

DOI: 10.21055/0370-1069-2025-3-140-146

УДК 616.932:579

М.П. Погожова<sup>1</sup>, С.О. Водопьянов<sup>1</sup>, А.С. Водопьянов<sup>1</sup>, А.В. Тюрина<sup>1</sup>, Ю.В. Сизова<sup>1</sup>, Н.Е. Гаевская<sup>1</sup>,  
Э.Р. Зулкарнеев<sup>2</sup>, И.А. Иванова<sup>1</sup>

## Разработка способа детекции жизнеспособных холерных вибрионов путем определения нарастания титра специфического бактериофага с помощью ПЦР-РВ

<sup>1</sup>ФКУЗ «Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт», Ростов-на-Дону, Российская Федерация;

<sup>2</sup>ФБУН «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского», Москва, Российская Федерация

**Цель** – разработка непрямого метода определения жизнеспособных холерных вибрионов путем оценки нарастания титра специфического бактериофага, детектируемого в ПЦР-РВ. **Материалы и методы.** Для исследования взят холерный бактериофаг Rostov M3 (миовирус класса *Caudoviricetes*; GenBank: MN379460.1-MN379463.1). Изучение биологических свойств фага проводили общепринятыми методами с небольшими модификациями. Праймеры для амплификации фага сконструированы с помощью <https://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0>. Культивирование проб, содержащих жизнеспособные и нежизнеспособные *Vibrio cholerae*, с бактериофагом осуществляли в 1 % пептонной воде в течение времени  $T_0$  и  $T_n$ . Результат ПЦР выражали в числе фаговых частиц на 1 мл образца или величиной  $C_p$ . **Результаты и обсуждение.** Бактериофаг Rostov M3 имеет высокую скорость адсорбции и урожайность, а также обладает широким спектром литической активности в отношении *V. cholerae* O1 Classical и El Tor. В процессе накопления частиц фага Rostov M3 фиксировали снижение величины  $C_p$  при инкубировании пробы не менее двух часов. В этом случае делается заключение о присутствии в пробе жизнеспособных холерных вибрионов. Используя данный метод, можно выявить бактериальные клетки, находящиеся в живом, но некультивируемом состоянии, так как фаги способны к размножению в клетках этого фенотипа. Применение метода на инактивированных культурах (негативный контроль) *V. cholerae* не показало нарастания количества частиц фага относительно нулевой точки, что позволяет сделать вывод об отсутствии в образце жизнеспособных клеток. Авторами предложен метод, который позволяет установить разницу в уровнях накопления фаговых частиц при исследовании проб, содержащих живые и неживые бактерии *V. cholerae* O1, в контакте с бактериофагом Rostov M3 в течение определенного времени  $T_0$  и  $T_n$ . Разработанная методика позволяет расширить возможности косвенного обнаружения жизнеспособных *V. cholerae* O1 Classical и El Tor в зараженных объектах.

**Ключевые слова:** бактериофаг, жизнеспособность, холерный вибрион, ПЦР-РВ.

Корреспондирующий автор: Погожова Марина Павловна, e-mail: [pogozhova\\_mp@antiplague.ru](mailto:pogozhova_mp@antiplague.ru).

Для цитирования: Погожова М.П., Водопьянов С.О., Водопьянов А.С., Тюрина А.В., Сизова Ю.В., Гаевская Н.Е., Зулкарнеев Э.Р., Иванова И.А. Разработка способа детекции жизнеспособных холерных вибрионов путем определения нарастания титра специфического бактериофага с помощью ПЦР-РВ. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2025; 3:140–146. DOI: 10.21055/0370-1069-2025-3-140-146

Поступила 22.11.2024. Отправлена на доработку 28.11.2024. Принята к публикации 27.01.2025.

M.P. Pogozhova<sup>1</sup>, S.O. Vodop'yanov<sup>1</sup>, A.S. Vodop'yanov<sup>1</sup>, A.V. Tyurina<sup>1</sup>, Yu.V. Sizova<sup>1</sup>,  
N.E. Gaevskaya<sup>1</sup>, E.R. Zul'karneev<sup>2</sup>, I.A. Ivanova<sup>1</sup>

## Development of a Method for Detecting Viable Cholera Vibrios by Determining the Increase in the Titer of a Specific Bacteriophage Using RT-PCR

<sup>1</sup>Rostov-on-Don Research Anti-Plague Institute, Rostov-on-Don, Russian Federation;

<sup>2</sup>G.N. Gabrichevsky Moscow Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation

**Abstract.** The aim of the work was to develop an indirect method for identifying viable cholera vibrios by evaluating the titer increase of a specific bacteriophage detected in RT-PCR. **Materials and methods.** The cholera bacteriophage Rostov M3 was used for the study (myovirus class *Caudoviricetes*; GenBank: MN379460.1-MN379463.1). The study of biological properties was carried out using conventional methods with minor modifications. Primers for phage amplification were designed using <https://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0>. Cultivation of samples containing viable and non-viable *Vibrio cholerae* with bacteriophage was carried out in 1 % peptone water for times  $T_0$  and  $T_n$ . The PCR result was expressed as the number of phage particles per ml of sample or as the  $C_p$  value. **Results and discussion.** Bacteriophage Rostov M3 has a high adsorption rate and yield, and also has a broad spectrum of lytic activity against *V. cholerae* O1 Classical and El Tor. During the accumulation of Rostov M3 phage particles, a decrease in the  $C_p$  value was recorded when the sample was incubated for at least two hours. In this case, a conclusion is made about the presence of viable *V. cholerae* in the sample. Using this method, it is possible to identify bacterial cells that are in a living but non-culturable state, since phages retain the ability to reproduce in this cell phenotype. The application of the proposed method to inactivated cultures (negative control) of *V. cholerae* did not show an increase in the number of phage particles relative to the zero point, therefore a conclusion is made about the absence of viable cells in the sample. The authors put forward the method that allows one to establish the difference in the levels of accumulation of phage particles when studying samples containing live and non-live *V. cholera* O1 bacteria in contact with the Rostov M3 bacteriophage for a certain period of time  $T_0$  and  $T_n$ . The developed method allows for expanding the possibilities of indirect detection of viable *V. cholerae* O1 Classical and El Tor in potentially contaminated objects.

**Key words:** Vibrio phage, viability, *Vibrio cholerae*, real-time PCR.

**Conflict of interest:** The authors declare no conflict of interest.

**Funding:** The authors declare no additional financial support for this study.

**Corresponding author:** Marina P. Pogozhova, e-mail: pogozhova\_mp@antiplague.ru.

**Citation:** Pogozhova M.P., Vodop'yanov S.O., Vodop'yanov A.S., Tyurina A.V., Sizova Yu.V., Gaevskaya N.E., Zul'karneev E.R., Ivanova I.A. Development of a Method for Detecting Viable Cholera Vibrios by Determining the Increase in the Titer of a Specific Bacteriophage Using RT-PCR. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii* [Problems of Particularly Dangerous Infections]. 2025; 3:140–146. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2025-3-140-146

Received 22.11.2024. Revised 28.11.2024. Accepted 27.01.2025.

Pogozhova M.P., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9779-3577>  
Vodop'yanov S.O., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4336-0439>  
Vodop'yanov A.S., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9056-3231>  
Tyurina A.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9359-3997>

Sizova Yu.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7831-7767>  
Gaevskaya N.E., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0762-3628>  
Zul'karneev E.R., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5920-8098>  
Ivanova I.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7068-4071>

Возбудитель холеры – граммотрицательная бактерия *Vibrio cholerae*, являясь факультативным патогеном, обитает во многих прибрежных и эстуарных экосистемах, вызывая пандемии. Холерные штаммы O1-серогруппы биотипа Classical стали причиной первых шести пандемий, а биотип El Tor является этиологическим агентом седьмой пандемии [1–4].

Стандартные микробиологические методы исследования образцов на наличие жизнеспособных бактерий основаны на визуально наблюдаемом росте и делении клеток, то есть жизнеспособность приравнивается к культивируемости [5]. Однако некоторые бактериальные патогены, включая *V. cholerae*, иногда теряют способность к росту, приобретая фенотип «жизнеспособного, но некультивируемого» состояния (VBNC) [6, 7]. Параллельно с бактериологическим методом при лабораторной диагностике холеры согласно МУК 4.2.3745-22 применяется экспресс-метод полимеразной цепной реакции (ПЦР), но операторы часто сталкиваются с проблемой ложноположительных результатов, когда обнаруживается нуклеиновая кислота возбудителя, но при этом отсутствует рост на питательных средах после этапов обогащения образца. Подтвердить жизнеспособность клеток и ускорить выдачу результата можно, используя метод, комбинирующий компонент бактериологической диагностики и молекулярно-генетическую детекцию частиц специфического фага с помощью ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ). Выбор такого подхода обоснован возможностью установить разницу в уровнях накопления продуктов амплификации размножающегося бактериофага при исследовании обогащаемых проб, содержащих живые и неживые бактерии.

**Цель** – разработка непрямого метода определения жизнеспособных холерных вибрионов путем оценки нарастания титра специфического бактериофага, детектируемого в ПЦР-РВ.

## Материалы и методы

**Индикаторный штамм *V. cholerae*, питательные среды, условия культивирования.** В работе в качестве индикаторного использовали штамм № 1391 *V. cholerae* O1 Classical Inaba (*ctx*<sup>+</sup>, *tcp*<sup>+</sup>) из коллекции ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора. Культуру засеивали штрихами на 1,5 % агар Мартена, pH 7,6–7,8, затем единичные колонии пересевали в бульон Мартена.

Бульонную культуру инкубировали до середины логарифмической фазы роста OD<sub>600</sub>=0,3 при 37 °C, при этом концентрация бактерий достигала около 10<sup>6</sup> клеток/мл. Контроль количества клеток во взвеси осуществляли путем высева методом Коха.

**Подготовка бактериофага.** В исследование взят холерный бактериофаг Rostov M3 (миовирус класса *Caudoviricetes*; GenBank: MN379460.1–MN379463.1) из коллекции-депозитария лаборатории бактериофагов ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора.

Для приготовления стоков бактериофага использовали метод твердой агаровой среды с небольшими модификациями согласно МР 4.2.02.63-21 [8]. 18-часовую бульонную культуру штамма-хозяина наносили поверх твердого 1,5 % агара Мартена двуслойным методом. После полного застывания второго слоя 0,7 % агара Мартена с культурой наносили Rostov M3 в количестве 0,1 мл, раскатывая по поверхности чашки Петри. Инкубацию проводили в течение 18–24 часов при 37 °C. Зоны лизиса с размноженным бактериофагом снимали стерильным скальпелем и помещали в пробирки с 5–10 мл 0,9 % раствора NaCl. Для инактивации *V. cholerae* добавляли хлороформ в соотношении 1:10 и выдерживали 30 мин при температуре 4 °C. Для освобождения бактериофагов от клеточного дербиса использовали центрифугирование при 6000 об/мин в течение 30 мин (Supra R22, Hanil, Южная Корея). Супернатант собирали и фильтровали через мембрану из полиэфирсульфона 0,22 мкм (ALWSCI Technologies, Китай). Полученные бактериофаги титровали по методу двойных агаровых слоев [9] и хранили при температуре 4 °C. Обычно очищенный бактериофаг содержит титр не менее 10<sup>8</sup> БОЕ/мл.

**Оценка спектра литической активности и специфичности фага.** Диапазон литической активности бактериофага был определен с помощью 100 бактериальных штаммов *V. cholerae* O1, из которых 50 принадлежали биовару Classical и 50 – биовару El Tor, включающих как токсигенные, так и нетоксигенные варианты. Для подтверждения специфичности фага использовали микроорганизмы семейства *Vibrionaceae* (39 штаммов, включающие виды *V. cholerae* nonO1/nonO139, *V. methchnikovii*, *V. parahaemolyticus*, *V. mimicus*, *V. alginolyticus*) и порядка *Enterobacterales* (44 штамма, включающие виды *Shigella dysenteriae*, *Salmonella typhi*, *Salmonella paratyphi*, *Escherichia coli*, *Yersinia enterocolitica*,

*Yersinia pseudotuberculosis*, *Salmonella enteritidis*). Круг хозяев определяли с помощью прямого нанесения бактериофага методом спот-теста. 10 мкл исследуемого фаголизата с титром  $10^8$  БОЕ/мл наносили на чашки Петри с 1,5 % агаром Мартена, которые содержали 200 мкл культуры *V. cholerae*. Затем чашки инкубировали в течение 18–24 часов при 37 °С. Литическую активность оценивали визуально по появлению зоны лизиса в точках нанесения бактериофага. Контроль жизнеспособности бактерий холерного вибриона проводили путем посева на 1,5 % агар Мартена.

**Скорость адсорбции и латентный период бактериофага.** Исследование адсорбции Rostov M3 проводили при помощи определения количества неадсорбированного фага. Экспоненциально растущие бактериальные клетки смешивали с бактериофагом (MOI=0,01) и инкубировали при 37 °С. Через определенные промежутки времени (0, 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20 мин) отбирали по 100 мкл и смешивали с 850 мкл охлажденного SM-буфера для более быстрого прекращения процесса адсорбции и 50 мкл хлороформа. Затем образцы центрифугировали при 5000 g в течение 5 мин при 4 °С. Титр фага в нулевой момент времени определен как 100 %.

Латентный период и урожайность Rostov M3 определяли путем динамических изменений количества фаговых частиц в течение репликативного цикла на штамме *V. cholerae* № 1391. 5 мл бактериальных клеток инкубировали 3 часа при 37 °С до середины экспоненциальной стадии роста (OD<sub>600</sub>=0,3), далее 5 мл полученной жидкой бактериальной культуры центрифугировали 5 мин при 4 °С, 7000 g. Осадок ресуспендировали в 4,5 мл бульона Мартена и смешивали с бактериофагом так, что MOI составляло 0,01. Фагам давали возможность адсорбироваться в течение 5 мин при 37 °С, а затем смесь центрифугировали при 12000 об/мин в течение 2 мин для удаления неадсорбированных фагов. Затем осадок ресуспендировали в 10 мл бульона Мартена и инкубировали при 37 °С. Образцы по 100 мкл собирали с 10-минутными интервалами в течение 80 мин в эппендорфы с 850 мкл SM-буфера и 50 мкл хлороформа, далее проверяли титр фага.

**Выделение ДНК** осуществляли комплектом реагентов «РИБО-преп» в соответствии с инструкцией производителя «АмплиСенс®» РУ № ФСР 2008/03147.

**Детекция ДНК фага в присутствии жизнеспособных и инактивированных *V. cholerae*.** В три пробирки по 10 мл 1 % пептонной воды добавляли 0,2 мл 3-часовой культуры *V. cholerae*. Затем отбирали 100 мкл в стерильный эппендорф, данная проба служила отрицательным контролем (K<sup>-</sup>).

Далее проводили культивирование проб с бактериофагом, добавляя в каждую пробирку по 0,2 мл Rostov M3 в титре  $10^2$  БОЕ/мл, после тщательного перемешивания отбирали 100 мкл в эппендорф для последующего выделения ДНК, пробу считали нуле-

вой точкой (T<sub>0</sub>). Пробирки помещали в термостат при температуре 37 °С при перемешивании 120 об/мин и отбирали пробы по 100 мкл через 1 час (T<sub>1</sub>), 2 часа (T<sub>2</sub>), 3 часа (T<sub>3</sub>). Из каждой пробы выделяли ДНК, как описано выше, и хранили при температуре (2±2) °С до постановки ПЦР. В качестве положительного контроля (K<sup>+</sup>) выделяли ДНК из стокового бактериофага Rostov M3 в титре  $10^8$  БОЕ/мл.

Перед проведением количественной ПЦР и построением калибровочной кривой были подготовлены стандарты фаговой ДНК в титре от  $10^4$  до  $10^6$  БОЕ/мл, которые использовали при детектировании накопления целевой ДНК. Результат ПЦР выражали в числе фаговых частиц на 1 мл образца или величиной Ср. Значения цикла (Cp), полученные после каждой временной точки, сравнивали с T<sub>0</sub>, так что снижение Cp было связано с увеличением копий ДНК бактериофагов, обусловленным их репликацией в жизнеспособных бактериях после заражения.

Для сравнения результатов дополнительно брали три пробирки с 10 мл 1 % пептонной воды, добавляли 0,2 мл 3-часовой инактивированной культуры (прогретой 1 час при 65 °С) и 0,2 мл фага Rostov M3 в титре  $10^2$  БОЕ/мл. Этапы инкубации, отбора проб и временные интервалы аналогичны описанным выше для жизнеспособной культуры.

**Статистическую обработку результатов** проводили в программах BioStat 2009 (AnalystSoft, Inc., США) и Microsoft Excel 2016. Результаты представлялись как средний титр бактериофага (среднее значение из трех повторов и стандартное отклонение, M±Sd). Размер выхода фаговых частиц из клетки (урожайность) рассчитывался как отношение среднего максимального количества высвободившихся частиц в конце размножения к среднему значению фаговых частиц во время латентного периода. Оценку нормальности распределения проводили с помощью теста Шапиро – Уилка для малых выборок. Достоверность различий определяли с помощью t-критерия Стьюдента для независимых наблюдений. Уровень p<0,05 оценивался как значимый.

## Результаты и обсуждение

Результаты показали, что скорость адсорбции фага Rostov M3 является высокой: 98 % фаговых частиц адсорбировались в течение первых 5 мин после контакта с бактериями штамма *V. cholerae* № 1391. Это свидетельствует о том, что Rostov M3 эффективно прикрепляется к клеткам-хозяевам и способен быстро начать процесс инфицирования (рис. 1).

Жизненный цикл бактериофага, включающий латентный период, урожайность и фазу плато, определяли количественно с использованием одноступенчатой кривой роста (рис. 2).

Как видно из рис. 2, латентный период для Rostov M3 составил в среднем 40–50 мин. Это означает, что после адсорбции на штамме-хозяине фаги проходят через фазу затмения (eclipse), прежде чем

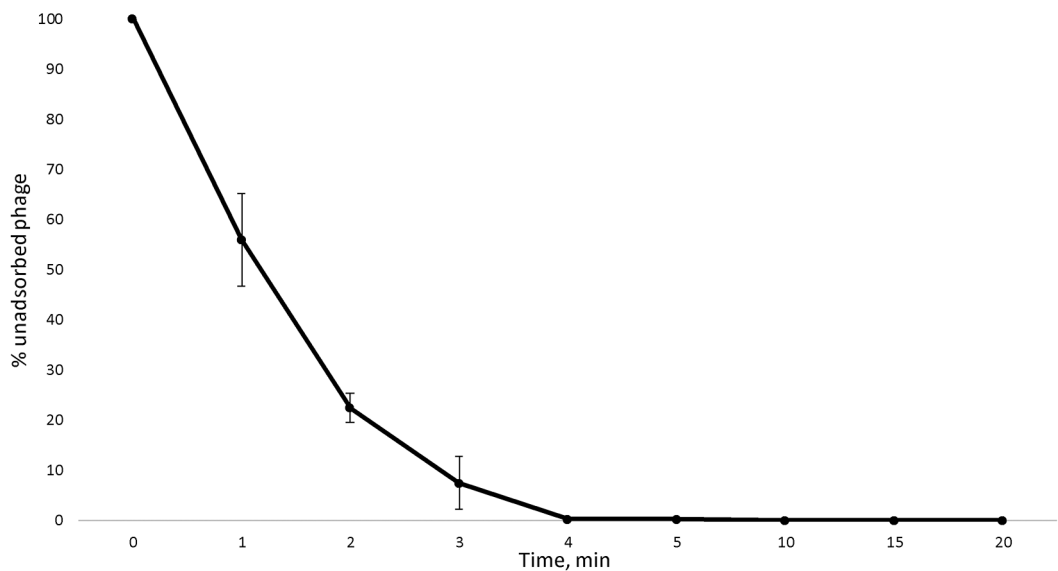


Рис. 1. Скорость адсорбции бактериофага Rostov M3 на штамме *V. cholerae* (n=3, M±Sd)

Fig. 1. Adsorption rate of bacteriophage Rostov M3 on *V. cholerae* strain (n=3, M±Sd)

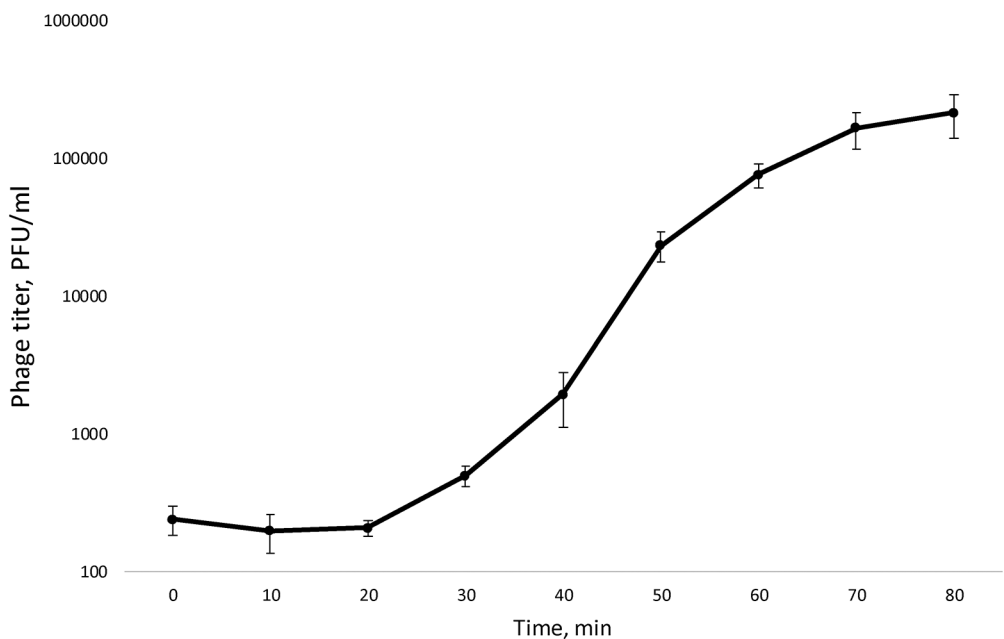


Рис. 2. График размножения бактериофага Rostov M3 на штамме *V. cholerae* (n=3, M±Sd)

Fig. 2. Reproduction curve of bacteriophage Rostov M3 on *V. cholerae* strain (n=3, M±Sd)

начинают активно размножаться. Среднее количество высвобождающихся фагов из одной хозяйской клетки (урожайность) составило 96 вирусных частиц в течение латентного периода. Это свидетельствует о том, что фаги эффективно растут и быстро размножаются после адсорбции, в отличие от бактериофага vB\_vcM\_KuJa с латентным периодом в 40–60 мин и урожайностью 30 вирусных частиц [10]. Полученные данные указывают на то, что Rostov M3 способен быстро распространяться среди клеток-хозяев. Эти результаты имеют важное значение для понимания динамики развития бактериофага и используются

для разработки новых методов диагностики инфекционных заболеваний, вызываемых бактериями. Производственно-перспективными бактериофагами как инструментом детекции бактериальных патогенов считаются фаги с широким спектром литической активности. Таковым является фаг Rostov M3, лизирующий *V. cholerae* O1-серогруппы двух биоваров (El Tor и Classical) в диапазоне от 44 до 82 %. При проверке специфичности фага другие микроорганизмы семейства *Vibrionaceae* и порядка *Enterobacteriales* оказались нечувствительны к нему.

**Подбор праймеров и зонда для детекции ДНК бактериофага в ПЦР-РВ.** Праймеры для амплификации уникальных последовательностей бактериофага Rostov M3 сконструированы с помощью комплекса программного обеспечения <https://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0> [11, 12] и синтезированы в ООО «Евроген» (Россия). Для подтверждения специфичности подобранных праймеров использовали ранее выделенные препараты ДНК бактериофагов различного рода и видов: 1 – *Y. enterocolytica*; 2 – *Y. pseudotuberculosis*; 3 – *V. metschnikovii*; 4 – *V. mimicus*; 5 – *V. parahaemolyticus*; 6, 7 – *V. cholerae* (рис. 3).

Сконструированная система из праймеров специфична для Rostov M3, поскольку при электрофорезе с другими образцами фагов были получены отрицательные результаты. ПЦР-РВ проводилась с использованием прямого PhaP\_F (5'-СТСТТТААСГГГГСГТСАГТС-3') и обратного PhaP\_R (5'-СТТГСТГАТАТЦГАСГСТСА-3') праймеров, а также зонда PhaP\_Z ([HEX]: TCGGACACATCGGTCCAGTGTAACA [BHQ1]), меченного флюорофором HEX и гасителем флюоресценции BHQ1. Смесь для проведения ПЦР объемом 25 мкл содержала: 2,5 мкл буфера, 1 Ед Taq ДНК-полимеразы, 0,2 мкМ смеси дНТФ (ООО «Евроген», Россия), 1,0 мкМ каждого из праймеров PhaP\_F,

PhaP\_R и 0,5 мкМ зонда PhaP\_Z, 5 мкл ДНК матрицы, оставшийся объем – вода. Амплификацию проводили с использованием прибора DTlite5 («ДНК-технология», Россия) по программе: денатурация 2 мин при 94 °С (1 цикл); затем 35 циклов: денатурация 8 с при 94 °С, отжиг и учет по каналу HEX 12 с при 60 °С.

**Метод определения жизнеспособных клеток *V. cholerae* с помощью фага в ПЦР-РВ.** Фаги в условиях окружающей среды способны эффективно инфицировать бактерию-мишень в присутствии конкурирующей микрофлоры. Это делает их перспективным инструментом при мониторинге объектов окружающей среды. Из данных, представленных в таблице, можно сделать вывод о том, что наблюдается увеличение количества частиц бактериофага, которое оценивается по уменьшению значения Ср, после одного (лизис 1 час) и двух (лизис 2 часа) часов инкубации на индикаторной культуре *V. cholerae*. После 3 часов инкубации (лизис 3 часа) показатель выходит на плато. Показатель кривых Ср увеличивается на 3 единицы после 2 часов инкубации, а количественная оценка фаговых частиц методом ПЦР-РВ в 100 раз – от 29 300 до 289 000 БОЕ/мл. В этом случае делается заключение о присутствии в пробе жизнеспособных холерных вибрионов O1-серогруппы биоваров Classical и El Tor.

Используя данный метод обнаружения *V. cholerae*, можно выявить даже бактериальные клетки, находящиеся в живом, но некультивируемом состоянии, так как фаги сохраняют способность к размножению в них [13, 14]. Однако латентный период бактериофага заметно увеличивается, что приведет к увеличению времени репликации вируса. Поэтому при латентном периоде бактериофага Rostov M3, равном 40 мин, точка учета результата будет оптимальной по истечении 2-часовой инкубации.

**Подтверждение нежизнеспособности клеток *V. cholerae* с помощью фага в ПЦР-РВ.** Заявленный метод применен на нежизнеспособных *V. cholerae* Classical (3 штамма) и El Tor (3 штамма). При помощи тест-системы «АмплиСенс® *Vibrio cholerae*-FL» в ПЦР-РВ обнаружена ДНК инактивированных клеток холерного вибриона, полученная путем прогревания образцов при 65 °С в течение 1 часа.

На прогретых (нежизнеспособных) культурах *V. cholerae* не наблюдалось нарастания количества частиц фага после 2 часов инкубирования при 37 °С относительно нулевой точки, поэтому формулируется вывод об отсутствии в образце жизнеспособных холерных вибрионов O1-серогруппы биоваров Classical и El Tor.

Таким образом, на основании изучения биологических свойств бактериофага Rostov M3 разработан специфический метод обнаружения жизнеспособных холерных вибрионов на основе детекции репликации фага в бактериях-мишенях с помощью ПЦР-РВ. Данная методика позволяет расширить возможности обнаружения жизнеспособных холер-

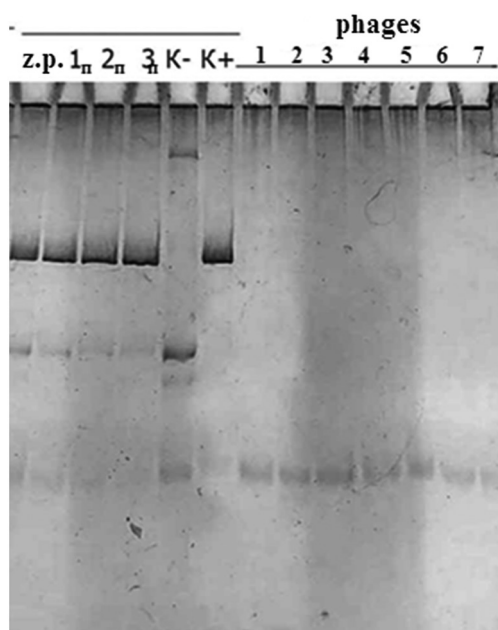


Рис. 3. Проверка специфичности праймеров в 1,5 % агарозном геле:

z.p. – нулевая точка; 1<sub>n</sub> – ДНК Rostov M3 с пробой через 1 час инкубирования; 2<sub>n</sub> – ДНК Rostov M3 с пробой через 2 часа инкубирования; 3<sub>n</sub> – ДНК Rostov M3 с пробой через 3 часа инкубирования; K<sup>-</sup> – 1 % пептонная вода + 0,2 мл индикаторной культуры; K<sup>+</sup> – ДНК Rostov M3 в титре 10<sup>2</sup> БОЕ/мл; 1–7 – препараты ДНК бактериофагов различного рода и видов

Fig. 3. Checking primer specificity in 1.5 % agarose gel:

z.p. – zero point; 1<sub>n</sub> – Rostov M3 DNA with sample after one hour of incubation; 2<sub>n</sub> – Rostov M3 DNA with sample after two hours of incubation; 3<sub>n</sub> – Rostov M3 DNA with sample after three hours of incubation; K<sup>-</sup> – 1 % peptone water + 0,2 ml indicator culture; K<sup>+</sup> – Rostov M3 DNA in titer 10<sup>2</sup> PFU/ml; 1–7 – DNA preparations of bacteriophages of various genus and species

Результат ПЦР-РВ с живой культурой *V. cholerae*  
Result of PCR-RT with viable culture of *V. cholerae*

| Наименование образца<br>Sample                                                                | Ср                                               | Число фаговых частиц (БОЕ/мл)<br>Number of phage particles (PFU/ml) |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------|
| Фар М3 – 10 <sup>4</sup> БОЕ/мл (стандарт)<br>Phage M3 – 10 <sup>4</sup> PFU/ml (standard)    | 21,3<br>(10 000 БОЕ/мл)<br>(10 000 PFU/ml)       | 10 000                                                              |
| Фар М3 – 10 <sup>5</sup> БОЕ/мл (стандарт)<br>Phage M3 – 10 <sup>5</sup> PFU/ml (standard)    | 19,4<br>(100 000 БОЕ/мл)<br>(100 000 PFU/ml)     | 100 000                                                             |
| Фар М3 – 10 <sup>6</sup> БОЕ/мл (стандарт)<br>Phage M3 – 10 <sup>6</sup> PFU/ml (standard)    | 17,2<br>(1 000 000 БОЕ/мл)<br>(1 000 000 PFU/ml) | 1 000 000                                                           |
| <i>V. cholerae</i> + фар Rostov M3 (0 часов)<br><i>V. cholerae</i> + Phage Rostov M3 (0 hour) | 20,7±1,1                                         | 29 300±1 700                                                        |
| <i>V. cholerae</i> + фар Rostov M3 (1 час)<br><i>V. cholerae</i> + Phage Rostov M3 (1 hour)   | 17,9±1,25                                        | 611 000±42 770                                                      |
| <i>V. cholerae</i> + фар Rostov M3 (2 часа)<br><i>V. cholerae</i> + Phage Rostov M3 (2 hours) | 16,5±0,3                                         | 2 890 000±57 800                                                    |
| <i>V. cholerae</i> + фар Rostov M3 (3 часа)<br><i>V. cholerae</i> + Phage Rostov M3 (3 hours) | 16,5±0,2                                         | 2 880 000±43 200                                                    |
| К <sup>-</sup>                                                                                | Отрицательно<br>Negative                         | Отрицательно<br>Negative                                            |
| К <sup>+</sup>                                                                                | 14,9±0,3                                         | 16 300 000±330 000                                                  |

ных вибрионов О1-серогруппы биоваров Classical и El Tor в потенциально зараженных объектах, что важно для своевременного выявления и предотвращения распространения холеры, а также для обеспечения безопасности водных объектов окружающей среды. Разработка защищена патентом № 2808577 (29.11.2023) «Способ обнаружения жизнеспособных холерных вибрионов О1 серогруппы биоваров Classical и El Tor в окружающей среде при помощи бактериофага М3 методом количественной ПЦР».

**Конфликт интересов.** Авторы подтверждают отсутствие конфликта финансовых/нефинансовых интересов, связанных с написанием статьи.

**Финансирование.** Авторы заявляют об отсутствии дополнительного финансирования при проведении данного исследования.

Список литературы

1. Nelson E.J., Harris J.B., Morris J.G. Jr, Calderwood S.B., Camilli A. Cholera transmission: the host, pathogen and bacteriophage dynamic. *Nat. Rev. Microbiol.* 2009; 7(10):693–702. DOI: 10.1038/nrmicro2204.

2. Santoriello F.J., Michel L., Unterweger D., Pukatzki S. Pandemic *Vibrio cholerae* shuts down site-specific recombination to retain an interbacterial defence mechanism. *Nat. Commun.* 2020; 11(1):6246. DOI: 10.1038/s41467-020-20012-7.

3. Weill F.X., Domman D., Njamkepo E., Tarr C., Rauzier J., Fawal N., Keddy K.H., Salje H., Moore S., Mukhopadhyay A.K., Bercion R., Luquero F.J., Ngandjio A., Dosso M., Monakhova E., Garin B., Bouchier C., Pazzani C., Mutreja A., Grunow R., Sidikou F., Bonte L., Breurec S., Damian M., Njanpop-Lafourcade B.M., Sapriel G., Page A.L., Hamze M., Henkens M., Chowdhury G., Mengel M., Koeck J.L., Fournier J.M., Dougan G., Grimont P.A.D., Parkhill J., Holt K.E., Piarroux R., Ramamurthy T., Quilici M.L., Thomson N.R. Genomic history of the seventh pandemic of cholera in Africa. *Science.* 2017; 358(6364):785–9. DOI: 10.1126/science.aad5901.

4. Domman D., Quilici M.L., Dorman M.J., Njamkepo E., Mutreja A., Mather A.E., Delgado G., Morales-Espinosa R., Grimont P.A.D., Lizárraga-Partida M.L., Bouchier C., Aanensen D.M., Kuri-

Morales P., Tarr C.L., Dougan G., Parkhill J., Campos J., Cravioto A., Weill F.X., Thomson N.R. Integrated view of *Vibrio cholerae* in the Americas. *Science.* 2017; 358(6364):789–93. DOI: 10.1126/science.aao2136.

5. Bogosian G., Bourneuf E.V. A matter of bacterial life and death. *EMBO Rep.* 2001; 2(9):770–4. DOI: 10.1093/embo-reports/kvel82.

6. Oliver J.D. Recent findings on the viable but nonculturable state in pathogenic bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 2010; 34(4):415–25. DOI: 10.1111/j.1574-6976.2009.00200.x.

7. Colwell R.R., Brayton P.R., Grimes D.J., Roszak D.B., Huq S.A., Palmer L.M. Viable but non-culturable *Vibrio cholerae* and related pathogens in the environment: implications for release of genetically engineered microorganisms. *Nature Biotech.* 1985; 3(9):817–20. DOI: 10.1038/nbt0985-817.

8. Габрилович И.М., редактор. Практическое пособие по бактериофагии. Минск: Вышэйш. школа; 1968. 179 с.

9. Kropinski A.M., Mazzocco A., Waddell T.E., Lingohr E., Johnson R.P. Enumeration of bacteriophages by double agar overlay plaque assay. *Methods Mol. Biol.* 2009; 501:69–76. DOI: 10.1007/978-1-60327-164-6\_7.

10. Maina A.N., Mwaura F.B., Wagacha J.M., Jumba M., Aziz R.K., Nour El-Din H.T. Phenotypic characterization of phage vB\_vcM\_Kuja. *J. Basic Microbiol.* 2023; 63(5):481–8. DOI: 10.1002/jobm.202200635.

11. Untergasser A., Cutcutache I., Koressaar T., Ye J., Faircloth B.C., Remm M., Rozen S.G. Primer3 – new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Res.* 2012; 40(15):e115. DOI: 10.1093/nar/gks596.

12. Koressaar T., Remm M. Enhancements and modifications of primer design program Primer3. *Bioinformatics.* 2007; 23(10):1289–91. DOI: 10.1093/bioinformatics/btm091.

13. Ben Said M., Masahiro O., Hassen A. Detection of viable but non cultivable *Escherichia coli* after UV irradiation using a lytic Qbeta phage. *Ann. Microbiol.* 2010; 60(1):121–7. DOI: 10.1007/s13213-010-0017-4.

14. Fernandes E., Martins V.C., Nóbrega C., Carvalho C.M., Cardoso F.A., Cardoso S., Dias J., Deng D., Kluskens L.D., Freitas P.P., Azeredo J. A bacteriophage detection tool for viability assessment of Salmonella cells. *Biosens. Bioelectron.* 2014; 52:239–46. DOI: 10.1016/j.bios.2013.08.053.

References

1. Nelson E.J., Harris J.B., Morris J.G. Jr, Calderwood S.B., Camilli A. Cholera transmission: the host, pathogen and bacteriophage dynamic. *Nat. Rev. Microbiol.* 2009; 7(10):693–702. DOI: 10.1038/nrmicro2204.

2. Santoriello F.J., Michel L., Unterweger D., Pukatzki S. Pandemic *Vibrio cholerae* shuts down site-specific recombination to retain an interbacterial defence mechanism. *Nat. Commun.* 2020; 11(1):6246. DOI: 10.1038/s41467-020-20012-7.
3. Weill F.X., Domman D., Njamkepo E., Tarr C., Rauzier J., Fawal N., Keddy K.H., Salje H., Moore S., Mukhopadhyay A.K., Bercion R., Luquero F.J., Ngandjio A., Dosso M., Monakhova E., Garin B., Bouchier C., Pazzani C., Mutreja A., Grunow R., Sidikou F., Bonte L., Breurec S., Damian M., Njanpop-Lafourcade B.M., Sapriel G., Page A.L., Hamze M., Henkens M., Chowdhury G., Mengel M., Koeck J.L., Fournier J.M., Dougan G., Grimont P.A.D., Parkhill J., Holt K.E., Piarroux R., Ramamurthy T., Quilici M.L., Thomson N.R. Genomic history of the seventh pandemic of cholera in Africa. *Science*. 2017; 358(6364):785–9. DOI: 10.1126/science.aad5901.
4. Domman D., Quilici M.L., Dorman M.J., Njamkepo E., Mutreja A., Mather A.E., Delgado G., Morales-Espinosa R., Grimont P.A.D., Lizárraga-Partida M.L., Bouchier C., Aanensen D.M., Kuri-Morales P., Tarr C.L., Dougan G., Parkhill J., Campos J., Cravioto A., Weill F.X., Thomson N.R. Integrated view of *Vibrio cholerae* in the Americas. *Science*. 2017; 358(6364):789–93. DOI: 10.1126/science.aao2136.
5. Bogosian G., Bourneuf E.V. A matter of bacterial life and death. *EMBO Rep.* 2001; 2(9):770–4. DOI: 10.1093/embo-reports/kve182.
6. Oliver J.D. Recent findings on the viable but nonculturable state in pathogenic bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 2010; 34(4):415–25. DOI: 10.1111/j.1574-6976.2009.00200.x.
7. Colwell R.R., Brayton P.R., Grimes D.J., Roszak D.B., Huq S.A., Palmer L.M. Viable but non-culturable *Vibrio cholerae* and related pathogens in the environment: implications for release of genetically engineered microorganisms. *Nature Biotech.* 1985; 3(9):817–20. DOI: 10.1038/nbt0985-817.
8. Gabrilovich I.M., editor. [Practice Guidelines to Bacteriophagy]. Minsk: “Higher School”; 1968. 179 p.
9. Kropinski A.M., Mazzocco A., Waddell T.E., Lingohr E., Johnson R.P. Enumeration of bacteriophages by double agar overlay plaque assay. *Methods Mol. Biol.* 2009; 501:69–76. DOI: 10.1007/978-1-60327-164-6\_7.
10. Maina A.N., Mwaura F.B., Wagacha J.M., Jumba M., Aziz R.K., Nour El-Din H.T. Phenotypic characterization of phage vB\_vcM\_Kuja. *J. Basic Microbiol.* 2023; 63(5):481–8. DOI: 10.1002/jobm.202200635.
11. Untergasser A., Cutcutache I., Koressaar T., Ye J., Faircloth B.C., Remm M., Rozen S.G. Primer3 – new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Res.* 2012; 40(15):e115. DOI: 10.1093/nar/gks596.
12. Koressaar T., Remm M. Enhancements and modifications of primer design program Primer3. *Bioinformatics*. 2007; 23(10):1289–91. DOI: 10.1093/bioinformatics/btm091.
13. Ben Said M., Masahiro O., Hassen A. Detection of viable but non cultivable *Escherichia coli* after UV irradiation using a lytic Qbeta phage. *Ann. Microbiol.* 2010; 60(1):121–7. DOI: 10.1007/s13213-010-0017-4.
14. Fernandes E., Martins V.C., Nóbrega C., Carvalho C.M., Cardoso F.A., Cardoso S., Dias J., Deng D., Kluskens L.D., Freitas P.P., Azeredo J. A bacteriophage detection tool for viability assessment of Salmonella cells. *Biosens. Bioelectron.* 2014; 52:239–46. DOI: 10.1016/j.bios.2013.08.053.

#### Authors:

Pogozhova M.P., Vodop'yanov S.O., Vodop'yanov A.S., Tyurina A.V., Sizova Yu.V., Gaevskaya N.E., Ivanova I.A. Rostov-on-Don Research Anti-Plague Institute. Russian Federation, 117/40, M. Gorkogo St., Rostov-on-Don, 344002, Russian Federation. E-mail: plague@aaanet.ru.

Zul'karneev E.R. G.N. Gabrichevsky Moscow Research Institute of Epidemiology and Microbiology. 10, Admiral Makarov St., Moscow, 125212, Russian Federation.

#### Об авторах:

Погожова М.П., Водопьянов С.О., Водопьянов А.С., Тюрина А.В., Сизова Ю.В., Гаевская Н.Е., Иванова И.А. Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт. Российская Федерация, 344002, Ростов-на-Дону, ул. М. Горького, 117/40. E-mail: plague@aaanet.ru.

Зулькарнеев Э.Р. Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского. Российская Федерация, 125212, Москва, ул. Адмирала Макарова, 10.