

sociated with an increased risk of pregnancy loss after IVF and ICSI: systematic review and metaanalysis. Hum. Reprod. 2008; 23: (12): 2663–8.

REFERENCES

1. Bozhedomov V. A., Vinogradov I. V., Lipatova N. A., Sporish E. A., Rokhlikov I. M. Violations of sperm chromatin structure: clinical significance, causes, diagnosis, treatment (review). Problemy reproduktsii. 2012; 5: 80–8. (in Russian)
2. Simon L., Lutton D., McManus J., Lewis S. E. Sperm DNA damage measured by the alkaline Comet assay as an independent predictor of male infertility and in vitro fertilization success. Fertil. Steril. 2011; 95: (2): 652–7.
3. Robinson L., Gallos I. D., Conner S. J., Rajkhowa M., Miller D., Lewis S., Kirkman-Brown J., et al. The effect of sperm DNA fragmentation on miscarriage rates: a systematic review and metaanalysis. Hum. Reprod. 2012; 27: (10): 2908–17.
4. Evenson D. P., Jost L. K., Marshall D., Zinaman M. J., Clegg E., Purvis K., et al. Utility of the sperm chromatin structure assay as a diagnostic and prognostic tool in the human fertility clinic. Hum. Reprod. 1999; 14: 1039–49.
5. WHO guidelines for research and treatment of human ejaculate. Fifth Edition. World Health Organization, Medical Genetics Research Center (Russian translation), 2012: 291s. (in Russian)
6. Sheina Yu. I., Zaytseva T. A., Makhalova N. A., Novosel tseva A. V., Markova E. V., Svetlakov A. V. Analysis of DNA fragmentation in the sperm were stained with acridine orange in patients with infertility. Problemy reproduktsii. 2012; 5: 74–80. (in Russian)
7. Larson K. L., DeJonge C. J., Barnes A. M., Jost L. K., Evenson D. P. Sperm chromatin structure assay parameters as predictors of failed pregnancy following assisted reproductive techniques. Hum. Reprod. 2000; 15: 1717–22.
8. Gosalvez J., Cortes-Gutierrez E., Lopez-Fernandez C., Fernandez J. L., Caballero P., Nunez R. Sperm deoxyribonucleic acid fragmentation dynamics in fertile donors. Fertil. Steril. 2009; 92: (1): 170–3.
9. Bungum M., Humaidan P., Axmon A., Spano M., Bungum L., Erenpreiss J., et al. Sperm DNA integrity assessment in prediction of assisted reproduction technology outcome. Hum. Reprod. 2007; 22: 174–9.
10. Lewis S., Aitken J., Conner S., Iulius G., Evenson D., Henkel R. et al. The impact of sperm DNA damage in assisted conception and beyond: recent advances in diagnosis and treatment. Reprod. BioMed. Online. 2013; 27: 325–37.
11. Bungum M., Humaidan P., Spano M., Jepson K., Bungum L., Givercman A. The predictive value of sperm chromatin structure assay (SCSA) parameters for the outcome of intrauterine insemination, IVF and ICSI. Hum. Reprod. 2004; 19: 1401–8.
12. Collins J. A., Barnhart K. T., Schlegel P. N. Do sperm DNA integrity tests predict pregnancy with in vitro fertilization? Fertil. Steril. 2008; 89: 823–31.
13. Simon L., Castillo J., Oliva R., Lewis S. E. Relationships between human sperm protamines, DNA damage and assisted reproduction outcomes. Reprod. Biomed. Online. 2011; 23: (6): 724–34.
14. Zini A., Boman J., Belzile E., Ciampi A. Sperm DNA damage is associated with an increased risk of pregnancy loss after IVF and ICSI: systematic review and metaanalysis. Hum. Reprod. 2008; 23: (12): 2663–8.

Поступила 06.09.14
Received 06.09.14

МИКРОБИОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2015

УДК 618.15/16-002.828:577.2.083

Савочкина Ю. А., Румянцева Т. А., Долгова Т. И., Гуцин А. Е.

РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ НА ОСНОВЕ КОЛИЧЕСТВЕННОЙ МУЛЬТИПЛЕКСНОЙ ПЦР ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ВУЛЬВОВАГИНАЛЬНОГО КАНДИДОЗА

ФБУН «ЦНИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора, 111123, г. Москва

Разработана методика (и соответствующий набор реагентов «АмплиСенс® Флороценоз/Кандиды-FL»), предназначенная для лабораторной диагностики вульвовагинального кандидоза. Методика основана на ПЦР в режиме реального времени и позволяет идентифицировать и количественно определять содержание в биологическом материале пяти наиболее распространенных возбудителей кандидоза: *Candida albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* и *C. tropicalis*. Проведено экспериментальное определение аналитических характеристик разработанной методики. Аналитическая чувствительность составила 100 ГЭ/мл (геномных эквивалентов в 1 мл), линейный диапазон – от 200 до $2 \cdot 10^7$ ГЭ/мл для каждого из выявляемых видов *Candida*.

Сравнение количественных результатов определения содержания *Candida spp.* с помощью разработанной методики с результатами посева показало их соответствие друг другу, для результатов в логарифмическом представлении коэффициент соотношения $\lg[\text{ГЭ}/\text{мл}]$ к $\lg[\text{КОЕ}/\text{мл}]$ составил 1,2. Корреляция результатов характеризовалась коэффициентом R^2 , равным 0,76.

Ключевые слова: вульвовагинальный кандидоз, *Candida spp.*; *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis*; количественный ПЦР-анализ; ПЦР в режиме реального времени.

Для корреспонденции:

Савочкина Юлия Анатольевна, канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаб. мол. диагностики и эпидемиологии инфекций органов репродукции
Адрес: 111123, Москва, ул. Новогиреевская, 3а
E-mail: savochkina@pcr.ru

Savochkina Yu.A., Rumiantseva T.A., Dolgova T.I., Guschin A.E.

THE DEVELOPMENT OF TECHNIQUE OF DIAGNOSTIC OF VUVLVOVAGINAL CANDIDIASIS BASED ON QUANTITATIVE MULTIPLEX POLYMERASE CHAIN REACTION

The central research institute of epidemiology of Rospotrebnadzor of Russia, Moscow, Russia

The technique is developed including corresponding kit of reagents "AmpliSens Florocenose/Candida-FL", to be applied in laboratory diagnostic of vulvovaginal candidiasis. The technique is based on polymerase chain reaction in real-time and permits identifying and quantitatively estimate in biological material content of five most prevalent agents of candidiasis: *Candida albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*. The experimental determination of analytical characteristics of developed technique was carried out. The analytical sensitivity amounted to 100 GE/mL (genome equivalent in 1 mL), linear range - from 200 to 2×10^7 GE/mL for every specie of detected *Candida*.

The comparison of quantitative results of detection of content of *Candida* spp using the developed technique with results of inoculation demonstrated their mutual matching. In logarithm presentation the relation coefficient of Ig (GE/mL) to Ig (CFU/mL) amounted to 1.2. The correlation of results characterized by coefficient R 2 equal 0.76.

Key words: vulvovaginal candidiasis; *Candida* spp; *C. albicans*; *C. glabrata*; *C. krusei*; *C. parapsilosis*; *C. tropicalis*; quantitative polymerase chain reaction analysis; polymerase chain reaction in real-time

Введение. Вульвовагинальный кандидоз (ВВК) – инфекция, вызванная дрожжеподобными грибами рода *Candida*, которая сопровождается воспалением слизистых оболочек влагалища и вульвы, – представляет собой широко распространенное среди женщин репродуктивного возраста заболевание. От 29 до 29% женщин во всем мире переносят по крайней мере один эпизод ВВК в течение жизни, а у 8–9% данное заболевание носит рецидивирующий характер [1, 2]. Наиболее распространенным возбудителем ВВК является *Candida albicans*. Доля non-*albicans* видов *Candida* в этиологической структуре ВВК составляет от 10 до 24% [3–5]. Некоторые non-*albicans* виды *Candida*, в первую очередь *C. krusei* и *C. glabrata*, обладают резистентностью или дозозависимой чувствительностью к широко применяемым в лечении ВВК препаратам азолового ряда [4–6], что необходимо учитывать при назначении терапии.

Диагноз ВВК устанавливается при выявлении грибов рода *Candida* лабораторными методами на фоне клинических признаков воспаления. Для выявления *Candida* spp. при диагностике ВВК применяют рутинные лабораторные методы – микроскопию и микологический метод [7–9]. Микроскопия наиболее широко используется для диагностики ВВК, однако ее чувствительность составляет от 47 до 78% по отношению к микологическому методу [10–12], кроме того, она не позволяет определить вид *Candida* spp.

Микологический метод – более чувствительный, позволяет как определять видовую принадлежность, так и проводить количественную оценку содержания *Candida* spp. в образце, однако для получения его результатов требуется длительное время – от 2 до 7 сут, что значительно задерживает постановку диагноза и назначение лечения.

Показана высокая эффективность применения молекулярно-биологических методов, в частности метода ПЦР и ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ), для диагностики кандидоза различной локализации, включая ВВК [13–15].

В настоящее время отсутствуют опубликованные методики, обеспечивающие возможность видовой дифференциации *Candida* spp. одновременно с количественной оценкой их содержания при диагностике ВВК. Поэтому целью данной работы стала разработка методики на основе ПЦР-РВ (и соответствующего набора реагентов), предназначенной для диагностики ВВК и позволяющей выявлять ДНК наиболее распространенных видов *Candida*, проводить их видовую дифференциацию и количественно определять их содержание в биологическом материале.

Материалы и методы. Для разработки методики выбран формат мультиплексной ПЦР-РВ, основанный на детекции специфических продуктов амплификации с помощью олигонуклеотидных флуоресцентно меченых гибридных зондов. В качестве ДНК-мишени для выявления *C. albicans*, *C. glabrata* и *C. krusei* выбран фрагмент ITS-2, для выявления ДНК *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* – фрагмент ITS-1 (транскри-

бируемые спейсеры между генами 5.8S рРНК и 28S рРНК, и 18S и 5.8S рРНК соответственно), используемые для выявления и видовой дифференциации грибов рода *Candida* [16–19].

При выборе олигонуклеотидных праймеров и гибридных зондов проводили сравнение их последовательностей с нуклеотидными последовательностями ДНК различных микроорганизмов и ДНК человека, опубликованными в базе данных NCBI с помощью программ BLAST (nucleotide blast, Primer-BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>)). Также использовали для анализа выравнивания нуклеотидных последовательностей, полученных с помощью программы AlignX (Vector NT1 11.0).

Олигонуклеотидные гибридные зонды, комплементарные к участкам ДНК *C. albicans*, *C. glabrata* и *C. krusei*, мечены флуорофорами FAM, R6G и ROX соответственно, два зонда, комплементарные к участкам ДНК *C. tropicalis* и *C. parapsilosis*, мечены флуорофором Cy5.

Для проведения ПЦР-РВ использовали приборы RotorGene Q (Qiagen) и CFX (Bio-Rad) и следующую программу амплификации: 95 °C – 15 мин (инкубация)/95 °C – 5 с/60 °C – 20 с/72 °C – 10 с (45 циклов). Детекция сигнала при 60 °C.

Расчет концентрации ДНК анализируемых видов *Candida* проводили на основании полученных значений пороговых циклов (Ct) образцов и графиков, определяемых двумя ДНК-стандартами, содержащими 10^4 и 10^6 копий/мл каждой ДНК-мишени. ДНК-стандарты представляли собой смесь рекомбинантных образцов ДНК каждого из выявляемых видов *Candida*, полученных путем клонирования соответствующего фрагмента ДНК в вектор λ gt10 (фаг ламбда). Измерение концентрации рекомбинантных контрольных образцов проводили с использованием разработанной ранее методики на основе количественной ПЦР-РВ.

Экстракцию ДНК из образцов биологического материала проводили с использованием набора «ДНК-сорб-АМ» (ФБУН «ЦНИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора), предназначенного для обработки мазков со слизистых оболочек органов урогенитального тракта.

Определение аналитических характеристик набора реагентов и методики

Аналитическую специфичность оценивали с использованием панели контрольных штаммов следующих микроорганизмов: *Candida albicans*, *C. glabrata*, *C. kiusei*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *Epidermophyton floccosum*, *Trichophyton rubrum*, *Lactobacillus* spp., *Gardnerella vaginalis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus agalactiae*, *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria* spp., *Mycoplasma genitalium*, *Trichomonas vaginalis*, *Treponema pallidum*, образцов ДНК *Toxoplasma gondii*, вирусов HSV 1-го и 2-го типов, CMV, HPV 16-го, 18-го типов и образцов ДНК человека.

При выборе олигонуклеотидных праймеров и гибридационных зондов оценивали специфичность путем сравнения их последовательностей с нуклеотидными последовательностями ДНК различных микроорганизмов и ДНК человека, опубликованными в базе данных NCBI.

Аналитическую чувствительность определяли путем тестирования последовательных разведений суспензии культуры соответствующего вида *Candida* в транспортной среде и в образцах биологического материала, исходно не содержащих выявляемых видов *Candida*. Соответствующие разведения суспензии культуры определенного вида *Candida* добавляли в каждый из 10 образцов мазков со слизистой оболочки влагалища, помещенных в транспортную среду ТСМ (производства ФБУН «ЦНИИ Эпидемиологии» Роспотребнадзора), и проводили дважды полную процедуру анализа полученных модельных образцов, включающую экстракцию ДНК и ПЦР-РВ.

Линейный диапазон определяли путем тестирования последовательных разведений суспензии культуры соответствующего вида *Candida* в транспортной среде ТСМ в четырех повторах для каждого разведения, дважды повторяя полную процедуру анализа.

Воспроизводимость количественных результатов определяли, рассчитывая коэффициент вариации значений логарифма концентрации ДНК анализируемых видов *Candida*, полученных при повторном анализе образцов с заданным содержанием ДНК каждого из них. Характеризовали воспроизводимость результатов при трехкратном проведении полной процедуры ПЦР-исследования образца (экстракции ДНК из образцов биологического материала и ПЦР-РВ) в четырех повторах. Тестировали модельные образцы – образцы мазков со слизистой оболочки влагалища в транспортной среде ТСМ (пулированные по 4 для получения достаточного объема биоматериала) с добавлением суспензии культуры каждого из определяемых видов *Candida* в количестве, соответствующем конечному содержанию в образце 200 ГЭ/мл и $2 \cdot 10^4$ ГЭ/мл.

Коэффициент соотношения количественных результатов, получаемых с помощью разработанной культуральным методом, определяли путем тестирования ряда последовательных десятикратных разведений суспензии суточной культуры *S. albicans* в физиологическом растворе. Используемые культуры *S. albicans* получены от 31 пациентки с диагнозом ВВК. Для анализа обоими методами использовали равные аликвоты последовательных разведений ($1 \cdot 10^{-4}$ · 10^{-6}) суспензии культуры *S. albicans*. На чашки Петри со средой Сабуро с левомицетином засеивали по 0,1 мл соответствующего разведения газонем, инкубировали в термостате при 37 °С 24 ч, на следующие сутки производили подсчет колоний на чашках. Для проведения ПЦР-РВ выполняли экстракцию ДНК из 0,1 мл каждого разведения в двух повторах.

Результаты и обсуждение. Лабораторное исследование для выявления грибов рода *Candida* имеет принципиальное значение в диагностике ВВК, поскольку симптомы и клинические проявления данного заболевания неспецифичны и могут встречаться при других заболеваниях вульвы и влагалища инфекционной и неинфекционной природы [3, 20]. В свою очередь выбор метода диагностики, его аналитические и диагностические характеристики во многом определяют правильность постановки диагноза и дальнейшую тактику ведения пациента.

Основным возбудителем ВВК является *S. albicans*, обладающая наиболее выраженными патогенными свойствами по сравнению с другими видами *Candida*. Доля *S. albicans* в этиологической структуре ВВК составляет от 76 до 90% [3–5]. Среда «non-albicans» видов *Candida*, вызывающих ВВК, наиболее распространенными являются *S. glabrata*, *S. krusei*, *S. parapsilosis* и *S. tropicalis*, которые в совокупности вызывают от 10 до 22% случаев данного заболевания в России и других странах Европы [3, 4]. Первые два из перечисленных non-albicans видов *Candida* – *S. glabrata* и *S. krusei* – обладают резистентностью или дозозависимой чувствительностью к

основным препаратам, применяемым при лечении ВВК, – флуконазолу и итраконазолу [4–6], что означает необходимость применения альтернативных схем противогрибковой терапии. Этим продиктована необходимость видовой идентификации штаммов *S. krusei* и *S. glabrata* при диагностике ВВК.

Необходимо учитывать, что ВВК, имеющий рецидивирующее течение и вызванный видами non-albicans, классифицируется как осложненный ВВК, в развитии которого значительную роль играют такие заболевания, как сахарный диабет и другие гормональные нарушения, иммуносупрессия различного происхождения и др. [23]. Лечение таких пациентов требует комплексного подхода, включающего применение не только антимикотиков, но и препаратов для лечения основного заболевания.

Другим важным лабораторным маркером ВВК, имеющим клинико-диагностическое значение, является плотность колонизации грибами слизистой оболочки влагалища. Примерно у 20–30% клинически здоровых женщин репродуктивного возраста наблюдается колонизация урогенитального тракта дрожжеподобными грибами [21–23]. Развитие симптоматичных форм кандидозной инфекции ассоциировано с увеличением содержания грибов на слизистой оболочке влагалища [24–26]. В исследованиях V. Norwood и соавт. показано, что при манифестных формах кандидоза в большинстве случаев содержание грибов рода *Candida* превышает 10^3 КОЕ/мл, и наоборот, при содержании грибов менее 10^3 КОЕ/мл они с малой вероятностью способны вызвать развитие воспалительной реакции [25].

В этой связи современные методы диагностики ВВК должны включать, во-первых, выявление не только *S. albicans* как основного возбудителя кандидозов, но и других видов *Candida*, а во-вторых, количественную оценку содержания грибов в биологическом материале.

Перечисленные требования в той или иной степени реализованы в предыдущих исследованиях. Методики выявления и видовой дифференциации *Candida* для диагностики ВВК предложены в нескольких работах [13, 22, 27], однако данные методики основаны на детекции продуктов амплификации методом электрофореза и позволяют проводить только качественное исследование. Методика, описанная J. Trama и соавт. [28], включает количественный анализ содержания *Candida* spp. в образце с помощью ПЦР-РВ, но требует проведения пироквенирования для дифференциации четырех выявляемых видов *Candida*. В исследовании S. Cartwright и соавт. [14] предложена методика мультиплексной ПЦР-РВ для диагностики ВВК, однако она позволяет выявлять только два вида *Candida* – *S. albicans* и *S. glabrata* и не включает количественной оценки их содержания в биологическом материале.

Предлагаемая нами методика основана на мультиплексной ПЦР-РВ и позволяет количественно определять содержание пяти видов *Candida* – *S. albicans*, *S. glabrata*, *S. krusei*, *S. parapsilosis* и *S. tropicalis* – и проводить их видовую дифференциацию.

Выбор ДНК-мишеней. В качестве ДНК-мишеней для идентификации *S. albicans*, *S. glabrata* и *S. krusei* выбран участок ITS-2 (спейсер между генами, кодирующими 5.8S рРНК и 28S рРНК), для выявления *S. tropicalis* и *S. parapsilosis* (видов *S. parapsilosis*, *S. metapsilosis* и *S. orthopsilosis*) использован участок ITS-1 (спейсер между генами 18SpРНК и 5.8SpРНК). Выбор мишеней продиктован результатами ряда исследований, в которых показано, что последовательности ДНК ITS-2 и ITS-1 позволяют надежно идентифицировать виды *Candida* spp. и других грибов, вызывающих микозы, благодаря наличию в них участков, значительно различающихся для разных видов *Candida* и консервативных для штаммов одного вида [16–19]. Последовательности ITS в геномах различных видов грибов и других микроорганизмов изучены наиболее хорошо. Большое число последовательностей этих участков ДНК, опубли-

Определение аналитической чувствительности

Содержание ДНК-мишени, ГЭ/мл	Число образцов (повторов)	Доля положительных результатов, %				
		по ДНК <i>C. albicans</i>	по ДНК <i>C. glabrata</i>	по ДНК <i>C. krusei</i>	по ДНК <i>C. parapsilosis</i>	по ДНК <i>C. tropicalis</i>
200	5 × 2	100	100	100	100	100
100	10 × 2	100	100	100	100	100
50	10 × 2	95	90	90	95	90
20	10 × 2	90	85	90	90	85
1	5 × 2	0	0	0	0	0

Таблица 1

Candida spp. в образцах мазков со слизистых оболочек влагалища в транспортной среде составила 100 ГЭ/мл для каждого из выявляемых видов *Candida* spp. (табл. 1). Данные показатели получены при использовании для экстракции ДНК набора реагентов «ДНК-сорб-АМ», предназначенного для обработки образцов мазков со слизистых оболочек влагалища и других органов урогенитального тракта, помещенных в транспортную среду.

Определение линейного диапазона

Содержание ДНК-мишени, ГЭ/мл	Log ₁₀ концентрации	Максимальное отклонение Log ₁₀ концентрации от заданного значения (CV Log ₁₀ концентрации, %)			
		<i>C. albicans</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. krusei</i>	<i>C. parapsilosis</i> + <i>C. tropicalis</i>
2 · 10 ⁷	7,3	0,20	0,16	0,10	0,20
		(0,8)	(1,3)	(1,2)	(1,3)
2 · 10 ⁶	6,3	0,14	0,11	0,18	0,20
		(1,0)	(1,4)	(1,3)	(0,8)
2 · 10 ⁵	5,3	0,16	0,11	0,16	0,18
		(1,2)	(1,3)	(1,1)	(1,5)
2 · 10 ⁴	4,3	0,19	0,07	0,17	0,07
		(1,1)	(1,1)	(2,0)	(1,4)
2 · 10 ³	0,18	0,05	0,03	0,09	
		(1,8)	(0,8)	(0,5)	(1,2)
200	2,3	0,19	0,15	0,10	0,17
		(4,8)	(4,2)	(2,1)	(4,2)
50	1,7	0,5	0,4	0,3	0,4
		(15)	(18)	(14)	(15)
Коэффициент корреляции полученных и заданных значений Log ₁₀ концентрации, R					
200 - 2 · 10 ⁷	2,3-2,7	0,996	0,999	0,998	0,998

Таблица 2

Аналитическая чувствительность методики обеспечивается как за счет чувствительности и эффективности этапа ПЦР-амплификации и детекции, которые определяются использованием многокопийной ДНК-мишени [29] и структурой разработанных праймеров и зондов, так и за счет высокой эффективности набора для экстракции «ДНК-сорб-АМ» при очистке ДНК из образцов мазков со слизистых оболочек влагалища и вульвы.

Строение клеточной стенки дрожжеподобных грибов представляет определенные трудности для ее эффективного разрушения [30]. Это приводит к снижению эффективности экстракции ДНК *Candida* spp. по сравнению с ДНК вирусов или бактерий. Выход ДНК из клеток *Candida* spp. может быть повышен в 5–20 раз при использовании дополнительной обработки. В связи с этим использование экспресс-методов экстракции ДНК может приводить к значительному снижению аналитической чувствительности методик выявления ДНК *Candida* spp.

Для контроля эффективности экстракции ДНК и отсутствия ингибирования реакции амплификации в

ликвананных в базе данных NCBI, позволяет в достаточном объеме проанализировать и оценить дифференцирующую способность выбранных олигонуклеотидных последовательностей и одновременно убедиться в отсутствии в них полиморфизмов, отличающих последовательности микроорганизмов одного вида, которые могли бы привести к снижению чувствительности анализа.

Характеристики разработанного набора реагентов и методики, определяемые экспериментально в данной работе, включали аналитическую специфичность, аналитическую чувствительность, линейный диапазон и воспроизводимость количественных результатов.

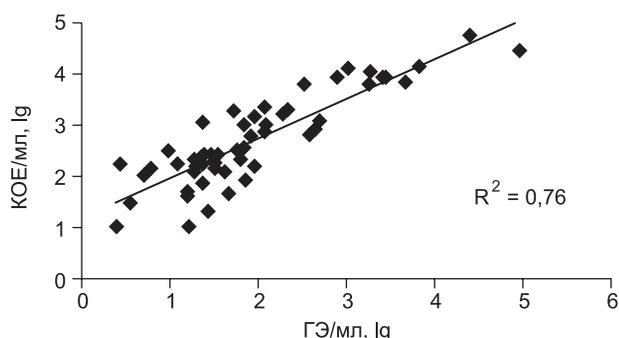
Аналитическая специфичность подтверждена отсутствием продуктов реакции при амплификации ДНК различных микроорганизмов и ДНК человека. При тестировании образцов ДНК *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* для каждого из них отсутствовали неспецифические результаты по каналам для детекции ДНК других видов *Candida*.

Специфичность выбранной комбинации олигонуклеотидных праймеров и гибридизационных зондов подтверждалась также результатами сравнения их последовательностей с нуклеотидными последовательностями ДНК различных микроорганизмов и ДНК человека, опубликованными в базе данных NCBI.

Аналитическая чувствительность при выявлении ДНК

методике используется экзогенный внутренний контрольный образец (ВКО), добавляемый к каждому образцу в начале процедуры очистки ДНК. ВКО служит для предотвращения ложноотрицательных результатов и значительных отклонений количественных результатов.

Коэффициент соотношения количественных результатов, получаемых с помощью посева и разработанной методики на



Соотношение количественных результатов, полученных при использовании набора "АмплиСенс® Флороценоз-Кандиды" (в ГЭ/мл) и при проведении микологического посева (в КОЕ/мл).

Таблица 3

Оценка воспроизводимости результатов

Образец А (2 · 10 ⁴ ГЭ/мл)				
Показатель	<i>C. albicans</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. krusei</i>	<i>C. parapsilosis</i> + <i>C. tropicalis</i>
Среднее Log ₁₀ концентрации	4,34	4,23	4,32	4,36
Std	0,10	0,12	0,08	0,13
CV, %	2,3	2,8	1,9	3,0
Образец В (200 ГЭ/мл)				
Показатель	<i>C. albicans</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. krusei</i>	<i>C. parapsilosis</i> + <i>C. tropicalis</i>
Среднее Log ₁₀ концентрации	2,20	2,25	2,36	2,34
Std	0,21	0,15	0,14	0,18
CV, %	9,5	6,7	7,2	7,7

основе ПЦР-РВ. На основании сопоставления количественных результатов, полученных с использованием двух методов (см. рисунок) для разведений культур *C. albicans*, рассчитан коэффициент соотношения количественных результатов, определяемых в соответствующих единицах – в КОЕ/мл и в ГЭ/мл. Коэффициент соотношения логарифмов оказался равным 1,2, это означает, что результаты определения содержания *Candida* spp., получаемые в КОЕ/мл при микробиологическом посеве и в ГЭ/мл при использовании данной методики, соответствуют друг другу. Полученный коэффициент не является универсальным и может быть использован только в рамках разработанной методики.

Линейный диапазон измерений для количественного определения каждого из выявляемых видов *Candida* составил от 200 до 2 · 10⁷ ГЭ/мл. Значения коэффициента корреляции *R*, полученных и заданных значений концентрации ДНК-мишеней в пределах линейного диапазона составили не менее 0,99 (0,992–0,998). Разность логарифмов расчетной и заданной концентрации в пределах линейного диапазона не превышала ±0,2 Lg (табл. 2). При посеве можно обеспечить линейный диапазон от 100 до 10⁵ КОЕ/мл, проводя посев двух последовательных десятикратных разведений образца с подсчетом количества колоний.

С учетом полученного коэффициента соотношения количественных результатов двух методов, определяемых в КОЕ/мл и в ГЭ/мл, линейный диапазон для микробиологического посева соответствует диапазону от 230 до 8 · 10⁵ ГЭ/мл. Линейный диапазон разработанной методики на основе ПЦР-РВ шире, его верхняя граница на порядок выше, чем при использовании посева.

Воспроизводимость результатов лежит в основе стандартизации количественных исследований. При оценке воспроизводимости количественных результатов при трехкратном повторении анализа образцов мазков со слизистых оболочек влагалища с определенным содержанием *Candida* spp. получены показатели, представленные в табл. 3. Коэффициент вариации (CV) логарифма концентрации ДНК не превышал 3 и 10% для образцов с содержанием выявляемых видов *Candida* 2 · 10⁴ ГЭ/мл (средняя часть линейного диапазона) и 200 ГЭ/мл (нижняя граница линейного диапазона) соответственно. Полученные достаточно высокие показатели воспроизводимости результатов характеризуют уровень стандартизации разработанной методики.

Заключение. Разработана методика (и соответствующий набор реагентов) для идентификации и количественного определения содержания в биологическом материале пяти наиболее распространенных видов *Candida*: *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* и *C. tropicalis*. Методика предназначена для лабораторной диагностики ВВК, основана на количественной мультиплексной ПЦР-РВ и не имеет аналогов, разработанных в России. Аналитическая чувствительность методики составила 100 ГЭ/мл, линейный диапазон – от 200 до 2 · 10⁷ ГЭ/мл для каждого из выявляе-

мых видов *Candida*. Разработанная методика позволяет в течение нескольких часов получить необходимую диагностическую информацию и характеризуется высокими показателями воспроизводимости количественных результатов.

Научно-производственной лабораторией ФБУН «ЦНИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора налажен серийный выпуск набора реагентов («АмплиСенс® Флороценоз/Кандиды-FL»), предназначенного для выполнения разработанной методики.

Авторы выражают глубокую признательность за помощь и сотрудничество проф. Л. В. Кудряв-

цевой, а также сотрудникам клиничко-диагностической лаборатории Поликлиники № 1 Управления делами президента РФ М. А. Кахерской и С. В. Зайцевой.

ЛИТЕРАТУРА

1. Foxman B., Muraglia R., Dietz J. P., Sobel J. D., Wagner J. Prevalence of recurrent vulvovaginal candidiasis in 5 European countries and the United States: results from an internet panel survey. *J. Low. Genit. Tract. Dis.* 2013; 17(3): 340–5.
2. Foxman B., Barlow R., D'arcy H., Gillespie B., Sobel J. D. *Candida* vaginitis: self-reported incidence and associated costs. *Sex Transm. Dis.* 2000; 14: 230–5.
3. Achkar J. M., Fries B. C. *Candida* infections of the genitourinary tract. *Clinical microbiology reviews.* 2010; 23(2): 253–73.
4. Анкирская А. С., Муравьева В. В., Фурсова С. А., Миронова Т. Г., Королева Т. Е. Мониторинг видового состава и чувствительности к антимикотикам дрожжеподобных грибов, выделенных из влагалища женщин репродуктивного возраста. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия.* 2006; 8 (1): 87–95.
5. Веселов А. В., Мултых И. Г., Клясова Г. А., Агапова Е. Д., Кречикова О. И., Климко Н. Н. и др. Эпидемиология возбудителей кандидозов и их чувствительность к азолам: результаты исследования ARTEMIS Disk в России. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия.* 2005; 7 (1): 68–76.
6. Веселов А. В., Климко Н. Н., Кречикова О. И.; Клясова Г. А., Агапова Е. Д., Мултых И. Г. и др. In vitro активность флуконазола и вориконазола в отношении более 10 000 штаммов дрожжей: результаты 5-летнего проспективного исследования ARTEMIS Disk в России. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия.* 2008; 10 (4): 345–54.
7. Урогенитальный кандидоз. В кн.: Введение больных инфекциями, передаваемыми половым путем и урогенитальными инфекциями. Клинические рекомендации. М.: Деловой экспресс; 2012: 79–84.
8. Савичева А. М., Кисина В. И., Соколовский Е. В., Башмакова М. А., Гриненко Г. В., Смирнова Т. С. и др. Кандидозный вульвовагинит. Методические рекомендации для врачей. СПб: Изд-во Н-Л; 2009.
9. Sherrard J., Donders G., White D. Lead editor: Jorgen Skov Jensen. 2011 European (IUSTI/WHO) Guideline on the Management of Vaginal Discharge; 2011.
10. Oriol J. D., Partridge B. M., Denny M. J., Coleman J. C. Genital yeast infections. *Br. Med. J.* 1972; 4(5843): 761–4.
11. Emmerson J., Gunputrao A., Hawkswell J. et al. Sampling for vaginal candidiasis: how good is it? *Int. J. STD. AIDS.* 1994; 5: 356–8.
12. Sonnex C., Lefort W. Microscopic features of vaginal candidiasis and their relation to symptomatology. *Sex Transm Inf.* 1999; 75: 417–9.
13. Weissenbacher T., Witkin S. S., Ledger W. J., Tolbert V., Gingelmaier A., Scholz C. et al. Relationship between clinical diagnosis of recurrent vulvovaginal candidiasis and detection of *Candida* species by culture and polymerase chain reaction. *Arch Gynecolr Obstet.* 2009; 279(2): 125–9.
14. Cartwright C. P., Lembke B. D., Ramachandran K., Body B. A., Nye M. B., Rivers C. A., Schwebke J. R. Comparison of nucleic acid amplification assays with BD affirm VPIII for diagnosis of vaginitis in

- symptomatic women. *J. Clin. Microbiol.* 2013; 51(11): 3694–9.
15. Avni T., Leibovici L. and Paul M. PCR diagnosis of invasive candidiasis: systematic review and meta-analysis. *J. Clin. Microbiol.* 2011; 49(2): 665–70.
 16. Chen Y. C., Eisner J. D., Kattar M. M., Rassoulian-Barrett S. L., Lafe K., Yarfitz S. L., Limaye A. P. and Cookson B. T. Identification of medically important yeasts using PCR-based detection of DNA sequence polymorphisms in the internal transcribed spacer 2 region of the rRNA genes. *J. Clin. Microbiol.* 2000; 38: 2302–10.
 17. Fujita S. I., Senda Y., Nakaguchi S., Hashimoto T. Multiplex PCR using internal transcribed spacer I and 2 regions for rapid detection and identification of yeast strains. *J. Clin. Microbiol.* 2001; 39(10): 3617–2.
 18. Chen Y. C., Eisner J. D., Kattar M. M., Rassoulian-Barrett S. L., Lafe K., Bui U., Limaye A. P. and Cookson B. T. Polymorphic internal transcribed spacer region I DNA sequences identify medically important yeasts. *J. Clin. Microbiol.* 2001; 39: 4042–51.
 19. Leaw S. N., Chang H. C., Sun H. F., Barton R., Bouchara J. P., Chang T. C.: Identification of medically important yeast species by sequence analysis of the internal transcribed spacer regions. *J. Clin. Microbiol.* 2006; 44(3): 693–9.
 20. Schaaf V. M., Perez-Stable E. J., Borchardt K. The limited value of symptoms and signs in the diagnosis of vaginal infections. *Arch. Intern. Med.* 1990; 150(9): 1929–33.
 21. Geiger A. M., Foxman B. Risk factors for vulvovaginal candidiasis: a case-control study among university students. *Epidemiology.* 1996; 7: 182–7.
 22. Trama J. P., Adelson M. E., Raphaelli I., Stemmer S. M., Mordechai E. Detection of *Candida* species in vaginal samples in a clinical laboratory setting. *Infect. Dis. Obstet. Gynecol.* Jun 2005; 13(2): 63–7.
 23. Sobel J. D., Faro S., Force R. W. et al. Vulvovaginal candidiasis: epidemiologic, diagnostic, and therapeutic considerations. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 1998; 178(2): 203–11.
 24. Odds F. C., Webster C. E., Riley V. C. and Fisk P. G. Epidemiology of vaginal *Candida* infection: significance of numbers of vaginal yeasts and their biotypes. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 1987; 25(1): 53–66.
 25. Hopwood V., Crowley T., Horrocks C. T., Milne J. D., Taylor P. K., Wamock D. W. Vaginal candidosis: relation between yeast counts and symptoms and clinical signs in non-pregnant women. *Genitourin Med.* 1988; 64(5): 331–4.
 26. Odds F. C., Webster C. E., Mayuranathan P., Simmons P. D. *Candida* concentrations in the vagina and their association with signs and symptoms of vaginal candidosis. *J. Med. Vet. Mycol.* 1988; 26(5): 277–83.
 27. Mahmoudi Rad M., Zafarghandi A. S., Amel Zabihi M., Tavallae M., Mirdamadi Y. Identification of *Candida* species associated with vulvovaginal candidiasis by multiplex PCR. *Infect. Dis. Obstet. Gynecol.* 2012; 2012: 872169.
 28. Trama J. P., Mordechai E., Adelson M. E. Detection and identification of *Candida* species associated with *Candida* vaginitis by real-time PCR and pyrosequencing. *Mol. cell. probes.* 2005; 19(2): 145–52.
 29. Malezka R., Clark-Walker G. D. 1993. Yeasts have a Four-fold Variation in Ribosomal DNA Copy Number. *Yeast.* 1993; 9(1): 53–8.
 30. Fredricks D. N., Smith C., Meier A. Comparison of six DNA extraction methods for recovery of fungal DNA as assessed by quantitative PCR. *J. Clin. Microbiol.* 2005; 43(10): 5122–8.
 - of childbearing age women. *Klinicheskaya microbiologiya i antimicrobnaya chemoterapiya.* 2006; 8(1): 87–95. (in Russian)
 5. Veselov A. V., Multih I. G., Kliasova G. A., Agapova E. D., Kretchikova O. I., Klimko N. N., et al. Epidemiology of candidiasis causative agents and their susceptibility to azoles: results of ARTEMIS Disc study in Russia. *Klinicheskaya microbiologiya i antimicrobnaya chemoterapiya.* 2005; 7(1): 68–76. (in Russian)
 6. Veselov A. V., Klimko N. N., Kretchikova O. I., Kliasova G. A., Agapova E. D., Multih I. G. et al. In vitro activity of fluconazole and voriconazole against more than 10000 yeast strains: results of 5-years prospective ARTEMIS Disc study in Russia. *Klinicheskaya microbiologiya i antimicrobnaya chemoterapiya.* 2008; 10 (4): 345–54. (in Russian)
 7. Urogenital candidiasis. In: Management of patients with sexually transmitted diseases and genitourinary tract infections. Clinical guidelines [Vedenie bol'nyh infekcijami, peredavaemyimi polovym putem i urogenitalnymi infekcijami. Klinicheskie rekomendacii]. M: Delovoi ekspres; 2012: 79–84. (in Russian)
 8. Savicheva A. M., Kisina V. I., Sokolovskiy E. V., Bashmakova M. A., Grinenko G. V., Smirnova T. S. et al. In: Vulvovaginal candidiasis. Guideline for clinicians [Kandidoznyj vul'vovaginit. Metodicheskie rekomendacii dlya vrachei]. SPb: Izd-vo N-L; 2009. (in Russian)
 9. Sherrard J., Donders G., White D. Lead editor: Jorgen Skov Jensen. 2011 European (IUSTI/WHO) Guideline on the Management of Vaginal Discharge; 2011.
 10. Oriel J. D., Partridge B. M., Denny M. J., Coleman J. C. Genital yeast infections. *Br. Med. J.* 1972; 4(5843): 761–4.
 11. Emmerson J., Gunputrao A., Hawkswell J. et al. Sampling for vaginal candidiasis: how good is it? *Int. J. STD. AIDS.* 1994; 5: 356–8.
 12. Sonnex C., Lefort W. Microscopic features of vaginal candidiasis and their relation to symptomatology. *Sex Transm Inf.* 1999; 75: 417–9.
 13. Weissenbacher T., Witkin S. S., Ledger W. J., Tolbert V., Gingelmaier A., Scholz C. et al. Relationship between clinical diagnosis of recurrent vulvovaginal candidiasis and detection of *Candida* species by culture and polymerase chain reaction. *Arch. Gynecol. Obstet.* 2009; 279(2): 125–9.
 14. Cartwright C. P., Lembke B. D., Ramachandran K., Body B. A., Nye M. B., Rivers C. A., Schwebke J. R. Comparison of nucleic acid amplification assays with BD affirm VPIII for diagnosis of vaginitis in symptomatic women. *J. Clin. Microbiol.* 2013; 51(11): 3694–9.
 15. Avni T., Leibovici L. and Paul M. PCR diagnosis of invasive candidiasis: systematic review and meta-analysis. *J. Clin. Microbiol.* 2011; 49(2): 665–70.
 16. Chen Y. C., Eisner J. D., Kattar M. M., Rassoulian-Barrett S. L., Lafe K., Yarfitz S. L., Limaye A. P. and Cookson B. T. Identification of medically important yeasts using PCR-based detection of DNA sequence polymorphisms in the internal transcribed spacer 2 region of the rRNA genes. *J. Clin. Microbiol.* 2000; 38: 2302–10.
 17. Fujita S. I., Senda Y., Nakaguchi S., Hashimoto T. Multiplex PCR using internal transcribed spacer I and 2 regions for rapid detection and identification of yeast strains. *J. Clin. Microbiol.* 2001; 39(10): 3617–2.
 18. Chen Y. C., Eisner J. D., Kattar M. M., Rassoulian-Barrett S. L., Lafe K., Bui U., Limaye A. P. and Cookson B. T. Polymorphic internal transcribed spacer region I DNA sequences identify medically important yeasts. *J. Clin. Microbiol.* 2001; 39: 4042–51.
 19. Leaw S. N., Chang H. C., Sun H. F., Barton R., Bouchara J. P., Chang T. C.: Identification of medically important yeast species by sequence analysis of the internal transcribed spacer regions. *J. Clin. Microbiol.* 2006; 44(3): 693–9.
 20. Schaaf V. M., Perez-Stable E. J., Borchardt K. The limited value of symptoms and signs in the diagnosis of vaginal infections. *Arch. Intern. Med.* 1990; 150(9): 1929–33.
 21. Geiger A. M., Foxman B. Risk factors for vulvovaginal candidiasis: a case-control study among university students. *Epidemiology.* 1996; 7: 182–7.
 22. Trama J. P., Adelson M. E., Raphaelli I., Stemmer S. M., Mordechai E. Detection of *Candida* species in vaginal samples in a clinical laboratory setting. *Infect. Dis. Obstet. Gynecol.* Jun 2005; 13(2): 63–7.
 23. Sobel J. D., Faro S., Force R. W. et al. Vulvovaginal candidiasis: epidemiologic, diagnostic, and therapeutic considerations. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 1998; 178(2): 203–11.
 24. Odds F. C., Webster C. E., Riley V. C. and Fisk P. G. Epidemiol-

REFERENCES

1. Foxman B., Muraglia R., Dietz J. P., Sobel J. D., Wagner J. Prevalence of recurrent vulvovaginal candidiasis in 5 European countries and the United States: results from an internet panel survey. *J. Low. Genit. Tract. Dis.* 2013; 17(3): 340–5.
2. Foxman B., Barlow R., D'arcy H., Gillespie B., Sobel J. D. *Candida* vaginitis: self-reported incidence and associated costs. *Sex Transm. Dis.* 2000; 14: 230–5.
3. Achkar J. M., Fries B. C. *Candida* infections of the genitourinary tract. *Clinical microbiology reviews.* 2010; 23(2): 253–73.
4. Ankirskaya A. S., Muravieva V. V., Fursova S. A., Mironova T. G., Koroleva T. E. Monitoring of species structure and susceptibility to antimycotics of yeast-like fungi, isolated from genital tract

- ogy of vaginal *Candida* infection: significance of numbers of vaginal yeasts and their biotypes. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 1987; 25(1): 53–66.
25. Hopwood V., Crowley T., Horrocks C. T., Milne J. D., Taylor P. K., Wamock D. W. Vaginal candidosis: relation between yeast counts and symptoms and clinical signs in non-pregnant women. *Genitourin Med.* 1988; 64(5): 331–4.
 26. Odds F. C., Webster C. E., Mayuranathan P., Simmons P. D. *Candida* concentrations in the vagina and their association with signs and symptoms of vaginal candidosis. *J. Med. Vet. Mycol.* 1988; 26(5): 277–83.
 27. Mahmoudi Rad M., Zafarghandi ASh., Amel Zabihi M., Tavallaee M., Mirdamadi Y. Identification of *Candida* species associated with vulvovaginal candidiasis by multiplex PCR. *Infect. Dis. Obstet. Gynecol.* 2012; 2012: 872169.
 28. Trama J. P., Mordechai E., Adelson M. E. Detection and identification of *Candida* species associated with *Candida* vaginitis by real-time PCR and pyrosequencing. *Mol. cell. probes.* 2005; 19(2): 145–52.
 29. Malezka R., Clark-Walker G. D. 1993. Yeasts have a Four-fold Variation in Ribosomal DNA Copy Number. *Yeast.* 1993; 9(1): 53–8.
 30. Fredricks D. N., Smith C., Meier A. Comparison of six DNA extraction methods for recovery of fungal DNA as assessed by quantitative PCR. *J. Clin. Microbiol.* 2005; 43(10): 5122–8.

Поступила 11.08.14

Received 11.08.14

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2015

УДК 579.843.1:578.811.083

Гаевская Н. Е., Кудрякова Т. А., Македонова Л. Д., Качкина Г. В.

ИДЕНТИФИКАЦИЯ И ДИФФЕРЕНЦИАЦИЯ БАКТЕРИОФАГОВ ПАТОГЕННЫХ ДЛЯ ЧЕЛОВЕКА ВИБРИОНОВ

ФКУЗ «Ростовский-на-Дону ордена Трудового Красного Знамени научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора, 344002, г. Ростов-на-Дону, Россия

До настоящего времени остается нерешенной проблема идентификации и дифференциации большой группы бактериофагов патогенных для человека вибрионов. Для исследовательских целей и решения прикладных задач важно учитывать признаки бактериофагов, позволяющие выявить сходство и различия между ними. В настоящем исследовании изучены представители ДНК-содержащих бактериофагов патогенных вибрионов, из которых подавляющее большинство отличались сложным видом симметрии, – это фаги, имеющие двуспиральную ДНК, а также открытые у вибрионов в последние годы фаги с односпиральной структурой ДНК. Впервые разработана общая схема идентификации и дифференциации бактериофагов патогенных вибрионов, что повышает возможность определения видовой принадлежности фагов и сравнения с фагами, зарегистрированными в базе данных «Коллекция бактериофагов и тест-штаммов патогенных для человека вибрионов» (№ 2010620549 от 24.09.2010).

Ключевые слова: *Vibrio cholerae; V. parahaemolyticus; V. mimicus; V. alginolyticus; V. metschnikovii.*

Gaevskaia N.E., Kudriakova T.A., Makedonova L.D., Kachkina G.V.

THE IDENTIFICATION AND DIFFERENTIATION OF BACTERIOPHAGES OF HUMAN PATHOGENIC VIBRIO

The Rostov-on-Don research institute anti-plague institute, 344002 Rostov-on-Don, Russia

The issue of identification and differentiation of large group of bacteriophages of human pathogenic vibrio is still unresolved. In research and practical applied purposes it is important to consider characteristics of bacteriophages for establishing similarity and differences between them. The actual study was carried out to analyze specimens of DNA-containing bacteriophages of pathogenic vibrio. The overwhelming majority of them characterized by complicated type of symmetry - phages with double-helical DNA and also phages with mono-helical DNA structure discovered recently in vibrio. For the first time, the general framework of identification and differentiation of bacteriophages of pathogenic vibrio was developed. This achievement increases possibility to establish species assignment of phages and to compare with phages registered in the database "The collection of bacteriophages and test-strains of human pathogenic vibrio" (№2010620549 of 24.09.2010).

Key words: *V. cholerae; V. parahaemolyticus; V. mimicus; V. alginolyticus; V. metschnikovii*

Бактериофаги являются постоянным спутником патогенных вибрионов. В настоящее время их широко используют для диагностики и дифференциации патогенных вибрионов.

Среди патогенных вибрионов особое место занимают *Vibrio cholerae* и *V. parahaemolyticus*. *V. cholerae* вызывают холеру, которая является древней болезнью, обусловившей семь пандемий, и продолжает вызывать эпидемии и крупные вспышки на различных континентах, несмотря на непрекращающиеся усилия ограничить ее распространение [9]. *V. parahaemolyticus* приводят к возникновению острого ки-

шечного заболевания, протекающего по типу пищевой токсикоинфекции в виде спорадических случаев или эпидемических вспышек. Опасность заражения паразитическими вибрионами существует везде, где население использует для питания продукты моря. В местах, удаленных от побережья, зарегистрированы случаи заболевания, связанные с завозом инфицированных морепродуктов.

Бактериофаги патогенных вибрионов представляют собой группу вирусов, характеризующихся широким морфологическим и генетическим разнообразием, поэтому их идентификация и дифференциация является актуальной проблемой, тесно связывающей между собой такие вопросы, как строение вириона, антигенная структура и литическая специфичность при взаимодействии фага с клеткой-хозяином [2, 4].

Цель работы – характеристика биологических свойств

Для корреспонденции:

Гаевская Наталья Евгеньевна, науч. сотр.

Адрес: 344002, Ростов-на-Дону, ул. М.Горького, 117/40

E-mail: gaevskaya.nata@mail.ru