შეუძლია ინტეგრირება ქრომოსომულ დნმ-ში. ინფიცირებული ბაქტერია საკმაოდ ხანგრძლივი პერიოდის განმავლობაში აგრძელებს ფაგური ნაწილაკების წარმოქმნას ლიზისის გარეშე. ამგვარად, ლოგიკურია დავასკვნათ, რომ ისინი მნიშვნელოვან როლს თამაშობენ გენების ჰორიზონტალურ გადატანაში მსგავსად ლამბდა ფაგისა, რომელიც ვეროციტოტოქსინის გენს ატარებს.

*Vibrio 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, რეპლიცირებას პლაზმიდის სახით. ვინაიდან *ctxAB* CTX ფაგის სტრუქტურის ნაწილია, მას შეუძლია *ctxAB*-ს ჰორიზონტალურად გადატანა *V. cholerae*-ს ტოქსიგენურიდან არატოქსიგენურ შტამებზე. ფილამენტური ბაქტერიოფაგები VSK, fs1 და fs2 გამოყოფილია *V. cholerae* O139-დან. VSK-ს შეუძლია ქრომოსომაში ინტეგრირება და ლიზოგენის წარმოქმნა.

*V. parahaemolyticus*-ის ფილამენტური ფაგების Vf12-ის და Vf33-ის მაგალითზე სწავლობდნენ კავშირს კანაგავა ფენომენსა და ფილამენტური ფაგის შემცველობას შორის. ეს არის დაახლოებით 1,400 ნმ სიგრძის და 7 ნმ სიგანის ფაგები, ერთჯაჭვიანი, წრიული დნმ-ით, რომლის ზომა დაახლოებით 8.4 კბ-ია. თუმცა ექსტრაქრომოსომული ელემენტების ქონასა და კანაგავა ფენომენს შორის პირდაპირი კავშირი ვერ მოინახა, დადგინდა, რომ Vf12 და Vf33 ფაგების გენომებს შეუძლიათ ურთიერთქმედება მასპინძელი უჯრედის პლაზმიდური და ქრომოსომული წარმოშობის დნმ-ებთან და შესაძლოა გარკვეული როლი ითამაშონ *V. parahaemolyticus*-ის ფილამენტური ფაგის პათოგენობის გენების დინამიკურ მობილიზაციაში [40].

მოგვიანებით დადგინდა, რომ *V. parahaemolyticus*-ის O3:K6 სეროტიპის შტამებთან ასოცირებულია f237-ბაქტერიოფაგი, რომელსაც გარკვეული გენები და გენომური სტრუქტურა *V. cholerae*-ს CTX-ფილამენტური ფაგის ანალოგიური აქვს. *ctxAB*-ის სანაცვლოდ f237-ბაქტერიოფაგს აქვს უნიკალური ათვლის ჩარჩო - ORF8, რომელსაც არ გააჩნია ჰომოლოგი დნმ-ის სხვა თანმიმდევრობებთან.

კვლევამ აჩვენა, რომ მოცემული f237-ბაქტერიოფაგი არა მხოლოდ O3:K6 სეროტიპის შტამებთან არის ასოცირებული, არამედ *V. parahaemolyticus* –ის სხვა სეროვარებთანაც, როგორცაა მაგალითად, O4:K68 და O1:KUT. O3:K6 –მონათესავე შტამების უმრავლესობა აღმოჩნდა ORF8-დადებითი. ჰიბრიდიზაციული კვლევებით დადასტურდა, რომ f237 ინტეგრირებულია ბაქტერიულ ქრომოსომაში. ამგვარი ფენოტიპი შესაძლოა, ორგანიზმს იცავს გარკვეული გარემო სტრესისგან, სანამ ის დააინფიცირებს ადამიანს. მეორეს მხრივ კი- f237-ის, როგორც ზრდადი პანდემური პოტენციალის მქონე კომპონენტის როლი *V. parahaemolyticus* –ის შტამებში, შემდგომ შესწავლას საჭიროებს [88].

## II. მასალები და მეთოდები

### 1. საკვლევი მასალა

წყლის სინჯები: პირველად საკვლევ მასალად ბაქტერიებისა და ბაქტერიოფაგების გამოყოფის მიზნით ვიყენებდით წყლის სინჯებს. სინჯებს ვიღებდით საქართველოს მტკნარი წყალსატევებიდან (ლისის და კუმისის ტბები, თბილისის ზღვა) და შავი ზღვის სხვადასხვა წერტილებიდან (მდ.სუფსის შესართავი, მდ.ჭოროხის შესართავი, მწვანე კონცხის სანაპირო ზოლი და ბათუმის ბულვარი).

ბაქტერიული შტამები: სტანდარტული შტამი ATCC # 17802 კვლევის პროცესში საქართველოს წყლიანი გარემოდან 2006-2008 წლებში გამოყოფილი *Vibrio parahaemolyticus*-ის 199 ბაქტერიული შტამი. მოცემული შტამები ინახება გ. ელიავას სახელობის ბაქტერიოფაგის, მიკრობიოლოგიისა და ვირუსოლოგიის ინსტიტუტში.

ბაქტერიოფაგები: კვლევის ფარგლებში გამოყოფილი *V. parahaemolyticus*-ის მიმართ სპეციფიკური 30 ბაქტერიოფაგი .

ანტიბიოტიკები: ამპიცილინი, ცეფაზოლინი, სულფამიდი, ფურაზოლიდონი, კანამიცილინი, პოლიმიქსინი B, დოქსიციკლინი, ტრიმეტოპრიმი, ტეტრაციკლინი, ქლორამფენიკოლი, ერითრომიცილინი, იმიპენემი, გენტამიცილინი, სტრეპტომიცილინი, ციპროფლოქსაცინი ( მწარმოებველები: Sigma, Liophilchem )

ბუფერული სისტემები და ქიმიური რეაქტივები:

- ფაგური ბუფერი – 50mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 22mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 85mM NaCl, 12mM MgSO<sub>4</sub>, 11mM CaCl<sub>2</sub>, pH 7,2
- PBS –დაბუფერებული ფიზიოლოგიური ხსნარი, pH 7,4 ( Sigma)
- TA- ტრის აცეტატური ბუფერი pH 7,4( Sigma)
- 1mM EDTA ბუფერული ხსნარი pH 7,4
- 5M NaCl- ხსნარი
- 10mM Tris
- 1% SDS

მიკრობიოლოგიური არეები:

ბაქტერიებისა და ბაქტერიოფაგების კულტივირებისთვის და შესანახად:

- LB (Luria-Bertani) ლურია-ბერტანის აგარი და ბულიონი (Difco)
- სოიოს აგარი და ბულიონი (“DiFco”, “Biomereux”);
- პეპტონიანი ტუტე წყალი

ბაქტერიების საიდენტიფიკაციოდ:

- TCBS- თიოსულფატ-ციტრატ-ნაღვლის მარილების- საქაროზას შემცველი მყარი არე *Vibrio spp.* ბატერიებისათვის.

ბაქტერიების ფიზიოლოგიურ- ბიოქიმიური თვისებების შესასწავლად:

- T<sub>1</sub>N<sub>1</sub> აგარი – ტრიპტონ მარილიანი აგარი
- GSA აგარი –3% ნატრიუმის ქლორიდის შემცველი აგარი
- GA აგარი –ჟელატინიანი, უმარილო აგარი
- ჰიუ-ლევისონის (HF) გლუკოზიანი არე
- ნახშირწყლები: საქაროზა, მანოზა, არაბინოზა, ლაქტოზა
- ამინომჟავები: არგინინი, ლიზინი, ორნითინი

ანტიგენების კომერციული ნაკრები (Denka Seiken co., Niigata-ken, Japan)  
*V. parahaemolyticus* ბაქტერიების სეროტიპირებისთვის;

სპეციალური კომერციული ნაკრები (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA da Gen Elute, Sigma ) ბაქტერიული დნმ-ის გამოსაყოფად;

პოლიმერაზა ჯაჭვური რეაქციის პრაიმერები *V. parahaemolyticus* ბაქტერიების გენეტიკური იდენტიფიკაციისთვის გამოყენებული (ცხრილი 1.)

ცხრილი 1.

სამიზნე გენი	თანმიმდევრობა (5'-3')	ამპლიკონის ზომა (ნუკლეოტიდური წყვილი)	წყარო
<b>VA-F</b>	F'-5'-CGAGTACAGTCACTTGAAAGC-3'	737	Di Pinto et al., 2006
<b>VA-R</b>	R-5'- CACAACAGAACTCGCGTTACC-3'		

ბაქტერიების გენეტიკური მრავალფეროვნების შესასწავლად პულსირებად ველში გელ-ელექტროფორეზისთვის ვიყენებდით Not I-რესტრიქციულ ენდონუკლეაზას. (ცხრილი 2.)

ცხრილი 2.

რესტრიქციული ენდონუკლეაზა	ამოსაცნობი თანმიმდევრობა	გაჭრის ადგილი
<b>Not I</b>	5' GCGGCCGC 3'	GCGGCC-- GC
	3' CGCCGGCG 5'	CG-- CCGGCG



ბაქტერიების ვირულენტობის ფაქტორების შესასწავლად გამოყენებული პოლიმერაზა ჯაჭვური რეაქციის (PCR) პრაიმერები: *toxR*, *tdh*, *trh*, *tlh*, *gs*, *orf8* (ცხრილი 3.)

ცხრილი 3. ვირულენტობის ფაქტორების გენეტიკური მახასიათებლები

სამიზნე გენი	თანმიმდევრობა (5'-3')	ამპლიკონის ზომა (ნუკლეოტიდური წყვილი)	წყარო
<b><i>toxR</i></b>	<b><i>toxR-F</i></b> : GTC TTC TGA CGC AAT CGT TG	368	Kim <i>et.al.</i> (1999)
	<b><i>toxR-R</i></b> : ATA CGA GTG GTT GCT GTC ATG		
<b><i>Tdh</i></b>	<b><i>tdh-F</i></b> :GTA AAG GTC TCT GAC TTT TGGAC	269	Bej <i>et.al.</i> (1999)
	<b><i>tdh-R</i></b> : TGG AAT AGA ACC TTC ATC TTC ACC		
<b><i>Trh</i></b>	<b><i>trh-F</i></b> : TTG GCT TCG ATA TTT TCA GTA TCT	500	Bej <i>et.al.</i> (1999)
	<b><i>trh-R</i></b> : CAT AAC AAA CAT ATG CCC ATT TCC G		
<b><i>Tlh</i></b>	<b><i>tlh-F</i></b> : AAA GCG GAT TAT GCA GAA GCA CTG	450	Bej <i>et.al.</i> (1999)
	<b><i>tlh-R</i></b> : GCT ACT TTC TAG CAT TTT CTC TGC		
<b><i>GS</i></b>	<b><i>gs-F</i></b> :TAA TGA GGT AGA AAC A	651	Catherine C <i>et.al.</i> (2006)
	<b><i>gs-R</i></b> :ACG TAA CGG GCC TAC A		
<b><i>Orf8</i></b>	<b><i>orf8-F</i></b> : GTT CGC ATA CAG TTG AGG	~700	Nasu <i>et.al.</i> , (2000)
	<b><i>orf8-R</i></b> : AAG TAC AGC AGG AGT GAG		

ბაქტერიოფაგების სეროლოგიური თვისებების შესასწავლად:

- ლაბორატორიული ცხოველები: ბოცვრები
- ადიუვანტი (Freund's adjuvant, Difco)
- ანტიფაგური შრატები: ანტი-Vpa 19KP და ანტი-Vpa A11

პროტეოლიზური ფერმენტები:

- პეპსინის 1%-იანი ხსნარი
- ქემოტრიფსინის 1%-იანი ხსნარი

რესტრიქციული ენდონუკლეაზები პროფილის შესასწავლად (ცხრილი 4):

ბაქტერიოფაგების რესტრიქციული

ცხრილი 4.

რესტრიქციული ენდონუკლეაზა	ამოსაცნობი თანმიმდევრობა	გაჭრის ადგილი
<b>EcoR I</b>	5'GAATTC 3'	5'--G AATTC--3'
	3'CTTAAG 5'	3'--CTTAA G--5'
<b>EcoR V</b>	5'GATATC 3'	5'--GAT ATC--3'
	3'CTATAG 5'	3'--CTA TAG--5'
<b>Hind III</b>	5'AAGCTT 3'	5'--A AGCTT--3'
	3'TTCGAA 5'	3'--TTCGA A--5'
<b>BamH I</b>	5'GGATCC 3'	5'--G GATCC--3'
	3'CCTAGG 5'	3'--CCTAG G--5'
<b>Sau3A</b>	5'GATC 3'	5'-- GATC---3'
	3'CTAG 5'	3'-- CTAG --5'
<b>Pst I</b>	5'CTGCAG 3'	5'--CTGCA G--3'
	3'GACGTC 5'	3'--G ACGTC--5'
<b>Sal I</b>	5'GTCGAC 3'	5'--G TCGAC--3'
	3'GAGCTG 5'	3'--GAGCT G--5'
<b>Xba I</b>	5'TCTAGA 3'	5'--T CTAGA--3'
	3'AGATCT 5'	3'--AGATC T--5'

## 2. კვლევაში გამოყენებული მეთოდები

### 2.1. ღია წყალსატევებიდან წყლის სინჯების აღება და დამუშავება

წყლის სინჯების აღება წარმოებდა ერთი ძირითადი სქემის მიხედვით, თუმცა გამოკვლევების მიზნისა და სპეციფიკის გათვალისწინებით, სინჯების აღების სიხშირე და დამუშავების პროცედურა იცვლებოდა. 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 არაუმეტეს 4 სთ-ის განმავლობაში.

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

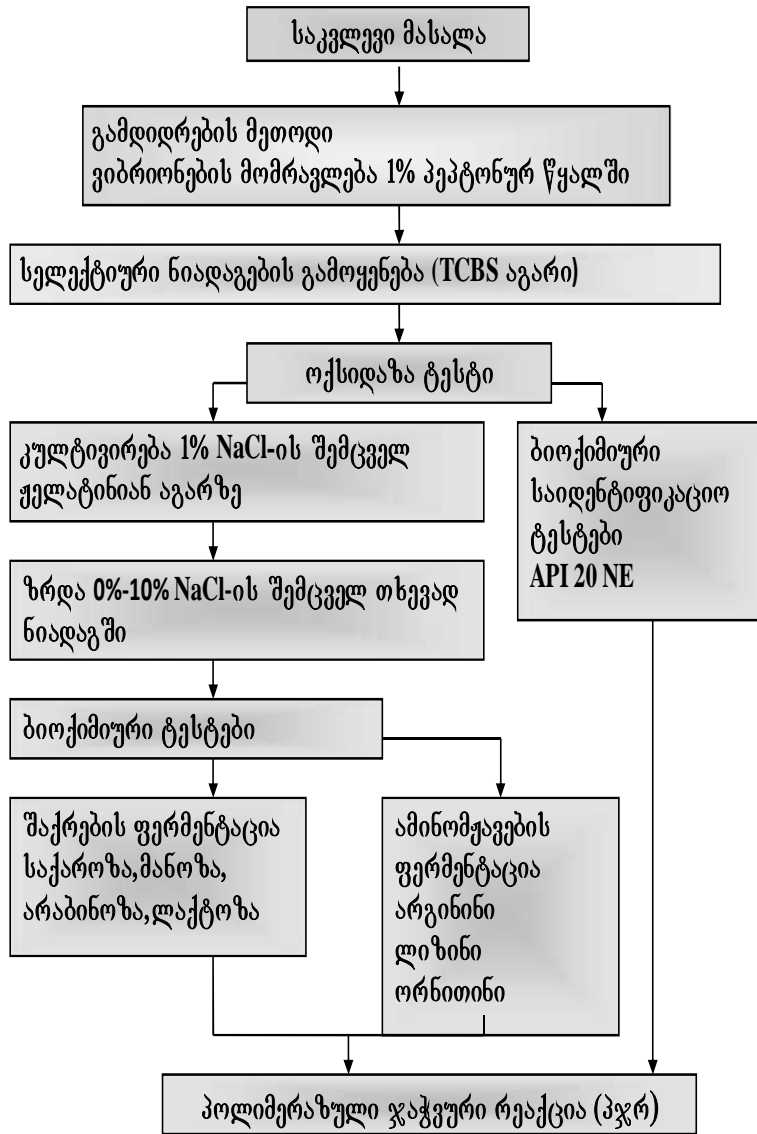
**მიკრობული დაბინძურების ხარისხის განსაზღვრა:** საკვლევ წყალში საერთო მიკრობული რიცხვის განსაზღვრისათვის ვიყენებდით 1,8% -იანი LB აგარის ფინჯნებს. საკვლევი წყლის საწყისი და ათჯერადი განზავებები 1მლ რაოდენობით დაგვქონდა პეტრის ფინჯანზე და ვამატებდით 15-20მლ გამლღვალ 45°C გაგრილებულ LB აგარს. ვახდენდით 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. პერტიფილმზე დაგვქონდა საკვლევი წყლის საწყისი და ათჯერადი განზავება 1მლ რაოდენობით. ვახდენდით ინკუბაციას 37°C-ზე 24 საათის განმავლობაში. შედეგს ვიწერდით შესაბამისი სქემის მეშვეობით.

### 2.2. *Vibrio*-ს გვარის ბაქტერიების გამოყოფა

*Vibrio*-ს გვარის ბაქტერიების გამოსაყოფად 100 ლიტრი მოცულობის წყალს ვატარებდით 200მკმ-იან და 64მკმ-იან ბადეში. 100მლ გაფილტრულ (პლანქტონისგან თავისუფალ) წყალს (PFW-plankton free water) ვფილტრავდით 0,45მკმ-იან ფილტრში, რომელსაც ფილტრაციის შემდეგ ვათავსებდით 100 მლ პეპტონიან წყალში. პარალელურად 10-50 მლ პლანქტონმოცილებულ წყალს ვფილტრავდით 0,45მკმ-იან ფილტრში და ფილტრს ვათავსებდით TCBS-ის ნიადაგზე. ორივე შემთხვევაში ინკუბაციას ვახდენდით თერმოსტატში 37°C-ზე 24 საათის განმავლობაში.

პლანქტონის ფრაქციიდან ბაქტერიების გამოყოფის მიზნით 9მლ პეპტონიან წყალს ვუმატებდით 1 მლ პლანქტონს (64მკმ და 200 მკმ-იან ბადეში გაფილტრული) და ვახდენდით ინკუბაციას თერმოსტატში 37°C-ზე 24 საათის განმავლობაში.

## წყლის სინჯებიდან ვიბრიოებს გამოყოფის და იდენტიფიკაციის სქემა



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

### 2.3. ბაქტერიული შტამების ბიოლოგიური თვისებების შესწავლა

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

**ბიოქიმიური თვისებების შესწავლა.** იზოლატები მოწმდებოდა მარილის მოხმარებაზე, გლუკოზის ჟანგვასა და ფერმენტაციაზე (პიუ-ლეივსონის ტესტი), ნახშირწყლების მოხმარებაზე (საქაროზა, ლაქტოზა, მანოზა, არაბინოზა), ციტოქრომ ოქსიდაზას, უელატინ დეჰიდროლაზას, ლიზინ- და ორნითინ- დეკარბოქსილაზასა და არგინინ-დეჰიდროლაზას შემცველობაზე. ბიოქიმიურ ტესტებზე დაყრდნობით იდენტიფიცირებული *Vibrio parahaemolyticus*-ის შტამების გენეტიკურ იდენტიფიკაციას პოლიმერაზა ჯაჭვური რეაქციით.

**გენეტიკური იდენტიფიკაცია.** გენომური დნმ-ს გამოსაყოფად ვიყენებდით დნმ-ის გამოსაყოფ სპეციალურ კომერციულ ნაკრებს (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). ბიოქიმიურად იდენტიფიცირებული *V. parahaemolyticus* –ის იზოლატების იდენტიფიკაცია ხდებოდა პოლიმერაზა ჯაჭვური რეაქციის (პჯრ) საშუალებით სახეობა-სპეციფიკური პრაიმერების გამოყენებით (ცხრილი 1). პოლიმერაზა ჯაჭვურ რეაქციაში გამოყენებულ იქნა ბაქტერიული კულტურების დნმ, Taq-დნმ პოლიმერაზა, თავისუფალი ნუკლეოტიდების ნარევი (10 მმოლი თითოეული კონცენტრაცია) და ორი პრაიმერი (პირდაპირი და უკუ- მიმართულების). პჯრ-პროდუქტების გასაანალიზებლად ვიყენებდით ელექტროფორეზს 1-1,2% აგაროზას გელში. ბიოქიმიურად არაიდენტიფიცირებული შტამების გენეტიკური იდენტიფიკაციისთვის ვახდენდით 16S რიბოსომული რნმ-ს ამპლიფიცირებას, სექვენირებას და ვადარებდით NCBI და RDPII ბაზებს.

**PFGE-ანალიზი.** ბაქტერიული შტამების ქრომოსომული დნმ-ის რესტრიქციული ფრაგმენტების პოლიმორფული ანალიზი განხორციელდა პულსირებად გელში გელ-ელექტროფორეზის საშუალებით (PFGE - Pulsed-Field Gel Electrophoresis). გენომური დნმ-ის ექსტრაქციას ვახდენდით 1% აგაროზას (SeaKem-Gold Agarose. Lonza) გელში, რომელიც მუშავდებოდა 1 მკ/მლ ლიზოციმისა და 100 მკგ/მლ პროტეინაზა K-ს შემცველი მალიზირებელი ბუფერით (6mM Tris-აცეტატი pH-8,0; 1M NaCl; 100mM EDTA pH8,0; 0,2% deoxycholate; 0,5% N-Lauroylsarcosine).

ინტაქტური დნმ-ის ფრაგმენტირებას ვახდენდით რესტრიქციული ენდონუკლეაზით NotI (Neb. BioLabs), მწარმოებლის მიერ მოწოდებული ანოტაციის მიხედვით. ფერმენტით დამუშავებული დნმ-ის ფრაგმენტების დაყოფას ვახდენდით პულსირებადი ელექტროფორეზით 1,2% SeaKem-Gold აგაროზას გელში, შესაბამისი ელექტროფორეზის ბუფერით (0,5xTris-Borate-EDTA), Gene Navigator™ System (Amersham) აპარატის გამოყენებით. ელექტროფორეზისათვის გამოყენებული იქნა მოლეკულური მასის მარკერი (Pulse Marker™ 50-1,000kb, Sigma). ელექტროფორეზის პულსირების პარამეტრები შეესაბამებოდა: 10-50 წამი, 200 ვოლტი (6 V/სმ), 20 საათი, 14°C.

გელის ვლებავდით ეთიდიუმის ბრომიდის ხსნარში (0,5მგ/მლ) 20 წუთის განმავლობაში. დნმ-ის ფრაგმენტების შეფასებას ვახდენდით UV-ტრანსილუმინატორის მეშვეობით.

რესტრიქციული ფრაგმენტების ანალიზისათვის გამოყენებული იქნა Freetree-threeview კომპიუტერული პროგრამა. გენეტიკური მსგავსების ამსახველი UPGMA

(unweighted pair group method with arithmetic means) დენდროგრამა კონსტრუირებული იქნა რესტრიქციული ფრაგმენტების მსგავსების კოეფიციენტის მიხედვით.

**Vibrio** –ს გვარის სხვადასხვა სახეობების გამოვლენა PCR/ESI- MS –ის საშუალებით. *Vibrio* PCR/ESI-MS გამოყენებულ იქნა გარემოს ნიმუშებიდან *Vibrio*-ს პათოგენური სახეობების გამოვლენისა და იდენტიფიკაციისათვის [172]. დნმ-ის გამოყოფა ხდებოდა წყლის ნიმუშიდან და გამოყოფილი დნმ გამოიყენებოდა 8 სხვადასხვა სახეობის მიმართ სპეციფიკურ პჯრ-რეაქციაში. იმის გამო, რომ სისტემის შემადგენლობაში შედიოდა 8 სხვადასხვა პრაიმერი, გენომის სხვადასხვა ნაწილის თითოეული ნიმუშისთვის აღებულ იქნა მრავალრიცხოვანი ანათვლები. ნიმუშის შემადგენელი ნაწილების კომპონენტები ემატებოდა ბაზაში *Vibrio*-ს გაშიფრული შტამების გენომებთან შესადარებლად.

**ვირულენტობის ფაქტორების განსაზღვრა.** გამოყოფილი იზოლატების პანდემურობის მარკერების და ვირულენტობის ფაქტორების განსაზღვრა ხდებოდა პოლიმერაზა-ჯაჭვური რეაქციით. PCR-ით შტამები შემოწმდა *tdh*-ზე, *trh*-ზე, *tlh*-ზე, აგრეთვე *f237*-ის *ORF8* –თანმიმდევრობაზე, პანდემურ ჯგუფ-სპეციფიკურ *toxRS* –თანმიმდევრობაზე (*GS-PCR*), ასევე *TTSS1*-ის *VP1680*-სა და *VP1686* –ზე. 25 ნაზოვრამი დნმ-ს შერევა ხდებოდა 2.5 mM dNTP –თან, 15 mM PCR-ბუფერთან, ემატებოდა  $5U^{-1} \mu l$  *TAQ* დნმ-პოლიმერაზა და 20  $\mu m$  შესაბამისი პრაიმერი. ვირულენტობის ფაქტორებისა და პანდემურობის მარკერების ვიზუალიზაცია ხდებოდა 1.5%-იან აგაროზის გელში, რომელსაც ვლებავდით ეთიდიუმ ბრომიდის ხსნარში და ვნახულობდით UV-ტრანსილუმინატორში.

**კანაგავა-ფენომენის ანალიზი** ხდებოდა ვაგაცუმა აგარზე. საკვლევ შტამებს თავდაპირველად ვზრდიდით მყარ 7% NaCl-იან საკვებ აგარზე. 18-24 სთ-იანი ინკუბაციის შემდეგ 37°C-ზე ცალკეული კოლონიები ითესებოდა თევად არეში, რომლის მარილიანობაც ასევე შეადგენდა 7%-ს. 37°C-ზე 18-24 სთ-იანი ინკუბაციის შემდეგ მიღებული კულტურის 10 მკლ ზოლების სახით ითესებოდა ვაგაცუმას აგარზე. შედეგების აღრიცხვა ხდებოდა 37°C-ზე 18-24 სთ-იანი ინკუბაციის შემდეგ. შტამები, რომლებიც იწვევდნენ სისხლის წითელი უჯრედების ჰემოლიზს, ითვლებოდა კანაგავა-დადებითად.

**მოლეკულური მრავალფეროვნების განსაზღვრა** ხდებოდა *rep-PCR*-ის საშუალებით, *Chokesajjawatee*-ს მეთოდის მიხედვით. PCR-პროდუქტების განცალკევება ხდებოდა 1%-იან აგაროზის გელში, *TAE*-ბუფერში. ფინგერპრინტის შედეგების გაანალიზებას ვახდენდით *GelDoc-It<sup>TM</sup>* -სისტემით (Ultra-Violet Products, Upland, CA).

**სეროტიპის განსაზღვრა.** საკვლევ შტამებს ვზრდიდით 37°C-ზე 3% NaCl-იან LB-აგარზე. კულტურის 24 სთ-იანი ნაზრდიდან 10 მკლ-იანი მარყუქით ხდებოდა კულტურის რესუსპენდირება 1 მლ 0.9%-იან NaCl-ის ხსნარში. მიღებული ხსნარი ნაწილდებოდა 2 სინჯარაში: 500-500 მკლ რაოდენობით. ერთი სინჯარა 2 საათის განმავლობაში იხარშებოდა. მოხარშული უჯრედების 10 მკლ-ის შერევა ხდებოდა O-ანტიგენის შრატებთან, ხოლო მოუხარშავის 10 მკლ ერეოდა K-ანტიგენის შრატებთან. რეაქციის შედეგად ხილული სლაიდ-აგლუტინაციით განისაზღვრებოდა ანტიგენი. (Denka Seiken co., Niigata-ken, Japan).

**ანტიბიოტიკების მიმართ მგრძობელობა** შევისწავლეთ შერჩეული შტამებზე დისკის დიფუზიის მეთოდით. ბაქტერიულ კულტურას ვზრდიდით მყარ- Muller-Hinton-ის აგარზე. გამოყენებულ იქნა 12 ანტიბიოტიკი. შედეგს აღვრიცხავდით მეთოდის

კლასიკური შეფასების შესაბამისად: მგრძობიარე, საშუალოდ მგრძობიარე და რეზისტენტული ბაქტერიული შტამები (S, I და R).

#### 2.4. მიკროკოსმების ექსპერიმენტი VBNC-უჯრედებზე

თავდაპირველად კულტურებს ვზრდიდით დაცერებულ 3%-იან LB-აგარზე. 24 საათიანი ინკუბაციის შემდეგ 37°C-ზე, ნაზრდს ვრეცხავდით 5 მლ ფიზიოლოგიური ხსნარით და შეგვექონდა სხვადასხვა არეებში: LB-ბულიონში, ლისის ტბის და ზღვის წყლებში. თითოეულს ვათავსებდით მაცივრის (4°C) და ოთახის (25°C) ტემპერატურებზე. მიკროკოსმების თითოეული სინჯარიდან დროის გარკვეული ინტერვალით ვახდენდით ბაქტერიების ამოთესვას. უჯრედები ითვლებოდა არაკულტივირებად მდგომარეობაში, როდესაც ხდებოდა 0.1 უჯ/მლ -ზე ნაკლები კულტივირებადი უჯრედის გამოვლენა. კულტივირებადი უჯრედების გამოვლენის ლიმიტი დგინდებოდა მიკროკოსმის 10 მლ-ის გაფილტვრით 0.22 მკმ ფოროვნების ფილტრში და შემდეგ ფილტრის მოთავსებით 3%-იან LB-აგარზე.

არაკულტივირებად VBNC-მდგომარეობაში გადასული უჯრედების კულტივირებადში გადაყვანის მიზნით მიკროკოსმის შიგთავსის 1 მლ-ის ინკუბაციას ვახდენდით 22°C-ზე 24 საათით, მეორე დღეს კი ვთესავდით 3%-იან LB-აგარზე.

#### 2.5. ბაქტერიოფაგების გამოყოფა

ბაქტერიული ვირუსების გამოყოფას და კულტივირებას ვახდენდით ორი მეთოდით:

**გამდიდრების სტანდარტული მეთოდით** (1) გაფილტრულ წყლის სინჯს ვუმატებდით კონცენტრირებულ ბულიონს და ბაქტერიული კულტურის ნარევეს, პროპორციით 10:1:1 და ვათავსებდით თერმოსტატში 18-24სთ 37°C-ზე. 5000 ბრ/წთ ცენტრიფუგირების შემდეგ სუსპენზიას ვფილტრავდით 0,2 მკმ ზომის ფილტრში და ვაწვეთებდით ინდიკატორი ბაქტერიის გაზონზე. ფაგის ლიზისური ზონების აღმოსაჩენად ფინჯნებს ვამოწმებდით 18-24 საათში.

**კულტურათა სუპერნატანტებიდან (ფისკას მეთოდი)-ბულიონში** გაზრდილ კულტურებს ვაძველებდით 48-72 საათის განმავლობაში. ვაცენტრიფუგირებდით 5000 ბრ/წთ სინქარეზე. სუპერნატანტებს ვაწვეთებდით ინდიკატორი ბაქტერიის გაზონზე. ლიზისურ ზონებს ვნახულობდით 18-24 საათის შემდეგ.

#### 2.6. ბაქტერიოფაგების ბიოლოგიური თვისებების შესწავლა

ფაგების სუფთა ხაზების მისაღებად ვიყენებდით ორშრიანი აგარის მეთოდს, რისთვისაც თანმიმდევრული პასაჟებით ვახდენდით მორფოლოგიურად ერთგვაროვანი კოლონიებიდან 5-10 კოლონიის შერჩევას.

**ფაგების ლიზისური სპექტრის** საორიენტაციო განსაზღვრას ვაწარმოებდით მყარ საკვებ არეზე კრეიჯის მეთოდის მოდიფიკაციის მიხედვით. საცდელი ფაგის სამუშაო ტიტრი შეადგენდა  $1 \times 10^8$  ნაწ/მლ. ფაგის სუსპენზიის წვეთები დაგვქონდა 4სთ-იანი ბულიონიანი კულტურის გამშრალ ზოლზე და  $28^{\circ}\text{C}$ -ზე 4-12 სთ ინკუბაციის შემდეგ აღვრიცხავდით შედეგებს.

**ფაგების ლიზისის სტაბილობის** შესწავლას ვახდენდით თხიერ არეში აპელმანის მეთოდის გამოყენებით. 4,5მლ LB ბულიონის შემცველ სინჯარებში შეგვქონდა  $2 \times 10^9$  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  $37^{\circ}\text{C}$ -ზე 4-6-24-48 საათის განმავლობაში. საკვლევი ფაგის ლიზისის სტაბილობის მახასიათებლად აღვრიცხავდით ინკუბაციის დროს და იმ ბოლო განზავებას, რომელ სინჯარაშიც არ აღინიშნებოდა ბაქტერიული კულტურის ზრდა.

**ფაგის ზუსტი ტიტრის** დადგენას ტესტ-შტამზე ვახდენდით ორშრიანი აგარის მეთოდით [2].

**ფაგის დათესვის ეფექტურობას** (დ.ე.) საკვლევ შტამზე ვსაზღვრავდით როგორც ფაგის ტიტრის შეფარდებას მოცემულ შტამზე და საწყის, სტანდარტულ ბაქტერიულ შტამებზე, რომელზედაც გამრავლებული იყო მოცემული ბაქტერიოფაგი [2]

**ფაგის ნეგატიური კოლონიის ფორმას** ვადგენდით სტანდარტული შემადგენლობის ნიადაგზე (LB ნიადაგი) და სხვადასვა ტემპერატურაზე ერთი და იგივე ტესტ-ბაქტერიების გამოყენებით ორშრიანი აგარის მეთოდის საშუალებით. ნეგატიური კოლონიების ანალიზს ვახდენდით მათი ფორმირების დამთავრების შემდეგ (18-24სთ) [2].

**ფაგის ვირიონის მორფოლოგიას** ვსწავლობდით ელექტრონული მიკროსკოპის საშუალებით. პრეპარატებს ვამზადებდით ნეგატიური კონსტრასტირების მეთოდით ურანილ-აცეტატის 2%-იანი წყალხსნარის გამოყენებით. ფაგის ბაქტერიის სუსპენზია ან კონცენტრატი დაგვქონდა საკონტრასტო ნიმუშებთან ერთად კოლოდიუმის აპკებზე – ბადებზე. სტრუქტურულ კვლევას ვაწარმოებდით IEM-1200CX (Jeol, იაპონია) და M10 (Opton-Zeiss, გერმანია) ელექტრონული მიკროსკოპების საშუალებით.

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

ა) აღსორბციის სიჩქარეს და ინტენსივობას მასპინძელი ბაქტერიული შტამის უჯრედებზე ვსაზღვრავდით არააღსორბცირებული ფაგის რაოდენობის მიხედვით ქლოროფორმირების მეთოდით [69, 70].

ბ) ლატენტიური პერიოდის ხანგრძლივობას და საშუალო გამოსავლის სიდიდეს ვადგენდით Eliss-delbruck-ის კლასიკური მეთოდით [2].

**ბაქტერიოფაგის მიმართ რეზისტენტული ბაქტერიული მუტანტების** მისაღებად LB – აგარის შემცველი ფინჯნებზე შეგვქონდა  $10^6$  ბაქტერიული უჯრედი და  $10^8$  ნაწ/მლ ფაგი. 24სთ-იანი ინკუბაციის შემდეგ გაზრდილი ცალკეული კოლონიები გადაგვქონდა LB-აგარიან და ფაგის შემცველ ფინჯნებზე, ვახდენდით რა შემდგომი კლონირების რამდენიმე ციკლს გასუფთავების მიზნით. ფაგისადმი გამძლე თითოეულ კლონს ვამოწმებდით სხვა ფაგებისადმი მგრძობელობაზე.

**ფაგის ეფექტური მრავლობითობის** განსაზღვრისათვის ვაწარმოებდით განზავებების ორ სერიას: 1) 4,5მლ ბულიონიან სინჯარებში შეგვქონდა მყარ არეზე



გაზრდილი ბაქტერიული კულტურის ჩამონარეცხი ისეთი განზავებით, რომ მიკრობთა რიცხვი თანმიმდევრობით შემცირებულიყო  $10^8$  უჯრ/მლ- $10^1$  უჯრ/მლ. სინჯარებს ვამატებდით 0,2 მკმ ფოროვნების მემბრანულ ფილტრში გაფილტრულ საკვლევი ბაქტერიოფაგის 0,5მლ-ს ( $10^8$  ნაწ/მლ). 2) იგივე მოცულობის ბულიონიან სინჯარებში შეგვქონა 0,2მკმ ფოროვნების მემბრანულ ფილტრში გაფილტრული საკვლევი ბაქტერიოფაგის ისეთი განზავება, რომ ფაგური ნაწილაკების რიცხვი თანმიმდევრობით შემცირებულიყო  $10^8$  ნაწ/მლ- $10^1$  ნაწ/მლ და თითოეულ სინჯარას ვამატებდით დაცერებულ აგარზე გაზრდილი ბაქტერიული კულტურის ჩამონარეცხის 10მკლ-ს. ვახდენდით ინკუბაციას თერმოსტატში 18 საათის განმავლობაში  $37^{\circ}\text{C}$ -ზე, რის შემდეგაც ყველა სინჯარაში გამოწმობდით 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).

**ფაგის სეროლოგიური თვისებებს** ვსწავლობდით ნეიტრალიზაციის ცდებში სპეციფიური ანტიფაგური შრატების მეშვეობით. ანტიფაგური შრატის მისაღებად 2-3 კგ წონის ბოცვრების კანქვეშ შეგვყავდა საკვლევი ბაქტერიოფაგის ( $1-5 \times 10^{11}$  ნაწ/მლ) და ფროინდის ადიუვანტის ნარევი (1:1). 1 თვის შემდეგ ვიმეორებდით აღნიშნულ პროცედურას ადიუვანტის გარეშე. 10 დღიანი ინტერვალის შემდეგ ბოცვრს ვუღებდით სისხლს გულიდან; გამოვყოფდით სისხლის შრატს, ვფილტრავდით და ვინახავდით –  $20^{\circ}\text{C}$ . ვსაზღვრავდით ნეიტრალიზაციის კონსტანტას ჰომოლოგიურ სისტემაში.

**ფაგის სეროლოგიურ ნათესაობას** ვსწავლობდით ფაგის ნეიტრალიზაციის ჯვარედინა რეაქციის ჩატარების გზით სხვადასხვა სპეციფიურობის ანტიფაგური შრატის გამოყენებით. ფაგი – ანტიფაგური შრატის თითოეული წყვილის შემთხვევაში ვსაზღვრავდით ნეიტრალიზაციის პროცენტს და კონსტანტას [2].

## 2.7. ფაგების მგრძობელობა ფიზიკური და ქიმიური ფაქტორების მიმართ

**ბაქტერიოფაგების ინაქტივაცია UV სხივებით**  $1-5 \cdot 10^{10}$  ნაწ/მლ ტიტრის მქონე ფაგის სუსპენზიას 1:100 ვანზავებდით 0,1 M ფოსფატურ ბუფერში, ვასხამდით პეტრის თასში 5მლ-ის ოდენობით და ვასხივებდით ულტრაიისფერი ნათურით 35სმ-ის დისტანციაზე. სინჯებს ვიღებდით 10 წმ-ის ინტერვალით და ვსაზღვრავდით სიცოცხლისუნარიანი ფაგური ნაწილაკების რიცხვს ორშრიანი აგარის მეთოდით.

**ბაქტერიოფაგების თერმოსტაბილობის შესწავლა.** საკვლევი ფაგებს ვანზავებდით  $10^3$  ნაწ/მლ შემცველობამდე და ვათავსებდით წყლის აბაზანაში სხვადასხვა ტემპერატურაზე ( $40^{\circ}\text{C}$ ,  $50^{\circ}\text{C}$ ,  $60^{\circ}\text{C}$ ,  $70^{\circ}\text{C}$ ,  $80^{\circ}\text{C}$ ) 30 წუთით. კონტროლად ვიღებდით ფაგიან სინჯარას იგივე განზავებითა და მოცულობით, რომელსაც ვათავსებდით  $37^{\circ}\text{C}$ -ზე. 30 წუთის შემდეგ საკვლევი და საკონტროლო სინჯარებიდან გადმოგვქონდა ფაგის 0,1 მლ და ვტიტრავდით გრაციას მეთოდით. კრიტიკული ტემპერატურის დადგენის შემდეგ ექსპერიმენტს ვიმეორებდით 5 წუთის ინტერვალით კრიტიკულ ტემპერატურაზე.

**მგრძობელობა pH-ის სხვადასხვა მნიშვნელობების მიმართ.** ფაგზე გარემო არის pH-ის გავლენას ვსწავლობდით შემდეგნაირად:  $1 \times 10^8$  ნაწ/მლ ტიტრის მქონე

ფაგის სუსპენზია შეგვქონდა სპეციალურ ფაგურ ბუფერში (SM-ბუფერი) (pH 2,0 -10,0) და ვახდენდით ინკუბაციას 1 სთ-ის განმავლობაში. ვსაზღვრავდით სიცოცხლისუნარიანი ნაწილაკების რაოდენობას.

**ბაქტერიოფაგის სტაბილობას** შენახვისას ვსაზღვრავდით სხვადასხვა არეში: LB-ბულიონი pH7,4; LB-ბულიონი ქლოროფორმით pH7,4; ონკანის წყალი; გამოსხდილი წყალი; ფიზიოლოგიური ხსნარი; 0,05M ფოსფატური ბუფერი pH7,4; ზღვის წყალი (შავი ზღვის წყალი); მტკნარი წყალი (კუს და ლისის ტბის წყალი); დაბუფერებული პეპტონური წყალი pH7,4; დაბუფერებული პეპტონური წყალი pH8,0; სოიოს ბულიონი pH7,4; ბულიონი pH7,4; ფაგური ბუფერი pH7,4. საკვლევი ფაგები ტიტრით  $10^9$  ნაწ/მლ გავფილტრეთ 0,2მკმ-იან მემბრანულ ფილტრში და შევინახეთ მაცივარში  $4^{\circ}\text{C}$ -ზე ერთი წლის მანძილზე. ფაგის სტაბილობას ვამოწმებდით 1 კვირის, 2 კვირის, და შემდეგ ყოველთვიურად გრაციას მეთოდით.

ფაგების სტაბილობის შესასწავლად  $-80^{\circ}\text{C}$  -ზე საკვლევი ფაგები ტიტრით  $10^8$  ნაწ/მლ გავფილტრეთ 0,2მკმ-იან ფილტრში, თანაფარდობით 1:1 შევეურიეთ 50% გლიცერინს და შევინახეთ  $-80^{\circ}\text{C}$ -ზე მაცივარში ერთი წლით. ფაგის სტაბილობას ვამოწმებდით ყოველთვიურად გრაციას მეთოდით.

**ოსმოსური შოკის** მოქმედებას ვსწავლობდით ანდერსონის მეთოდით დაბალი და მაღალი იონური ძალის მქონე ხსნარებში ბაქტერიოფაგების ინოკულაციის გზით [9].

## 2.8. ფაგის გამრავლება და კონცენტრირება

ფაგის კონცენტრატების მიღება ხდებოდა შემდეგი მეთოდების გამოყენებით:

**მყარ არეზე კონცენტრატს** ვღებულობდით სტანდარტული მეთოდით [2], რომელიც გულისხმობს თხელი აგარის ფენაში მაღალკონცენტრირებული ბაქტერიული სუსპენზიის ფაგოლიზის და მინიმალური მოცულობის თხევად არეში ფაგის შემდგომ ექსტრაგირებას. ფაგურ კონცენტრატს ვამზადებდით 10-20 ფინჯანზე: 0,7% LB აგარში შეგვქონდა ბაქტერიები  $1-5 \times 10^8$  უჯ/მლ და ბაქტერიოფაგები  $1 \times 10^5$  ნაწ/მლ საბოლოო კონცენტრაციით. ინკუბაციას ვახდენდით  $28^{\circ}\text{C}$ -ზე 18-24 სთ, ვხსნიდით აგარის ზედა ფენას შპატელით, ვაცენტრიფუგირებდით 5000 ბრ/წთ 30 წთ და ვამოწმებდით ტიტრს გრაციას მეთოდით. მიღებული ფაგოლიზატის ტიტრი საშუალოდ შეადგენდა  $1-5 \times 10^{10}-1 \times 10^{11}$  ნაწ/მლ.

**თხიერ არეში ფაგოლიზატის** მიღებისას კულტურას ვზრდიდით ბულიონთან კოლბებში სანჯღრეველაზე  $37^{\circ}\text{C}$ -ზე ლოგარითმული ფაზამდე ( $1-5 \times 10^8$  უჯ/მლ). შემდეგ ხდებოდა ფაგის სუსპენზიის დამატება სხვადასხვა მრავლობითობით (1:10, 1:25, 1:50, 1:100) და ვაგრძელებდით კულტივირებას შემცირებული აერაციით.  $28^{\circ}\text{C}$ -ზე 1,5-2,0 სთ-ის შემდეგ ხდებოდა ბაქტერიების სრული ლიზისი. ქლოროფორმით (1:5) დამუშავების შემდეგ, ლიზატს ვტოვებდით 14-16 სთ მაცივარში სრული ლიზისისთვის. ლიზატს ვაცენტრიფუგირებდით 3000 ბრ/წთ 20 წთ (45 წთ) და ვადგენდით ტიტრს გრაციას მეთოდით. მიღებული ფაგოლიზატის ტიტრი აღწევდა  $1-5 \times 10^{10}$  ნაწ/მლ კონცენტრაციას [2].

კონცენტრირებისა და ბაქტერიოფაგის შემდგომი გაწმენდის მიზნით ვახდენთ დიფერენციალურ ცენტრიფუგირებას 20000ბრ/წთ (35000g)  $+4^{\circ}\text{C}$ -ზე, 1,5-3სთ-ის განმავლობაში, პრეპარატის მოცულობიდან გამომდინარე (ცენტრიფუგა Bekman Allegra 64R). ნალექს ვხსნიდით ბუფერულ ხსნარში 1 SSC (pH 7,0) ან PBS (pH 7,2), ვღვამდით

მაგნიტურ სარეველაზე +4°C-ზე 3-4 სთ-ის განმავლობაში და შემდეგ ვაცენტრიფუგირებით 3500g ბაქტერიული ნარჩენების მოცილების მიზნით [2].

## 2.9. ბაქტერიოფაგების გენეტიკური თვისებების შესწავლა

ფაგური დნმ-ის გამოყოფას ვახდენდით ფენოლ/ქლოროფორმით დეპროტეინიზაციის მეთოდით. ბაქტერიოფაგის გაწმენდილ კონცენტრატს ( $5 \times 10^{11}$  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 (pH 8.0) თანაფარდობით 1:1, განჯღრევდით და ვაცენტრიფუგებდით 15000ბრ/წთ 10წთ. შემდგომ ეტაპზე ვუმატებდით ფენოლ-ქლოროფორმს 1:1 შეფარდებით, კვლავ განჯღრევდით და ვაცენტრიფუგირებდით 15000 ბრ/წთ 10წთ. ბოლოს კი- იზოამილ-ქლოროფორმს 1:24 თანაფარდობით, განჯღრევდით 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 კი ვაშრობდით ოთახის ტემპერატურაზე, ვუკეთებდით რესუსპენდირებას TE-ბუფერში და ვინახავდით მაცივარში შემდგომი პროცედურებისათვის [2].

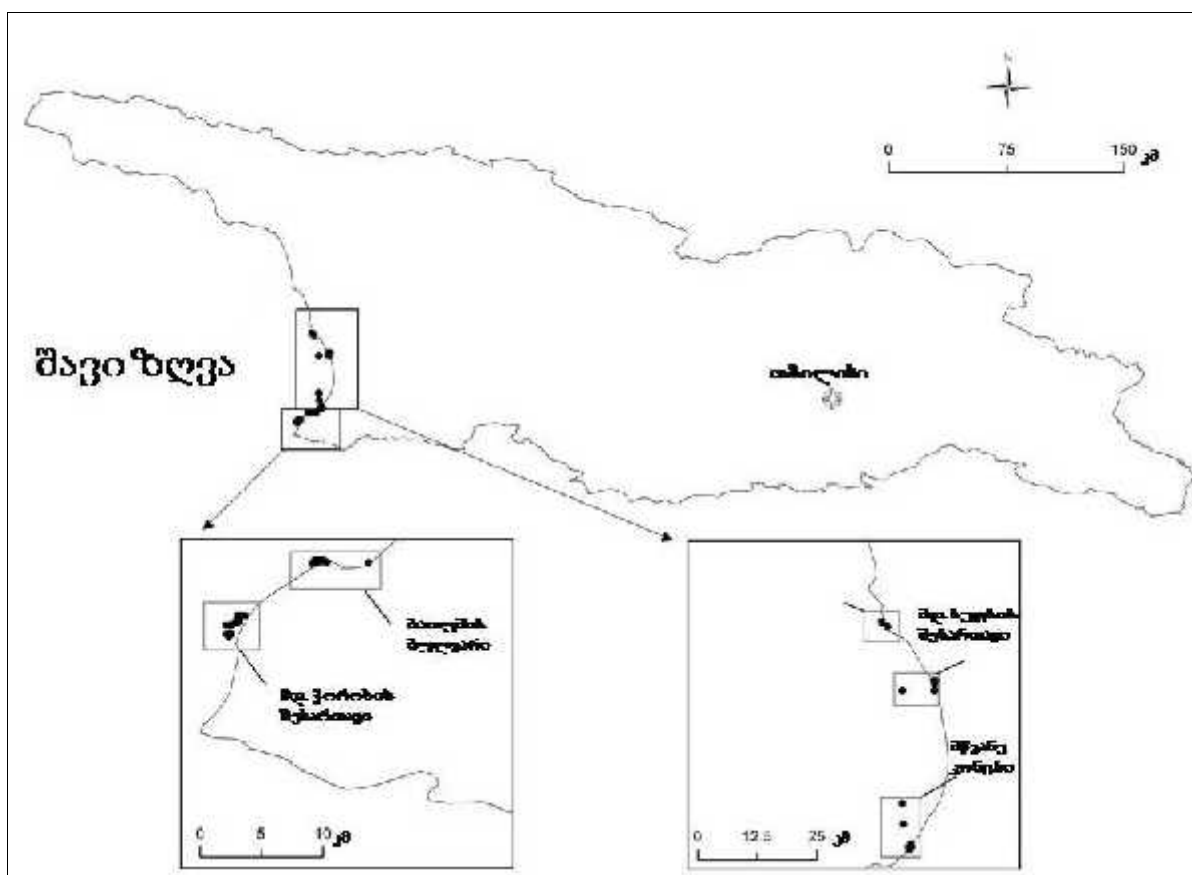
ფაგური დნმ-ის რესტრიქციული ანალიზის მიზნით გამოყოფილ ფაგურ დნმ-ს ვამუშავედით სხვადასხვა რესტრიქციული ენზიმებით (EcoRI, EcoRV, HindIII, BamHI, XhoI და სხვა) მწარმოებლის მიერ მოწოდებულ პირობებში. შემდეგ სინჯები შეგვქონდა 0,8% აგაროზის გელში და ვაწარმოებდით ელექტროფორეზს 1,5-2 სთ-ის განმავლობაში. მარკერულ 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.

### III. მიღებული შედეგები

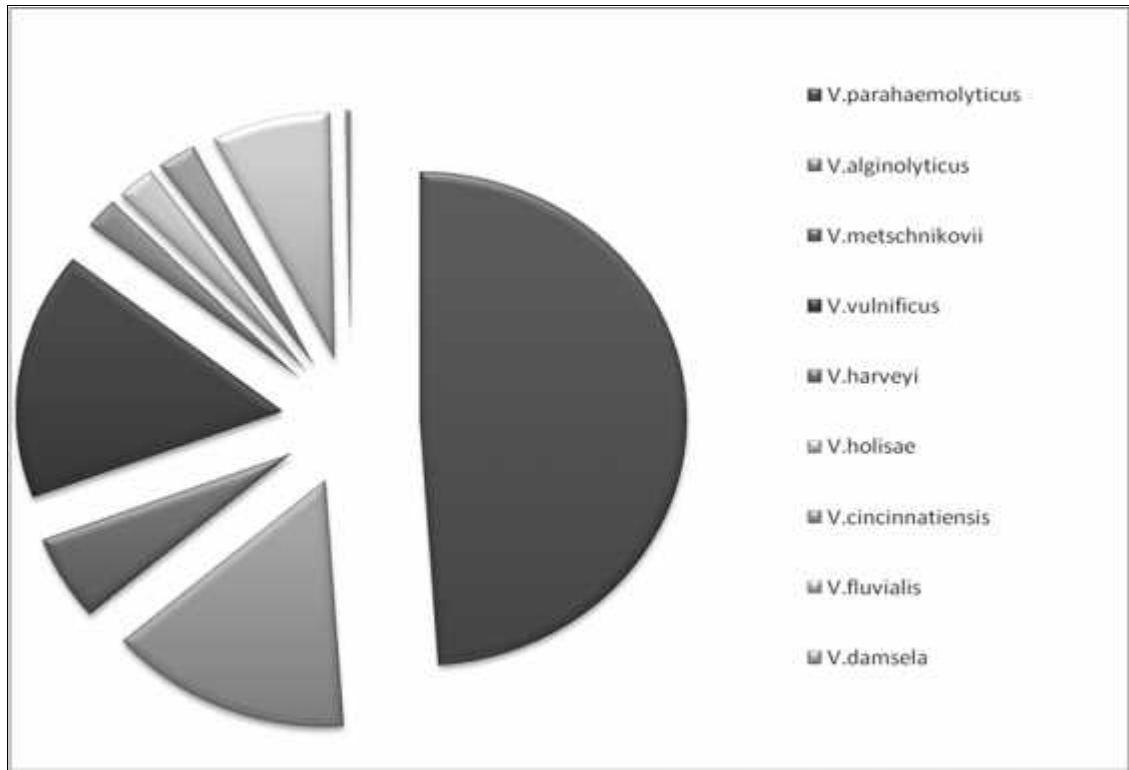
#### 1. *Vibrio parahaemolyticus*-ის გამოყოფა და ეკოლოგია

*V.parahaemolyticus*-ის და შესაბამისი ბაქტერიოფაგების მონიტორინგი ხორციელდებოდა 2006-2008 წლებში, საქართველოში, შავი ზღვის სანაპიროს ოთხ სხვადასხვა წერტილში და თბილისის შემოგარენში არსებულ წყალსატევებში (თბილისის ზღვა, ლისის ტბა, კუმისის ტბა), როგორც წყლიდან, ასევე ფიტო- და ზოოპლანქტონიდან (სურ.3).

ჩვენი გამოკვლევის ფარგლებში საქართველოს წყალსატევებიდან გამოიყო *V.parahaemolyticus* -ის 183 იზოლატი. *V.parahaemolyticus* -ის გამოყოფის სისშირე *Vibrio*-ს გვარის სხვა ჰალოფილურ სახეობებთან შედარებით მაღალი იყო და გამოყოფილი იზოლატების დაახლოებით 50% წარმოადგენდა *V.parahaemolyticus* -ს. (სურ.4)



სურ. 3. მონიტორინგის საიტები



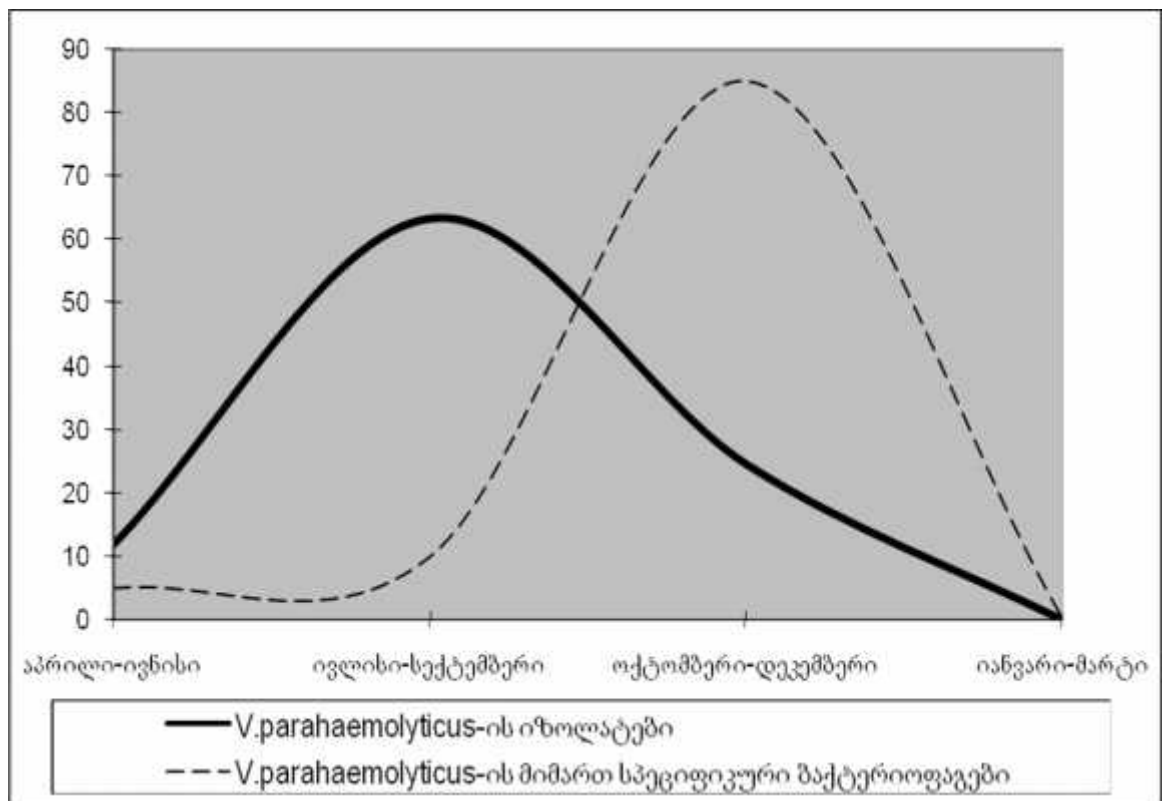
სურ. 4. პათოლოგიური ვიბრიონების გამოყოფის სისშირე

წყლის სინჯებში *V. parahaemolyticus* –ის გამოვლენა სხვადასხვა ბიოტურ და აბიოტურ ეკოლოგიურ ფაქტორზეა დამოკიდებული, როგორცაა წყლის ტემპერატურა, მარილიანობა, გახსნილი ჟანგბადის რაოდენობა, პლანქტონის შემცველობა და ა.შ. [71] (ცხრილი 5).

ცხრილი 5. ეკოლოგიური ფაქტორების გავლენა *V. parahaemolyticus*-ის გამოყოფაზე

ეკოლოგიური ფაქტორი	მარილიანობა ‰		წყლის ტემპერატურა °C		pH		გახსნილი ჟანგბადის რაოდენობა (მგ/ლ)	
	+	-	+	-	+	-	+	-
სინჯში <i>V. parahaemolyticus</i> -ის შემცველობა	+	-	+	-	+	-	+	-
პლანქტონისაგან თავისუფალი წყალი	12,9	12	22,8	16,5	7,7	7,8	4,4	4,3
ფიტოპლანქტონი	13,6	12,3	25,4	17,3	7,9	7,8	4,1	4,4
ზოოპლანქტონი	12,8	12,3	24,6	17	7,6	7,8	4,4	4,3

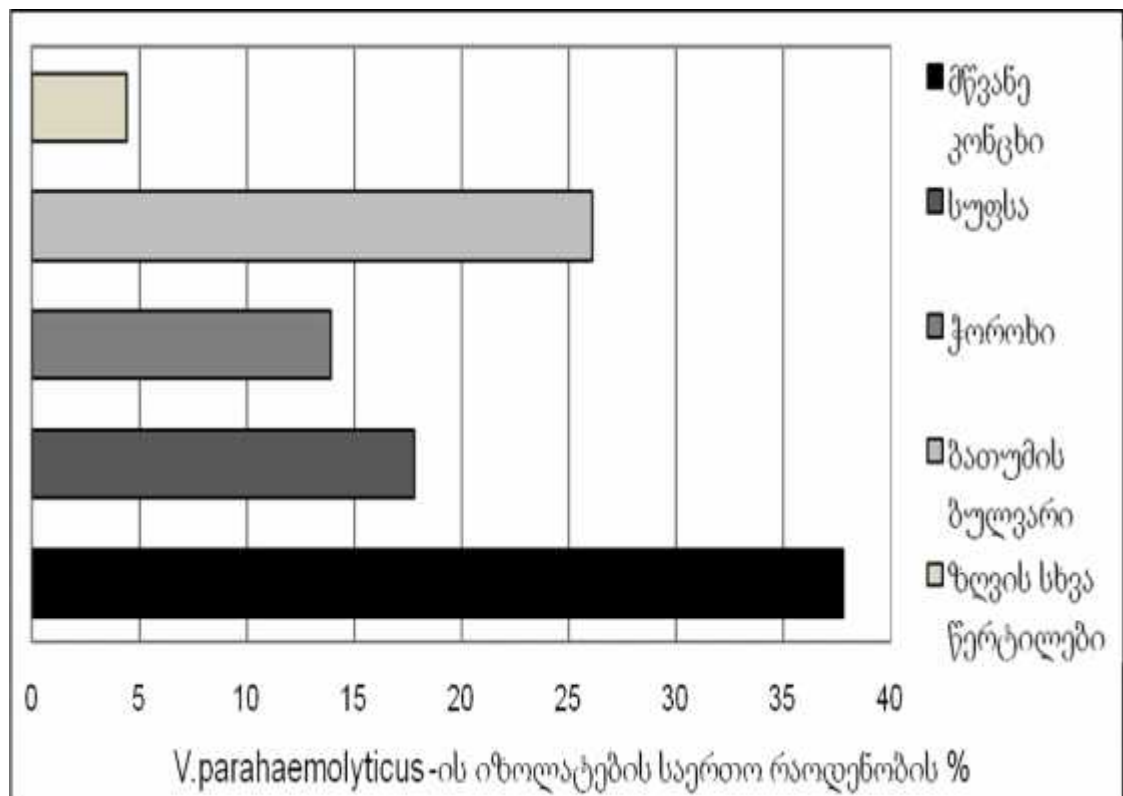
ჩატარებულმა მონიტორინგმა აჩვენა, რომ წყლის ტემპერატურა *V.parahaemolyticus*-ის გამოყოფის მნიშვნელოვანი ეკოლოგიური ფაქტორია, როგორც პლანქტონმოცილებული წყლის, ასევე ფიტო- და ზოოპლანქტონების შემთხვევაში. მოცემული შედეგი შეიძლება იმით აიხსნას, რომ ჩვენს მიერ ჩატარებული მონიტორინგის მანძილზე ტემპერატურისაგან განსხვავებით, წყლის მარილიანობა, მასში გახსნილი ჟანგბადის რაოდენობა და მჟავიანობა, წყლის ეკოსისტემის, მეტნაკლებად, უცვლელ მახასიათებლებს წარმოადგენდა. ტემპერატურაზე დამოკიდებულება განსაზღვრავს *V.parahaemolyticus* -ის გამოყოფის სეზონურ ხასიათს. *V.parahaemolyticus*-ის შტამების უმრავლესობა 100 იზოლატი ( 54.7%) გამოიყო შემოდგომის თვეებში, 69 (37.7%) –ზაფხულში, ხოლო 14 იზოლატი (7.6%)- გაზაფხულზე. *V.parahaemolyticus*-ის გამოყოფის პიკი დაფიქსირდა სექტემბერში - 55 იზოლატი (30.1%) ( სურ. 3).



სურ. 5. *V.parahaemolyticus*-ის და სპეციფიკური ბაქტერიოფაგების გამოყოფის დინამიკა

გარდა ტემპერატურისა მნიშვნელოვანი მახასიათებელია წყლის მარილიანობა, რამდენადაც *V.parahaemolyticus* -ის შტამების უმრავლესობა- 180 იზოლატი (98.3%) გამოიყო შავი ზღვის სხვადასხვა წერტილიდან, სადაც მტკნარ წყალსაცავებთან შედარებით მარილიანობა მაღალია. მხოლოდ 3 იზოლატი ( 1.7%) გამოიყო მტკნარი წყალსატევებიდან, მათგან 2- მდინარე მტკვრის, 1 კი- კუს ტბის წყლიდან. ამასთან

შავი ზღვის თითოეულ საიტში გამოყოფის სიხშირე იყო განსხვავებული (სურ. 6). ყველაზე მაღალი სიხშირე დაფიქსირდა მწვანე კონცხში, ხოლო ყველაზე დაბალი - ჭოროხის ესტუარიაში. შტამების გამოყოფის ეს კანონზომიერებაც დაკავშირებულია მოცემულ წერტილებში მარილის განსხვავებულ შემცველობასთან. *V.parahaemolyticus*, როგორც ჰალოფილური სახეობა, ჭარბობს სწორედ იმ ადგილებში, სადაც მარილიანობა უფრო მაღალია.

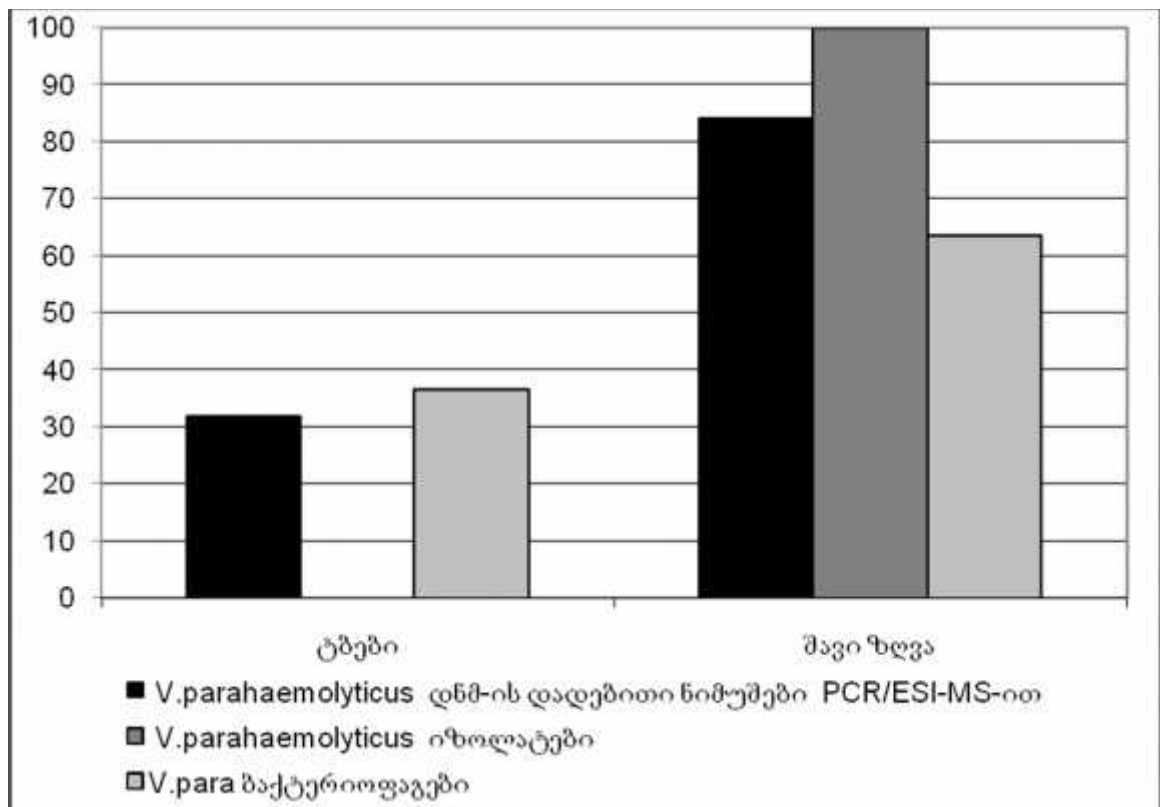


სურ. 6. *V.parahaemolyticus*-ის იზოლატების გამოყოფა

რაც შეეხება პლანქტონის შემცველობის გავლენას, *V.parahaemolyticus* -ის იზოლატების საკმაოდ დიდი ნაწილი- 50 ბაქტერიული შტამი (27%) გამოიყო პლანქტონიდან, მათ შორის 30 ( 16.4%) ზოოპლანქტონიდან, ხოლო 20 ( 10.9%) – ფიტოპლანქტონიდან.

## 2. *Vibrio parahaemolyticus*-ის ბაქტერიების გამოვლენა პირდაპირი დეტექციის მეთოდით

PCR/ESI-MS გამოყენებით წყლის ნიმუშებიდან *Vibrio*-ს სხვა პათოგენურ სახეობებთან ერთად მოხდა *Vibrio parahaemolyticus*-ის გამოვლენა და იდენტიფიკაცია [172]. *V. parahaemolyticus* –ის დნმ აღმოჩნდა როგორც ზღვის ასევე ტბის წყლების სინჯებში, მაშინ როდესაც *V. parahaemolyticus* არ ამოთესილა ტბის წყლის არც ერთი ნიმუშიდან. საინტერესოა, რომ ეს მონაცემები დადებით კორელაციაშია *V. parahaemolyticus* –ის მიმართ სპეციფიკური ბაქტერიოფაგების გამოყოფის შედეგებთან ( სურ. 7). ეს შეიძლება აიხსნას, ერთის მხრივ, მტკნარი წყლის ჰიდრობიონტებით ზღვის ბაქტერიის გადატანის უნარით, და ასევე, ამ ბაქტერიის პერსისტირებით სიცოცხლისუნარიან, მაგრამ არაკულტივირებად ფორმაში (იხ. თავი III.4 ).



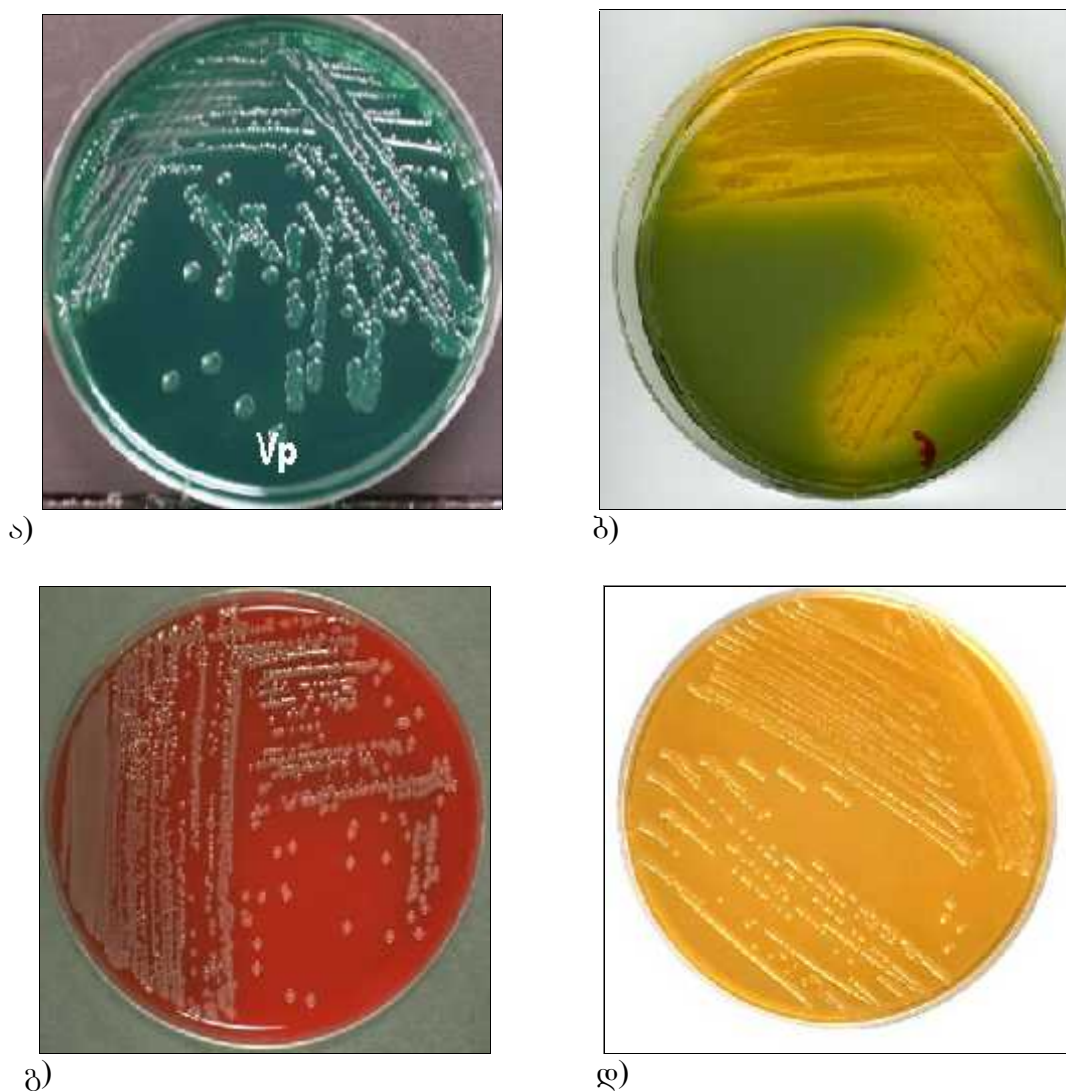
სურ. 7. *V. parahaemolyticus*-ის და შესაბამისი ბაქტერიოფაგების დეტექცია



### 3. ბაქტერიული შტამების ბიოლოგიური თვისებების შესწავლა

საკვლევი შტამების კულტურალურ-მორფოლოგიურ თვისებებს ვსწავლობდით ბაქტერიების ზრდის ხასიათით როგორც ზოგად, ასევე სპეციფიკურ (TCBS); მყარ, თხევად და ნახევრადთხევად არეებზე (სურ. 8).

მყარ LB-ნიადაგზე *Vibrio parahaemolyticus*-ის იზოლატები წარმოქმნიან 2-5 მმ ზომის ღორწოვან კოლონიებს. პეპტონიან წყალში იზრდებიან ზედაპირულად, აპკის სახით. TCBS-აგარზე *Vibrio parahaemolyticus*-ის იზოლატები, როგორც წესი, წარმოქმნიან მწვანე ფერის კოლონიებს, თუმცა აღმოჩნდა, რომ იზოლატების დაახლოებით 13% TCBS-აგარზე იზრდებოდა ყვითლად, რაც მიუთითებს ამ ბაქტერიების საქაროზის ფერმენტაციის უნარზე.



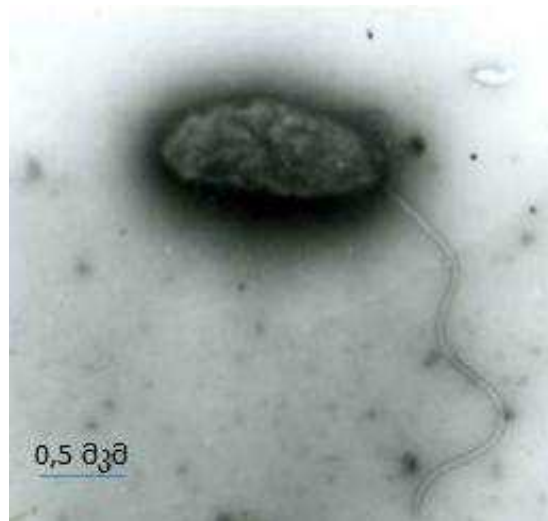
სურ. 8. სხვადასხვა ბაქტერიულ არეზე გაზრდილი *V.parahaemolyticus*-ის შტამები  
ა-ბ) TCBS-აგარი გ) სისხლიანი აგარი დ) LB-აგარი

შევისწავლეთ *Vibrio parahaemolyticus*-ის ზოგიერთი იზოლატის მორფოლოგია M10 (Opton-Zeiss, გერმანია) ელექტრონული მიკროსკოპის საშუალებით (სურ. 9).

*Vibrio parahaemolyticus*-ის ბაქტერიები მოხრილი ჩხირის ფორმისაა, ზომით სიგრძეში დაახლოებით 1-1,5 მკმ-ია, ხოლო სიგანეში 0,4-0,8 მკმ.



ა)



ბ)

სურ. 9. *V.parahaemolyticus*-ის შტამების ელექტრონული მიკროსკოპია

ა) *V.parahaemolyticus* 372 ბ) *V.parahaemolyticus* 548

**ბიოქიმიური თვისებების** შესწავლას ვაწარმოებდით სპეციალიზირებულ საკვებ არეებზე: კერძოდ: პროტეოლიზურ აქტივობას ვსწავლობდით ჟელატინის გაჯირჯვების მიხედვით GSA და GA აგარზე. *Vibrio*-ს გვარის ბაქტერიებს აქვთ როგორც გლუკოზის ფერმენტაციის, ასევე მისი დაჟანგვის უნარი. ვსწავლობდით აგრეთვე სხვადასხვა კონცენტრაციის ნატრიუმის ქლორიდის შემცველ თხევად ნიადაგში მიკრობთა ზრდას. *V.parahaemolyticus*-ის იზოლატები დანარჩენი სახეობების მსგავსად აუცილებლად იზრდებიან 1%-იან მარილიანობის ნიადაგში. თუმცა, როგორც ჰალოფილურ სახეობებს, არ ახასიათებთ უმარილო არეში ზრდა. სამაგიეროდ იზრდებიან 6%-იან და ზოგიერთ შემთხვევაში 8%-იან მარილიანობის არეშიც კი. შევისწავლეთ აგრეთვე *V.parahaemolyticus*-ის იზოლატების მიერ ნახშირწყლებისა და ამინომჟავების ფერმენტაცია. (ცხრილი 6.)

ცხრილი 6. *V.parahaemolyticus*-ის ზოგიერთი შტამის ბიოქიმიური თვისებები

შტამი	შტამების მახასიათებლები															
	TCBS	ციტოქრომ ოქსიდაზა	ჰელატივ პილარულაზა	ციტრატის მოხმარება	ზრდა უმარილო არეში	ზრდა 6% მარილიანობის არეში	ზრდა 8% მარილიანობის არეში	გლუკოზის ჟანგვა	გლუკოზის ფერმენტაცია	საკაროზის ფერმენტაცია	მანოზის ფერმენტაცია	ლაქტოზის ფერმენტაცია	არაბინოზის ფერმენტაცია	ლიზინ დეკარბოქსილაზა	არგინინ დეჰიდროლაზა	ორნითინ დეკარბოქსილაზა
<i>V.parahaemolyticus</i> S.W.7	ზ	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-	[+]	+	-	+
<i>V.parahaemolyticus</i> 315	ზ	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+
<i>V.parahaemolyticus</i> 328	ზ	+	+	-	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+
<i>V.parahaemolyticus</i> 372	ზ	+	+	-	-	+	+	+	+	-	[+]	[+]	[+]	+	-	+
<i>V.parahaemolyticus</i> 401	მ	+	+	[+]	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
<i>V.parahaemolyticus</i> 428	ზ	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+
<i>V.parahaemolyticus</i> 957	ზ	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-	[+]	+	-	+
<i>V.parahaemolyticus</i> 970	ზ	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-	[+]	+	-	+
<i>V.parahaemolyticus</i> 974	ყ	+	+	-	-	+	+	+	+	+	[+]	-	-	+	-	[+]
<i>V.parahaemolyticus</i> 641	მ	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+
<i>V.parahaemolyticus</i> 1025	ზ	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+
<i>V.parahaemolyticus</i> 3025	ზ	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+
<i>V.parahaemolyticus</i> 2335	მ	+	+	-	-	+	[+]	+	+	-	+	-	+	+	-	+
<i>V.parahaemolyticus</i> 2344	მ	+	+	-	+	-	[+]	+	+	+	+	-	+	+	-	+
<i>V.parahaemolyticus</i> 2358	მ	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+

ზ - ზეთისხილისფერი  
 მ - მწვანე  
 ყ - ყვითელი  
 + - დადებითი  
 - - უარყოფითი  
 [+] - არაზუსტი რეაქცია

**გენეტიკური იდენტიფიკაცია.** ბაქტერიული იზოლატების ბიოქიმიური იდენტიფიკაციის სიზუსტის გადასამოწმებლად გენეტიკურ დონეზე ვიყენებდით პოლიმერაზა ჯაჭვურ რეაქციას (PCR) და სახეობა-სპეციფიკურ პრაიმერებს (ცხრილი 1). შტამების 98%-თვის ბიოქიმიური იდენტიფიკაცია აღმოჩნდა ზუსტი. (სურ.10)



სურ. 10. კოლაგენაზა სპეციფიკური პოლიმერაზა ჯაჭვური რეაქცია

1. PCR-მარკერი; 2. V.para SW7; 3.V.para SW8; 4.V.para 315; 5.V.para 552; 6. V.para 548; 7. V.para1025; 8. V.para 1025; 9. V.para 528; 10. V.para 563; 11. V.para 651; 12.V.para 652; 13.V.para 653; 14.V.para 654; 15.V.para 328; 16.V.para 372; 17.V.para 932; 18. V.para 950; 19.Vpara 905; 20.V.para 957; 21.V.para 966; 22.V.para 1010; 23. V.para 970; 24.V.para1019; 25.V.para1023; 26. PCR-მარკერი.

**სეროტიპის განსაზღვრა.** სეროტიპირება ანტიგენის განსაზღვრის მიზნით განხორციელდა სლაიდ-აგლუტინაციის მეთოდით *V.parahemolyticus*-ის 81 იზოლატზე (ცხრილი 7). აღნიშნულ შტამებს შორის გამოვლინდა 9 სეროჯგუფის და 27 სხვადასხვა სეროტიპის წარმომადგენლები არატიპირებული იზოლატების ჩათვლით. მათი საკმაოდ დიდი ნაწილის (24 იზოლატი) სეროტიპირება ვერ მოხერხდა. შემოწმებული შტამების 25% და ტიპირებული შტამების 35% მიეკუთვნებოდა O3-სეროტიპს. ფოთსა და ქობულეთში მოცემული სეროტიპის არც ერთი იზოლატი არ გამოყოფილა, მაშინ როდესაც აქ აღინიშნებოდა O8-სეროტიპის დომინანტობა (გამოყოფილი შტამების 60%). O3-სეროტიპი კვებითი ინფექციების გამომწვევი ყველაზე ხშირი წარმომადგენელია. მას მიეკუთვნება პანდემური კლონი- O3:K6 [137], რომლის მიერ არაერთი გლობალური ინფექცია იქნა გამოწვეული უკანასკნელ წლებში. ჩვენს კვლევაში არცერთი შტამი არ აღმოჩნდა მოცემული სეროტიპის მქონე, თუმცა მწვანე კონცხიდან გამოყოფილი ერთ-ერთი შტამი ტიპირებულ იქნა, როგორც O1:KUT , რაც O3:K6-ის პანდემური კლონის სეროვარიანტს წარმოადგენს. მოცემული ბაქტერიული იზოლატი tdh- და trh-უარყოფითი იყო, თუმცა გააჩნდა O3:K-ის GS-PCR

მარკერი. პანდემური შტამის მარკერთან ერთად მოცემული სეროტიპის არსებობა შავ ზღვაში პანდემური შტამების ან მათი ვარიანტების არსებობაზე მიუთითებს. უფრო მეტიც, კლინიკურად მნიშვნელოვანი O2:K28, O3:K31, O3:KUT, O4:KUT-სეროტიპების გამოყოფის სისწრე რეგიონში კლინიკურად მნიშვნელოვანი შტამების არსებობას ადასტურებს.

**ვირულენტობის ფაქტორების შესწავლა** განხორციელდა *V.parahaemolyticus*-ის გენეტიკურად იდენტიფიცირებულ 81 შტამზე. PCR-ის საშუალებით მოხდა მოცემული შტამების შემოწმება *tdh*, *trh*, *tlh*, ფილამენტური ფაგის *f237*-ის *ORF8*, პანდემური ჯგუფ-სპეციფიკური *toxRS*-ის და *TTSS1*-ის *VP1680* და *VP1686*-გენების მიხედვით.

არც ერთი შტამი არ აღმოჩნდა *tdh*-გენის მატარებელი. შესწავლილი შტამები აგრეთვე არ აექსპრესირებდა *tdh* –ის მონათესავე *trh*-ის გენს. რაც შეეხება თერმოლაბილურ ჰემოლიზინს, 3 შტამის გარდა, ყველა შეიცავდა მის მაკოდირებელ გენს. ამ შტამებიდან ორი იყო O2:K28-სეროტიპის, ერთი კი არატიპირებადი. არცერთი შტამი არ შეიცავდა ფილამენტური ფაგის *f237*-ის *ORF8*- გენს. 7 იზოლატი შეიცავდა პანდემური ჯგუფ-სპეციფიკურ *toxRS*-მარკერს, რისი დადასტურებაც მოხდა აგაროზის გელზე 651 ნუკლეოტიდური წყვილის სიდიდის ბენდის ვიზუალიზაციით. თითოეული შტამი სხვადასხვა სეროტიპს მიეკუთვნებოდა, მათ შორის იყო: O1:KUT, O3:KUT, O3:K31, O3:K33, O3:K65, UT. განსაკუთრებით მნიშვნელოვანია O1:KUT- ის არსებობა, რომელიც ერთ-ერთი პანდემიის დროს იქნა დაფიქსირებული. 6 მათგანი UT-სეროტიპს მიეკუთვნებოდა, 5- O3:K31-ს, 1 კი- O1:K58-ს.

78 შტამი (96%) დადებითი აღმოჩნდა *TTSS1*-მესამე ტიპის სეკრეციული სისტემის ეფექტორული პროტეინების- *VP1680* და *VP1686*-ის არსებობის მიხედვით. ერთი შტამი *VP1686*-ის მიხედვით აღმოჩნდა დადებითი, თუმცა უარყოფითი იყო *VP1680*-ის და სხვა ვირულენტობის ფაქტორებისა და პანდემური მარკერების მიხედვით და ვერ განხორციელდა მათი ტიპირება. 2 შტამი, რომლებიც როგორც *VP1680*-ის, ასევე *VP1686*-ის არსებობის მიხედვით, უარყოფები აღმოჩნდნენ, და აგრეთვე არ დაფიქსირდა მათში არც ერთი ვირულენტობის გენის ექსპრესია, ტიპირებულ იქნა როგორც O2:K28 და O10:K61.

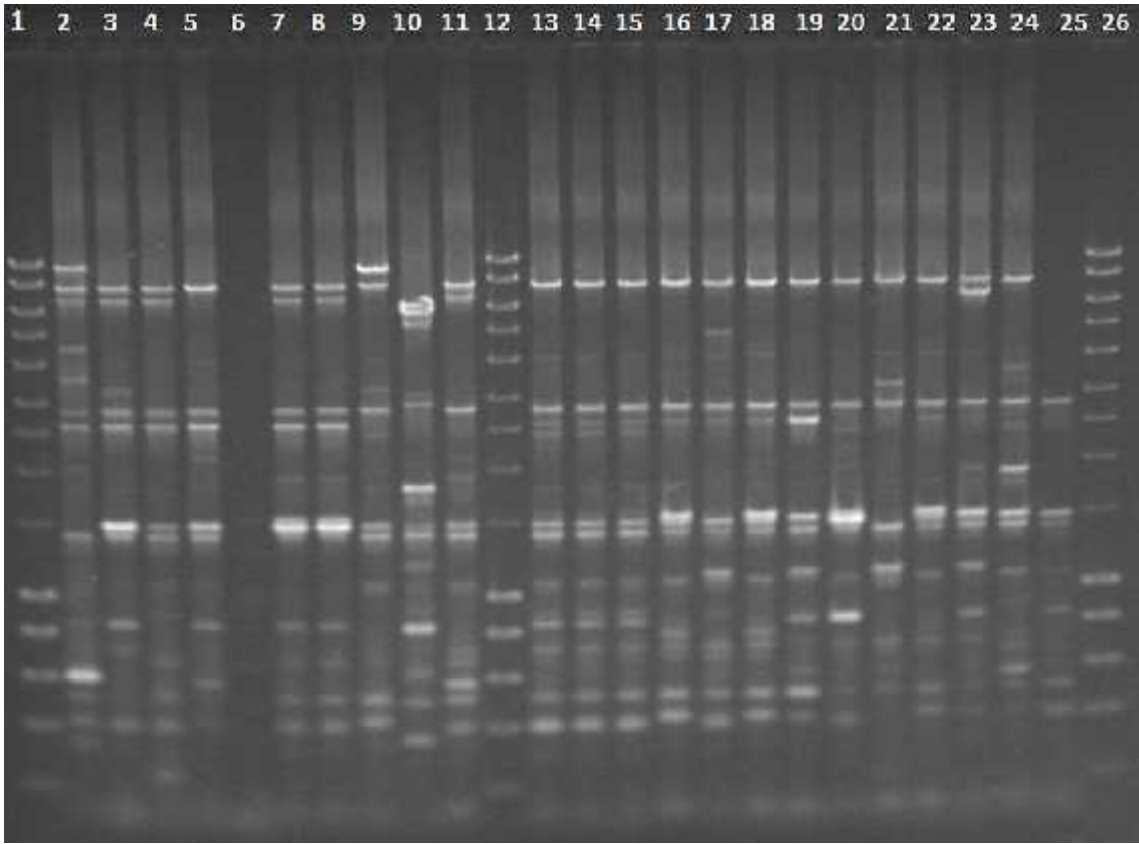
თერმოლაბილური ჰემოლიზინის და მესამე ტიპის სეკრეციული სისტემის ეფექტორული პროტეინების არსებობა რეგიონში პათოგენური შტამების არსებობის შესაძლებლობაზე მიუთითებს. ზემოთნახსენები თვისებებით ხასიათდებოდა შემოწმებული შტამების 96%, რაც შესაძლებლობას იძლევა დავასკვნათ, რომ შავი ზღვის *V.parahaemolyticus*-ის პოპულაციაში ვირულენტობის ფაქტორები ფართოდაა გავრცელებული. გარდა ამისა, *tlh*- და *TTSS1*-დადებით შტამებს შორის O3:K6-პანდემური კლონის სეროვარიანტის არსებობა საქართველოში შავი ზღვის სანაპიროზე საზოგადოებრივი ჯანდაცვისთვის საყურადღებო მოვლენაა, რამდენადაც ასეთი ტიპის იზოლატები ინფექციის წყაროა დაზიანებული კანის (ჭრილობითი ინფექციები) ან ზღვის პროდუქტების დაბინძურების (კვებითი ინფექციები) შემთხვევაში.

**ჰემოლიზის უნარის-იგივე კანაგავა-ფენომენის** ანალიზი ხდებოდა ვაგაცუმა სისხლიან-აგარზე. ჩვენს მიერ გამოყოფილი არც ერთი შტამი არ აღმოჩნდა კანაგავა-დადებითი. მოცემული შედეგი დადასტურებულ იქნა გენეტიკურადაც, ვირულენტობის ფაქტორების შესწავლისას არც ერთ მათგანს არ აღმოაჩნდა *tdh*-გენი.

ცხრილი 7. *V.parahaemolyticus*-ის შტამების სეროლოგიური და გენეტიკური მახასიათებლები

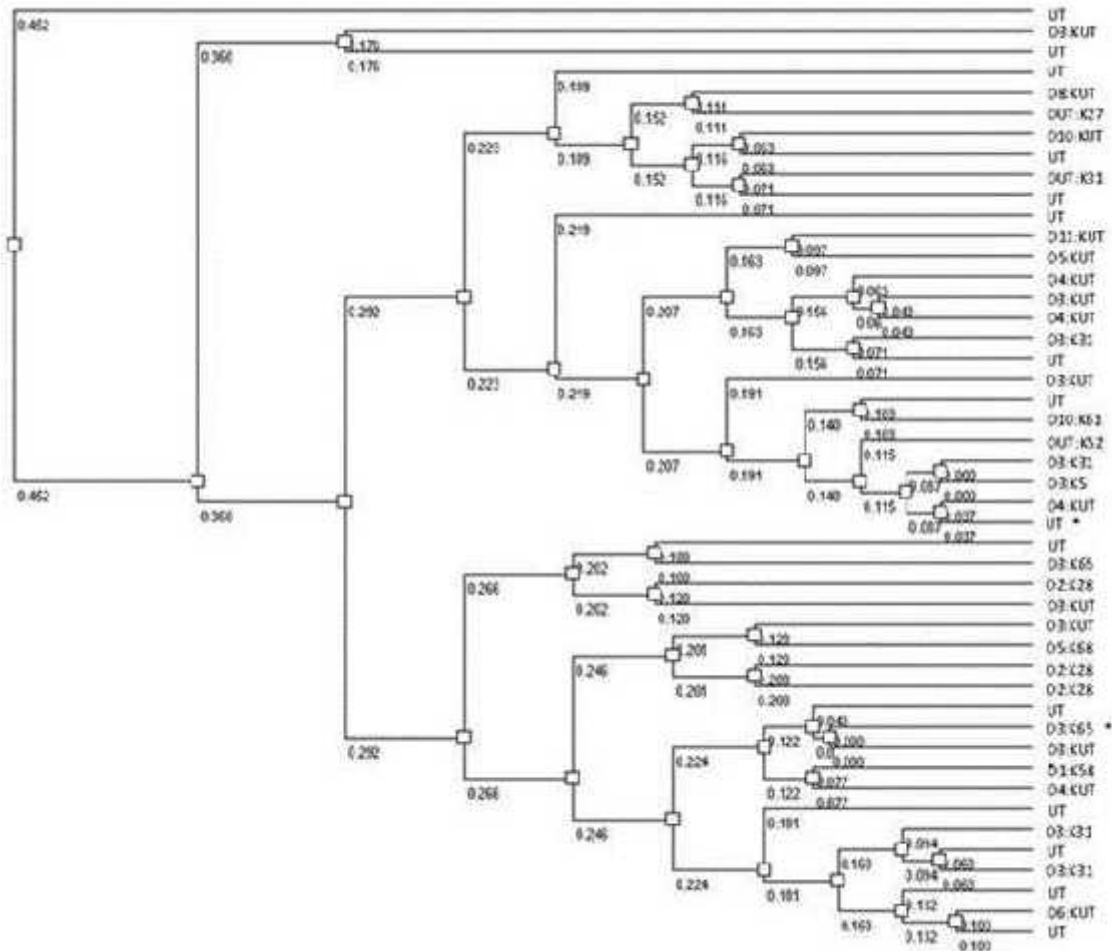
შეროტიპი	იზოლატების რაოდენობა	თერმოსტაბილური პირდაპირი ჰემოლიზინი (tdh)	თერმოსტაბილური ჰემოლიზინი (tth)	თერმოსტაბილური პირდაპირი ჰემოლიზინის მონათესავე ჰემოლიზინი (trh)	მესამე ტიპის სეკრეციული სისტემის ცილა VP1680	მესამე ტიპის სეკრეციული სისტემის ცილა VP1686	ფილაგენტური ფაგის ORF8-გენი	პანდემური კლონის ჯგუფ-სპეციფიკური პჯრ-მარკერი
O1:K32	1	0	1( 100%)	0	1( 100%)	1( 100%)	0	0
O1:K58	1	0	1( 100%)	0	1( 100%)	1( 100%)	0	0
O1:KUT	1	0	1( 100%)	0	1( 100%)	1( 100%)	0	1 (100%)
O2:K28	8	0	7(87.5%)	0	7 (87.5%)	7 (87.5%)	0	0
O2:KUT	1	0	1( 100%)	0	1( 100%)	1( 100%)	0	0
O3:K5	1	0	1( 100%)	0	1( 100%)	1( 100%)	0	0
O3:K31	7	0	7( 100%)	0	7( 100%)	7( 100%)	0	1 (1)
O3:K33	1	0	1( 100%)	0	1( 100%)	1( 100%)	0	1 (100%)
O3:K51	2	0	2 (100%)	0	2 (100%)	2 (100%)	0	0
O3:K65	2	0	2 (100%)	0	2 (100%)	2 (100%)	0	1 (50%)
O3:KUT	7	0	7( 100%)	0	7( 100%)	7( 100%)	0	1 (14%)
O4:K12	1	0	1( 100%)	0	1( 100%)	1( 100%)	0	0
O4:K34	1	0	1( 100%)	0	1( 100%)	1( 100%)	0	0
O4:K37	1	0	1( 100%)	0	1( 100%)	1( 100%)	0	0
O4:KUT	7	0	7( 100%)	0	7( 100%)	7( 100%)	0	0
O5:K68	2	0	2 (100%)	0	2 (100%)	2 (100%)	0	0
O5:KUT	2	0	2 (100%)	0	2 (100%)	2 (100%)	0	0
O6:KUT	1	0	1( 100%)	0	1( 100%)	1( 100%)	0	0
O8:KUT	2	0	2 (100%)	0	2 (100%)	2 (100%)	0	0
O10:K61	1	0	0	0	0	0	0	0
O10:K60	1	0	1( 100%)	0	1( 100%)	1( 100%)	0	0
O10:KUT	1	0	1( 100%)	0	1( 100%)	1( 100%)	0	0
O11:KUT	1	0	1( 100%)	0	1( 100%)	1( 100%)	0	0
OUT:K27	1	0	1( 100%)	0	1( 100%)	1( 100%)	0	0
OUT:K33	2	0	2 (100%)	0	2 (100%)	2 (100%)	0	1 (50%)
OUT:K52	1	0	1( 100%)	0	1( 100%)	1( 100%)	0	0
UT	24	0	23(95.8%)	0	23 (95.8%)	24 (100%)	0	1 (4%)
სულ:	81	0	78	0	78	79	0	7

მოლეკულური მრავალფეროვნების შესწავლა. 45 შემთხვევითად შერჩეულ ბაქტერიულ შტამზე გაკეთდა rep-PCR (სურ. 11). შედეგების გაანალიზება მოხდა ბენდების განაწილების მიხედვით GelDoc-It™ –სისტემით (Ultra-Violet Products, Upland, CA). არსებული სურათის საფუძველზე აიგო დენდროგრამა (სურ. 12) გამოვლინდა შავი ზღვიდან გამოყოფილი შტამების კლონური მრავალფეროვნება, რაც შესაბამისობაშია სეროტიპებისა და სეროჯგუფების მრავალფეროვნებასთან.



სურ. 11. *V. parahaemolyticus*-ის იზოლატების Rep-PCR.

1. Rep-PCR-მარკერი; 2. V.para SW7; 3.V.para SW8; 4.V.para 315; 5.V.para 552; 6. V.para 548; 7. V.para1025; 8. V.para 1025; 9. V.para 528; 10. V.para 563; 11. V.para 651; 12.V.para 652; 13.V.para 653; 14.V.para 654; 15.V.para 328; 16.V.para 372; 17.V.para 932; 18. V.para 950; 19.Vpara 905; 20.V.para 957; 21.V.para 966; 22.V.para 1010; 23. V.para 970; 24.V.para1019; 25.V.para1023; 26. Rep-PCR-მარკერი.

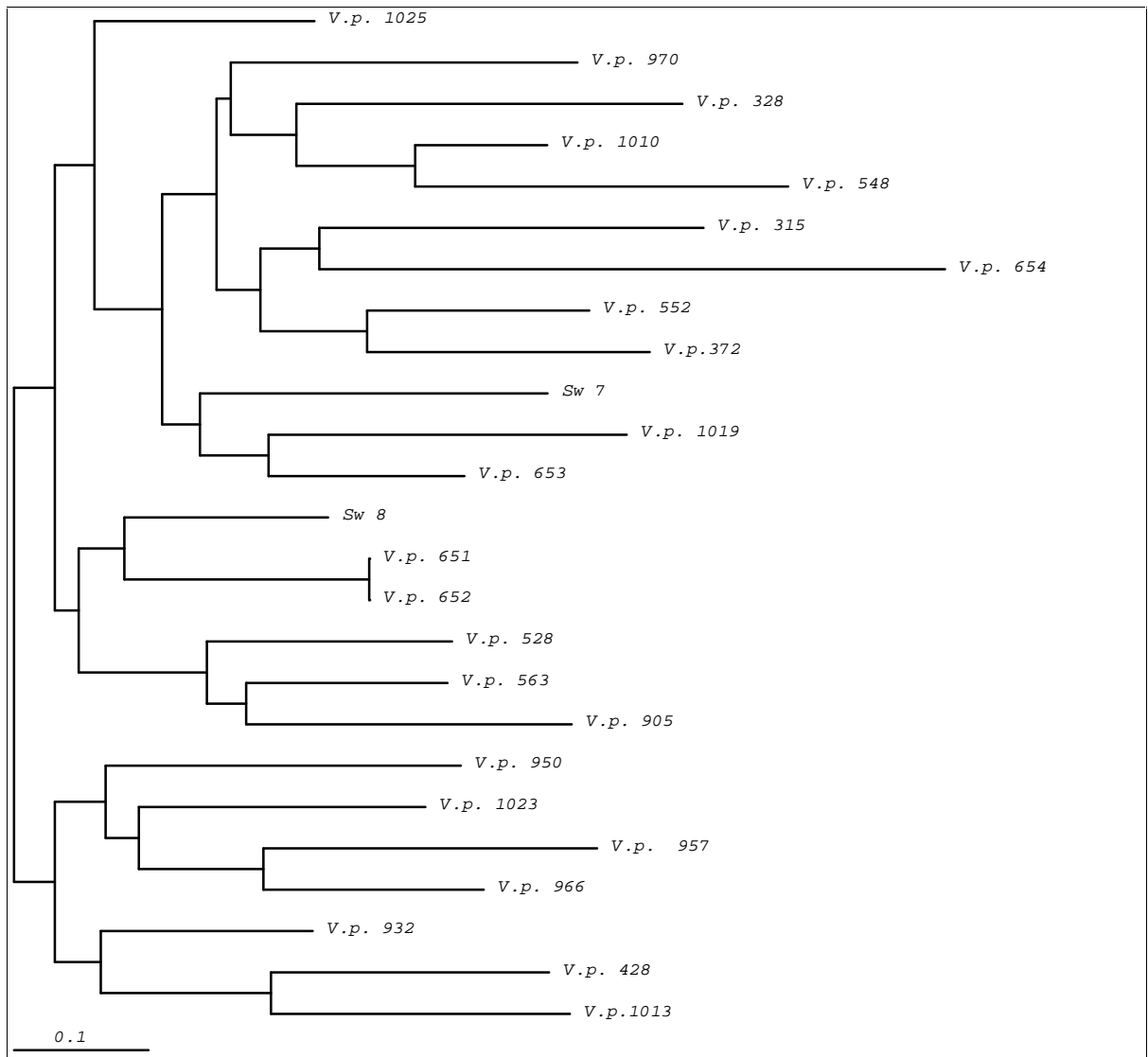


სურ. 12 *V.parahaemolyticus*-ის შემთხვევითად შერჩეული ზოგიერთი შტამის Rep-PCR-ის დენდროგრამა



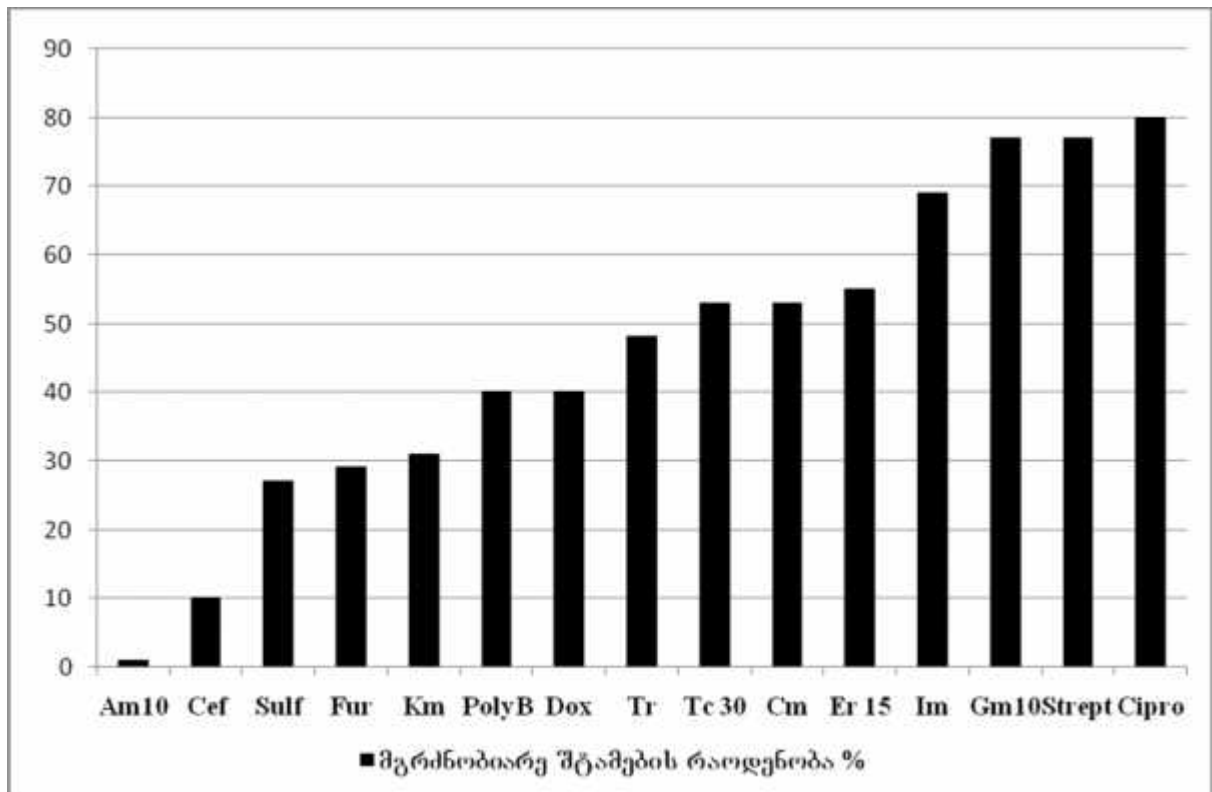
შტამების გენოტიპირებისათვის და მოლეკულური მრავალფეროვნების შესასწავლად ალტერნატიულ მეთოდად გამოვიყენეთ ასევე პულსირებად გელში გელ-ელექტროფორეზის მეთოდი (PFGE). ეს მეთოდი ფართოდ არის აპრობირებული მრავალი ბაქტერიული აგენტის დიფერენცირებისათვის.

შემთხვევითად შერჩეულ 73 ბაქტერიულ შტამზე გაკეთებულმა ანალიზმა აჩვენა შტამების საკმაოდ დიდი მრავალფეროვნება, რაც ზოგადად დამახასიათებელია გარემოდან გამოყოფილი შტამებისთვის. (სურ. 13).



სურ. 13. *V. parahaemolyticus* -ის იზოლატების PFGE- დენდროგრამა

**ანტიბიოტიკებისადმი მგრძობელობა.** შერჩეული შტამები შემოწმდა აგრეთვე ანტიბიოტიკების მიმართ მგრძობელობაზე დისკების დიფუზიის მეთოდით მყარ არეზე (Muller-Hinton-ს აგარი). გამოყენებულ იქნება 12 ანტიბიოტიკი. შედეგი ჩაიწერა ამ მეთოდის კლასიკური შეფასების შესაბამისად: მგრძობიარე, საშუალოდ მგრძობიარე და რეზისტენტული (S, I და R). შესწავლილი შტამების დაახლოებით 40% რეზისტენტული აღმოჩნდა ყველა ანტიბიოტიკის მიმართ. ანტიბიოტიკორეზისტენტული ბაქტერიების მაღალი პროცენტული მაჩვენებელი დაკავშირებულია იმასთან, რომ ჩვენს მიერ შესწავლილი შტამები გარემოდან გამოყოფილი, არაპათოგენური იზოლატებია, რომლებიც, როგორც წესი, ანტიბიოტიკების მიმართ ნაკლები მგრძობელობით ხასიათდებიან. ყველაზე მაღალი მგრძობელობა დაფიქსირდა ციპროფლოქსაცინის, სტრეპტომიცინისა და გენტამიცინის მიმართ. ამავე დროს შტამების უმრავლესობამ გამოავლინა რეზისტენტობა ამპიცილინის მიმართ. (სურ. 14)



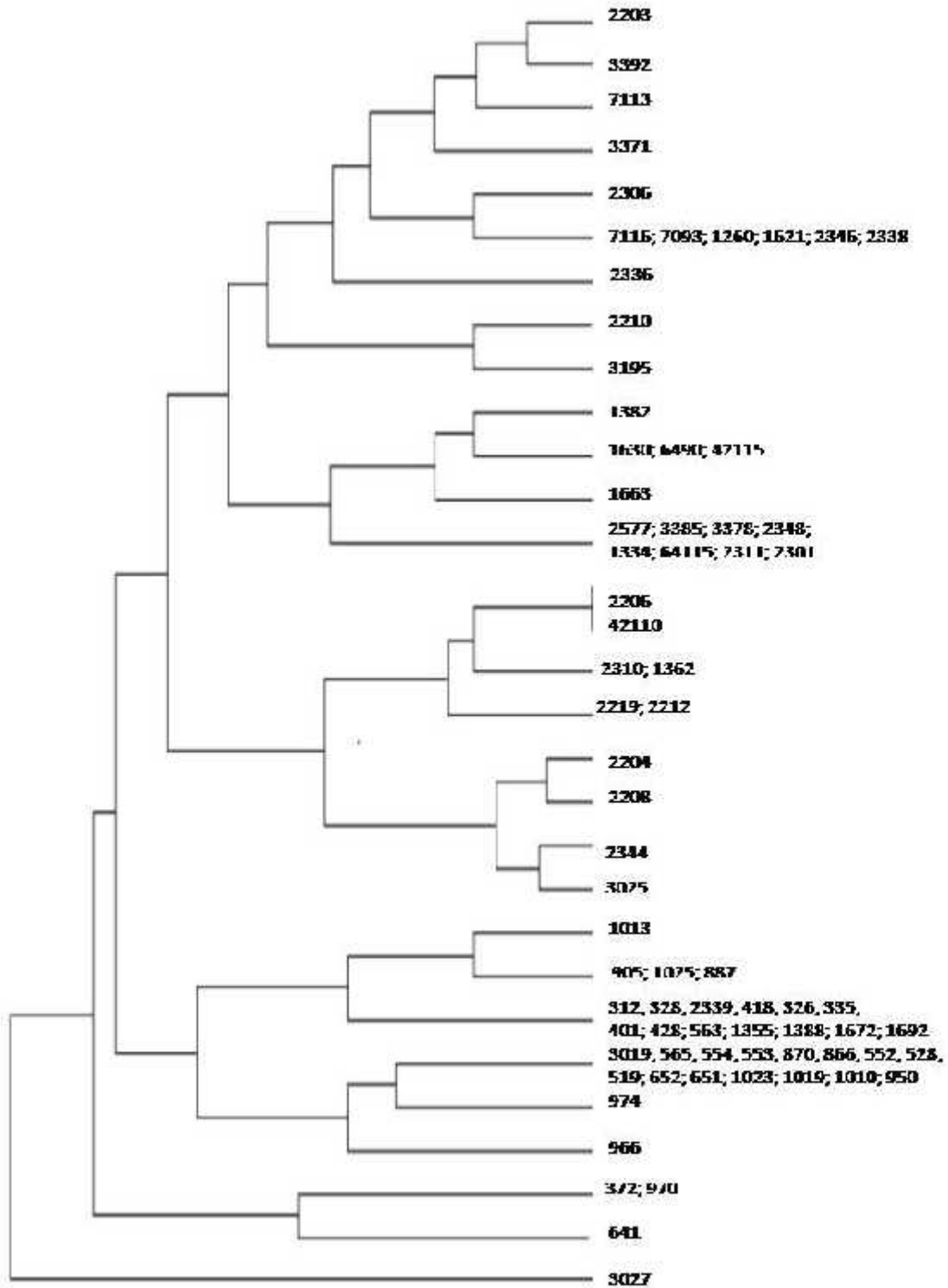
სურ.14. *V.parahaemolyticus*-ის ანტიბიოტიკების მიმართ მგრძობიარე იზოლატების %-ული რაოდენობა

**ბაქტერიოფაგების მიმართ მგრძობელობა.** გამოყოფილი ბაქტერიული იზოლატები შემოწმდა კვლევის ფარგლებში გამოყოფილი ბაქტერიოფაგების მიმართ მგრძობელობაზე. 87 შტამი (47.5%) მგრძობიარე აღმოჩნდა მოცემული ფაგების მიმართ. ფაგომგრძობელობის პროფილის მიხედვით ბაქტერიული შტამების შედარების და მათი დაჯგუფების მიზნით ავაგეთ დენდროგრამა ( სურ. 14).

საინტერესოა აგრეთვე ფაგომგრძობელობისა და შტამების სეროლოგიური მახასიათებლების ურთიერთკავშირი (ცხრილი 8). ფაგების მიმართ ყველაზე მაღალი მგრძობელობით ხასიათდებიან O3:K51, O3:K65 და O10:KUT სეროტიპების შტამები. რაც შეეხება O3:K6-ის პანდემური კლონის სეროვარიანტს- 01:KUT (*V.parahaemolyticus* 1019) - ის, მის მიმართ აქტიური აღმოჩნდა მხოლოდ ერთი ბაქტერიოფაგი- VpaA11.

ცხრილი. 8. *V.parahaemolyticus*-ის სხვადასხვა სეროტიპის შტამების ფაგომგრძობელობა

აქტიური ბაქტერიოფაგები	სეროტიპი	O1:K58	O1:KUT	O2:K28	O2:KUT	O3:K51	O3:K65	O3:KUT	O4:K12	O5:K68	O5:KUT	O8:KUT	O10:K60	O10:KUT	UT	O10:K27	O10:K33
	რაოდენობა	1	1	3	2	19	8	3	1	2	2	2	5	14	3	4	1
	%	2, 43	2, 43	7, 32	4, 88	46,3	19,5	7, 32	2, 43	4, 88	4, 88	4, 88	12, 2	34,2	7, 32	9, 76	2, 43



**0,1**

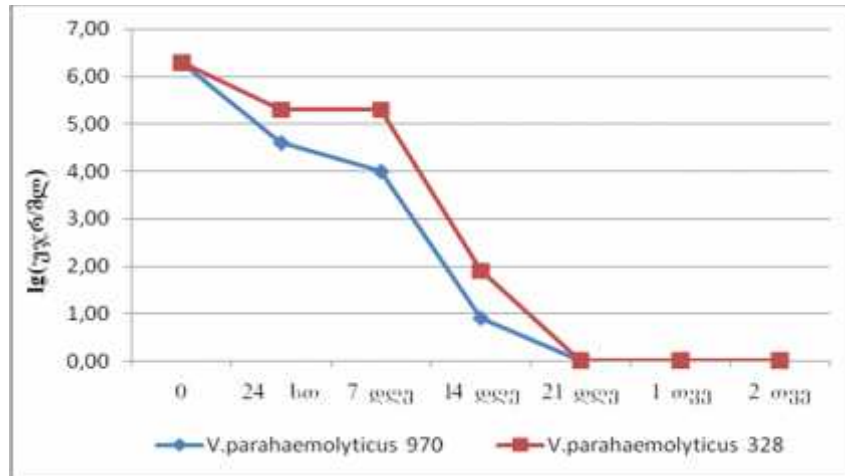
სურ. 15. *V. parahaemolyticus*-ის შტამების დენდროგრამა ბაქტერიოფაგების მიმართ მგრძობელობის მიხედვით

#### 4. არაკულტივირებადი, მაგრამ სიცოცხლისუნარიანი მდგომარეობა (VBNC)

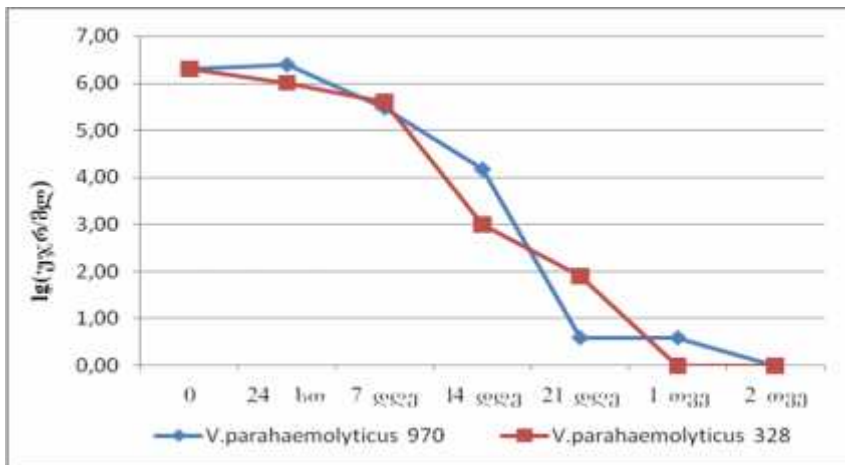
*V.parahaemolyticus* –ის ბაქტერიების გადასვლის უნარს ვსწავლობდით არასაკმარისი საკვების შემცველობის და არახელსაყრელი ტემპერატურული რეჟიმის შექმნით. ვიყენებდით ლისისა და შავი ზღვის წყლებს, შესადარებლად კი მდიდარ საკვებ არეს LB-ნიადაგს. არახელსაყრელი ტემპერატურის მაგალითად ვიყენებდით 4°C-ს, კონტროლად კი ოპტიმალურ ტემპერატურას- 25°C-ს. უჯრედები ითვლებოდა არაკულტივირებად მდგომარეობაში, როდესაც ხდებოდა 0.1 უჯ/მლ -ზე ნაკლები კულტივირებადი უჯრედის გამოვლენა.

კვლევაში აჩვენა, რომ 4°C-ზე ტბის წყალში *V.parahaemolyticus* –ის ბაქტერიები უფრო სწრაფად (21 დღეში) გადადიან არაკულტივირებად მდგომარეობაში, ვიდრე ზღვის წყალში (1-2 თვე) (სურ.15. ა, ბ). მოცემული მანვენებელი დაკავშირებულია *V.parahaemolyticus* –ის, როგორც ჰალოფილური სახეობის მიერ მარილის მოხონილებასთან. რაც შეეხება მდიდარ საკვებ არეს, აქ 2 თვიანი პერიოდის განმავლობაში კულტივირებადი ბაქტერიების რაოდენობა მხოლოდ 2 log- ით შემცირდა (სურ. 15. გ) და, შესაბამისად, არ მოხდა არაკულტივირებად მდგომარეობაში გადასვლა. ეს ფაქტი შესაძლოა აიხსნას არეში საკმარისი რაოდენობით საკვები ნივთიერებების არსებობით.

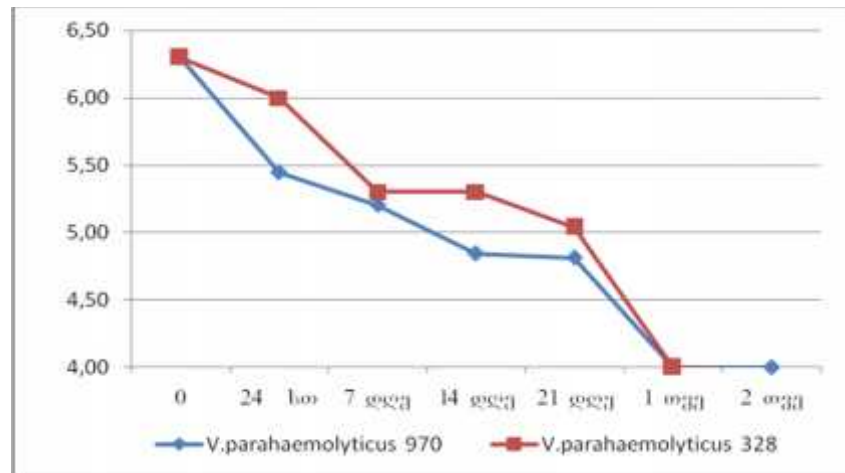
რაც შეეხება ოპტიმალურ 25°C ტემპერატურაზე შენახულ ბაქტერიებს, არც ერთ არეში არ მოხდა არაკულტივირებად მდგომარეობაში გადასვლა, 2 თვიანი დაყოვნების შემდეგ ბაქტერიული უჯრედების რაოდენობა  $10^3$ - $10^4$  იყო. თუმცა საკვები ნივთიერებებით ღარიბ წყალში, სიცოცხლისუნარიან ბაქტერიულ უჯრედთა რაოდენობა უფრო სწრაფად მცირდებოდა, ვიდრე LB-ნიადაგში.



ა)



ბ)

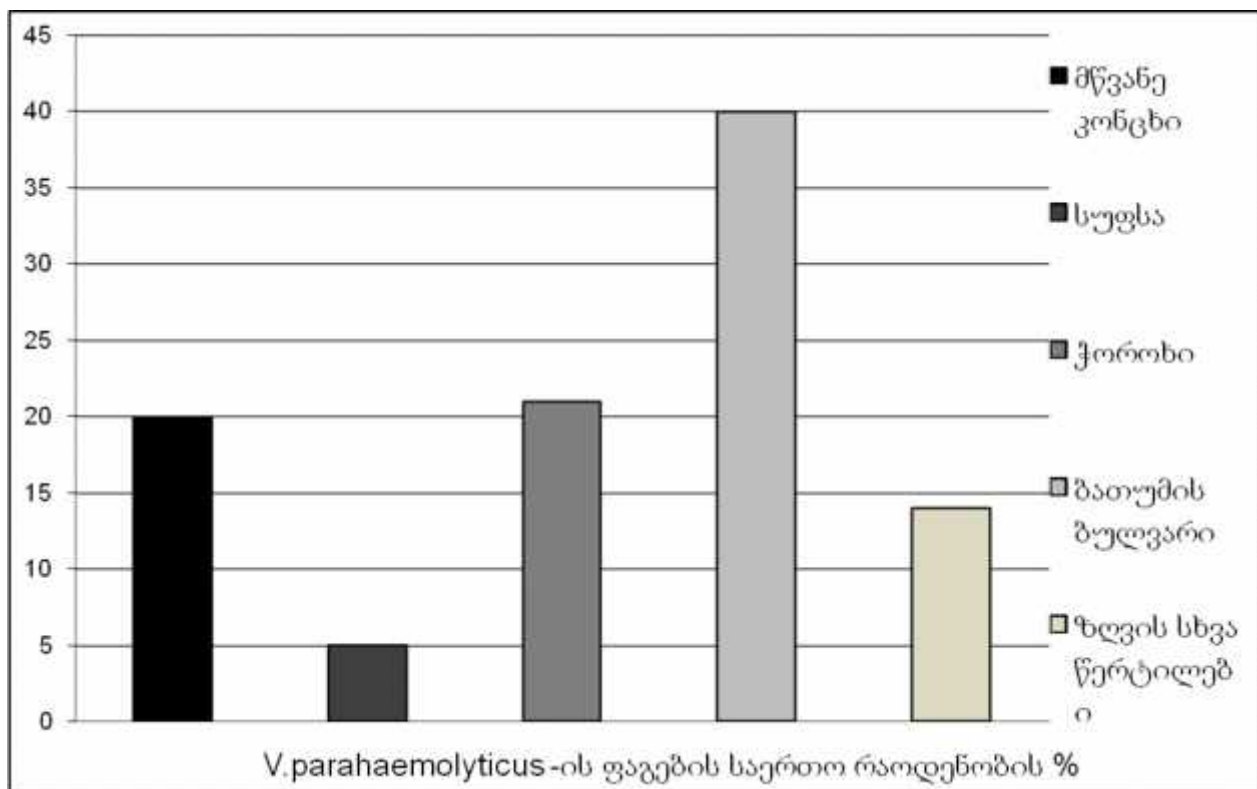


გ)

სურ. 16. *V.parahaemolyticus* –ის ბაქტერიების სიცოცხლისუნარიანობის შესწავლა 4<sup>0</sup>C-ზე სხვადასხვა არეში ა) ლისის ტბის წყალი ბ) ზღვის წყალი გ) LB-ნიადაგი

## 5. *Vibrio parahaemolyticus*-ის მართ სპეციფიკური ბაქტერიოფაგების გამოყოფა და ეკოლოგია

ჩვენი გამოკვლევის ფარგლებში საქართველოს მტკნარი წყალსატევებიდან და ზღვიდან, აგრეთვე კულტურათა სუპერნატანტებიდან გამოიყო *V.parahaemolyticus* –ის მიმართ სპეციფიკური ბაქტერიოფაგების- 69 იზოლატი. ბაქტერიოფაგების გამოყოფის სიხშირე შეადგენდა 6,5%-ს. *V.pa* ფაგები ყველაზე ხშირად იყოფოდა ზღვის წყლის სინჯებიდან ( 39 იზოლატი). 16 ფაგი გამოიყო ტბის წყლებიდან, 14 კი- კულტურათა სუპერნატანტებიდან (სურ.17). ზღვიდან *V.pa*-ფაგების გამოყოფის პიკი აღინიშნა შემოდგომის თვეებში, რაც თან სდევდა მასპინძელი ბაქტერიის გამოყოფის პიკს (სურ.5).



სურ. 17. *Vibrio parahaemolyticus*-ის მართ სპეციფიკური ბაქტერიოფაგების გამოყოფა

**6. *Vibrio parahaemolyticus*-ის მიაართ სპეციფიკური ბაქტერიოფაგების დახასიათება**

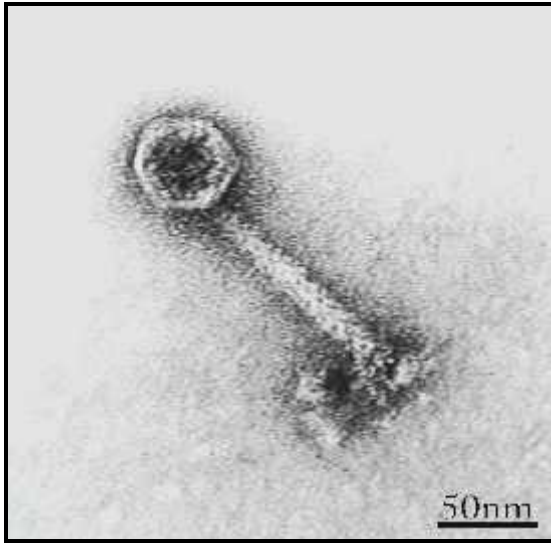
ფაგის ნეგატიური კოლონიის ფორმას ვნახულობდით ბაქტერიული შტამების გაზონებზე მათი ფორმირების დამთავრების შემდეგ. სხვადასხვა ბაქტერიოფაგებს აღმოაჩნდათ მორფოლოგიურად განსხვავებული ნეგატიური კოლონიები. რომელთა ზომები ვარირებდა 1-3 მმ დიამეტრის ფარგლებში. თითოეული საკვლევი ფაგისათვის, მორფოლოგიურად ერთგვაროვანი კოლონიების 5-10 თანმიმდევრული პასაჟის შედეგად მივიღეთ სუფთა ფაგური კლონები შემოწმებული ელ. მიკროსკოპით და აგაროზის გელში ელექტროფორეზით. გარკვეულ შემთხვევებში ფაგები კვლავ ხასიათდებოდნენ პოლიმორფიზმით, რაც ნეგატიური კოლონიების არაერთგვაროვნებაში გამოიხატებოდა.

ფაგის ვირიონის მორფოლოგიას ვსწავლობდით ელექტრონული მიკროსკოპის საშუალებით. სტრუქტურულ კვლევას ვაწარმოებდით M10 (Opton-Zeiss, გერმანია) ელექტრონული მიკროსკოპის საშუალებით. ფაგების ელექტრონულ-მიკროსკოპიურმა შესწავლამ გვიჩვენა, რომ ყველა მათგანი მიეკუთვნება Myoviridae-ს ოჯახს, ჰექსაგონალური თავითა და კუმშვადი კუდით. აღინიშნა მცირე სხვაობა საკვლევი ფაგების ნუკლეოკაპსიდისა და მორჩის ზომებში (ცხრილი 9), ( სურ 18).

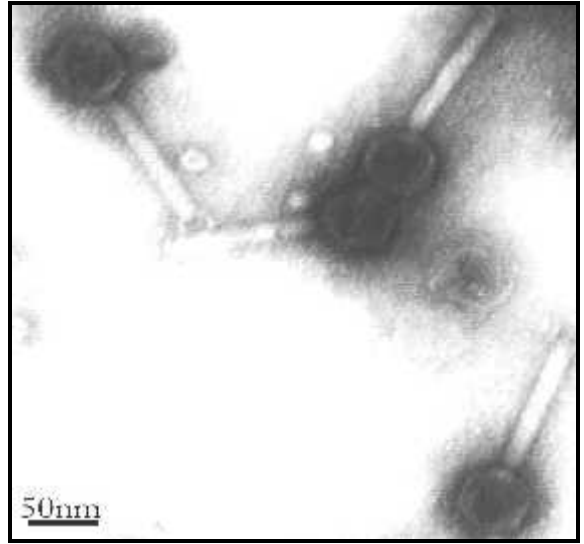
ცხრილი 9. *V.parahaemolyticus*-ის მიმართ სპეციფიკური ბაქტერიოფაგების მორფოლოგია

ბაქტერიოფაგები	ოჯახი	თავი	კუდის სიგანე	კუდის სიგრძე
<b>Vpa ch2s</b>	Myoviridae	60±2	16±2	120±2
<b>Vpa lab</b>	Myoviridae	60±2	20±2	140±2
<b>Vpa 555</b>	Myoviridae	80±2	15±2	175±2
<b>Vpa 5/II(372)</b>	Myoviridae	60±2	20±2	140±2
<b>Vpa 19KP</b>	Myoviridae	60±2	20±2	135±2
<b>Vpa 549</b>	Myoviridae	55±2	13±2	125±2
<b>Vpa 26</b>	Myoviridae	50±2	17±2	112±2
<b>Vpa 18</b>	Myoviridae	70±2	15±2	85±2
<b>Vpa 37</b>	Myoviridae	60±2	14±2	88±2
<b>Vpa G40</b>	Myoviridae	66±2	20±2	92±2
<b>Vpa 80</b>	Myoviridae	60±2	20±2	100±2
<b>Vpa A11</b>	Myoviridae	80±2	12±2	97±2

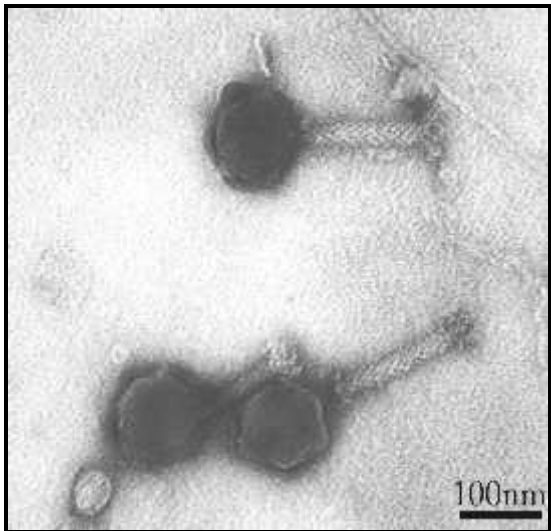




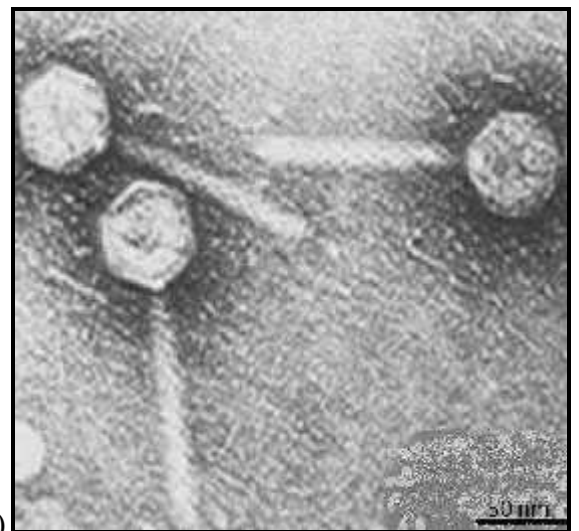
ა)



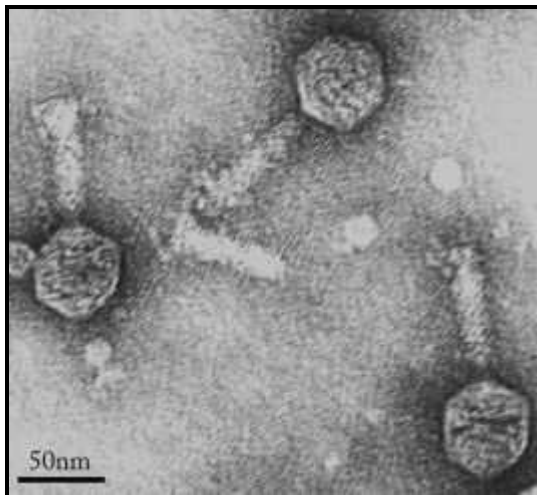
ბ)



გ)



დ)



ე)

სურ. 18. *V.parahaemolyticus*-ის მიმართ სპეციფიკური ბაქტერიოფაგების მორფოლოგია

ა) Vpa 26    ბ) Vpa 19KP    გ) Vpa A11

დ) Vpa ch2s    ე) Vpa G40

ფაგების საორიენტაციო ღიზისური სპექტრის განსაზღვრას

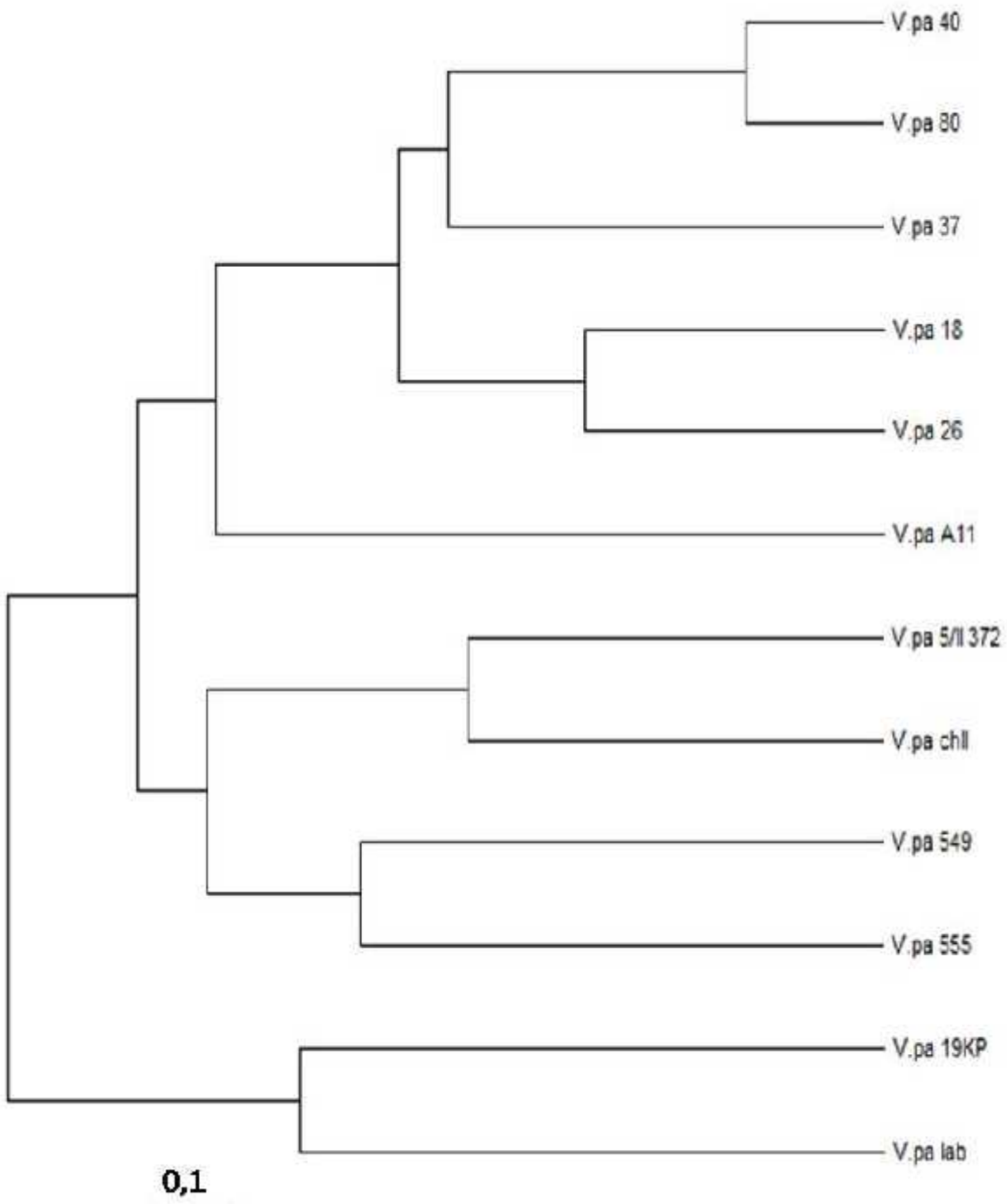
ვაწარმოებდით მყარ საკვებ არეზე [2]. საცდელი ფაგის სამუშაო ტიტრი შეადგენდა  $10^7$ - $10^8$  ნაწ/მლ. სკრინინგი განხორციელდა *V.parahaemolyticus*-ის 158 იზოლატზე.

კვლევების შედეგად დადგინდა, რომ ბაქტერიოფაგების უმრავლესობა ხასიათდებოდა მასპინძელი შტამის მიმართ მაღალი სპეციფიკურობით, მაშინ როდესაც ზოგიერთ ფაგს შეეძლო 8-24 იზოლატის ლიზისი. ხოლო შტამების 30% არ იყო მგრძობიარე მოცემული ფაგების მიმართ.

ცხრილი 10.

<i>V.parahaemolyticus</i> - ბაქტერიოფაგი	მგრძობიარე შტამების რიცხვი	მგრძობიარე შტამების %
Vpa ch2s	19	12.03
Vpa 555	5	3.16
Vpa lab	3	1.9
Vpa 5/II(372)	8	5.06
Vpa 19KP	2	1.27
Vpa 549	7	4.43
Vpa 26	33	20.89
Vpa 18	4	2.53
Vpa 37	4	2.53
Vpa G40	13	8.23
Vpa 80	11	6.96
Vpa A11	22	13.92

ფაგების გარკვეულმა ჯგუფებმა გამოავლინა მსგავსება ლიზისური სპექტრის მიხედვით ( სურ. 19). ეს მონაცემები კორელაციაშია სეროლოგიური და გენეტიკური მახასიათებლების შედეგებთან. თუმცა უნდა აღინიშნოს, რომ შესწავლილი ბაქტერიოფაგები მოქმედების დიაპაზონის მიხედვით უფრო მრავალფეროვანია, ვიდრე სხვა მახასიათებლების მიხედვით. ეს აიხსნება ზედაპირული ცილოვანი სტრუქტურების-ფაგოსპეციფიკური რეცეპტორების მრავალფეროვნებით.

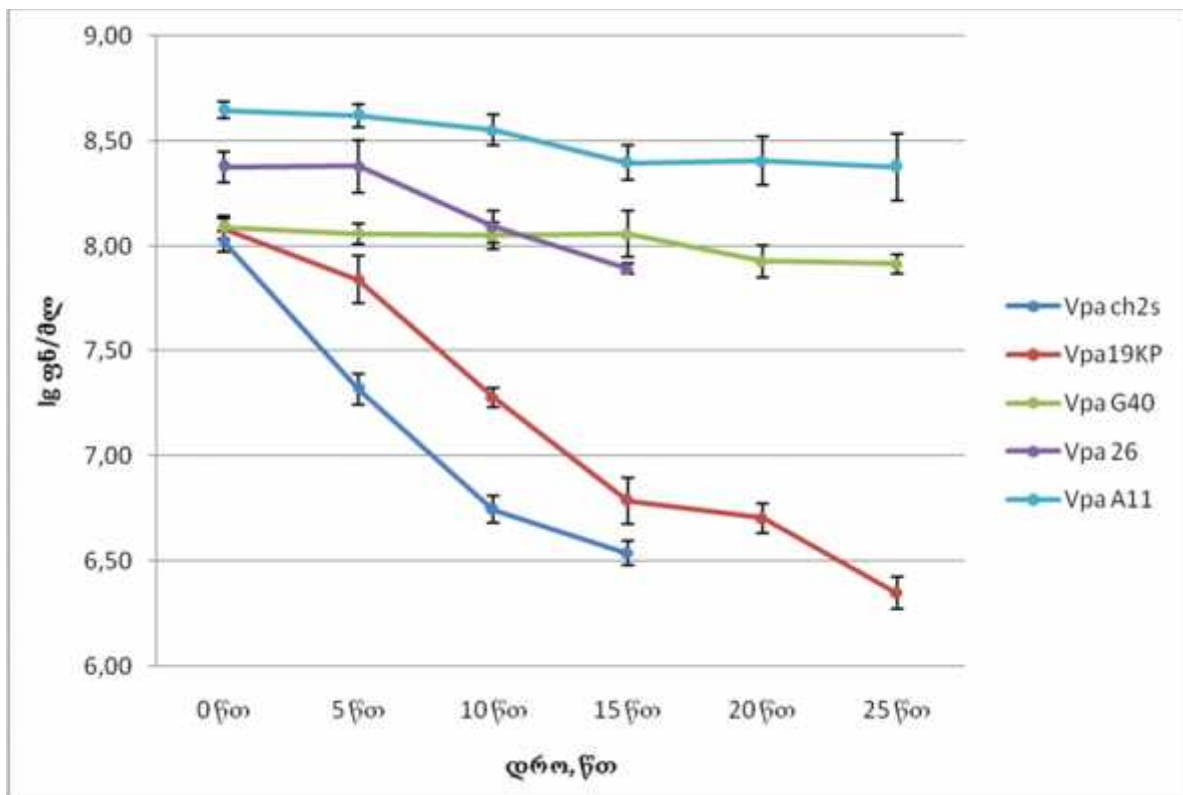


სურ. 19. ბაქტერიოფაგების დაჯგუფება ლიზისური სპექტრის მიხედვით

ბაქტერიოფაგის მიმართ რეზისტენტული ბაქტერიული მუტანტების ანალიზმა გვიჩვენა, რომ ბაქტერიოფაგებს ძალიან მსგავსი, რეცეპტორული აპარატი გააჩნიათ, რადგან ჯვარედინა სკრინინგის ექსპერიმენტებმა ბაქტერიოფაგების ფაგორეზისტენტულ მუტანტებზე გვიჩვენა, რომ ეს ფაგები არ არიან მგრძობიარენი ერთმენეთის ფაგორეზისტენტული ბაქტერიული მუტანტების მიმართ.

პატრონ -უჯრედთან ურთიერთქმედების ფაზების შესწავლისას თავდაპირველად შევარჩიეთ ადსორბციისთვის ოპტიმალური ტემპერატურა, რომელიც განისაზღვრა 29°C-ით, განსხვავებით *V.parahaemolyticus*-ის ბაქტერიებისთვის ოპტიმალური 37°C-სა.

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 (სურ. 20, ცხრილი 11).



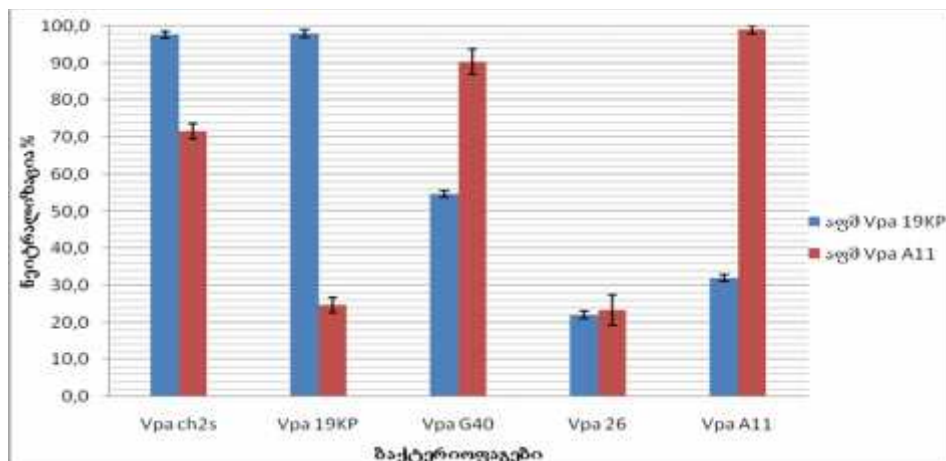
სურ. 20. *V. parahaemolyticus*-ის ბაქტერიოფაგების ადსორბცია

ცხრილი 11.

ფაგები	K(აღს) მლ/წთ	აღს %	ლათ.პერიოდი	გამოსავალი(1უჯრ)
Vpach2s	7,5X 10 <sup>-9</sup>	80%	40-45	193
Vpa19KP	4,5X10 <sup>-11</sup>	69%	40-45	100
VpaG40	6X 10 <sup>-7</sup>	40%	55-60	74
Vpa26cl	8,0X 10 <sup>-9</sup>	57%	50-55	108
VpaA11	2,2X10 <sup>-10</sup>	60%	184	

ჩატარებული ექსპერიმენტების შედეგად დადგინდა, რომ ბაქტერიოფაგები ხასიათდება საკმაოდ შენელებული, თუმცა მაღალპროცენტული აღსორბციის უნარით, ხანგრძლივი ლატენცური პერიოდით და ვირუსული ნაწილაკების მაღალი გამოსავალით, განსაკუთრებით ზოგიერთი ფაგის (Vpach2, VpaA11) შემთხვევაში.

ფაგების სეროლოგიურ ნათესაობას ვსწავლობდით ფაგის ჯვარედინა ნეიტრალიზაციის რეაქციის ჩატარების გზით სხვადასხვა ბაქტერიოფაგებისა და სპეციფიკური ანტიფაგური შრატების გამოყენებით. ვსაზღვრავდით ნეიტრალიზაციის მაქსიმალურ პროცენტს (სურ. 21) და ნეიტრალიზაციის კონსტანტას [1, 2]. სპეციფიკური Vpa 19KP და Vpa A11 ანტიფაგური შრატების გამოყენებით ჩატარებული ჯვარედინა ნეიტრალიზაციის რეაქციების შედეგების მიხედვით მოვახდინეთ ფაგების დაყოფა 4 ჯგუფად. სეროლოგიური მონაცემები კორელაციაში აღმოჩნდა ფაგების ღიზისური სპექტრის (ცხრილი 12) და რესტრიქციული პროფილის შედეგებთან (იხილეთ ქვემოთ)



სურ. 21. ბაქტერიოფაგების ნეიტრალიზაცია ანტიფაგური შრატებით

ცხრილი 12.

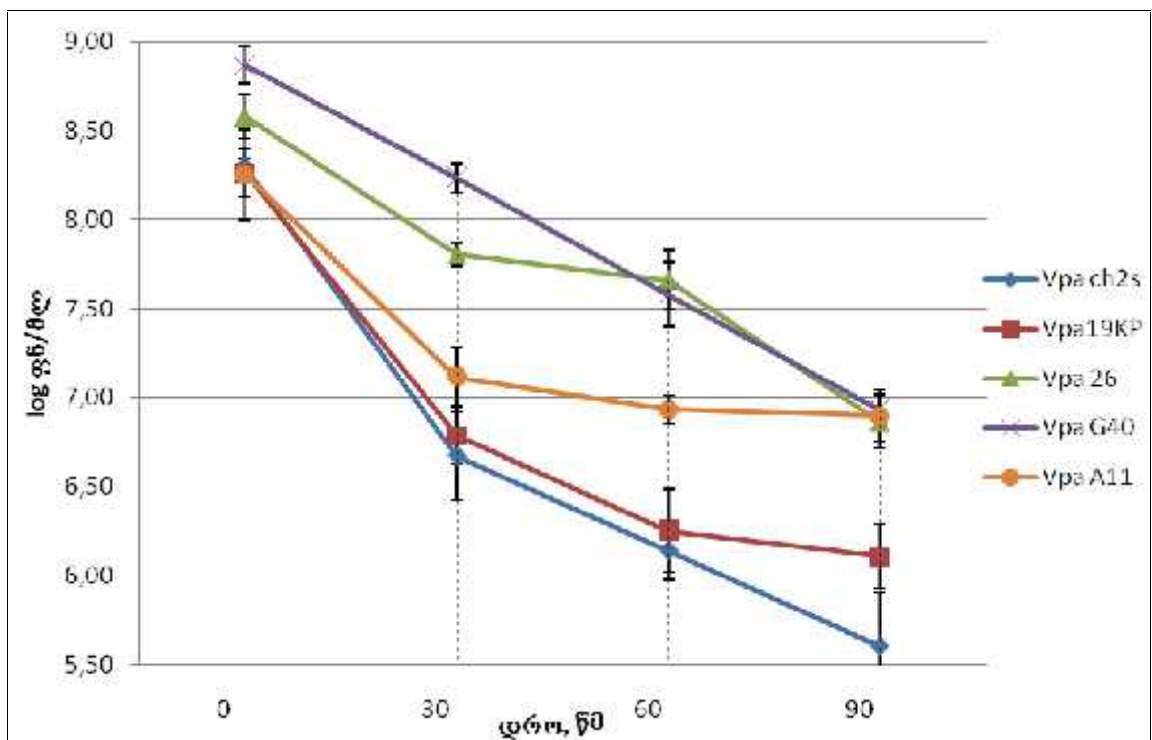
ბაქტერიოფაგები	დაჯგუფება ნეიტრალიზაციის შედეგების (%) მიხედვით			დაჯგუფება ლიზისური სპექტრის მსგავსების (%) მიხედვით		
	Vpa 19 KP	Vpa A11	ჯგუფი	Vpa 19 KP	Vpa A11	ჯგუფი
Vpa lab	99	28		78	44	
Vpa 555	99	45		78	44	
Vpa 5/II(372)	98	30		79	45	
Vpa 19KP	100	23		100	45	
Vpa 549	99	29		70	45	
Vpa ch2s	99	63	I	64	40	
Vpa 37	55	20	III	68	46	
Vpa 26	22	24		44	34	III
Vpa 18	82	71	II	66	46	
Vpa 80	83	80		63	44	
Vpa G40	56	90		63	44	
Vpa 7cl	58	38	III	65	41	II
Vpa A11	32	100	IV	45	100	IV

## 6. ფაგების მგრძობელობა ფიზიკური და ქიმიური ფაქტორების მიმართ

ცნობილია, რომ ბაქტერიოფაგების სტრუქტურული კომპონენტების შენებისა და ფუნქციონირების შეფასებისათვის დიდი მნიშვნელობა აქვს მათზე მთელი რიგი ფიზიკური და ქიმიური ფაქტორების მაინაქტივირებელი მოქმედების შესწავლას. ამიტომაც შესწავლილ იქნა საკვლევი ბაქტერიოფაგების დამოკიდებულება ისეთი ფაქტორების მიმართ, როგორცაა ულტრაიისფერი გამოსხივება, ტემპერატურა, წყალბად იონთა მაღალი ან დაბალი მაჩვენებლები, მაღალი იონური ძალა და ა.შ.

**ბაქტერიოფაგების ინაქტივაცია UV სხივებით.** ბუნებრივ პირობებში ფაგების პოპულაციის შენარჩუნებისათვის დიდი მნიშვნელობა აქვს ბაქტერიოფაგების ულტრაიისფერი სხივებისადმი გამძლეობას. გარდა ამისა, ეს ნიშან-თვისება დაკავშირებულია ფაგების ნუკლეინის მუკავების სტრუქტურის თავისებურებებთან და მნიშვნელოვნად განაპირობებს ფაგების ცხოველყოფელობის შენარჩუნებას ბუნებრივ პირობებში.

ულტრაიისფერი სხივების მიმართ მგრძობელობას ვსწავლობდით დინამიკაში (30; 60 და 90 წმ-ის განმავლობაში) 254 ნმ ტალღის სიგრძეზე. მიღებული შედეგების მიხედვით შესწავლილი ბაქტერიოფაგები განსხვავდებიან ერთმანეთისგან ულტრაიისფერი გამოსხივების მიმართ გამძლეობის მიხედვით. Vpa ch2s და Vpa 19KP ბაქტერიოფაგებისთვის 100 %-იანი ინაქტივაციის დრო 60 წმ-ია, ხოლო Vpa G40 , Vpa 26 და Vpa A11 ბაქტერიოფაგების შემთხვევაში- 90 წმ.



სურ. 22. *V.parahaemolyticus*-ის მიმართ სპეციფიკური ბაქტერიოფაგების ულტრაიისფერი სხივების მიმართ მგრძობელობა

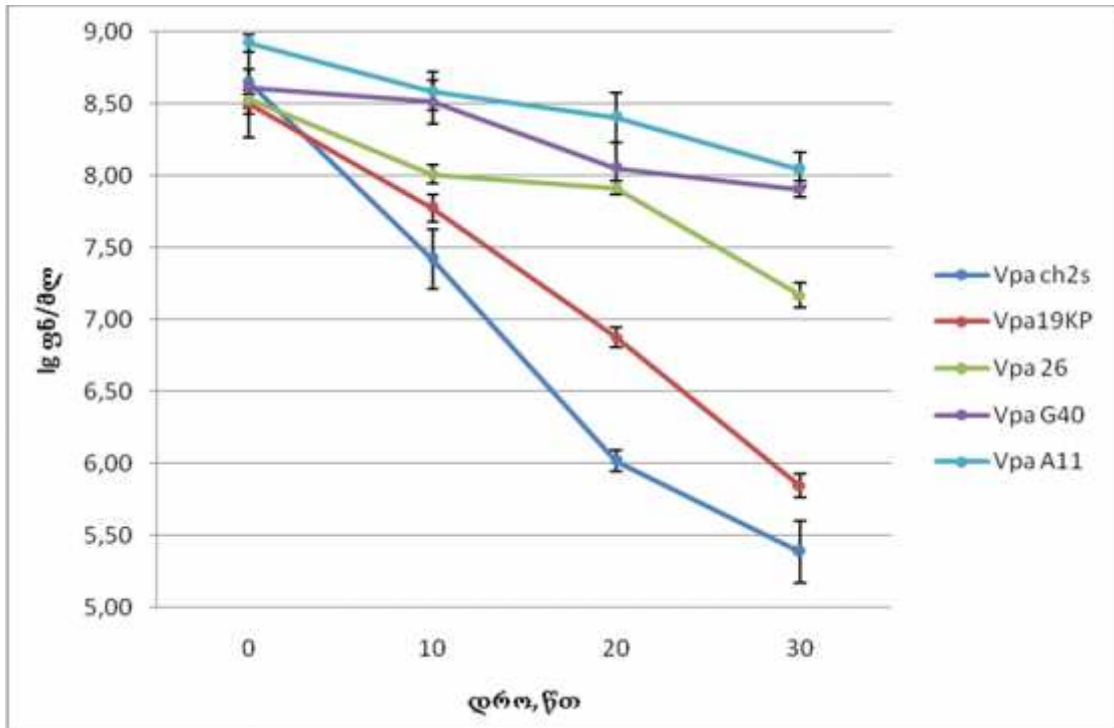
ბაქტერიოფაგების თერმოსტაბილობის შესწავლას ვახდენდით სხვადასხვა ტემპერატურული რეჟიმის (55°C, 60°C, 65°C, 70°C) და ექსპოზიციის პირობებში. მიღებულ შედეგებზე დაყრდნობით შეიძლება ითქვას რომ, Vpa 40 , Vpa 26 და Vpa A11 ბაქტერიოფაგები მეტი თერმოსტაბილობით ხასიათდება, ვიდრე Vpa ch2s და Vpa 19KP ბაქტერიოფაგები, რომელთა თერმული ინაქტივაცია 60°C-ზე ხდებოდა 30 წთ-ში. თუმცა Vpa A11 თერმული ინაქტივაციის კრიტიკულ ტემპერატურად შესაძლოა ჩავთვალოთ 70°C-ც, რაც ამ ფაგის ცილების თერმოსტაბილურობაზე მიგვითითებს და რაც განასხვავებს მას დანარჩენი ფაგებისგან (სურ. 23), ( ცხრილი 13).

საკვლევი ბაქტერიოფაგების სხვადასხვა თერმომგრძობელობა მიუთითებს მათი ცილოვანი სტრუქტურების განსხვავებაზე და ამდენად, ფაგების ტაქსონომიური მიკუთვნებისა და არსებული კოლექციის ფარგლებში დაჯგუფებისათვის გარკვეული მნიშვნელობა აქვს.

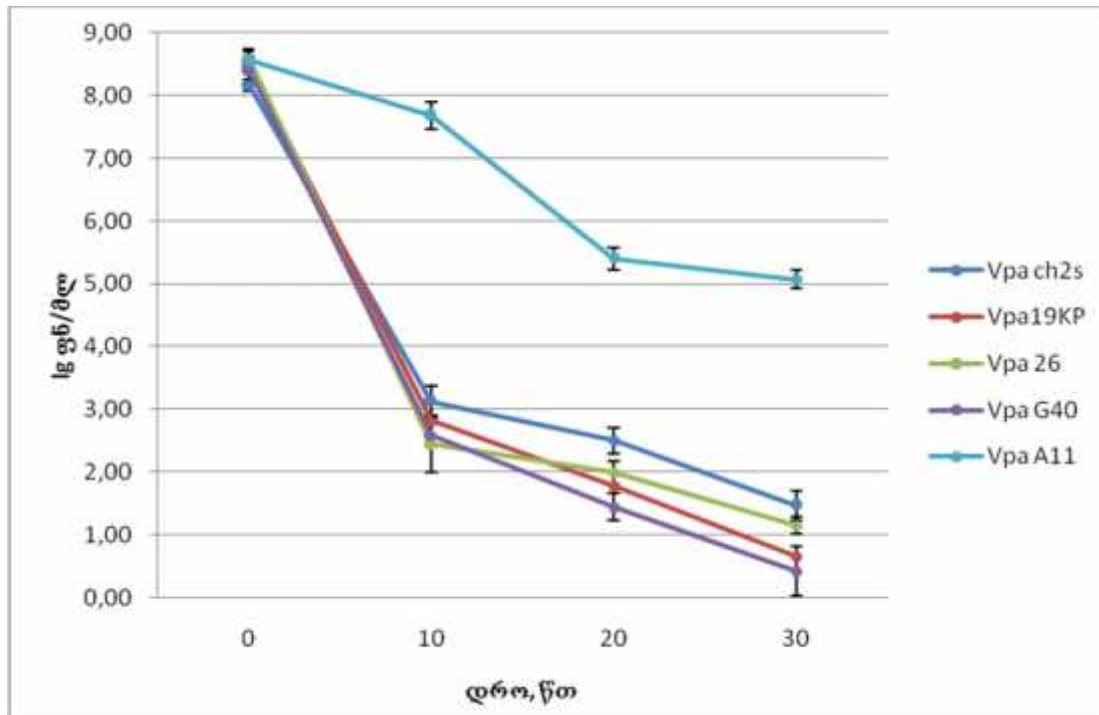
ცხრილი 13. *V.parahaemolyticus*-ის მიმართ სპეციფიკური ბაქტერიოფაგების თერმონაქტივაცია

ბაქტერიოფაგები	საწყისი ტიტრი	55°C	60°C	65°C	70°C
		საბოლოო ტიტრი (30წთ)			
Vpa ch2s	2,5X10 <sup>8</sup>	3X10 <sup>5</sup>	3X10 <sup>4</sup>	120	28
Vpa19KP	3X10 <sup>8</sup>	6,8X10 <sup>5</sup>	3X10 <sup>4</sup>	90	2
Vpa G40	4X10 <sup>8</sup>	8,4X10 <sup>7</sup>	8X10 <sup>6</sup>	5X10 <sup>6</sup>	1
Vpa 26	3,4X10 <sup>8</sup>	1,5X10 <sup>7</sup>	1,4X10 <sup>6</sup>	1X10 <sup>6</sup>	16
Vpa A11	5X10 <sup>8</sup>	1X10 <sup>8</sup>	3X10 <sup>7</sup>	1,5X10 <sup>7</sup>	1,1X10 <sup>5</sup>





ა)



ბ)

სურ. 23 *V. parahaemolyticus*-ის მიმართ სპეციფიკური ბაქტერიოფაგების მგრძობელობა სხვადასხვა ტემპერატურის მიმართ ა) 55°C ბ) 70°C

შევისწავლეთ ბაქტერიოფაგების ოსმოსური შოკისადმი დამოკიდებულება (ცხრილი 14). NaCl-ის 4M ხსნარში ინკუბაციისა და გამოხდილ წყალში შემდგომი 100-ჯერადი განზავების შემდეგ ფაგის ინფექციური ნაწილაკების რაოდენობის მკვეთრი შემცირება არ აღინიშნებოდა. მოცემული შედეგი იმაზე მიუთითებს, რომ მათი ცილოვანი გარსი ადვილად ატარებს წყლის მოლეკულებს და იონებს. არსებობს მოსაზრება, რომ ოსმოსური შოკისადმი მგრძობელობა დამოკიდებულია ფაგების ცილოვანი კაფსიდის სიმკვრივეზე, კერძოდ, კაფსომერების შეფუთვის კომპაქტურობაზე. ანდერსონის მიერ T-ფაგები სწორედ ამ ნიშნის მიხედვით იქნა დაყოფილი მგრძობიარე (T-წყვილი ფაგები) და რეზისტენტულ (T3,T5,T7) ჯგუფებად.

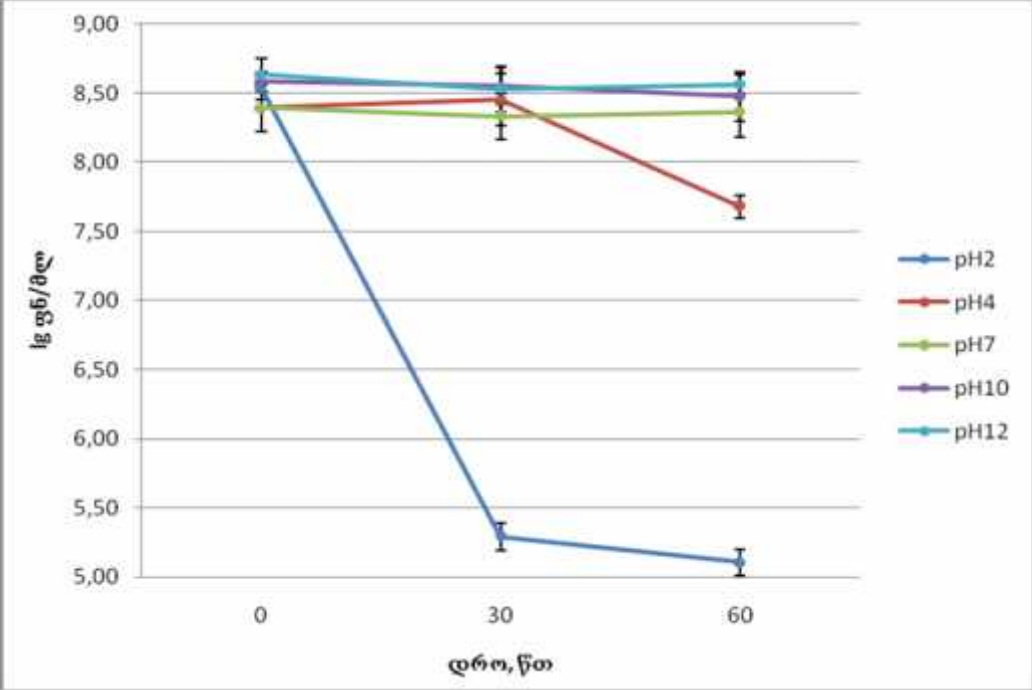
ცხრილი 14. *V.para*-ფაგების დამოკიდებულება იონური ძალის მიმართ

ბაქტერიოფაგები	აქტიური ფაგური ნაწილაკების პროცენტული შემცველობა (%)
<b>Vpa ch2s</b>	81.25
<b>Vpa 19KP</b>	56.30
<b>Vpa 26</b>	61.50
<b>Vpa G40</b>	45.80
<b>Vpa A11</b>	99.90

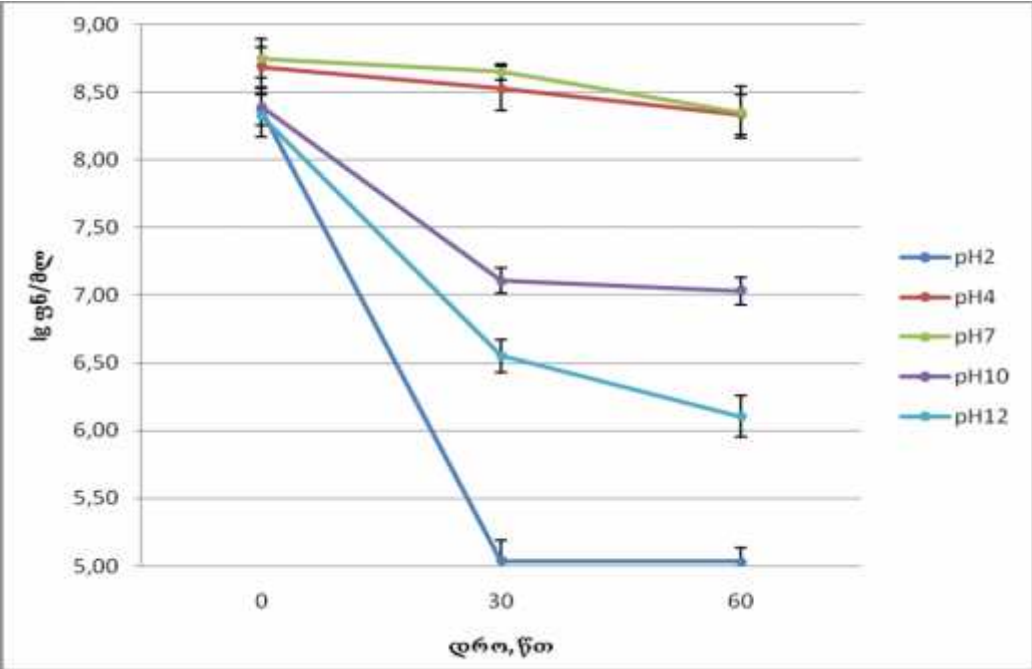
შესწავლილი იქნა აგრეთვე ბაქტერიოფაგების მგრძობელობა წყალბად-იონთა სხვადასხვა მნიშვნელობების მიმართ. ცნობილია, რომ ბაქტერიოფაგების უმრავლესობა საკმაოდ სტაბილურია pH-ის შუალედურ დიაპაზონში pH-5-9. საკვები არის გატუტონება იწვევს ვირიონების თანდათანობით დეგრადაციას, ამასთან თავდაპირველად იშლება მორჩები, შემდეგ კი იწყება დნმ-ის გამოსვლა, pH-12 ტუტიანობის პირობებში კაფსიდი იშლება ცალკეულ სუბერთეულებად. კაფსიდის სტრუქტურული ელემენტების დაშლას ასევე იწვევს ექსტრემალურად დაბალი მაჩვენებლები (<pH-2). თუმცა pH-ის ზომიერად დაბალი მაჩვენებლის დროს ბაქტერიოფაგების გამოლექვა ხდება ინფექციურობის დაკარგვის გარეშე. არსებობს მოსაზრება, რომ pH-ის გამოსატულად მაღალი ან დაბალი მნიშვნელობის დროს გამოვლენილი ფაგური ნაწილაკები მუტანტურ ფორმებს წარმოადგენენ, რომელთა გადარჩევა ცვალებად პირობებში მიმდინარეობს.

საბოლოოდ, ბაქტერიოფაგების მუავურ-ტუტოვანი დენატურაციის ცდებმა გვიჩვენა *V.parahaemolyticus*-ის ფაგების საკმაოდ მაღალი სტაბილურობა pH-4-7-ის პირობებში. pH-ის ექსტრემალურად დაბალი მნიშვნელობის დროს ნაწილაკების რაოდენობა მკვეთრად მცირდება. იგივეს ვერ ვიტყვით ექსტრემალურად ტუტე არეზე

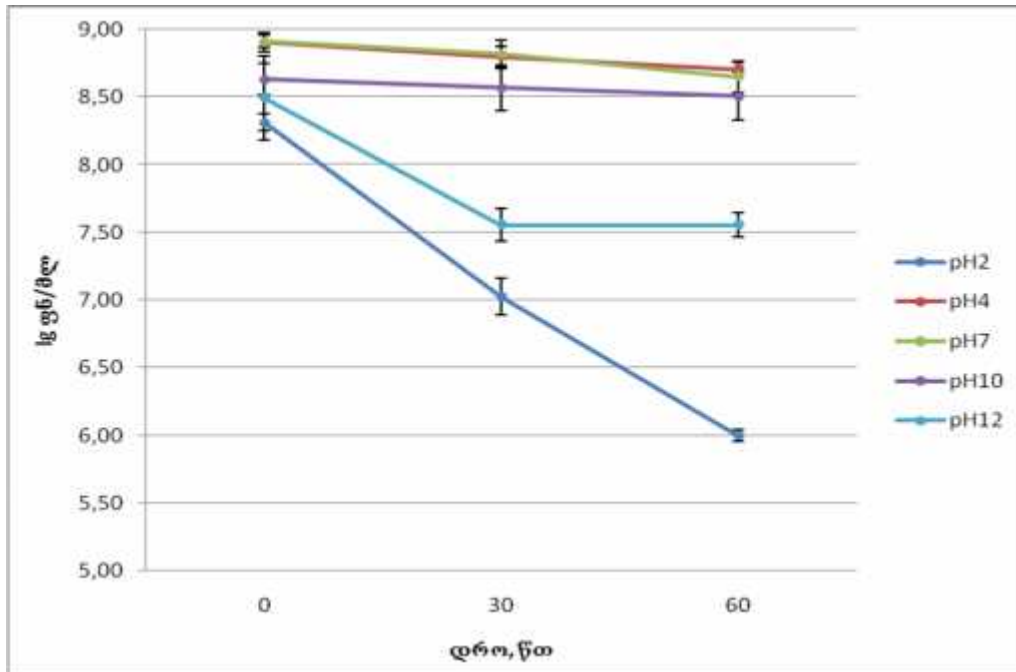
pH-10-12, რიგი ფაგების შემთხვევაში (Vpa 19KP და Vpa ch2s) მაღალი pH არამარტო არ ამცირებს, არამედ ხელს უწყობს ფაგური ნაწილაკების სიცოცხლისუნარიანობის შენარჩუნებას (სურ.24).



ა)



ბ)



გ)

სურ. 24. ბაქტერიოფაგების მგრძობელობა წყალბად-იონთა სხვადასხვა მნიშვნელობების მიმართ. ა) Vpa 19KP ბ) Vpa G40 გ) Vpa A11

შესწავლილ იქნა საკვლევი ბაქტერიოფაგების სხვა ფიზიოლოგიური თვისებებიც. კერძოდ, ნატრიუმის ციტრატისადმი დამოკიდებულება (ცხრილი 15). 2%-იანი ნატრიუმის ციტრატის მიმართ ფაგები ავლენენ საკმაოდ მაღალ მგრძობელობას რაც შესაძლოა მიუთითებდეს იმაზე, რომ ეს ფაგები დამოკიდებულნი არიან ორვალენტიან იონებზე, როგორც ადსორბციის კოფაქტორებზე.

ცხრილი 15. Vpara-ფაგების დამოკიდებულება ნატრიუმის ციტრატზე

ბაქტერიოფაგები	აქტიური ფაგური ნაწილაკების პროცენტული შემცველობა (%)
<b>Vpa ch2s</b>	0.06
<b>Vpa 19KP</b>	0.15
<b>Vpa 26</b>	0.01
<b>Vpa G40</b>	0.06
<b>Vpa A11</b>	0.08

ჩატარებულ ექსპერიმენტებში გამოვლინდა *V.parahaemolyticus*-ის ფაგების მდგრადობა ორგანული გამსხნელების (სპირტი, ქლოროფორმი) მიმართ. რაც არაპირდაპირად მიუთითებს მათ ვირიონებში ლიპიდური კომპონენტის არარსებობაზე.

**ბაქტერიოფაგების სტაბილურობა სხვადასხვა არეში შენახვისას.**  
 ბაქტერიოფაგების პრაქტიკული გამოყენებისთვის როგორც სამკურნალო-პროფილაქტიკური მიზნით, ასევე ეკოლოგიური კვლევების, სხვადასხვა წყალსატევებში ტრასირების ექსპერიმენტების ჩასატარებლად, დიდი მნიშვნელობა აქვს მათ სტაბილობას საკვლევ გარემოში და ასევე შენახვისა და ტრანსპორტირების პირობებში.

ამიტომ ჩატარებულ იქნა *V.parahaemolyticus*-ის ფაგების სტაბილობის ექსპერიმენტები სხვადასხვა მიკრობიოლოგიურ არეებსა და ხსნარებში, ასევე ბუნებრივ ტბისა და ზღვის წყლებში (ცხრილი 16). კვლევებმა გვიჩვენა, რომ ფაგების აქტივობა უმნიშვნელოდ ეცემოდა 6 თვის განმავლობაში. ფაგების შესანახად შედარებით ნაკლებეფეფქტურ არედ შეიძლება ჩაითვალოს ლისის ტბის, როგორც მტკნარი წყალსატევის, წყალი. ამ შემთხვევაში დაბალი მარილიანობა *V.parahaemolyticus* –ის ბაქტერიოფაგებისთვის, ისევე როგორც თვით ბაქტერიებისთვის, არახელსაყრელ ფიზიკურ ფაქტორს წარმოადგენს.

ცხრილი 16. ბაქტერიოფაგების სტაბილურობა სხვადასხვა არეებში 4<sup>0</sup>C-ზე შენახვისას

დრო	ფაგები	PBS	SM- ფაგური ბუფერი	ზღვის წყალი	ლისის ტბის წყალი
24 საათი	Vpa ch2s	2,5x10 <sup>8</sup>	2,5x10 <sup>8</sup>	2,5x10 <sup>8</sup>	2,5x10 <sup>8</sup>
	Vpa A11	2x10 <sup>8</sup>	2x10 <sup>8</sup>	2x10 <sup>8</sup>	2x10 <sup>8</sup>
10 დღე	Vpa ch2s	2,5x10 <sup>8</sup>	2,5x10 <sup>8</sup>	2,5x10 <sup>8</sup>	2,5x10 <sup>8</sup>
	Vpa A11	2x10 <sup>8</sup>	2x10 <sup>8</sup>	2x10 <sup>8</sup>	2x10 <sup>8</sup>
2 თვე	Vpa ch2s	2,5x10 <sup>8</sup>	2,5x10 <sup>8</sup>	2,5x10 <sup>8</sup>	6x10 <sup>7</sup>
	Vpa A11	8x10 <sup>7</sup>	2x10 <sup>8</sup>	6,6x10 <sup>7</sup>	7,2x10 <sup>7</sup>
6 თვე	Vpa ch2s	5x10 <sup>7</sup>	4,5x10 <sup>7</sup>	4,4x10 <sup>7</sup>	1,5x10 <sup>7</sup>
	Vpa A11	6,5x10 <sup>7</sup>	7,2x10 <sup>7</sup>	6,5x10 <sup>7</sup>	4,2x10 <sup>7</sup>

## 7. პროტეოლიტური ფერმენტების მოქმედების შესწავლა ბაქტერიოფაგებზე

პროტეოლიტური ფერმენტების მოქმედების ეფექტი *Vibrio parahaemolyticus* –ის მიმართ სპეციფიკურ ბაქტერიოფაგებზე, შესწავლილ იქნა პეპსინისა და ქემოტრიფსინის მაგალითზე.

პეპსინი, ქემოტრიფსინთან და ტრიფსინთან ერთად საჭმლის მომნელებელი სისტემის ძირითადი ფერმენტია. პეპსინის მოქმედების ეფექტი ყველაზე მაღალია ნორმალური კუჭის წვენის მუავიანობის პირობებში (pH 1.5-2.5) [178]. ქემოტრიფსინი პანკრეასის წვენის ერთ-ერთი კომპონენტია, რომელიც მოქმედებს თორმეტგოჯა ნაწლავში და შლის ცილებს და პოლიპეპტიდებს. პრაქტიკულ მედიცინაში ის გამოიყენება პერ-ორალურად მოხმარებისთვის ან ზედაპირების დასამუშავებლად, აბსცესებთან, ტრავმებთან და ქირურგიულ ოპერაციებთან ასოცირებული სიწითლისა და შეშუპების შესამცირებლად [151].

ექსპერიმენტებმა ფერმენტების გავლენის შესწავლასთან დაკავშირებით, აჩვენა, რომ ჩვენს მიერ გამოყოფილი *Vibrio parahaemolyticus* –ის მიმართ სპეციფიკური ბაქტერიოფაგები მგრძობიარეა პეპსინის 1% -იანი ხსნარის მიმართ. ფაგების ტიტრი პეპსინის ხსნარში ძალიან მაღე, თითქმის შეტანისთანავე შემცირდა  $>2 \log$  –ით. ეს მონაცემი შესაბამისობაშია ჩვენს გამოკვლევებთან, მოცემული ფაგის pH-ის სხვადასხვა მნიშვნელობებზე დამოკიდებულებასთან დაკავშირებით. იმდენად რამდენადაც, პეპსინის ხსნარის pH 1-1.5-ია, ხოლო ჩვენმა კვლევებმა აჩვენა სიცოცხლისუნარიანი ფაგური ნაწილაკების რაოდენობის მნიშვნელოვანი კლება pH 2-ზე, მოცემული შედეგი სავსებით მოსალოდნელი უნდა ყოფილიყო. მიღებული ნეგატიური ეფექტების გათვალისწინებით, კუჭის წვენის მუავე pH-ის გასანეიტრალებლად უმჯობესი იქნება ფაგების მიღება ტუტე ბუნების ხსნარებთან ერთად.

რაც შეეხება ქემოტრიფსინის გავლენას ფაგების სიცოცხლისუნარიანობაზე, არ იყო თვალშისაცემი. ქემოტრიფსინის სხვადასხვა კონცენტრაციებმა (0.1%; 0.25%; 0.5%; 1%) და დროის სხვადასხვა ექსპოზიციებმა (10 წთ, 30 წთ, 60 წთ) არ გამოიწვია ფაგის ტიტრის მნიშვნელოვანი ცვლილებები ( $< 1 \log$ ). მოცემული შედეგი შესაძლებლობას იძლევა ვიფიქროთ *V. parahaemolyticus* –ის მიმართ სპეციფიკური ბაქტერიოფაგების გამოყენებაზე იქნეს ჭრილობითი ინფექციების სამკურნალოდ ქემოტრიფსინთან ერთობლიობაში.

## 8. ბაქტერიოფაგების გენეტიკური თვისებების შესწავლა

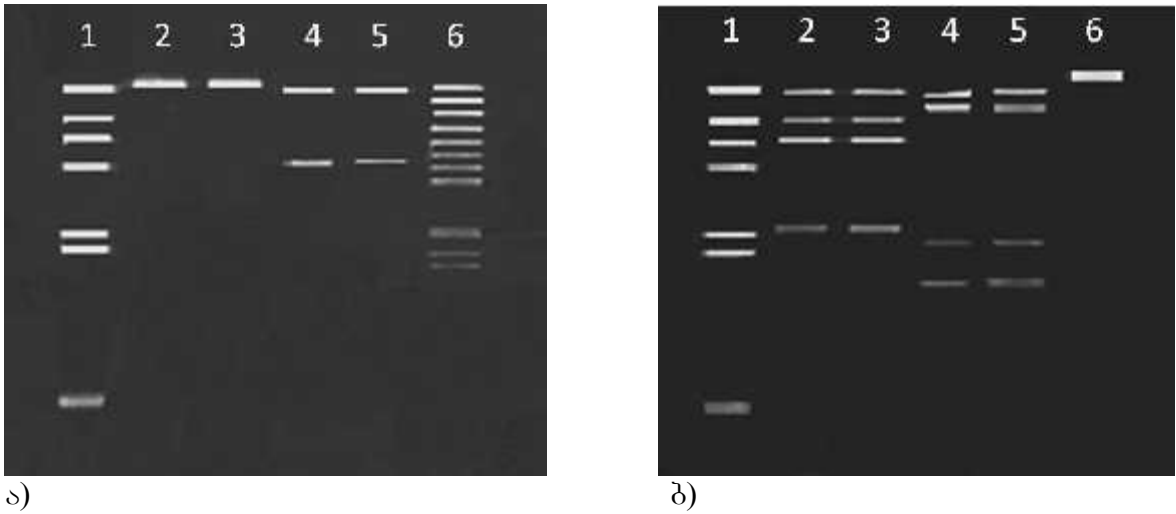
ფაგური დნმ-ის რესტრიქციული ანალიზი ჩვენს მიერ შესწავლილი ყველა ბაქტერიოფაგის დნმ არის ორჯაჭვიანი და მგრძობიარეა შეწავლილი რესტრიქციული ენდონუკლეაზების უმრავლესობის მიმართ. დნმ-ების მოლეკულური წონის დასათვლელად შევარჩიეთ ორი ენდონუკლეაზა (Sal I და PstI), რომლებიც შესწავლილი ფაგების დნმ-ს შედარებით მსხვილ ფრაგმენტებად ჭრიდნენ (დიდი ზომის ფრაგმენტებით მოლეკულური წონა შედარებით ზუსტად იანგარიშება).

ფაგების უმრავლესობის დნმ 43-44 kb-ია, შედარებით მაღალი მოლეკულური წონა აქვს Vpa A11-ის დნმ-ს- 60 kb.

ცხრილი 17. ფაგური დნმ-ის მგრძობიარეობა რესტრიქციული ენდონუკლეაზების მიმართ

ბაქტერიოფაგები	რესტრიქციული ენდონუკლეაზა							
	EcoR I	EcoR V	Hind III	BamH I	Sau3A	Pst I	Sal I	Xba I
Vpa ch2s	+	+	+	-	-	-	+	+
Vpa lab	+	+	+	-	-	-	+	+
Vpa 555	+	+	+	-	-	-	+	+
Vpa 5/II(372)	+	+	+	-	-	-	+	+
Vpa 19KP	+	+	+	-	-	-	+	+
Vpa 549	+	+	+	-	-	-	+	+
Vpa 26	+	+	+	+	+	+	+	+
Vpa 18	+	+	+	+	+	+	+	+
Vpa 37	+	+	+	+	+	+	+	+
Vpa G40	+	+	+	+	+	+	+	+
Vpa 80	+	+	+	+	+	+	+	+
Vpa A11	+	+	+	+	+	+	-	+

რესტრიქციული პროფილი საშუალებას გვაძლევს ვიმსჯელოთ ფაგების გენეტიკურ მრავალფეროვნებაზე. ამისათვის ავაგეთ ფილოგენეტიკური ხე, სადც ჩანს, რომ ფაგები სამ კლასტერულ ერთეულშია გაერთიანებული. აღსანიშნავია, რომ ერთი და იმავე სეროტიპის მასპინძელი უჯრედის მქონე ბაქტერიოფაგები (მაგ. Vpa ch2s და Vpa 19KP, Vpa 26 და Vpa G40) ერთ კლასტერშია გაერთიანებული. ამასთან, ცალკე ჯგუფშია Vpa A11, რომელიც გენომის ზომით, სეროლოგიური და ფიზიოლოგიური მახვენებლებით განსხვავებულია დანარჩენი ფაგებისგან.

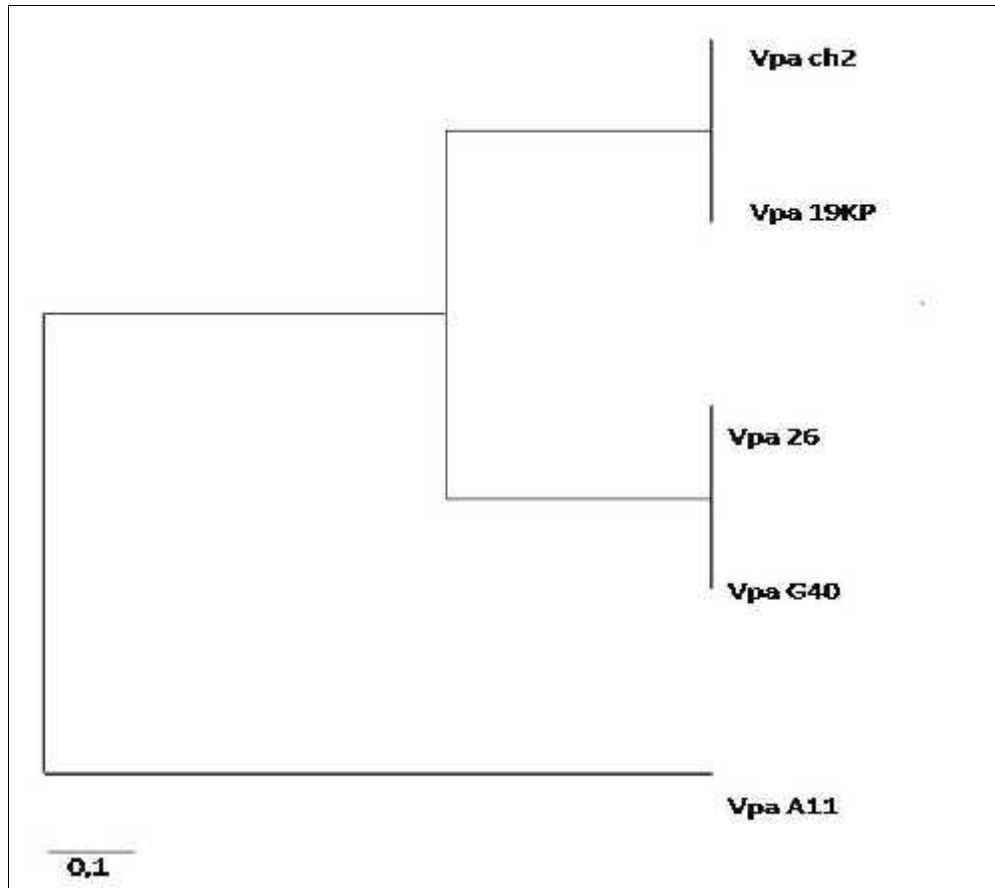


სურ. 25. *V.para*-ბაქტერიოფაგების დენმ-ის რესტრიქციული ანალიზი

- ა)
- 1.Hind III+ Lambda-დნმ;
  2. Pst I+Vpa ch2s-დნმ;
  3. Pst I+ Vpa19KP-დნმ
  4. Pst I+Vpa G40-დნმ
  5. Pst I+Vpa 26-დნმ
  6. Pst I+Vpa A11-დნმ

- ბ)
- 1.Hind III+ Lambda-დნმ;
  2. Sal I+Vpa ch2s-დნმ;
  3. Sal I+ Vpa19KP-დნმ
  4. Sal I+Vpa G40-დნმ
  5. Sal I+Vpa 26-დნმ
  - 6.Sal I+Vpa A11-დნმ





სურ. 26. *V.para*-ბაქტერიოფაგების დაჯგუფება რესტრიქციული პროფილის მიხედვით.

#### IV. შედეგების განხილვა

წყლიანი გარემოს დაბინძურება თანამედროვე მსოფლიოს და მათ შორის საქართველოს ერთ-ერთი უმნიშვნელოვანესი პრობლემაა. გაზრდილი ანთროპოგენული ზემოქმედება კლიმატური პირობების ცვლილებასთან ერთად საკმაოდ მოკლე დროში აისახება წყლის დაბინძურების ხარისხზე. სასმელი წყლისა და სარეკრეაციო წყალსატევების რეგულარული მონიტორინგი და დაბინძურების წყაროების გამოვლენა, კონკრეტული ღონისძიებების დაგეგმვისა და ჩატარებისთვის მეტად მიშვნელოვანია.

წყლიანი გარემოს დაბინძურება განაპირობებს სხვადასხვა ბაქტერიული თუ ვირუსული წყლისმიერი ინფექციის გავრცელებას, რაც ძირითადად, დაბინძურებულ წყალთან სხვადასხვა სახის კონტაქტითაა გამოწვეული. მიკრობულ პათოგენებად დაბინძურებულ წყლებში გვხვდება: *Salmonella spp.*, *Shigella spp.*, *Vibrio spp.*, ენტეროპათოგენური *E. coli* და სხვა ბაქტერიები, გარდა ამისა 100-ზე მეტი ტიპის პათოგენური ვირუსი, უმარტივესები და სხვა. სხვადასხვა დაავადებების თავიდან აცილების მიზნით აუცილებელია ინფექციის წყაროს და მისი გავრცელების გზების დადგენა.

ბოლო ორ ათწლეულში მნიშვნელოვნად იმატა ჰალოფილური ვიბრიონებით გამოწვეული ინფექციების სიხშირემ. მათ შორის, *Vibrio parahaemolyticus* ყველაზე ხშირად იწვევს სერიოზულ გასტროენტერიტებს, ძირითადად ასოცირებულია უმი და ცუდად დამუშავებული ზღვის პროდუქტების მოხმარებასთან. გარდა ამისა, *V. parahaemolyticus*-ით დაბინძურებულ წყლებთან კონტაქტის შედეგად ვითარდება ჭრილობითი ინფექციები. ჰალოფილური ვიბრიონები ასევე პათოგენურია ზღვის ორგანიზმებისთვის (თევზები, ხამანწკები) და ზარალს აყენებს აქვაკულტურის მეურნეობებს.

*V. parahaemolyticus*-ის გამოყოფა ჩვეულებრივ ხდება ზღვის როგორც გაშლილი უბნებიდან, ასევე მდინარეთა შესართავების წყლებიდან. საშუალო და მაღალი მარილიანობა, აგრეთვე 18°C-ზე მაღალი ტემპერატურა ოპტიმალურ პირობებს წარმოადგენს არაქოლერული ვიბრიონების ზრდისა და გამრავლებისთვის. ამ თვალსაზრისით, საქართველოში შავი ზღვის სანაპიროზე არსებული სუბტროპიკული კლიმატი და წყლიანი გარემო, ჰალოფილური ვიბრიონებისთვის ხელსაყრელ გარემოს წარმოადგენს. გარემო-კლიმატური პირობები და მათი სეზონური ცვლილებები მნიშვნელოვნად აისახება როგორც პათოგენური ვიბრიონების, აგრეთვე მათი სპეციფიური ბაქტერიოფაგების გავრცელებაზე.

ჰალოფილური ვიბრიონების ბაქტერიოფაგები დიდ ინტერესს იწვევს, წყალში შესაბამისი ბაქტერიული სახეობების შემცველობის გამოსავლენად (ფაგი-ინდიკატორები), ასევე პათოგენობის მექანიზმების შესასწავლად და შტამების დიფერენციაციისათვის, დაბოლოს როგორც ალტერნატიული საშუალება, ამ პათოგენებით გამოწვეული დაავადებების პროფილაქტიკისა და მკურნალობისთვის.

კვლევის ძირითად მიზანს წარმოადგენდა საქართველოს წყლიან გარემოში *V. parahaemolyticus* -ის და შესაბამისი ბაქტერიოფაგების გავრცელების და ბიომრავალფეროვნების შესწავლა. ამისათვის შავი ზღვიდან და მტკნარი წყალსატევებიდან გამოვყავით *V. parahaemolyticus* -ის ბაქტერიები და შესაბამისი ბაქტერიოფაგები. შევისაწვდეთ მათი ბიოლოგიური თვისებები.

ჩვენი კვლევის ფარგლებში 2006-2008 წლებში შავი ზღვის სანაპირო ზოლში და ზოგიერთ მტკნარ წყალსაცავში ჩატარებულმა მონიტორინგმა აჩვენა, რომ საქართველოს წყლიანი გარემო და კლიმატი ხელსაყრელ პირობებს ქმნის *V.parahaemolyticus*-ის ბაქტერიების და შესაბამისი ბაქტერიოფაგების ცხოველყოფილობისთვის. ბაქტერიის, ისევე როგორც სპეციფიკური ბაქტერიოფაგების, გამოყოფა სეზონური ხასიათისაა და დამოკიდებულია გამოყოფის ადგილზე. *V.parahaemolyticus*-ი ჰალოფილური ბაქტერიაა, შესაბამისად იზოლატების გამოყოფა ძირითადად შავი ზღვიდან მოხდა, ერთეული იზოლატები გამოვყავით მტკნარი წყალსაცავიდანაც, თუმცა ლიტერატურის თანახმად, ბაქტერიის არსებობა ნაკლებადმარილიან გარემოში დროებითია. აღსანიშნავია, რომ მტკნარი წყალსაცავებიდან გამოყოფილ იქნა *V.parahaemolyticus*-ის მიმართ სპეციფიკური ბაქტერიოფაგები, რაც ასევე შესაძლოა მიანიშნებდეს მოცემულ გარემოში პატრონი ბაქტერიის არსებობაზე. ამაზე მეტყველებს აგრეთვე პირდაპირი დეტექციის მეთოდით (PCR-ESI/MS) ტბებში *V.parahaemolyticus*-ის გენომის არსებობის დადგენა. მოცემული შედეგებიდან გამომდინარე შეგვიძლია ვივარაუდოთ, რომ მტკნარ წყალსაცავებში, სადაც გარემო პირობები არახელსაყრელია ჰალოფილური ბაქტერიებისთვის გამრავლებისთვის, *V.parahaemolyticus* გადადის არაკულტივირებად მდგომარეობაში, თუმცა ინარჩუნებს სასიცოცხლო თვისებებს. მოცემული მდგომარეობა ლიტერატურაში ცნობილია სიცოცხლისუნარიანი, მაგრამ არაკულტივირებადი მდგომარეობის (VBNC) სახელწოდებით. *V.parahaemolyticus*-ის ბაქტერიების არაკულტივირებად მდგომარეობაში გადასვლა არამხოლოდ დაბალ მარილიანობასთან არის დაკავშირებული. ის ფაქტი, რომ *V.parahaemolyticus*-ის მიმართ სპეციფიკური ბაქტერიოფაგების გამოყოფა ხდებოდა გვიან შემოდგომის თვეებში, მაშინ როდესაც შესაბამისი ბაქტერიები მცირე რაოდენობით ან საერთოდ არ ითვისებოდა, აგრეთვე მეტყველებს იმაზე, რომ წყლის დაბალი ტემპერატურა დაბალ მარილიანობასთან ერთად არის ფაქტორი, რომელიც უჯრედების არაკულტივირებად მდგომარეობაში გადასვლას განაპირობებს. ეს მოსაზრება ექსპერიმენტულად დადასტურებულ იქნა ჩვენი კვლევის შედეგებით, სადაც VBNC-მდგომარეობაში *V.parahaemolyticus*-ის ბაქტერიების გადასვლა იყო ნაჩვენები. სხვადასხვა ტიპის არახელსაყრელი პირობების ზეგავლენით, კერძოდ, არასაკმარისმა მარილიანობამ, დაბალმა ტემპერატურამ და საკვები ნივთიერებების ნაკლებობამ, სასიცოცხლო პროცესების დაქვეითება და კულტივირების უნარის დაკარგვა გამოიწვია.

დაავადების რისკის განვითარებათან მიმართებაში დიდი მნიშვნელობა აქვს *V.parahaemolyticus*-ის გამოყოფილი იზოლატების სეროლოგიურ მაჩვენებლებს. *V.parahaemolyticus*-ის სეროტიპირების თანამედროვე სქემის მიხედვით იდენტიფიცირებულია 75 სეროვარიანტი 13 O- ანტიგენის და 71 K-ანტიგენის სხვადასხვა კომბინაციების მიხედვით. მათგან O3-სეროტიპი კვებითი ინფექციების გამომწვევი ყველაზე ხშირი წარმომადგენელია. მას მიეკუთვნება პანდემური კლონი-O3:K6, რომელმაც უკანასკნელ წლებში არაერთი აფეთქება გამოიწვია მრავალ სხვადასხვა რეგიონში. ჩვენი კვლევის ფარგლებში შესწავლილ 81 იზოლატს შორის დადგენილ იქნა 9 სეროფაგის და 27 სხვადასხვა სეროტიპის იზოლატების შემცველობა. O3:K6-სეროტიპის არც ერთი შტამი არ გამოვლინდა, თუმცა მწვანე კონცხიდან გამოყოფილი ერთ-ერთი შტამი ტიპირებულ იქნა, როგორც O1:KUT, რაც O3:K6-ის პანდემური კლონის სეროვარიანტს წარმოადგენს. მოცემული ბაქტერიული

იზოლატი ვირულენტობის ფაქტორების მიხედვით- *tdh*- და *trh*-უარყოფითი იყო, თუმცა გააჩნდა O3:K-ის GS-PCR მარკერი.

პანდემური შტამის მარკერთან ერთად მოცემული სეროტიპის არსებობა შავ ზღვაში პანდემური შტამების ან მათი ვარიანტების შესაძლო არსებობაზე მიუთითებს. ამის შესაძლებლობაზე მიუთითებს აგრეთვე თერმოლაბილური ჰემოლიზინის და მესამე ტიპის სეკრეტორული სისტემის ეფექტორული პროტეინების დეტექცია გამოყოფილ იზოლატებში. ზემოთნახსენები ვირულენტური თვისებებით ხასიათდებოდა შემოწმებული შტამების 96%, რაც შესაძლებლობას იძლევა დავასკვნათ, რომ შავი ზღვის *V.parahaemolyticus*-ის პოპულაციაში ვირულენტობის ფაქტორები ფართოდაა გავრცელებული. აღსანიშნავია ის ფაქტი, რომ ლიტერატურის თანახმად გარემოდან გამოყოფილი იზოლატების მხოლოდ 1% შეიცავს ვირულენტობის ფაქტორებს. განსაკუთრებით საყურადღებოა მოცემულ შტამებს შორის O3:K6-პანდემური კლონის სეროვარიანტის არსებობა. საქართველოში, შავი ზღვის სანაპირო ზოლში, წყლიდან გამოყოფილი ბაქტერიული იზოლატებში ვირულენტური მახასიათებლების არსებობა უნდა განვიხილოთ, როგორც საზოგადოებრივი ჯანდაცვისთვის საყურადღებო მოვლენა, რამდენადაც ასეთი ტიპის (*tdh*, *trh*, TTSS2-დადებითი) იზოლატები ინფექციის წყაროს წარმოადგენს დაზიანებულ კანთან კონტაქტის (ჭრილობითი ინფექციები) ან დაბინძურებული ზღვის პროდუქტების მოხმარების (კვებითი ინფექციები) შემთხვევაში.

*V.parahaemolyticus*-ის იზოლატების გენეტიკური მრავალფეროვნება შესწავლილ იქნა ორი მეთოდით, პულსირებად ველში გელ ელექტროფორეზით (PFGE) და Rep-PCR-ით. ორივე მეთოდმა გვიჩვენა *V.parahaemolyticus*-ის იზოლატების დიდი მრავალფეროვნება, თუმცა სეროლოგიურ მახასიათებლებთან მნიშვნელოვანი კორელაცია არ გამოვლენილა. ეს აიხსნება სეროტიპირების შედეგებთან შედარებით გენეტიკური მრავალფეროვნების მაღალი მრავალფეროვნებით. ეს ფაქტი კიდევ ერთხელ ადასტურებს ბიომრავალფეროვნების შესასწავლად სხვადასხვა მეთოდების გამოყენების აუცილებლობას.

*V.parahaemolyticus*-ის შტამების ფაგომგრძობელობის შესწავლა ბაქტერიების ტიპირების კიდევ ერთი ალტერნატივაა. ფაგოტიპირებამ აჩვენა, რომ ერთი და იგივე სეროტიპისა და გენეტიკური სტრუქტურის მქონე ბაქტერიული იზოლატები ფაგომგრძობელობის მიხედვით კიდევ განსხვავდებიან ერთმანეთისგან. მოცემული შედეგი შეიძლება აიხსნას იმით, რომ ფაგოტიპირება ასახავს ზედაპირული სტრუქტურების-ფაგის საადსორბციო რეცეპტორების მრავალფეროვნებას.

*V.parahaemolyticus*-ის შტამების ანტიბიოტიკების მიმართ მგრძობელობის შესწავლამ აჩვენა, რომ იზოლატების დაახლოებით 40% მულტირეზისტენტულია. როგორც ცნობილია, გარემოდან გამოყოფილი, არაპათოგენური იზოლატები, ანტიბიოტიკების მიმართ ნაკლები მგრძობელობით ხასიათდებიან. ჩვენს კვლევაში ყველაზე მაღალი მგრძობელობა დაფიქსირდა ციპროფლოქსაცინის, სტრეპტომიცინისა და გენტამიცინის მიმართ. ამავე დროს შტამების უმრავლესობამ გამოავლინა რეზისტენტობა ამპიცილინის მიმართ, რაც აგრეთვე დასტურდება სხვადასხვა ავტორთა კვლევებში.

*V.parahaemolyticus*-ის იზოლატების 47.5% მგრძობიარე აღმოჩნდა კვლევის ფარგლებში გამოყოფილი ბაქტერიოფაგების მიმართ. საინტერესოა სხვადასხვა სეროტიპის შტამების ბაქტერიოფაგების მიმართ მგრძობელობის შედეგები. კვლევამ აჩვენა, რომ ინფექციების გამომწვევი O3-სეროტიპი (O3:K51, O3:K65) ყველაზე მაღალი

მგრძობელობით ხასიათდება. რაც შეეხება O3:K6-ის პანდემური კლონის სეროვარიანტს- 01:KUT -ს, ნაშრომის ფარგლებში გამოყოფილ იქნა მოცემული სეროტიპის მიმართ აქტიური ბაქტერიოფაგი- VpaA11. ფაგოტიპირების შედეგები გათვალისწინებული უნდა იქნას *V.parahaemolyticus*-ის მიერ გამოწვეული ინფექციების სამკურნალო პრეპარატის შექმნის პროცესში.

ფაგების ელექტრონულ-მიკროსკოპიურმა შესწავლამ გვიჩვენა, რომ ჩვენს მიერ გამოყოფილი *V.parahaemolyticus*-ის ბაქტერიოფაგები არ ხასიათდებიან მორფოლოგიური მრავალფეროვნებით- ყველა მათგანი მიეკუთვნება Myoviridae-ს ოჯახს- ჰექსაგონალური თავითა და კუმშვადი კუდით, თუმცა განსხვავება აღინიშნება ვირიონის ზომებში. ლიტერატურაში Mioviridae-ს გარდა აღწერილია Siphoviridae-ს ოჯახის სხვადასხვა გვარი წარმომადგენლებიც [107]. ცნობილია, რომ სამკურნალო პრეპარატების შემადგენლობაში არსებული ბაქტერიოფაგების უმრავლესობა კუდიანი ფაგებია და, ძირითადად, Myoviridae-ს და Siphoviridae-ს ოჯახებს მიეკუთვნება. ამდენად, *V.parahaemolyticus*-ის მიმართ სპეციფიკური ბაქტერიოფაგები სავარაუდოდ ატარებენ თერაპიულ პოტენციალს.

თერაპიული მიზნით ბაქტერიოფაგების გამოყენებისთვის მნიშვნელოვანია აგრეთვე მათი სწრაფი და ეფექტური გამრავლების უნარი. ჩატარებულმა ექსპერიმენტებმა აჩვენა, რომ ჩვენს მიერ გამოყოფილი ფაგები ხასიათდება ეფექტური აღსორბციის უნარით (მაღალი პროცენტული მაჩვენებლით) და ვირუსული ნაწილაკების მაღალი გამოსავალით. შევისწავლეთ ბაქტერიოფაგების ურთიერთქმედება აღსორბციის კოფაქტორებთან, მაგალითად, 2%-იანი ნატრიუმის ციტრატთან, ფაგები ავლენენ საკმაოდ მაღალ მგრძობელობას რაც შესაძლოა მიუთითებდეს იმაზე, რომ ეს ფაგები დამოკიდებულნი არიან ორგანული იონებზე, როგორც აღსორბციის კოფაქტორებზე.

ბაქტერიოფაგები დახასიათებისას დიდი მნიშვნელობა ენიჭება მათ სეროლოგიურ მაჩვენებლებს. ანტიფაგური შრატების გამოყენებით ჩატარებული ჯვარედინა ნეიტრალიზაციის რეაქციების შედეგების მიხედვით მოვახდინეთ საკვლევი ფაგების დაყოფა 4 სეროჯგუფად. აღსანიშნავია, რომ სეროლოგიური მონაცემები კორელაციაში აღმოჩნდა ფაგების ლიზისური სპექტრის და რესტრიქციული პროფილის შედეგებთან.

კვლევების შედეგად აღმოჩნდა, რომ ბაქტერიოფაგების 70% აქტიურია გამოყოფილი შტამების მიმართ. თუმცა ფაგების უმრავლესობა ხასიათდებოდა მასპინძელი შტამის მიმართ მაღალი სპეციფიკურობით. მოცემული შედეგი თერაპიული ფაგებისთვის არასასურველი მახასიათებელია, თუმცა მეორეს მხრივ, მოქმედების ვიწრო სპექტრის მქონე ფაგები წარმატებით გამოიყენება შტამების ფაგოტიპირებისთვის.

ბაქტერიოფაგების დაჯგუფება გარკვეულ კორელაციაში მოდის გენეტიკურ მახასიათებლებთან, კერძოდ, ფაგური დნმ-ის რესტრიქციულ პროფილთან. თუმცა უნდა აღინიშნოს, რომ შესწავლილი ბაქტერიოფაგები მოქმედების დიაპაზონის მიხედვით უფრო მრავალფეროვანია, ვიდრე სხვა მახასიათებლების მიხედვით. ისევე როგორც ბაქტერიების შემთხვევაში, ბაქტერიოფაგების მრავალფეროვნება ლიზისური სპექტრის მიხედვით აიხსნება ზედაპირული ცილოვანი სტრუქტურების- სააღსორბციო რეცეპტორების მაღალი მრავალფეროვნებით.

მეორეს მხრივ, ფაგორეზისტენტული (მეორადი) ბაქტერიული მუტანტების ანალიზმა გვიჩვენა, რომ ჩვენს მიერ გამოყოფილ ბაქტერიოფაგებს მსგავსი

რეცეპტორული აპარატი გააჩნიათ, რადგან ჯვარედინა სკრინინგის ექსპერიმენტებმა სხვადასხვა ფაგორეზისტენტულ მუტანტებზე გვიჩვენა, რომ ფაგები არ ავლენენ აქტივობას ფაგორეზისტენტული ბაქტერიული მუტანტების მიმართ.

რესტრიქციული პროფილი საშუალებას გვაძლევს ვიმსჯელოთ ფაგების გენეტიკურ მრავალფეროვნებაზე. აღსანიშნავია, რომ ერთი და იმავე სეროტიპის მასპინძელი უჯრედის მქონე ბაქტერიოფაგები ერთ კლასტერშია გაერთიანებული. ამასთან, ცალკე ჯგუფშია Vpa A11, რომელიც გენომის ზომით, სეროლოგიური და ფიზიოლოგიური მახვენებლებით განსხვავებულია დანარჩენი ფაგებისგან.

ცნობილია, რომ ბაქტერიოფაგებზე ფიზიკური და ქიმიური ფაქტორების მაინაქტივირებელი მოქმედების შესწავლას დიდი მნიშვნელობა აქვს სტრუქტურული კომპონენტების შენებისა და ფუნქციონირების შეფასებისათვის. შესწავლილ იქნა საკვლევი ბაქტერიოფაგების დამოკიდებულება ისეთი ფაქტორების მიმართ, როგორცაა ულტრაიისფერი გამოსხივება, ტემპერატურა, წყალბად იონთა მაღალი ან დაბალი მახვენებლები, მაღალი იონური ძალა და ა.შ.

ჩატარებულ ექსპერიმენტებში გამოვლინდა *V.parahaemolyticus*-ის ფაგების მდგრადობა ორგანული გამსხნელების (სპირტი, ქლოროფორმი) მიმართ. რაც არაპირდაპირად მიუთითებს მათ ვირიონებში ლიპიდური კომპონენტის არარსებობაზე. იმის გათვალისწინებით, რომ ლიტერატურაში აღწერილი *V.parahaemolyticus*-ის ფაგების უმრავლესობა მგრძობიარეა ორგანული გამსხნელების მიმართ, ჩვენს მიერ გამოყოფილი ფაგური იზოლატები განსხვავდება აქამდე შესწავლილი

ბაქტერიოფაგები განსხვავდებიან ერთმანეთისგან ულტრაიისფერი გამოსხივების მიმართ გამძლეობის მიხედვით. თუმცა ყველაზე არამდგრადი ბაქტერიოფაგების შემთხვევაშიც ინაქტივაციის დრო 60 წმ-ია, ზოგიერთ შემთხვევაში კი 90 წმ.

თერმომგრძობელობის შესწავლამ აჩვენა, რომ გამოყოფილი ბაქტერიოფაგები საკმაოდ მდგრადია მაღალი ტემპერატურის მიმართ (მაგ *E.coli*-ის და *V.parahaemolyticus*-ის სხვა ფაგებთან შედარებით), ამასთან ისინი განსხვავდებიან ერთმანეთისგან ტემპერატურაზე დამოკიდებულების მიხედვით. საკვლევი ბაქტერიოფაგების სხვადასხვა თერმომგრძობელობა მიუთითებს მათი ცილოვანი სტრუქტურების განსხვავებაზე და ამდენად, ფაგების ტაქსონომიური მიკუთვნებისა და არსებული კოლექციის ფარგლებში დაჯგუფებისათვის გარკვეული მნიშვნელობა აქვს.

შესწავლილი ბაქტერიოფაგები მდგრადი აღმოჩნდა ოსმოსური შოკის მიმართ. მოცემული შედეგი იმაზე მიუთითებს, რომ მათი ცილოვანი გარსი ადვილად ატარებს წყლის მოლეკულებს და იონებს. არსებობს მოსაზრება, რომ ოსმოსური შოკისადმი მგრძობელობა დამოკიდებულია ფაგების ცილოვანი კაფსიდის სიმკვრივეზე, კერძოდ, კაფსომერების შეფუთვის კომპაქტურობაზე. ანდერსონის მიერ T-ფაგები სწორედ ამ ნიშნის მიხედვით იქნა დაყოფილი მგრძობიარე (T-წყვილი ფაგები) და რეზისტენტულ (T3,T5,T7) ჯგუფებად.

ცნობილია, რომ ბაქტერიოფაგების უმრავლესობა საკმაოდ სტაბილურია შუალედურ pH-5-9 დიაპაზონში. საკვები არის pH-ის ექსტრემალურად მაღალი ან დაბალი მახვენებლები იწვევს ვირიონის დეგრადაციას და ინფექციურობის დაკარგვას.

შესწავლილი *V.parahaemolyticus*-ის ბაქტერიოფაგები საკმაოდ მაღალი სტაბილურობით ხასიათდება pH-4-7-ის პირობებში. pH-ის ექსტრემალურად დაბალი მნიშვნელობის დროს ნაწილაკების რაოდენობა მკვეთრად მცირდება. იგივეს ვერ ვიტყვით ექსტრემალურად ტუტე არეზე pH-10-12, რიგი ფაგების შემთხვევაში მაღალი pH არამარტო არ ამცირებს, არამედ ხელს უწყობს ფაგური ნაწილაკების

სიცოცხლისუნარიანობის შენარჩუნებას. ეს შესაძლოა აიხსნას პატრონი ბაქტერიების ალკალოფილური თვისებებითაც.

ბაქტერიოფაგების პრაქტიკული გამოყენებისთვის როგორც სამკურნალო პროფილაქტიკური მიზნით, ასევე ეკოლოგიური კვლევების, მაგალითად სხვადასხვა წყალსატევებში ტრასირების ექსპერიმენტების ჩასატარებლად, დიდი მნიშვნელობა აქვს მათ სტაბილობას საკვლევ გარემოში და ასევე შენახვისა და ტრანსპორტირების პირობებში.

ამ მიზნით ჩატარებულ იქნა *V.parahaemolyticus*-ის ფაგების სტაბილობის შესწავლა სხვადასხვა მიკრობიოლოგიურ არეებსა და ხსნარებში, ასევე ბუნებრივ ტბისა და ზღვის წყლებში. კვლევებმა გვიჩვენა, რომ *V.parahaemolyticus*-ის ბაქტერიოფაგები გამოირჩევიან სტაბილურობით. მათი აქტივობა უმნიშვნელოდ ეცემოდა 6 თვის განმავლობაში.

ბაქტერიოფაგების, როგორც თერაპიული პრეპარატების, დასახასიათებლად მნიშვნელოვანია მასზე პროტეოლიტური ფერმენტების მოქმედების შესწავლა. ამ ტიპის ექსპერიმენტები *V.parahaemolyticus* –ის ბაქტერიოფაგებზე, როგორც პოტენციურ თერაპიულ საშუალებაზე აქამდე არ გამოქვეყნებულა.

ჩვენს მიერ ჩატარებულმა ექსპერიმენტებმა აჩვენა, რომ გამოყოფილი *V.parahaemolyticus* –ის მიმართ სპეციფიკური ბაქტერიოფაგები მგრძობიარეა პეპსინის 1% -იანი ხსნარის მიმართ. იმდენად რამდენადაც, პეპსინის ხსნარის pH 1-1.5-ია, ხოლო ჩვენმა კვლევებმა აჩვენა სიცოცხლისუნარიანი ფაგური ნაწილაკების რაოდენობის მნიშვნელოვანი კლება pH 2-ზე, მოცემული შედეგი სავსებით მოსალოდნელი უნდა ყოფილიყო. მიღებული ნეგატიური ეფექტების გათვალისწინებით, კუჭის წველის მუავე pH-ის გასანეიტრალებლად უმჯობესი იქნება ფაგების მიღება ტუტე ბუნების ხსნარებთან ერთად.

რაც შეეხება ქემოტრიფსინის გავლენას ფაგების სიცოცხლისუნარიანობაზე, არ იყო თვალშისაცემი. მოცემული შედეგი შესაძლებლობას იძლევა ვიფიქროთ *V.parahaemolyticus* –ის მიმართ სპეციფიკური ბაქტერიოფაგების გამოყენებაზე იქნეს ჭრილობითი ინფექციების სამკურნალოდ ქემოტრიფსინთან ერთობლიობაში.

მომდევნო ეტაპზე საჭიროა *in vivo*- ექსპერიმენტების ჩატარება ბაქტერიოფაგების გამოყენებასთან დაკავშირებული უარყოფითი შედეგების გამორიცხვის მიზნით.

ჩვენს მიერ ჩატარებული კვლევის შედეგად შეგვიძლია დავასკვნათ, რომ საქართველოს შავი ზღვის სანაპიროს წყლები ხელსაყრელ გარემოს წარმოადგენს *Vibrio parahaemolyticus*-ის და შესაბამისი ბაქტერიოფაგების სიცოცხლისუნარიანობისა და გავრცელებისთვის. საყურადღებოა ბაქტერიების სეროტიპირებისა და ვირულენტობის ფაქტორების შესწავლის შედეგები, რომლის თანახმად გამოვლინდა შავ ზღვაში *V. parahaemolyticus*-ის პანდემური კლონების არსებობა.

მტკნარ წყალსატევებიდან ბაქტერიების გამოყოფის დაბალ სიხშირე და შესაბამისი ბაქტერიოფაგების გამოყოფის შესაძლებლობა მიანიშნებს, რომ არახელსაყრელ პირობებში (მაგ. დაბალი მარილიანობა) *Vibrio parahaemolyticus*-ის ბაქტერიები გადადიან არაკულტივირებად მდგომარეობაში.

ჩვენს მიერ გამოყოფილი *V.parahaemolyticus*-ის მიმართ სპეციფიკური ბაქტერიოფაგების ბიოლოგიურ მახასიათებლები მიანიშნებს მათ მაღალ თერაპიულ პოტენციალზე.

გარდა თერაპიული დანიშნულებისა შესწავლილი ბაქტერიოფაგების გამოყენება შესაძლებელია ფაგოტიპირების მიზნით ერთნაირი სეროტიპისა და გენეტიკური სტრუქტურის *V.parahaemolyticus*-ის ბაქტერიული შტამების დიფერენცირებისთვის.



## V. დასკვნები

1. საქართველოს შავი ზღვის სანაპიროს წყლები ხელსაყრელ პირობებს ქმნის *Vibrio parahaemolyticus*-ის და შესაბამისი ბაქტერიოფაგების სიცოცხლისუნარიანობისა და გავრცელებისთვის. მათი შემცველობა კორელაციაშია ტემპერატურის მატებასთან.
2. მტკნარი და მომლაშო შიდა წყალსატევები არახელსაყრელ გარემოს წარმოადგენს *Vibrio parahaemolyticus*-ის ბაქტერიების სიცოცხლისუნარიანობისთვის, რაც აისახება მტკნარ წყალსატევებში ბაქტერიების გამოყოფის დაბალ სიხშირეზე.
3. ექსპერიმენტული კვლევით დადასტურდა, რომ არახელსაყრელ პირობებთან შეგუების მიზნით *Vibrio parahaemolyticus* გადადის არაკულტივირებად მდგომარეობაში.
4. *V. parahaemolyticus*-ის საქართველოში გამოყოფილი შტამები ხასიათდება მაღალი ფენოტიპური და გენეტიკური მრავალფეროვნებით. დადგენილია შავ ზღვაში *Vibrio parahaemolyticus*-ის პანდემური კლონების არსებობა.
5. საქართველოში გამოყოფილი *V. parahaemolyticus* –ის მიმართ სპეციფიკური ბაქტერიოფაგები ხასიათდება მაღალი პატრონ-სპეციფიკურობით, შედარებით დაბალი მორფოლოგიური და გენეტიკური მრავალფეროვნებით.
6. *V. parahaemolyticus* –ის მიმართ სპეციფიკური ბაქტერიოფაგები ავლენენ გარემო ფაქტორებისადმი უფრო მაღალ გამძლეობას, ვიდრე შესაბამისი ბაქტერიული შტამები, რაც მათ ინდიკატორულ თვისებებს განაპირობებს.
7. შერჩეულია *Vibrio parahaemolyticus*-ის მიმართ სპეციფიკური რამდენიმე ბაქტერიოფაგი, რომელთა თერაპიული პოტენციალი ეფუძნება მათ ბიოლოგიურ მახასიათებლებს.
8. *V. parahaemolyticus* –ის მიმართ სპეციფიკური ფაგების ნაკრების გამოყენება შედეგს იძლევა განხორციელდეს ერთნაირი სეროტიპისა და გენეტიკური სტრუქტურის მქონე *V. parahaemolyticus*-ის იზოლატების სუბტიპირება.

## VI. გამოყენებული ლიტერატურა:

1. Адамс М. Бактериофаги. Москва, изд-во «Иностранная Литература», 1961г.
2. Габрилович И.М. Основы бактериофагии. Минск, «Вимеймая школа», 1973.
3. Покровский В.И. Медицинская Микробиология. Учебная литература для студентов медицинских вузов и врачей. ГЭОТАР МЕДИЦИНА. Москва, 1999, 1184 стр.
4. Abedon ST, Kuhl SJ, Blasdel BG, Kutter EM. 2011. Phage treatment of human infections *Bacteriophage*. 1:66-85.
5. Ackermann H.W. Bacteriophage taxonomy. *J. Microbiol. Sci.* 1987, v.4, 7, p. 214-218.
6. Akiyama, S., K. Takizawa, A. Matsushima, and Y. Miyamoto. 1966. Contamination of *Vibrio parahaemolyticus* in circulation of sea fish and serotypes of the vibrios isolated from them. *Jap. J. Pub. Health* 13:159.
7. Allen, R., and Baumann, P. 1971. Structure and arrangement of flagella in species of the genus *Beneckea* and *Photobacterium fischeri*. *J. Bacteriol.* 107: 295-302.
8. Alsina, M., and Blanch, A.R. (1994). Improvement and update of a set of keys for biochemical identification of *Vibrio* species. *Journal of Applied Bacteriology*, 77: 719-721
9. 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.
10. Arakawa, E.; Murase, T.; Shimada, T.; Okitsu, T.; Yamai, S. and Watanabe, H.; 1999; Emergence and Prevalence of a Novel *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 Clone in Japan; *J. Infect. Dis.*, 52 (6), 246-247
11. Arbedon S.T., Heschler T.D., Stopar D. Bacteriophage Latent-Period Evolution as a Response to Resource Availability. *J. Appl. Enviro. Micriobiol*, 2001, vol. 67, 9, p. 4233-4241.
12. Asakawa, Y., S. Akabane, and M. Noguchi. 1966. Studies on *Vibrio parahaemolyticus*. 5. Distribution of the vibrios in Hamana Lake. *Jap. J. Pub. Health* 13:158.
13. Asplund ME, et al. 2011. Water column dynamics of *Vibrio* in relation to phytoplankton community composition and environmental conditions in a tropical coastal area. *Environ. Microbiol.* 13:2738–2751.
14. Atsumi, T., McCarter, L., and Imae, Y. 1992. Polar and lateral flagellar motors of marine *Vibrio* are driven by different ion membrane forces. *Nature.* 355: 182-184

15. Bag, P. K., S. Nandi, R. K. Bhadra, T. Ramamurthy, S. K. Bhattacharya, M. Nishibuchi, T. Hamabata, S. Yamasaki, Y. Takeda, and G. B. Nair. 1999. Clonal diversity among recently emerged strains of *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 associated with pandemic spread. *J. Clin. Microbiol.* 37:2354–2357.
16. 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.
17. Baross, J. A., J. Liston, and R. Y. Morita. 1978. Incidence of *Vibrio parahaemolyticus* bacteriophages and other *Vibrio* bacteriophages in marine samples. *Appl. Environ. Microbiol.* 36:492-499.
18. Bastias, R., Higuera, G., Sierralta, W., Espejo, R.T., 2010. A new group of cosmopolitan bacteriophages induce a carrier state in the pandemic strain of *Vibrio parahaemolyticus*.
19. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (2005). Brenner, D.J., Krieg, N.R. and Staley, J.T. Eds. 2<sup>nd</sup> ed. Volume 2, Part B, Springer, New York, USA.
20. Bergh, O., K. Y. Borsheim, G. Bratbak, and M. Heldal. 1989. High abundance of viruses found in aquatic environments. *Nature* 340:467-8.
21. Bhuiyan, N.A, Ansaruzzaman, M., Kamruzzaman, M., Alam, K., Chowdhury, N.R., Nishibuchi, M., Faruque, S.M., Sack, D.A., Takeda, Y., and Nair, G.B., (2002), Prevalence of the pandemic genotype of *Vibrio parahaemolyticus* in Dhaka, Bangladesh, and significance of its distribution across different serotypes. *J.Clin.Microbiol.* 40, 284-286
22. Blackwell KD, Oliver JD., The ecology of *Vibrio vulnificus*, *Vibrio cholerae*, and *Vibrio parahaemolyticus* in North Carolina estuaries, *J Microbiol.* 2008 Apr;46(2):146-53.
23. Blake, and Weaver, R.W. (1980). Diseases of humans (other than cholera) caused by vibrios. *Annual Review of microbiology*, 34:341-367.
24. Borsheim, K. Y., G. Brantbak, and M. Heldal. 1990. Enumeration and biomass estimation of planktonic bacteria and viruses by transmission electron microscopy, *Appl. Environ. Microbiol.* 56:352-356.
25. Botstein D.A. Theory of modular evolution for bacteriophages. *Ann. 4. Acad. Sci.* 1980. v. 354. p. 484-490.
26. Bouvier T, del Giorgio PA, 2007, Key role of selective viral-induced mortality in determining marine bacterial community composition. *Environ Microbiol.* Feb;9(2):287-97.
27. Bratbak, G., M. Heldal, S. Norland, and T. F. Thingstad. 1990. Viruses as partners in spring bloom microbial trophodynamics, *Appl. Environ. Microbiol.* 56:1400-1405.

28. Bredley D. E. Ultrastructure of bacteriophages and bacteriocins. *J. Bacteriol. Rev.* 1967, v.31.pp.230-314.
29. Broberg CA, Calder TJ, Orth K. 2011. *Vibrio parahaemolyticus* cell biology and pathogenicity determinants. *Microbes Infect.* 13:992–1001.
30. Brussaard, C.P.D.; Timmermans, K. R.; Uitz ,J.; Veldhuis, M. J. W.; 2008; Virioplankton dynamics in the waters southeast of the Kerguelen (Southern Ocean). *Deep-Sea Res. Pt. II* 55:752-765.
31. Brüssow, H., Canchaya, C. & Hardt, W. D. (2004). Phages and the evolution of bacterial pathogens: from genomic rearrangements to lysogenic conversion. *Microbiol Mol Biol Rev* 68, 560–602.
32. Burrowes B, Harper DR, Anderson J, McConville M, Enright MC. 2011. Bacteriophage therapy: potential uses in the control of antibiotic-resistant pathogens *Expert. Rev. Anti. Infect. Ther.* 9:775-85.
33. Calendar, R. 2006, *The Bacteriophages*. OXFORD, University Press.
34. 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.
35. Ceccarelli D., Hasan N.A, Huq A., Colwell R.R., Distribution and dynamics of epidemic and pandemic *Vibrio parahaemolyticus* virulence factors, 2013; *Front Cell Infect Microbiol.* 2013; 3: 97.
36. Chanishvili N. 2012. Phage therapy--history from Twort and d'Herelle through Soviet experience to current approaches *Adv. Virus Res.* 83:3-40.
37. Caruso, G., Zaccone, R., Genovese, L., and Crisafi, E. (1998). Microbiological monitoring of Castellamare Gulf (TP) waters for their suitability in marine aquaculture. *New Microbiology*, 21:169-182.
38. Casas V., 2011. Role of bacteriophage-encoded exotoxins in the evolution of bacterial pathogens.
39. Chakraborty, S., Nair, G.B., and Shimada, S. (1997). Pathogenic vibrios in the natural aquatic environment. *Reviews on Environmental Health*, 12:63-80
40. Chang, B., S. Yoshida, H. Miyamoto, M. Ogawa, K. Horikawa, M. Nishibuchi, and H. Taniguchi. 2000. A unique and common restriction fragment pattern of the nucleotide sequences homologous to the genome of Vf33, a filamentous bacteriophage, in pandemic strains of *Vibrio parahaemolyticus*
41. 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.

42. Chiou, C., S. Hsu, S. Chiu, T. Wang, and C. Chao. 2000. *Vibrio parahaemolyticus* serovar O3:K6 as cause of unusually high incidence of food-borne disease outbreaks in Taiwan from 1996 to 1999. *J. Clin. Microbiol.* 38:4621–4625.
43. Chowdhury A, Ishibashi M, Thiem VD, Tuyet DT, Tung TV, Chien BT, Seidlein Lv L, Canh DG, Clemens J, Trach DD, Nishibuchi M. Emergence and serovar transition of *Vibrio parahaemolyticus* pandemic strains isolated during a diarrhea outbreak in Vietnam between 1997 and 1999. *Microbiol Immunol* 2004a; 48(4): 319–327.
44. Chowdhury N. R., Chakraborty S., Ramamurthy T., Nishibuchi M., Yamasaki S., Takeda Y., et al. (2000). Molecular evidence of clonal *Vibrio parahaemolyticus* pandemic strains. *Emerg. Infect. Dis.* 6, 631–636.
45. Chowdhury N. R., Stine O. C., Morris J. G., Nair G. B. (2004b). Assessment of evolution of pandemic *Vibrio parahaemolyticus* by multilocus sequence typing. *J. Clin. Microbiol.* 42, 1280–1282. 10.1128/JCM.42.3.1280-1282.
46. Colwell. R.R (1996). Global climate and infectious disease: the cholera paradigm. *Science*, 274: 2025—2031.
47. Colwell R., Huq A. Vibrios in the environment: viable but nonculturable vibrio cholerae. p.117-133. In I.K. Wachmuth, O.Olsvik, P.Blakke (ed.). *Vibrio cholerae and cholera: molecular and global perspectives*. 1994. *ASM, Washington, D.C.*
48. 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.
49. Comeau, A. M., A. M. Chan, and C. A. Suttle. 2006. Genetic richness of vibriophages isolated in a coastal environment. *Environ. Microbiol.* 8:1164–1176.
50. Comeau, A. M., Buenaventura E., C. A. Suttle., A Persistent, Productive, and Seasonally Dynamic Vibriophage Population within Pacific Oysters (*Crassostrea gigas*) *Appl. Environ. Microbiol.*, Sept. 2005, 71: 5324–5331.
51. Curtis A. Suttle, Viruses in the sea, 2005, *Nature* 437, 356-361.
52. Daniels NA, Ray B, Easton A, Marano N, Kahn E, McShan AL 2nd, et al. Emergence of a new *Vibrio parahaemolyticus* serotype in raw oysters: a prevention quandary. *JAMA.* 2000; 284:1541-5.
53. DePaola, A., C. A. Kaysner, J. Bowers, and D. W. Cook. 2000. Environmental investigations of *Vibrio parahaemolyticus* in oyster after outbreaks in Washington, Texas, and New York (1997 and 1998). *Appl. Environ. Microbiol.* 66:4649–4654.

54. DePaola, A., Ulaszek J., Kaysner, C.A., Tenge, B.J., Nordstrom. J.L., Wells. 1., Puhr, N., Gendel. S.M. (2003). Molecular serological and virulence characteristics of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from environmental food and clinical sources in North America and Asia. *Applied and Environmental Microbiology* 69:3999-4005.
55. Deresinski S. 2009. Bacteriophage therapy: exploiting smaller fleas *Clin. Infect. Dis.* 48:1096-1101.
56. Deter J., Lozach S., Véron Antoine., Chollet J., Derrien A., Hervio-Heath D., 2010, *Environmental microbiology* Volume 12, Issue 4, Pages 929 - 937
57. Diez, B., J. Anton, N. Guixa-Boixereu, C. Pedros-Alio, and R. Rodriguez-Valera.2000. Pulse-field gel electrophoresis analysis of virus assemblages present in a hypersaline environment. *Internatl. Microbiol.* 3:159-164.
58. Dinh Thi Tuyet, Vu Dinh Thiem, Lorenz von Seidlein, Ashrafazzuman Chowdhury, Eunsik Park, Do Gia Canh, Bui Trong Chien, Tran Van Tung, Abdollah Naficy, Malla Raghav Rao, Mohammad Ali, Hyejon Lee, Trinh Hung Sy, Mitsuaki Nichibuchi, John Clemens and Dang Duc Trach, Clinical, Epidemiological, and Socioeconomic Analysis of an Outbreak of *Vibrio parahaemolyticus* in Khanh Hoa Province, Vietnam, *The Journal of Infectious Diseases* 2002;186:1615–1620.
59. Enos-berlage, J. L., Guvener, Z. T., Keenan, C. E. & Mccarter, L. L. (2005). Genetic determinants of biofilm development of opaque and translucent *Vibrio parahaemolyticus*. *Mol Microbiol* 55, 1160–1182.
60. Fabbri, A., Falzano, L., Frank, C., 1999, *Vibrio parahaemolyticus* thermostable direct hemolysin modulates cytoskeletal organisation and calcium homeostasis in intestinal cultured cells. *Infection and Immunity*, 67, 1139- 1148.
61. Faruque SM, Mekalanos JJ. 2012. Phage-bacterial interactions in the evolution of toxigenic *Vibrio cholerae* *Virulence*. 3.
62. 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.
63. Freifelder D. *Molecular biology.* Jones and Bartlett Inc., Boston, 1987.
64. Fuerst, J.A. 1980. Bacterial sheathed flagella and the rotary motor model for the mechanism of bacterial motility. *J. Theor. Biol.* 84: 761-774.
65. Fujino, T., Sakaguchi, G., Sakazaki, R. & Takeda, Y. (2002). Discovery of *Vibrio parahaemolyticus*. *J Jpn Soc Intern Med* 91, 2903–2906.
66. Gavilan RG, Zamudio ML, Martinez-Urtaza J (2013) Molecular Epidemiology and Genetic Variation of Pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in Peru. *PLoS Negl Trop Dis* 7(5) .

67. George, M.R., John, K.R., Iyappan, T., and Jeyaseelan, M.J.P (2005). Genetic heterogeneity among *Vibrio alginolyticus* isolated from shrimp farms by PCR fingerprinting. *Letters in Applied Microbiology* 40:369-372.
68. Gonzalez-Escalona, N., Cachicas, V., Acevedo, C., Rioseco, M. L., Vergara, J. A., Cabello, F., Romero, J. & Espejo, R. T. (2005). *Vibrio parahaemolyticus* diarrhea, Chile, 1998 and 2004. *Emerg Infect Dis* 11, 129–131.
69. 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.
70. Guerinot M.L. and Patriquin, D.G.(1981). N<sub>2</sub>-fixing vibrios isolated from the gastrointestinal tract of sea urchins. *Canadian Journal of Microbiology*, 27:311-317.
71. Haley BJ, Kokashvili T, Tskshvediani A, Janelidze N, Mitaishvili N, Grim CJ, Constantin de Magny G, Chen AJ, Taviani E, Eliashvili T, Tediashvili M, Whitehouse CA, Colwell RR, Huq A.;Molecular diversity and predictability of *Vibrio parahaemolyticus* along the Georgian coastal zone of the Black Sea.; *Front Microbiol.* 2014; 5:45.
72. Hara, S., K. Terauchi, and I. Koike. 1991. Abundance of viruses in marine water: Assessment by epifluorescence and transmission electron microscopy. *Appl. Environ. Microbiol.* 57:2731-2734.
73. Hara-Kudo, Y., Kasuga, Y., Kiuchi, A., Horisaka, T., Kawasumi, T., and Kumagai, S. (2003). Increased sensitivity in PCR detection of *tdh*-positive *Vibrio parahaemolyticus* in seafood with purified template DNA. *Journal of Food Protection*, 66: 1675-7680.
74. Hardies, S. C., A. M. Comeau, P. Serwer, and C. A. Suttle. 2003. The complete sequence of marine bacteriophage VpV262 infecting *Vibrio parahaemolyticus* indicates that an ancestral component of a T7 viral supergroup is widespread in the marine environment. *Virology* 310:359–371.
75. Hashimoto, H., S. Baba, T. Terada, H. Zen-Yoji, S.Sakai, Y. Kudo, and T. Ito. 1966. Isolation of new types of *Vibrio parahaemolyticus* and its etiological distribution. *Jap. J. Bacteriol.* 21:409-410.
76. Hatfull GF, Hendrix RW. 2011. Bacteriophages and their genomes *Curr. Opin. Virol.* 1:298-303.
77. Hervio-Heath, D., Colwell, R.R., Derrien, A., Robert-Pillot, A., Fournier, J., and Pommepuy, M. (2003). Occurrence of pathogenic vibrios in coastal areas of France. *Journal of Applied Microbiology*, 92:1123-1135.
78. Hlady, and Klontz, KC. (1996). The epidemiology of *Vibrio* infections in Florida, 1981 -1993. *Journal of Infectious Diseases*, 173:1176-1183.
79. Hollis, D.G., Weaver, R.E., Baker, C.N., and Thomsbeny, C, (1976). Halophilic *Vibrio* spp. isolated from blood cultures. *Journal of Clinical Microbiology*, 3:425.

80. Holmberg .S.D. (1992). *Vibrio*. In: Gorbach, S.L., Bartlett, J.G., Blacklow,N.R., (eds.), *Infectious Diseases*, Philadelphia, WB Saunders Company.
81. Honda T, Iida T. The pathogenicity of *Vibrio parahaemolyticus* and the role of the thermostable direct hemolysin and related hemolysins. *Rev Med Microbiol*. 1993;4:106–113.
82. Honda, S., Matsumoto, S., Miwatani, T. & Honda, T. (1992). A survey of urease-positive *Vibrio parahaemolyticus* strains isolated from traveller’s diarrhea, sea water and imported frozen sea foods. *Eur J Epidemiol*8, 861-864.
83. Honda, T., Ni, X.Y., and Miwatani, T. (1988). Purification and characterization of a hemolysin produced by a clinical isolate of Kanagawa phenomenon-negative *Vibrio parahaemolyticus* and related to the thermostable direct hemolysin. *Infection and Immunity*, 56: 961-965.
84. Housby JN, Mann NH. 2009. Phage therapy *Drug Discov. Today* 14:536-40.
85. Hueck CJ., Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants, 1998, *Microbiol Mol Biol Rev*. Jun;62(2):379-433.
86. Huntley JS, Hall AC, Sathyamoorthy V, Hall RH. Cation flux studies of the lesion induced in human erythrocyte membranes by the thermostable direct hemolysin of *Vibrio parahaemolyticus*. *Infect Immun*. 1993 Oct;61(10):4326–4332.
87. Igbinosa E.O., Okoh A.I. Emerging *Vibrio* species: an unending threat to public health in developing countries. *Res Microbiol*. 2008; 159:495–506.
88. Iida, T., A. Hattori, K. Tagomori, H. Nasu, R. Naim, and T. Honda. 2001. Filamentous phage associated with recent pandemic strains of *Vibrio parahaemolyticus*. *Emerg. Infect. Dis*. 7:477–478. *Infectious Disease*. Philadelphia, WB Saunders Company
89. 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., and Sack, D.A. (2004). Pandemic strains of 031146 *Vibrio parahaemolyticus* in the aquatic environment of Bangladesh. *Canadian Journal of Microbiology*, 50:827-834.
90. Jaiani E, Kokashvili T, Mitaishvili N, Elbakidze T, Janelidze N, Lashkhi N, Kalandadze R, Mikashavidze E, Natroshvili G, Whitehouse CA, Huq A, Tediashvili M.; Microbial water quality of recreational lakes near Tbilisi, Georgia.; *J Water Health*. 2013 Jun;11(2):333-45.
91. Jaiani E., Tediashvili M., Janelidze N., Chanishvili N., Ivanova A., Mdzinarashvili T., Mrevlishvili G., Tushisvili 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.



92. Jaiani E., Tediashvili M., Janelidze N., Chanishvili N., Tsertsvadze G., Mdzinarashvili T., Mrevlishvili G. Peculiarities of the Interactions of Cb and Un Phages with the Host Cell in Different Conditions. *Interact. Microb. World.* Amsterdam, (2001) p.395.
93. Jaiani E., Natroshvili G., Tediashvili M., Giorgadze N., Lashkhi N. Investigation of microbial pollution in aquatic reservoirs of Tbilisi by biological methods. I -Caucasian Symposium on medical-Biological Sciences, Thesis, September 21-25, Tbilisi, 1999, p73-74.
94. 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.
95. Jeffrey W. Turner, Leena Malayil, Dominic Guadagnoli, D. Cole, Erin K. Lipp, Detection of *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus* and *Vibrio cholerae* with respect to seasonal fluctuations in temperature and plankton abundance, *Environmental Microbiology*, 2014, 16, 3
96. Jiang, S. C., and J. H. Paul. 1998. Gene transfer by transduction in the marine environment. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:2780-7.
97. Johnson C.N., Bowers J.C., Griffitt K.J., Molina V., Clostio R.W., Pei S., Laws E., Paranjpye R.N., Strom M.S., Chen A., Hasan N.A., Huq A., Noriega N.F, Grimes D.J., Colwell R.R., Ecology of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* in the Coastal and Estuarine Waters of Louisiana, Maryland, Mississippi, and Washington (United States) *Appl Environ Microbiol.*, 2012; 78(20): 7249–7257.
98. Jones J. L., Lüdeke C.H. M., Bowers J. C., Fischer N.G, M., Parsons M.B., Bopp C.A and DePaola A., Biochemical, Serological, and Virulence Characterization of Clinical and Oyster *Vibrio parahaemolyticus* Isolates, April 2012, *J. Clin. Microbiol.* vol. 50 no. 7 ,2343-2352
99. Jones, S.H. and B. Summer-Brason. 1998. Incidence and detection of pathogenic *Vibrio* sp. in a northern New England estuary, USA. *J. of Shellfish Research* 17:1665-1669.
100. Joseph SW, Colwell RR, Kaper JB. *Vibrio parahaemolyticus* and related halophilic vibrios. *Crit Rev Microbiol.* 1982;10:77-124.
101. Kampelmacher E.H., van Noorle, Jansen L.M., Mossel. D.A.A., Groen, F.J. (1972). A survey on the occurrence of *Vibrio parahaemolyticus* and *V. alginolyticus* on mussels and oysters and in estuarine waters in the Netherlands. *Journal of Applied Bacteriology*, 35, 431-438.
102. Kaneko, T., and Colwell, R.R. (1978). The annual cycle of *Vibrio parahaemolyticus* in Chesapeake Bay. *Microb. Ecol.* 4:135-156.
103. Kawagishi, I., Imagawa, M., Imae, Y., McCarter, L., and Homma, M. 1996. The sodium-driven polar flagellar motor of marine *Vibrio* as the mechanosensor that regulates lateral flagellar gene expression. *Mol Microbiol.* 20: 693-699.

104. Khan, A. A., S. McCarthy, R. F. Wang, and C. E. Cerniglia. 2002. Characterization of United States outbreak isolates of *Vibrio parahaemolyticus* using enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC) PCR and development of a rapid PCR method for detection of O3:K6 isolates. *FEMS Microbiol. Lett.* 206:209–214.
105. 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.
106. Koga, T., and T. Kawata. 1991. Comparative characterization of inducible and virulent *Vibrio parahaemolyticus* bacteriophages having unique head projections. *Microbiol. Immunol.* 35:49–58.
107. Koga T., Toyoshima S., Kawata T. ; Morphological Varieties and Host Ranges of *Vibrio parahaemolyticus* Bacteriophages Isolated from Seawater; *Appl. And Env. Microbio.*, 1982, Vol. 44, No. p. 466-470
108. Kogure, K. 1998. Bioenergetics of marine bacteria. *Curr. Opin. Biotechnol.* 9: 278-82.
109. Kristensen, K.K. (1974). The occurrence of *Vibrio paraliaemolyrius* and *Vibrio alginolyticus* in the Sound. *Nord Veterinary Medicine*, 26:188-196.
110. Kudoh, Y. 1969. Studies on K antigens of *Vibrio parahaemolyticus*. 2. Immunochemical specificity of K antigens and their sugar constituents. *Jap. J. Bacteriol.* 24:331-337.
111. Kutateladze M, Adamia R. 2010. Bacteriophages as potential new therapeutics to replace or supplement antibiotics *Trends Biotechnol.* 28:591-5.
112. Kutter Elizabeth, Alexander sulakvelidze. Bacteriophages: biology and applications. Burton Guttman, Raul Raua Elizabeth Kutter. Basic Phage Biology. 2005.
113. Kutter Elizabeth Alexander Sulakvelidze. Bacteriophages: biology and applications. Hans-W.Ackermann. Bacteriophage classification. 2005.
114. 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.
115. MacRae, J., and M. Srivastava. 1998. Detection of viruses by electron microscopy: An efficient approach. *J. Virol. Meth.* 72:105-108.
116. Magny G, Murtugudde R, Sapiano MR, Nizam A, Brown CW, et al. (2008) From the Cover: Environmental signatures associated with cholera epidemics. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 17676–17681
117. Makino, K., Oshima, K., Kurokawa, K., Yokoyama, K., Uda, T., Tagomori, K., Iijima, Y., Najima M., Nakano, M., Yamashita, A., Kubota, Y., Kimura, S., Yasunaga, T., Honda, T., Shinagawa, H., Hattori, M., and Iida, T. (2003). Genome sequence of *Vibrio parahaemolyticus*: a pathogenic mechanism distinct from that of *V. cholerae*. *Lancet*, 361 :743-749.

118. Manz W., Amann R., Ludwig W., Wagner M., Schleifer K-H. Phylogenetic oligodeoxynucleotide probes for the major subclasses of proteobacteria: problems and solutions. *Syst. Appl. Microbiol.* 1992, **15**, 593–600.
119. Marie, D., C. P. D. Brussard, R. Thyraug, G. Bratbak, and D. Voulot. 1999. Enumeration of marine viruses in culture and natural samples by flow cytometry, *Appl. Environ. Microbiol.* 65:45-52.
120. Martinez-Urtaza, J.; Lozano-Leon, A.; Varela-Pet, J.; Trinanes, J.; Pazos, Y.; Garcia-Martin, O.; (2008), Environmental determinants of the occurrence and distribution of *Vibrio parahaemolyticus* in the rias of Galicia, Spain, *Appl. Environ. Microbiol.*,74, 265-274
121. Matsuda S, et al. 2010. Association of *Vibrio parahaemolyticus* thermostable direct hemolysin with lipid rafts is essential for cytotoxicity but not hemolytic activity. *Infect. Immun.* 78:603–610
122. Matsuzaki, S., T. Inoue, S. Tanaka, T. Koga, M. Kuroda, S. Kimura, and S. Imai. 2000. Characterization of a novel *Vibrio parahaemolyticus* phage, KVP241, and its relatives frequently isolated from seawater. *Microbiol. Immunol.* 44:953–956.
123. 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.
124. McCarter, L. 1995. Genetic and molecular characterization of the polar flagellum of *Vibrio parahaemolyticus*. *J. Bacteriol.* 177: 1595-1609.
125. McCarter, L.L., and Wright, M.E. 1993. Identification of genes encoding components of the swarmer cell flagellar motor and propeller and a sigma factor controlling differentiation of *Vibrio parahaemolyticus*. *J. Bacteriol.* 175: 3361-3371.
126. Mdzinarashvili T.J., Mrevlishvili G.M., Al-Zaza M., Tushishvili D.G., Tediashvili M.I., Kiziria E.L. Thermodynamics of temperature- Induced Destruction of Phages, *J. Georg. Engineer. News (GEN)*, 2000, 2 p. 89-92.
127. Merrill C.R., Biswas B., Carlton R. Long circulating bacteriophages as antibacterial agents. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 1996. V. 93. P. 3188-3192.
128. 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.
129. Miller, R. V. 1998. Bacterial gene swapping in nature. *Scientific American* 278: 66-71.
130. Miller, R. V., S. Ripp, J. Replicon, O. A. Ogunseitan, and T. A. Kokjohn. 1992. Virus-mediated gene transfer in freshwater environments. In Gauthier, M.J. (ed.), *Gene Transfers and Environment*, Springer-Verlag, Berlin, German, pp. 50-62.

131. Miller, R. V. 1988. Potential for transfer and establishment of engineered genetic sequences in the environment. In Hodgson, J., and Sugden, A.M. (eds.), *Planned Release of Genetically Engineered Organisms* (Trends Biotech. and Trends Ecol. Evolution Special Publication), Elsevier, Cambridge, pp. S23-7.
132. Miller V. R. *Marine Phages, The bacteriophages*. 2th edition, R. Calendar (ed), Oxford University Press.
133. Miwatani, T., S. Shinoda, T. Tamura, H. Nishimune, A. Tomaru, A. Yoshihara, and T. Fujino. 1969. Antigens of *Vibrio parahaemolyticus*. I. Preparation of specific antisera to somatic (O) antigen and their application in antigen analysis of *Vibrio parahaemolyticus*.
134. Miyamoto, Y., T. Kato, Y. Obara, S. Akiyama, K. Takizana, and S. Yamai. 1969. *In vitro* hemolytic characterization of *Vibrio parahaemolyticus*: its close correlation with human pathogenicity. *J. Bacteriol.* 100, 1147-1149.
135. Morris, I. and Black, R. (1985). Cholera and other vibrioses in the United States. *New England Journal of Medicine*, 312: 343-350.
136. Muramatsu, K., and H. Matsumoto. 1991. Two generalized transducing phages in *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio alginolyticus*. *Microbiol. Immunol.* 35:1073–1084.
137. Myers M.L., Panicker G., Bej, A.K.(2003). PCR Detection of a newly emerged pandemic *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 pathogen in pure cultures and seeded waters from the Gulf of Mexico. *Applied and Environmental Microbiology*, 69: 1194-2200.
138. Nasu, H., T. Iida, T. Sugahara, Y. Yamaichi, K. S. Park, K. Yokoyama, K. Makino, H. Shinagawa, and T. Honda. 2000. A filamentous phage associated with recent pandemic *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 strains. *J. Clin. Microbiol.* 38:2156–2161.
139. Nishibuchi. M.. and Kaper. J.B. (1995). Thermostable direct hemolysin gene of *Vibrio parahaemolyticus* : A virulence gene acquired by a marine bacterium. *Infection and Immunity*, 63:2093-2099.;
140. Nishio, T. 1967. Ecological studies on *Vibrio parahaemolyticus*.3. Comparison of K antigen type and hemolytic activity between cultures isolated from human patients and from sea water. *Jap. J. Bacteriol.* 22:446-447.
141. Noble, R. T., and J. A. Fuhrman. 1998. Use of SYBR Green I for rapid epifluorescence counts of marine viruses and bacteria. *Aquatic Microb. Ecol.* 14:113-118.
142. Ohnishi, T., and K. Nozu. 1986. Induction of phage-like particles from a pathogenic strain of *Vibrio parahaemolyticus* by mitomycin C. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 141:1249–1253.

143. Okuda J, Ishibashi M, Hayakawa E, Nishino T, Takeda Y, Mukhopadhyay AK, Garg S, Bhattacharya SK, Nair GB, Nishibuchi M. Emergence of a unique O3:K6 clone of *Vibrio parahaemolyticus* in Calcutta, India, and isolation of strains from the same clonal group from Southeast Asian travelers arriving in Japan. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 3150–3155.
144. Okura, M., Osawa, R., Iguchi, A., Arakawa, E., Terajima, J., and Watanabe, H. (2003). Genotypic analyses of *Vibrio parahaemolyticus* and development of a pandemic group specific multiplex PCR assay. *Journal of Clinical Microbiology*, 41: 4676-4682
145. Oliver, J.D. 2000. The public health significance of viable but nonculturable bacteria, p. 277-299. In R.R. Colwell and D.J.Grimes (eds.), *Nonculturable Microorganisms in the Environment*. American Society for Microbiology Press, Washington, D.C.
146. Omori, G., M. Iwao, S. Iida, and K. Kuroda. 1966. Studies on K antigen of *Vibrio parahaemolyticus*. I. Isolation and purification of K antigen from *Vibrio parahaemolyticus* A55 and some of its biological properties. *Biken J.* 9:33-43.
147. Osawa, R., T. Okitsu, H. Morozumi, and S. Yamai. 1996. Occurrence of urease-positive *Vibrio parahaemolyticus* in Kanagawa, Japan, with specific reference to presence of thermostable direct hemolysin (TDH) and the TDH-related-hemolysin genes. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:725–727.
148. Ottemann, K.M., and Miller, J.F. 1997. Roles for motility in bacterial-host interactions. *Mol. Microbiol.* 24: 1109-1117.
149. Paranjpye R. N., Myers M. S., Yount E. C., Thompson J. L., Zebrafish as a model for *Vibrio parahaemolyticus* virulence, *Microbiology*, 2013, 159, Pt\_12, 2605
150. Paul and Sullivan, 2005, Marine phage genomics, *Current Opinion in Biotechnology*, 16:299–307
151. Petsko, Gregory; Ringe, Dagmar (2009). *Protein Structure and Function*. Oxford: Oxford University Press. pp. 78–79.
152. Pollitzer 1959. History of the disease, pp.11-50. In R. Pollitzer,(ed.), *Cholera World Health Organization*, Geneva, Switzerland.
153. Proctor, L. M., A. Okubo, and J. A. Fuhrman. 1993. Calibrating estimates of phage-induced mortality in marine bacteria: Ultrastructural studies of marine bacteriophage development from one-step growth experiments. *Microb. Ecol.* 25:161-182.
154. Proctor, L. M., and J. A. Fuhrman. 1990. Viral mortality of marine bacteria and cyanobacteria. *Nature* 343:60-62.
155. Raimondi F., Kao J. P., Fiorentini C., Fabbri A., Donelli G., Gasparini N., et al. (2000). Enterotoxicity and cytotoxicity of *Vibrio parahaemolyticus* thermostable direct hemolysin in *in vitro* systems. *Infect. Immun.* 68, 3180–3185.

156. Reali, D., Caroli, G., Filippi, S., Simonetti, S. (1977). Isolation of halophilic vibrios as possible agents of food poisoning, *Allergy and Immunology Communicable Diseases*, 19:455-463.
157. Sakazaki, R. 1965. *Vibrio parahaemolyticus* a non-cholera enteropathogenic vibrio. In Proceedings of the cholera research symposium. U.S. Dept. of Health, Education, and Welfare, Washington, D.C.
158. Sakazaki, R., S. Iwanami, and K. Tamura. 1968. Studies on the enteropathogenic, facultatively halophilic bacteria, *Vibrio parahaemolyticus*. I. Serological characteristics. *Jap. J. Med. Sci. Biol.* 21:313-324.
159. Shime-Hattori, A., Iida, T., Arita, M., Park, K. S., Kodama, T. & Honda, T. (2006). Two type IV pili of *Vibrio parahaemolyticus* play different roles in biofilm formation. *FEMS Microbiol Lett* 264, 89–97.
160. Shimouchi, H. 1968. Studies on new serological types of *Vibrio parahaemolyticus*. 2. New K-antigens of new O group strains. *Bull. Pub. Health Inst. Hyogo Pref.* 3:7- 11.
161. Shimouchi, H. 1968. *Vibrio parahaemolyticus*. 3. New K antigens of O-3, O-4, O-8, and O-9 strains. *Bull. Publ. Health Inst. Hyogo Pref.* 3:12-16.
162. Sulakvelidze A. 2005. Phage therapy: an attractive option for dealing with antibiotic-resistant bacterial infections *Drug Discov. Today* 10:807-9.
163. Sulakvelidze A, Alavidze Z, Morris JG, Jr. 2001. Bacteriophage therapy *Antimicrob. Agents Chemother.* 45:649-59.
164. Suthieukul, O., Ishibashi, M., Iida, T., Nettip, N., Supavej, S., Eampokalap, B., Makino, M., and Honda, T. (1995). Urease production correlates with possession of *trh*'-gene in *Vibrio parahaemolyticus* strains isolated from Thailand. *Journal of Infectious Diseases*, 172: 1405- 1408.
165. Takikawa, L. 1958. Studies on pathogenic halophilic bacteria. *Yokohama Med. Bull.* 2:313-322.
166. Thompson FL, Iida T, Swings J. Biodiversity of vibrios. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2004; 68: 403-31.
167. Turner JW, Paranjpye RN, Landis ED, et al. Population structure of clinical and environmental *Vibrio parahaemolyticus* from the Pacific Northwest coast of the United States. *PLoS One* 2013;8:726-736.
168. Twedt R.M., et al, 1972 Antigenic Relationships Among Strains of *Vibrio parahaemolyticus* *Applied Microbiology*, p.966-971.
169. Twedt, R. M., P. L. Spaulding, and H. E. Hall. 1969. Morphological, cultural, biochemical, and serological comparison of Japanese strains of *Vibrio parahaemolyticus* with related cultures isolated in the United States. *J. Bacteriol.* 98:511-518.

170. Vasconcelos G.J., Stang, W.I., and Laidlaw, R.H. (1975). Isolation of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio alginolyticus* from estuarine areas of southeastern Alaska. *Applied Microbiology*, 29: 557-559.
171. Vuddhakul, V., Chowdhury, A., Loahaprertthisan, V., Pungrasamee, P., Patararungrong, N., Thianmontri, P., Ishibashi, M., Matsumoto, C. & Nishibuchi, M., 2000., Isolation of a pandemic O3:K6 clone of a *Vibrio parahaemolyticus* strain from environmental and clinical sources in Thailand. *Appl Environ Microbiol* 66, 2685–2689.
172. Whitehouse C. A, Rangarajan Sampath C.B., Lawrence B. B., Melton R, Li F., Hall T. A, Matthews V.H., Tediashvili M., , Jaiani E., Kokashvili T., Janelidze N., Grim C., Colwell R.R., Huq A.; Identification of Pathogenic *Vibrio* Species by Multilocus PCR-Electrospray Ionization Mass Spectrometry and Its Application to Aquatic Environments of the Former Soviet Republic of Georgia ; *Appl Environ Microbiol*. 2010; 76-86.
173. Wommack E.K., Colwell R.R., 2000, Virioplankton: Viruses in Aquatic Ecosystems *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, Vol. 64, No. 1 pp. 69–114.
174. Wong, H. C., S. H. Liu, T. K. Wang, C. L. Lee, C. S. Chiou, D. P. Liu, M. Nishibuchi, and B. K. Lee. 2000. Characteristics of *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 from Asia. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:3981–3986.
175. Xie, Z.Y., Hu. C.Q., Chen, C., Zhang, L.P. and Ren, CH. (2005) investigation of seven *Vibrio* virulence genes among *Vibrio alginolyticus* and *Vibrio parahaemolyticus* strains from the coastal mariculture systems in Guangdong, China. *Letters in Applied Microbiology*, 41:202-207.
176. Yamaichi Y, Iida T, Park KS, Yamamoto K, Honda T. Physical and genetic map of the genome of *Vibrio parahaemolyticus*: presence of two chromosomes in *Vibrio* species. *Mol Microbiol*. 1999(5):1513-21
177. Zen-Yoji H, Le Clair RA, Ota K, Montague TS. Comparison of *Vibrio parahaemolyticus* cultures isolated in the United States with those isolated in Japan. *J Infect Dis*. 1973 Mar;127(3):237–241.
178. <http://www.britannica.com/EBchecked/topic/450873/pepsin>

## პუბლიკაციები:

Haley, Kokashvili, Tskhvediani, Janelidze, Mitaishvili, Grim, Constantin de Magny, Chen, Taviani, Eliashvili, Tediashvili, Whitehouse, Colwell, Huq, "Molecular Diversity and Predictability of *Vibrio parahaemolyticus* along the Georgian coastal zone of the Black Sea", 2014, *Frontiers in Microbiology, Aquatic Microbiology*, Volume 5, Article 45, 1-9.

Tskhvediani A., Khukhunashvili T., Eliashvili T., Tsertsvadze G., Gachechiladze N., Tediashvili M., "The possible use of *V. parahaemolyticus* –specific bacteriophages for prevention and therapy of infections caused by *V. parahaemolyticus*", 2014, *Georgian Medical News*, No 6 (231), pp. 82-88.

N. Janelidze, E. Jaiani, N. Lashkhi, A. Tskhvediani, T. Kokashvili, T. Gvarishvili, D. Jgenti, E. Mikashavidze, R. Diasamidze, S. Narodny, R. Obiso, C.A. Whitehouse, A. Huq, M. Tediashvili "Microbial water quality of the Georgian coastal zone of the Black Sea" 2011, *Mar. Pollut. Bull.*, vol. 62, pp. 573-580.

A. Tskhvediani, T. Kokashvili, N. Janelidze, N. Lashkhi, T. Khukhunashvili, T. Eliashvili, G. Tsertsvadze, M. Tediashvili. Tbilisi, 2010. "*V. parahaemolyticus*-specific phages in relation to bacterial host ecology and diversity". *Georgia Chemical Journal*, V.10, N4 (special issue „The main ecological problems of modernity and Caucasus“), pp. 123-125.



## საკონფერენციო მოხსენებები:

2014- Diversity of bacteriophages specific to *Vibrio parahaemolyticus* (Poster Presentation), ASM general meeting 2014, Boston, USA

2011- *V.parahaemolyticus* Bacteriophages- Characterisation and Biodiversity, VII international scientific conference for students and PhD students "Youth and Progress of Biology", Ivan Franko National University of Lviv

2010- *V.parahaemolyticus* bacteriophages: Relationship to Bacterial Ecology and Diversity, «Viruses of Microbes», Pasteur Institute, Paris, France